UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS."

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo

Autor:
Osorio Changoluisa Paul Andres

Tutora:
Arévalo Granda Johanna Valentina

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2026

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Osorio Changoluisa Paul Andres, con cédula de ciudadanía No. 0503164527, declaro ser autor del presente Proyecto de Investigación: **"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS."** siendo la Ingeniera Mg. Johanna Valentina Arévalo Granda, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 07 de agosto del 2026

Paul Andres Osorio Changoluisa.
C.C: 0503164527
ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **OSORIO CHANGOLUISA PAUL ANDRES**, identificado con cédula de ciudadanía **0503164527** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Biotecnología titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS",** el cual se encuentra elaborado según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: octubre 2022 - marzo 2023

Finalización de la carrera: abril 2026 – agosto 2026

Tutora: Ing Mg. Johanna Valentina Arévalo Granda.

Tema: **"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS"**

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
b) La publicación del trabajo de grado.
c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 07 días del mes de agosto de 2026.

Paul Andres Osorio Changoluisa.	Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
EL CEDENTE	**LA CESIONARIA**

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS", de Osorio Changoluisa Paul Andres, de la carrera de Biotecnología, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 07 de agosto del 2026

Ing. Johanna Valentina Arévalo Granda, Mg.
C.C: 1715849582
DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Osorio Changoluisa Paul Andres, con el título del Proyecto de Investigación: **"IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS"**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 07 de agosto del 2026

Ing. Karla Cedeño Saltos Mg.
C.C: 2300456262
LECTOR 1 (PRESIDENTE)

MVZ. Vanessa Herrera Yunga, Mtr.
C.C: 1103758999
LECTOR 2 (MIEMBRO)

Ing. Monserrath Morales Padilla, Mg.
CC: 1803691144
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Expreso mi profundo agradecimiento a Dios, por haberme brindado fortaleza y perseverancia para culminar esta etapa; a mi familia, por su apoyo incondicional durante mi formación académica; a mi tutora y cotutor, por su orientación, compromiso y valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación; a los docentes, por los conocimientos impartidos; y a mis amigos y amigas de la Universidad Técnica de Cotopaxi, por su compañía y respaldo a lo largo de este proceso.

Paul Andres Osorio Changoluisa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a mi madre, por estar presente en cada momento de mi vida, por su apoyo incondicional, sus sacrificios y su confianza permanente. Su fortaleza y motivación fueron fundamentales para superar cada dificultad y alcanzar esta meta. Este logro también le pertenece.

Paul Andres Osorio Changoluisa

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: "IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS UTERINAS DE BOVINOS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS"

Autor:
Osorio Changoluisa Paul Andres

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana en bacterias asociadas a bovinos con alteraciones reproductivas representa una preocupación, debido a su relación con fallas terapéuticas, prolongación de los días abiertos y circulación de microorganismos resistentes entre animales, personas y ambiente; por ello, el estudio tuvo como objetivo identificar fenotípicamente aislamientos de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en muestras uterinas de bovinos procedentes de Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha y Tungurahua. Se utilizó un enfoque cuantitativo, de tipo aplicado, con diseño descriptivo, no experimental y de corte transversal, sustentado en procedimientos microbiológicos y análisis estadístico descriptivo. Se procesaron 92 muestras endometriales obtenidas mediante cepillado con cytobrush, transportadas bajo refrigeración, enriquecidas en caldo nutritivo y sembradas en agar eosina azul de metileno (EMB); las colonias con morfología compatible fueron purificadas, conservadas y evaluadas mediante la técnica de difusión en disco Kirby Bauer en agar Müeller-Hinton frente a cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), cefazolina (KZ) y cefoxitina (FOX). La producción de BLEE se confirmó por sinergia de doble disco. De las 92 muestras analizadas, 51 presentaron crecimiento presuntivo compatible con *E. coli*, equivalente al 55,43%, mientras 41 fueron negativas bajo las condiciones del cultivo; el perfil de susceptibilidad mostró 100 % de sensibilidad a cefotaxima y cefoxitina, 98,04 % a amoxicilina con ácido clavulánico y ceftazidima, 90,20 % a ampicilina y 72,55 % a cefazolina. Seis aislamientos mostraron un perfil de resistencia sospechoso de BLEE por lo que fueron seleccionados para la prueba de sinergia, de los cuales U10, M18, T5 y C1 presentaron interacción positiva con ácido clavulánico, equivalente al 66,67 % de las muestras sospechosas y al 7,84 % de los 51 aislamientos; los resultados respaldan la presencia de fenotipos compatibles con BLEE.

Palabras claves: *Escherichia coli*; betalactamasas de espectro extendido; resistencia antimicrobiana; bovinos, muestras uterinas.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: "PHENOTYPIC IDENTIFICACTION OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE (ESBL) PRODUCING Escherichia coli IN UTERINE SAMPLES FROM CATTLE WITH REPRODUCTIVE DISORDERS"

Author:
Osorio Changoluisa Paul Andres

ABSTRACT

Antimicrobial resistance among bacteria associated with bovine reproductive involves a production a concern because of its relationship with therapeutic failure, prolonged open days, and the circulation of resistant microorganisms among animals, humans, and the environment. Therefore, this research work aimed to phenotypically identify presumptive *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in uterine samples from cattle originating in Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, and Tungurahua. A quantitative, applied, descriptive, non-experimental, cross-sectional design was used, supported by microbiological procedures and descriptive statistical analysis. A total of 92 endometrial samples were collected using a cytobrush, transported under refrigeration, enriched in nutrient broth, and cultured on eosin methylene blue agar. Colonies with compatible morphology were purified, preserved, and evaluated by disk diffusion on Mueller-Hinton agar against cefotaxime, ceftazidime, amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, cefazolin, and cefoxitin, while ESBL production was assessed through the double-disk synergy test. Of the 92 samples analyzed, 51 showed presumptive growth compatible with *E. coli*, corresponding to 55.43%, whereas 41 were negative under the culture conditions. The susceptibility profile showed 100% susceptibility to cefotaxime and cefoxitin, 98.04% to amoxicillin-clavulanic acid and ceftazidime, 90.20% to ampicillin, and 72.55% to cefazolin. Six isolates were selected for the synergy test; U10, M18, T5, and C1 showed a positive interaction with clavulanic acid, representing 66.67% of the suspected isolates and 7.84% of the 51 isolates evaluated. The findings support the presence of phenotypes compatible with ESBL production, although bacterial identity and the resistance genes involved require biochemical or molecular confirmation before definitive classification in future confirmatory studies.

Keywords: *Escherichia coli*; extended-spectrum beta-lactamases; antimicrobial resistance; cattle; uterine samples.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA ii

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR iii

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN v

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN vi

AGRADECIMIENTO vii

DEDICATORIA viii

RESUMEN ix

ABSTRACT x

ÍNDICE DE CONTENIDO xi

ÍNDICE DE TABLAS xvi

ÍNDICE DE FIGURAS xvii

INFORMACIÓN GENERAL 1

1 JUSTIFICACIÓN DELPROYECTO 3

2 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO 4

2.1 Directos 4

2.2 Indirectos 4

3 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN 4

4 OBJETIVOS 7

4.1 General 7

4.2 Específicos 7

5 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS 7

Tabla 1. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS 7

6 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA 9

6.1 Antecedentes 9

6.2 Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina 12

6.2.1 Importancia del endometrio en las alteraciones reproductivas 14

6.2.2 Relación del endometrio con la toma de muestras.....14

6.3 Concepto de biotecnología 14

6.3.1 Biotecnología microbiana 14

6.3.2 Aplicaciones de la microbiología en sanidad animal.....15

6.4 E.coli 15

6.4.1 Taxonomia 15

6.4.2 Tipos de muestreo para la detección de bacterias Gram negativas y enterobacterias 16

6.4.3 Medios de transporte y recuperación de bacterias gram negativas 16

6.5 Cultivo de microorganismos como herramienta biotecnológica.....17

6.6 Selección y purificación de bacterias 18

6.7 Medios de cultivo 18

6.7.1 Medios Selectivos 18

6.7.2 Caracterización fenotípica de microorganismos 19

6.7.3 Evaluación de la resistencia antimicrobiana 19

6.7.4 Conservación de aislamientos bacterianos.....20

6.7.5 Criopreservación con glicerol 20

6.7.6 Banco de cepas microbianas 20

6.7.7 Relación entre identificación fenotípica y molecular 21

6.7.8 Importancia de la biotecnología en la vigilancia epidemiológica.....21

6.8 Población.....22

6.9 Muestra.....22

6.10 Muestreo censal.....22

6.11 Frecuencia 22
6.12 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana 22
6.13 Sinergia antimicrobiana.....22
6.14 Colonización uterina por *Escherichia coli* 23
6.15 Respuesta del endometrio bovino frente a *Escherichia coli* 24
6.16 Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos betalactámicos.....25
6.17 Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido.....26
7 VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS 27
8 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL 28
8.1 Área de investigación.....28
8.2 Enfoque metodológico 29
9.3.1 Enfoque cuantitativo 29
8.3 Población y muestra 30
8.3.1 Población.....30
8.3.2 Muestra 31
8.3.3 Unidad de observación y unidad de análisis 31
8.4 Criterios de selección 31
8.4.1 Criterios de inclusión 32
8.4.2 Criterios de exclusión 32
8.4.3 Determinación de la condición reproductiva 33
8.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de información.....33
8.5.1 Observación directa 33
8.5.2 Diálogo con los propietarios y revisión de registros.....34
8.6 Registro de campo y laboratorio 34
8.7 Técnicas microbiológicas.....35
8.8 Descripción de las técnicas de laboratorio 35
8.8.1 Recolección de las muestras endometriales.....35
8.8.2 Enriquecimiento bacteriano 36

8.8.3 Aislamiento de *Escherichia coli* 36
8.8.4 Purificación de cepas Escherichia coli....36
8.8.5 Conservación de los aislamientos 36
8.8.6 Reactivación de las cepas conservadas 37
8.8.7 Preparación del inóculo bacteriano....37
8.8.8 Siembra en agar Mueller-Hinton 37
8.8.9 Colocación de los discos antimicrobianos 37
8.8.10 Lectura de los halos de inhibición 38
8.8.11 Interpretación del perfil de susceptibilidad....38
8.8.12 Selección de aislamientos sospechosos de BLEE....39
8.8.13 Confirmación fenotípica de BLEE....39
8.9 Análisis estadístico....40
9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 41
9.1 Frecuencia de crecimiento compatible con *Escherichia coli* 41
9.2 Distribución de las muestras positivas según la provincia de procedencia....42
9.3 Distribución según los días abiertos....43
9.4 Distribución según la edad de los bovinos....44
9.5 Distribución según el número de partos....45
9.6 Distribución según la producción diaria de leche 46
9.7 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana 47
9.8 Selección de aislamientos para la prueba fenotípica de BLEE 49
9.9 Resultados individuales de la prueba de sinergia....49
10 IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS ...53
10.1 Impacto técnico 53
10.2 Impacto social 54
10.3 Impacto económico 54
11 PRESUPUESTO DEL PROYECTO....55

12 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 55
12.1 Conclusiones 55
12.2 Recomendaciones 55
13 BIBLIOGRAFIA 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS 7

Tabla 2. Puntos de corte para interpretar la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos compatibles con Escherichia coli, según CLSI M100. 38

Tabla 3. Distribución de las muestras con aislamiento de Escherichia coli según la provincia. 43

Tabla 4. *Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según los días abiertos* 44

Tabla 5. Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según la edad..... 45

Tabla 6. Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según el número de partos. 46

Tabla 7. Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según el nivel de producción de leche. 47

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los 51 aislamientos de Escherichia coli..... 48

Tabla 9. Aislamientos seleccionados para la prueba de sinergia según el patrón fenotípico observado 49

Tabla 10. Halos e interacción con ácido clavulánico en los aislamientos sometidos a la prueba de sinergia 50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Distribución geográfica de las provincias de procedencia de las muestras y la ubicación del laboratorio de procesamiento* 28

Figura 2. Frecuencia de muestras uterinas con aislamiento de Escherichia coli en agar EMB.42

Figura 3 Frecuencia de detección fenotípica de BLEE.....51

INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Identificación fenotípica de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en muestras uterinas de bovinos con alteraciones reproductivas.

Fecha de inicio: Abril de 2026.

Fecha de finalización: Julio de 2026.

Lugar de ejecución:

Parroquia: Eloy Alfaro

Cantón: Latacunga

Provincia: Cotopaxi

Zona: 3

Institución: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN) de la Universidad Técnica de Cotopaxi ubicado en el barrio Salache, parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi, Zona 3.

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN).

Carrera que auspicia:

Carrera de Biotecnología.

Equipo de trabajo:

Tutor: Ing. Valentina Arévalo, Mg.

Co-tutor: MVZ. Eddie Molina, Mg.

Estudiante: Paul Andres Osorio Changoluisa.

Lector 1: Ing. Karla Andreina Cedeño Saltos, Mg.

Lector 2: Ing. Vanessa del Rosario Herrera Yunga, Mtr.

Lector 3: Ing. María Monserrath Morales Padilla, Mg.

Coordinador del proyecto:

Nombre: Paul Andres Osorio Changoluisa.

Teléfono: +593 958818245

Correo electrónico: paul.osorio4527@utc.edu.ec

Área de conocimiento:

Ciencias naturales, matemáticas y estadística.

Línea de investigación:

Producción y biotecnología animal

Sublínea de vinculación de la carrera:

Biotecnología aplicada al mantenimiento y producción animal.

Línea de vinculación de la carrera:

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano y social.

1 JUSTIFICACIÓN DELPROYECTO

La biotecnología en las ciencias pecuarias se ha convertido en una herramienta indispensable para frenar la crisis global de la resistencia antimicrobiana (RAM), un claro ejemplo de este problema es el fracaso de las terapias tradicionales contra las infecciones uterinas en bovinos y está relacionado con el uso constante de cefalosporinas de tercera generación ya que ha ejercido una presión selectiva tan fuerte que provoca la aparición de cepas de *Escherichia coli* con sistemas de evasión molecular sumamente complejos como es el caso de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Ante esta situación, la presente investigación, se realiza para comprender dicha problemática mediante técnicas microbiológicas que detecten y confirman BLEE. La dispersión de estas enzimas no solo pone en riesgo la eficiencia reproductiva de los hatos, sino también la seguridad sanitaria de toda la cadena alimentaria desde el enfoque One Health (Ma et al., 2018; Montenegro et al., 2024; Zhang et al., 2024).

El aporte fundamental de esta investigación radica en la integración de un flujo de trabajo biotecnológico traslacional, es decir, conecta directamente el trabajo de campo y de laboratorio en un flujo metodológico integrado. Por otro lado, a través del estudio de la microbiología se puede realizar técnicas como el aislamiento de cepas bacterianas en medios selectivos y diferenciales, como es el agar EMB, y la determinación de perfiles fenotípicos de susceptibilidad mediante pruebas de antibiograma. Abordar este problema desde una perspectiva microbiológica y biotecnológica resulta fundamental bajo el enfoque One Health, debido a que permite comprender procesos de adaptación y circulación de bacterias en los sistemas productivos. De esta manera la generación de evidencia desde el campo al laboratorio puede permitir el establecimiento de estrategias vigilancia, control y prevención frente a la transmisión de la resistencia bacteriana en el ecosistema (Agrawal et al., 2021; Chaudhary et al., 2023; Yadav et al., 2022).

El impacto y relevancia de este enfoque son de trascendencia inmediata y a largo plazo bajo el paradigma de "Una Sola Salud" (One Health). La identificación precisa de cepas resistentes a antimicrobianos es un componente necesario de bioseguridad; a mediano plazo, los datos generados servirán de base para modelos de vigilancia epidemiológica molecular. Los beneficios se extienden de manera sistémica: los microbiólogos y los laboratorios obtendrán protocolos optimizados para la detección diagnóstica; los médicos veterinarios contarán con evidencia científica para sustituir el uso empírico de fármacos por terapias dirigidas; y la sociedad se verá

favorecida al reducir el riesgo de transmisión de bacterias multirresistentes del ganado al ser humano (Agrawal et al., 2023; Kholik, 2022).

En términos de utilidad práctica, los resultados de esta investigación son directamente aplicables al diseño de programas de control sanitario. La capacidad de identificar bovinos portadores de bacterias con genes BLEE permitiría la toma de decisiones críticas en el manejo de hatos con problemas de infertilidad o metritis persistente. En última instancia, este proyecto demuestra que la biotecnología es el puente indispensable para transformar el manejo reproductivo bovino, garantizando que el uso de antibióticos sea racional, ético y, sobre todo, eficaz frente a las demandas de una industria ganadera moderna y sostenible (Agrawal et al., 2023; Chaudhary et al., 2023; Zhang et al., 2024).

2 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

2.1 Directos

Los beneficiarios directos en el presente proyecto son los productores ganaderos y médicos veterinarios vinculados con los bovinos muestreados en Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Pichincha que podrán disponer de información que permite mejorar el manejo sanitario y reproductivos de los animales.

2.2 Indirectos

Los beneficiarios indirectos serán los productores de los hatos lecheros bovinos aledañas, comunidad ganadera de la región interandina e instituciones vinculadas con la sanidad animal, además de la comunidad científica y académica, estudiantes y biotecnología y carreras afines.

3 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Las alteraciones reproductivas en bovinos, como la metritis, endometritis, repetición de servicios, abortos y prolongación de los días abiertos, representan una limitante para la eficiencia de los sistemas de producción lechera. Desde una perspectiva biotecnológica, estas alteraciones no deben evaluarse únicamente mediante signos clínicos, debido a que pueden estar relacionadas con cambios en la composición del microbiota uterino, y con el predominio de microorganismos

potencialmente patógenos. Mediante el análisis del gen 16S rRNA en muestras endometriales obtenidas con cytobrush, se ha demostrado que las vacas con endometritis presentan menor diversidad bacteriana y una mayor abundancia de microorganismos pertenecientes al grupo *Escherichia–Shigella* en comparación con animales sanos y gestantes, lo que evidencia la importancia de estudiar microbiológicamente el ambiente uterino (Becker et al., 2023b).

A nivel mundial, *Escherichia coli* ha sido identificada como una bacteria asociada con procesos infecciosos del útero bovino, especialmente durante el periodo posterior al parto. En un estudio reciente realizado en vacas lecheras con metritis puerperal se aisló *E. coli* del contenido uterino y, mediante técnicas microbiológicas, pruebas de susceptibilidad y PCR, se identificaron diferentes grupos filogenéticos, factores de virulencia y genes de resistencia. Entre los resultados se encontró una elevada presencia del gen de resistencia betalactámica TEM, lo que demuestra que los aislados uterinos pueden combinar características de patogenicidad y resistencia antimicrobiana, disminuyendo la posibilidad de éxito de los tratamientos aplicados sin un diagnóstico de laboratorio (Wei et al., 2024).

Los avances biotecnológicos han permitido comprobar que la resistencia puede circular entre diferentes especies y componentes de un ecosistema pecuario. En las islas Galápagos se utilizó agar MacConkey suplementado con cefotaxima para seleccionar bacterias resistentes y posteriormente se aplicaron métodos moleculares para identificar genes BLEE y analizar la relación genética de los aislados con su perfil fenotípico. El estudio detectó *E. coli* BLEE en animales de producción, animales de compañía y fauna silvestre; todos los aislados identificados fueron multirresistentes y los genes predominantes pertenecieron al grupo blaCTX-M. Estos resultados demuestran la utilidad de combinar métodos de cultivo microbianao, selección antimicrobiana y caracterización genética para vigilar la circulación de bacterias resistentes en la interfaz animal-ambiente (Rhea et al., 2024)

En Ecuador, la problemática también ha sido demostrada en bovinos productores de leche. Una investigación desarrollada en la provincia de Pichincha analizó 182 muestras fecales y determinó que 93, equivalentes al 51 %, fueron positivas para *E. coli* productora de BLEE. El análisis fenotípico evidenció porcentajes de resistencia superiores al 80 % frente a amoxicilina con ácido clavulánico, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacina, amikacina y tetraciclina; además, el 100 % de los aislados presentó fenotipos de multirresistencia. Estos hallazgos confirman que los

bovinos lecheros ecuatorianos pueden actuar como reservorios de bacterias y genes de resistencia; sin embargo, debido a que el estudio se realizó con muestras fecales, sus resultados no permiten conocer la presencia ni el comportamiento de estos microorganismos en el endometrio bovino (Calvopiña Montenegro et al., 2024).

La evidencia ecuatoriana reciente se ha concentrado principalmente en la identificación de *E. coli* BLEE en muestras fecales de bovinos y en muestras de animales de producción, compañía y fauna silvestre. En consecuencia, los estudios previos sobre la presencia de *E. coli* resistente en muestras obtenidas directamente del endometrio de vacas con alteraciones reproductivas de la Región Interandina son escasos o nulos. Esta brecha impide establecer si los aislados uterinos presentan susceptibilidad o resistencia frente a los betalactámicos y si expresan un fenotipo compatible con la producción de BLEE. Se debe considerar, además, que el aislamiento de *E. coli* no demuestra por sí solo que sea la única causa de la alteración reproductiva, pero sí permite establecer su presencia en el ambiente uterino y evaluar su importancia microbiológica y epidemiológica

Ante esta problemática, es necesario emplear herramientas de biotecnología microbiana para aislar y caracterizar *Escherichia coli* presente en muestras uterinas de bovinos con alteraciones reproductivas. La utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales, el aislamiento del inóculo bacteriano, el antibiograma por difusión en disco y la confirmación fenotípica de BLEE mediante la interacción entre cefalosporinas y ácido clavulánico permitirán generar información sobre los perfiles locales de susceptibilidad. Los resultados constituirán una línea base para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, el uso responsable de antibióticos y el desarrollo posterior de investigaciones moleculares dirigidas a detectar genes como blaCTX-M, blaTEM y blaSHV en los aislados obtenidos (Bastidas-Caldes et al., 2022; Ma et al., 2018; Wei et al., 2024; Zhang et al., 2024)

4 OBJETIVOS

4.1 General

Identificar fenotípicamente *Escherichia coli*, productora de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en muestras uterinas de bovinos con alteraciones reproductivas.

4.2 Específicos

- Determinar la frecuencia de *Escherichia coli* y los factores asociados a su presencia en bovinos con alteraciones reproductivas.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Escherichia coli* frente a un panel de antibióticos β-lactámicos mediante la técnica de difusión de discos Kirby-Bauer.
- Confirmar fenotípicamente la producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en los aislamientos de *Escherichia coli* mediante la prueba de sinergia de doble disco.

5 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Objetivo específico	Actividad	Metodología	Resultado obtenido
Determinar la frecuencia de *Escherichia coli* y los factores asociados a su presencia en bovinos con alteraciones reproductivas.	Selección de bovinos y recolección de muestras endometriales.	Muestreo mediante Cytobrush.	Muestras de cepillados uterinos de bovinos.
	Transporte y procesamiento de las muestras.	Conservación y enriquecimiento en caldo nutritivo.	Muestras aptas para el aislamiento presuntivo bacteriano.
	Aislamiento de cepas de *E. coli*.	Siembra en agar EMB.	Colonias presuntivas de *E. coli*.

Objetivo específico	Actividad	Metodología	Resultado obtenido
	Obtención de cultivos puros.	Resiembra en agar nutritivo.	Cepas purificadas.
	Conservación de los aislamientos.	Criopreservación en caldo nutritivo–glicerol.	Banco de cepas de *E. coli*.
	Reactivación de cepas.	Cultivo previo al análisis microbiológico en EMB y AN.	Cepas viables para las pruebas de susceptibilidad.
Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Escherichia coli* frente a un panel de antibióticos β-lactámicos mediante la técnica de difusión de discos Kirby-Bauer.	Establecimiento del inóculo bacteriano.	Suspensión 0,5 McFarland.	Inóculo a concentración de $1,5x10^8$UFC/mL.
	Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana.	Método de Kirby–Bauer en agar Mueller-Hinton.	Perfil de susceptibilidad obtenido.
	Medición e interpretación de halos de inhibición.	Criterios establecidos por CLSI.	Clasificación de las presuntivas a *E.coli* S, I, R.
	Selección de cepas sospechosas de BLEE.	Análisis del patrón de resistencia.	Aislamientos candidatos a BLEE.
Confirmar fenotípicamente la producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en los aislamientos de *Escherichia coli* mediante la prueba de sinergia de doble disco.	Confirmación fenotípica de BLEE en aislados con sospecha de producción de betalactamasas	Prueba de sinergia con CTX–AMC y CAZ–AMC.	Cepas productoras de BLEE confirmadas.

Nota: Actividades realizadas de acuerdo a los objetivos específicos.

6 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

6.1 Antecedentes

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema mundial que afecta a la salud humana, animal y ambiental. La Organización Mundial de la Salud informó que aproximadamente una de cada seis infecciones bacterianas confirmadas en laboratorio durante 2023 presentó resistencia a los antibióticos y señaló que el uso inadecuado o excesivo de estos medicamentos favorece la selección y propagación de microorganismos resistentes. En los sistemas pecuarios, la ausencia de cultivos microbiológicos, antibiogramas y otras herramientas diagnósticas puede conducir a la utilización de antimicrobianos sin conocer previamente el agente involucrado ni su susceptibilidad, lo cual limita la eficacia terapéutica y dificulta la vigilancia de la resistencia desde el enfoque de Una Sola Salud (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 2023)

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los principales desafíos para la salud pública, la producción animal y la investigación biotecnológica a nivel mundial. En 2019 se estimaron 4,95 millones de muertes asociadas a la RAM bacteriana, de las cuales 1,27 millones fueron directamente atribuibles, y las proyecciones apuntan a 1,91 millones de muertes atribuibles anuales para 2050. Dentro de este panorama, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro; su prevalencia va en aumento y, en muchas partes del mundo, entre el 10 y el 40% de las cepas de *E. coli y K. pneumoniae* expresan BLEE

El problema adquiere mayor relevancia en la Región Interandina del Ecuador, donde se concentra una parte importante de la producción bovina nacional. Durante 2025, la región Sierra reunió el 52,6 % de las cabezas de ganado vacuno y produjo aproximadamente 4,03 millones de litros de leche diarios, equivalentes al 78,2 % de la producción nacional. Debido a esta concentración ganadera, las enfermedades reproductivas, la prolongación de los días abiertos y los tratamientos antimicrobianos aplicados en las explotaciones pueden generar repercusiones sanitarias, productivas y económicas importantes. Por ello, la disponibilidad de métodos biotecnológicos para identificar los microorganismos involucrados y determinar su susceptibilidad resulta necesaria para orientar el manejo sanitario de los animales (Baba et al., 2021)

Los estudios que cultivan hisopados uterinos reportan de forma consistente una alta frecuencia de aislamiento de *E. coli*. En 374 vacas Holstein de Nueva York, el 33.4% (125/374) resultó positivo en el cultivo de *E. coli* en hisopos uterinos. En un estudio prospectivo sobre 371 vacas, la prevalencia *de E. coli, Trueperella pyogenes* y metritis posparto fue del 42%, 34% y 15%, respectivamente. En otra cohorte de 465 vacas, el 52% de las muestras uterinas fueron positivas a *E. coli* y el 34% a *T. pyogenes*. En vacas con endometritis clínica diagnosticada con Metricheck, *E. coli* fue el aislado más frecuente (24%), por encima de *Corynebacterium spp*. (18%) y *A. pyogenes* (14%). En un estudio reciente sobre 70 vacas mestizas con endometritis, de 83 bacterias aisladas, 35 (42,16%) se confirmaron como *E. coli*(Basbas et al., 2022a).

Las infecciones uterinas posparto metritis y endometritis afectan a cerca del 40% del ganado tras el parto, y *E. coli* es uno de los primeros patógenos en colonizar el útero. Se han identificado cepas específicas de *E. coli* patógeno endometrial (EnPEC), más adherentes e invasivas para el endometrio que las aisladas de úteros sanos. La frecuencia de aislamiento uterino es alta: en cohortes de vacas posparto, la prevalencia de *E. coli* intrauterino se ha reportado en torno al 42% y del 33.4% en hisopados uterinos de vacas Holstein. En vacas con infección uterina posparto en la India, de 40 aislados de *E. coli* se registraron altas tasas de resistencia a ampicilina (95%), cefpodoxima (97.5%), cefotaxima (87.5%) y ceftriaxona (70%); 39 de los 40 aislados se confirmaron como productores de BLEE y el 70% fue multirresistente, con predominio del genotipo bla CTX-M (grupo CTX-M-1). En vacas con metritis, un estudio genómico encontró un alto porcentaje de *E. coli* patógeno intrauterino (IUPEC) productor de BLEE con multirresistencia, incluida la resistencia a ceftiofur cefalosporina de uso común contra la metritis, portando genes de resistencia frente a 29 clases de antibióticos. En vacas con endometritis clínica en Rumania, de 47 cepas aisladas de secreciones uterinas se confirmó una prevalencia del 35.3% de cepas BLEE de E. coli y K. pneumoniae. En un estudio sobre aislados intrauterinos de metritis en California, la totalidad fue resistente a ampicilina, mientras que solo el 8.6% fue resistente a ceftiofur(Jaureguiberry et al., 2016; Zhang et al., 2024).

Más allá del útero, el ganado bovino constituye un reservorio importante de *E. coli* BLEE, lo que aporta contexto epidemiológico al problema. En granjas de leche y carne de Baviera (Alemania), el 32.8% de las muestras (196/598) contenía *E. coli* BLEE, procedente del 86.7% de las granjas, y el 93.4% de los aislados portaba genes CTX-M, siendo el grupo CTX-M-1 el más frecuente. En bovinos aparentemente sanos de Turquía, la prevalencia de *E. coli* BLEE fue del

8.3% (26/312), con bla CTX-M-15 como gen predominante y un 84.6% de aislados multirresistentes.

En Latinoamérica, un estudio en bovinos productores de leche del norte de Ecuador identificó E. coli BLEE en el 51% (93/182) de las muestras fecales, con el 100% de los aislados multirresistentes y resistencias superiores al 80% a varias familias de antibióticos. En leche de tanque de hatos lecheros de Antioquia (Colombia), las enterobacterias BLEE se aislaron en el 3.3% (4/120) de las muestras, y todos los aislados albergaban la enzima bla CTX-M-96 (CTX-M-12a). La producción de BLEE en cepas uterinas tiene consecuencias clínicas directas: el tratamiento antibiótico de la metritis presenta una alta tasa de fracaso, entre el 23 y el 35%, y la multirresistencia de estos aislados reduce la eficacia de los antibióticos habitualmente usados en las infecciones uterinas, comprometiendo el resultado terapéutico. Dado que estas cepas pueden transmitirse a otros animales y a los humanos, su presencia en el útero bovino representa un riesgo relevante desde la perspectiva One Health. La eficiencia reproductiva es un parámetro determinante en la viabilidad económica y productiva de los sistemas pecuarios, ya que condiciona de forma directa el volumen de producción láctea, la disponibilidad de hembras de reemplazo y el retorno financiero de la explotación; es decir, se integra en un modelo de economía circular donde la producción y la reproducción optimizan el uso de los recursos del sistema(Basbas et al., 2022a; Bastidas-Caldes et al., 2022; Garzon et al., 2024; Jaureguiberry et al., 2016).

Dentro de esta problemática, las betalactamasas de espectro extendido representan uno de los mecanismos de resistencia de mayor importancia. Estas enzimas pueden hidrolizar diferentes antibióticos betalactámicos, especialmente penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido. Los genes **bla**CTX-M, **bla**TEM y **bla**SHV se encuentran entre los principales determinantes genéticos relacionados con este fenotipo y pueden estar localizados en elementos genéticos móviles, favoreciendo su transferencia entre bacterias. Por esta razón, la identificación de *E. coli* productora de BLEE requiere herramientas de biotecnología microbiana que integren el aislamiento en medios de cultivo, la caracterización de la susceptibilidad antimicrobiana, la confirmación fenotípica y, cuando sea posible, la detección molecular de genes de resistencia (Bastidas-Caldes et al., 2022)

En Sudamérica, la presencia de *E. coli* productora de BLEE ha sido reportada en seres humanos, animales, alimentos y ambientes contaminados. Una revisión sistemática que incluyó 130 investigaciones determinó que únicamente el 20 % de los estudios correspondía al componente

animal y que las enzimas de la familia CTX-M fueron las más frecuentemente identificadas. Los autores señalaron la necesidad de incrementar los estudios en países con información limitada y fortalecer la vigilancia multisectorial de la resistencia antimicrobiana. Esta situación demuestra que, aunque la problemática se encuentra ampliamente distribuida en la región, todavía existen vacíos respecto a determinados sistemas productivos, enfermedades y tipos de muestras, entre ellas las obtenidas directamente del aparato reproductor bovino (Bastidas-Caldes et al., 2022; Zhang et al., 2024)

6.2 Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina

El aparato reproductor de la hembra bovina está constituido por los ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina y vulva. Estas estructuras participan en la producción de gametos, la fecundación, la gestación, el parto y la protección del tracto reproductivo frente al ingreso de agentes externos.

Ovarios: Los ovarios son órganos pares encargados de producir los ovocitos y las hormonas sexuales, principalmente estrógenos y progesterona. Estas hormonas regulan el ciclo estral, la ovulación y el mantenimiento de la gestación.

Oviductos: Los oviductos son conductos que conectan los ovarios con los cuernos uterinos. Su función principal es transportar el ovocito y permitir la fecundación, que generalmente ocurre en la región de la ampolla.

Útero: El útero bovino es de tipo bicorne y está formado por dos cuernos uterinos, un cuerpo uterino corto y el cérvix. Su función es proporcionar el ambiente necesario para la implantación, nutrición y desarrollo del embrión y del feto.

Cuernos uterinos: Los cuernos uterinos son las porciones más desarrolladas del útero bovino. En ellos se produce el establecimiento y desarrollo de la gestación. Su pared está formada por endometrio, miometrio y perimetrio.

Capas de la pared uterina: La pared del útero está compuesta por tres capas:

Endometrio: capa interna que se encuentra en contacto con la cavidad uterina.

Miometrio: capa muscular media responsable de las contracciones uterinas durante el ciclo reproductivo, la gestación y el parto.

Perimetrio: capa externa que recubre y protege al útero.

Endometrio: El endometrio es la mucosa que recubre internamente el útero. Está formado por un epitelio superficial, tejido conjuntivo y glándulas uterinas. Participa en la implantación y nutrición inicial del embrión, además de intervenir en los mecanismos de defensa local del útero.

En los bovinos, el endometrio presenta zonas especializadas denominadas carúnculas uterinas. Durante la gestación, estas estructuras se unen con los cotiledones fetales y forman los placentomas, responsables del intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto.

Epitelio endometrial: El epitelio endometrial constituye la primera barrera de protección de la cavidad uterina. Sus células ayudan a impedir la invasión de microorganismos y participan en la respuesta inmunitaria mediante la producción de sustancias y señales inflamatorias.

Glándulas uterinas: Las glándulas uterinas se encuentran dentro del endometrio y producen secreciones que favorecen la supervivencia y nutrición del embrión durante las primeras etapas de la gestación.

Carúnculas uterinas: Las carúnculas son áreas elevadas y sin glándulas presentes en el endometrio de los rumiantes. Durante la gestación se relacionan con los cotiledones de la placenta fetal para formar los placentomas.

Cérvix: El cérvix es una estructura fibromuscular ubicada entre el cuerpo uterino y la vagina. En la vaca presenta varios anillos cervicales y funciona como una barrera física que limita el ingreso de microorganismos hacia el útero.

Vagina: La vagina es un conducto musculomembranoso que comunica el cérvix con la vulva. Participa en la cópula, sirve como canal del parto y constituye una vía de acceso hacia el tracto reproductivo interno.

Vulva: La vulva corresponde a la porción externa del aparato reproductor femenino. Su función es proteger la entrada del tracto reproductivo y actuar como primera barrera frente a contaminantes ambientales (Calvopiña Montenegro et al., 2024; Garzon et al., 2024; Jason Tuner, 2014).

6.2.1 Importancia del endometrio en las alteraciones reproductivas

El endometrio puede entrar en contacto con bacterias después del parto, el aborto o durante procedimientos reproductivos. Cuando los mecanismos de defensa uterina no eliminan estos microorganismos, puede desarrollarse inflamación o infección, lo que altera el ambiente uterino y puede afectar la fertilidad.

La presencia de bacterias como *Escherichia coli* puede estimular una respuesta inflamatoria en el endometrio. Esta respuesta puede modificar las secreciones uterinas, retrasar la recuperación del útero y disminuir las condiciones necesarias para el establecimiento de una nueva gestación.

6.2.2 Relación del endometrio con la toma de muestras

La toma de muestras endometriales permite obtener células, secreciones y microorganismos presentes en la superficie interna del útero. Para reducir la contaminación procedente de la vagina o del ambiente, el instrumento de muestreo debe permanecer protegido durante su paso por el tracto reproductivo y exponerse únicamente al llegar a la cavidad uterina.

6.3 Concepto de biotecnología

La biotecnología se define como la aplicación de la ciencia y la tecnología sobre organismos vivos, sus componentes, productos o procesos, con la finalidad de generar conocimientos, bienes y servicios. Su campo de acción comprende la salud, la agricultura, la producción animal, la industria y el ambiente. En el ámbito investigativo, permite utilizar células, microorganismos, enzimas y material genético como recursos para la identificación de agentes biológicos, el desarrollo de métodos diagnósticos y el análisis de características de interés. En este estudio, la biotecnología se aplicó mediante el aislamiento, cultivo, conservación y caracterización de bacterias procedentes de muestras uterinas bovinas (Montegu et al., 2026)

6.3.1 Biotecnología microbiana

La biotecnología microbiana es una rama de la biotecnología que aprovecha las propiedades metabólicas, fisiológicas y genéticas de bacterias, hongos, levaduras y otros

microorganismos. Estos organismos pueden utilizarse para producir enzimas, antibióticos, vacunas, metabolitos, alimentos fermentados y compuestos de interés industrial. También pueden ser estudiados para determinar características relacionadas con patogenicidad, virulencia y resistencia antimicrobiana. En microbiología veterinaria, su aplicación permite recuperar bacterias procedentes de animales y evaluar sus propiedades mediante técnicas de cultivo, pruebas fenotípicas y métodos moleculares, lo que fortalece el diagnóstico y la vigilancia sanitaria (Koirala et al., 2022)

6.3.2 Aplicaciones de la microbiología en sanidad animal

La microbiología desempeña un papel importante en la sanidad animal porque permite detectar, aislar e identificar microorganismos asociados con enfermedades infecciosas. Sus aplicaciones incluyen el diagnóstico bacteriológico, el control de enfermedades, la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana, la vigilancia epidemiológica y la verificación de la calidad de productos biológicos. Para obtener resultados confiables, las muestras deben recolectarse, transportarse y procesarse bajo condiciones que mantengan su integridad y reduzcan el riesgo de contaminación. (Montenegro et al., 2024; WOAH, 2024)

6.4 E.coli

6.4.1 Taxonomia

Dominio: Bacteria

Filo: Pseudomonadota (anteriormente Proteobacteria)

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, caracterizada por ser un bacilo Gram negativo (Rhea et al., 2024).

6.4.2 Tipos de muestreo para la detección de bacterias Gram negativas y enterobacterias

Muestreo fecal: recolección de heces frescas en un recipiente estéril para detectar bacterias intestinales, especialmente enterobacterias.

Hisopado rectal: obtención de material fecal y microorganismos de la mucosa rectal mediante un hisopo estéril.

Muestreo endometrial: recolección de células, secreciones y microorganismos de la superficie interna del útero mediante cytobrush, hisopo uterino o lavado uterino.

Muestreo vaginal: obtención de secreciones vaginales mediante un hisopo estéril para evaluar la presencia de bacterias gram negativas.

Muestreo urinario: recolección de orina bajo condiciones asépticas para identificar bacterias asociadas con infecciones urinarias.

Muestreo de leche: recolección aséptica de leche para detectar bacterias relacionadas con infecciones intramamarias o contaminación.

Muestreo de agua: recolección de agua en recipientes estériles para evaluar contaminación fecal y presencia de enterobacterias.

Muestreo de alimentos: obtención de una porción representativa de alimentos o materias primas para realizar análisis microbiológicos.

Muestreo de superficies: recolección de microorganismos presentes en equipos, utensilios o instalaciones mediante hisopos, esponjas o paños estériles.

6.4.3 Medios de transporte y recuperación de bacterias gram negativas

medio stuart: medio semisólido y pobre en nutrientes que conserva la viabilidad bacteriana durante el transporte sin favorecer una multiplicación excesiva.

Medio amies: modificación del medio stuart utilizada para transportar muestras bacteriológicas; puede contener carbón activado para neutralizar sustancias inhibitorias.

Medio cary-blair: medio semisólido recomendado principalmente para el transporte de muestras fecales y la conservación de enterobacterias.

Solución salina estéril: solución isotónica utilizada para suspender, diluir o transportar muestras durante periodos cortos.

Agua peptonada: diluyente nutritivo no selectivo utilizado para mantener y recuperar bacterias presentes en diferentes tipos de muestras.

Agua peptonada tamponada: medio de preenriquecimiento que mantiene estable el ph y favorece la recuperación de bacterias estresadas.

Caldo nutritivo: medio líquido de enriquecimiento general que favorece el crecimiento de bacterias no exigentes, incluidas varias bacterias gram negativas.

Caldo tripticasa de soya: medio nutritivo de uso general empleado para la recuperación y multiplicación de diferentes grupos bacterianos.

Medios con glicerol: preparaciones utilizadas para conservar cultivos bacterianos durante periodos prolongados, especialmente mediante congelación (cdc, 2025; human foods program, 2024; merck, 2026).

6.5 Cultivo de microorganismos como herramienta biotecnológica

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionar condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para favorecer su multiplicación en medios artificiales. Esta herramienta permite recuperar bacterias viables, observar sus características de crecimiento y disponer de biomasa suficiente para realizar pruebas posteriores. Los medios líquidos pueden favorecer el enriquecimiento bacteriano, mientras que los medios sólidos permiten reconocer y separar colonias. Dentro de la presente investigación, el cultivo fue fundamental para recuperar bacterias presentes en las muestras uterinas, seleccionar colonias compatibles con *E. coli* y obtener aislamientos que posteriormente fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Koirala et al., 2022; WOAH, 2024)

6.6 Selección y purificación de bacterias

La selección bacteriana consiste en escoger colonias que presentan características macroscópicas compatibles con el microorganismo de interés, como forma, tamaño, color, textura y comportamiento en medios selectivos o diferenciales. Posteriormente, la purificación se realiza mediante resiembras sucesivas, generalmente por estriado de agotamiento, hasta obtener colonias aisladas con una morfología uniforme. Este procedimiento es necesario porque las muestras biológicas pueden contener diferentes especies bacterianas y un cultivo mixto produciría resultados imprecisos en el antibiograma (American Type Cultu Collection, 2025).

6.7 Medios de cultivo

Agar nutritivo: medio sólido de uso general empleado para el crecimiento, mantenimiento y purificación de bacterias no exigentes, entre ellas Escherichia coli.

Agar Mueller-Hinton: medio no selectivo utilizado principalmente para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco.

6.7.1 Medios Selectivos

Agar eosina-azul de metileno (EMB): medio selectivo y diferencial que inhibe parcialmente el crecimiento de bacterias Gram positivas y permite distinguir bacterias fermentadoras de lactosa. E. coli produce generalmente colonias oscuras con brillo verde metálico debido a su intensa fermentación de la lactosa.

Agar MacConkey: medio selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas entéricas. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben principalmente a las bacterias Gram positivas, mientras que E. coli, por fermentar la lactosa, forma colonias rosadas o rojizas.

Agar MacConkey con sorbitol: medio selectivo y diferencial empleado principalmente para la detección presuntiva de E. coli O157. La mayoría de las cepas de E. coli fermentan sorbitol y producen colonias rosadas, mientras que las cepas O157 típicas forman colonias incoloras.

Agar cromogénico para E. coli: medio selectivo y diferencial que contiene sustratos cromogénicos. Las enzimas características de E. coli degradan estos compuestos y producen colonias con una coloración específica, según la formulación comercial del medio.

Agar TBX triptone bile X-glucuronide—: medio selectivo y cromogénico utilizado para detectar y enumerar E. coli. La actividad de la enzima β-glucuronidasa produce generalmente colonias de color azul verdoso.

Agar m-FC: medio selectivo utilizado principalmente para detectar y cuantificar coliformes fecales en muestras de agua. Favorece el crecimiento de bacterias termotolerantes, entre ellas E. coli, que suelen producir colonias azules.

Agar de colitis hemorrágica: medio selectivo y diferencial formulado para facilitar la recuperación de cepas de E. coli asociadas con colitis hemorrágica, especialmente en muestras de alimentos o materiales clínicos (Human Foods Program, 2024; TermoFisher SCIENTIFIC, 2026)

6.7.2 Caracterización fenotípica de microorganismos

La caracterización fenotípica comprende la evaluación de las características observables y funcionales expresadas por un microorganismo. Incluye la morfología celular y colonial, el crecimiento en medios específicos, las propiedades bioquímicas y el comportamiento frente a los antimicrobianos. En este trabajo, la apariencia de las colonias en agar eosina azul de metileno y los diámetros de inhibición obtenidos mediante difusión en disco constituyeron expresiones fenotípicas de los aislamientos. Este tipo de caracterización permite conocer si la bacteria manifiesta resistencia en las condiciones del ensayo, aunque no identifica directamente el gen o mecanismo molecular responsable de dicho comportamiento (Petrin et al., 2023).

6.7.3 Evaluación de la resistencia antimicrobiana

La evaluación de la resistencia antimicrobiana utiliza procedimientos estandarizados para determinar el comportamiento de una bacteria frente a diferentes agentes terapéuticos. Los métodos fenotípicos, como la difusión en disco (Kirby-Bauer), evidencian si el crecimiento bacteriano es inhibido por un antimicrobiano y permiten clasificar los aislamientos de acuerdo con criterios técnicos. La utilización de métodos estandarizados permite generar resultados comparables y útiles para la vigilancia microbiológica (Al Amin et al., 2022).

6.7.4 Conservación de aislamientos bacterianos

La conservación de aislamientos bacterianos tiene como finalidad mantener la viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas después de su recuperación. La necesidad de realizar resiembras continuas, disminuye el riesgo de contaminación y permite disponer del microorganismo para repetir pruebas o ejecutar estudios posteriores. El método de conservación debe seleccionarse de acuerdo con la especie bacteriana, la duración del almacenamiento y la finalidad de la investigación (Senaratne & Jayaweera, 2024).

6.7.5 Criopreservación con glicerol

La criopreservación es un método de conservación que reduce la actividad metabólica de los microorganismos mediante el almacenamiento a bajas temperaturas. El glicerol se utiliza como agente crioprotector porque disminuye el daño ocasionado por la formación de cristales de hielo y contribuye a conservar la integridad de las células bacterianas durante la congelación. Para obtener resultados adecuados, el cultivo debe encontrarse puro, viable y correctamente identificado antes de prepararse el criovial. También debe mantenerse una temperatura estable, debido a que los ciclos repetidos de congelación y descongelación pueden reducir la viabilidad y modificar algunas características de la cepa (American Type Culture Collection, 2025).

6.7.6 Banco de cepas microbianas

Los bancos de cepas microbianas son colecciones organizadas de microorganismos conservados bajo condiciones controladas y acompañados de información sobre su procedencia, identificación y características. Su función es mantener recursos biológicos que puedan emplearse como material de referencia, en investigaciones microbiológicas, estudios taxonómicos, análisis de resistencia y desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. En esta investigación, la conservación de los aislamientos permitió formar una colección bacteriana básica vinculada con muestras uterinas bovinas. Este material puede utilizarse posteriormente para repetir pruebas, comparar perfiles fenotípicos o realizar análisis moleculares de genes asociados con la resistencia a los betalactámicos (EUCAST, 2025)

6.7.7 Relación entre identificación fenotípica y molecular

La identificación fenotípica y la identificación molecular son procedimientos complementarios. La primera demuestra las características expresadas por la bacteria, como el crecimiento en medios de cultivo y la resistencia observada en el antibiograma; la segunda detecta secuencias de ADN relacionadas con la identidad del microorganismo o con mecanismos específicos de resistencia. La presencia de un gen no siempre garantiza su expresión, mientras que un fenotipo resistente puede deberse a mecanismos distintos del gen investigado. Por esta razón, la combinación de ambos enfoques permite interpretar con mayor precisión la relación entre el comportamiento de la bacteria y su base genética (Al Amin et al., 2022; Anand et al., 2022; EUCAST, 2025; Petrin et al., 2023)

6.7.8 Importancia de la biotecnología en la vigilancia epidemiológica

La biotecnología fortalece la vigilancia epidemiológica al proporcionar técnicas para aislar microorganismos, determinar su susceptibilidad, conservar cepas y detectar genes de resistencia. La integración de resultados microbiológicos, moleculares y epidemiológicos permite reconocer cambios en los perfiles de resistencia, comparar aislamientos de diferentes lugares e identificar mecanismos con capacidad de diseminación. En el sector pecuario, esta información contribuye al uso responsable de los antimicrobianos y a la evaluación de riesgos para los animales, las personas y el ambiente. Por ello, los datos obtenidos en aislamientos uterinos bovinos pueden constituir una base para programas de vigilancia bajo el enfoque de Una Sola Salud (Al Amin et al., 2022; EUCAST, 2025; Mekibib et al., 2024; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 2023; Senaratne & Jayaweera, 2024)

6.8 Población

La población corresponde al número total de unidades de estudio que presentan características comunes y servibles para el estudio (Hernández-Sampieri, 2022).

6.9 Muestra

La muestra es un subconjunto de la población seleccionado para obtener información de interés para el estudio (Marín-Campos, 2004).

6.10 Muestreo censal

El muestreo censal consiste en seleccionar todas las unidades de la población que cumplen los criterios de selección establecidos; es decir, la muestra es igual a la población, n=N (Champ & Sills, 2022; Thompson et al., 1998).

6.11 Frecuencia

La frecuencia representa el número de veces que se presenta una característica, condición o resultado dentro de un conjunto de unidades evaluadas. Puede expresarse como frecuencia absoluta, mediante el número de casos, o como frecuencia relativa, mediante una proporción o porcentaje.

6.12 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana corresponde al comportamiento de una bacteria frente a diferentes agentes antimicrobianos. Se determina mediante pruebas de laboratorio y permite clasificar los resultados en susceptible, intermedio o resistente, de acuerdo con los puntos de corte establecidos.

6.13 Sinergia antimicrobiana

La sinergia antimicrobiana ocurre cuando la acción conjunta de dos compuestos produce un efecto mayor que el observado cuando cada uno actúa por separado. En la detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido Menocal 2024 abarca que, la sinergia se evidencia por el

aumento o deformación del halo de inhibición de una cefalosporina en dirección al disco de amoxicilina–ácido clavulánico, debido a que el ácido clavulánico inhibe la actividad de la enzima.

6.14 Colonización uterina por *Escherichia coli*

Durante el periodo posterior al parto, el aparato reproductor bovino atraviesa procesos de involución, reparación tisular y eliminación de microorganismos que ingresaron mientras el cérvix permanece abierto, por cuanto la cavidad uterina queda expuesta temporalmente a bacterias procedentes del entorno, la piel, las heces o el tracto genital inferior. Becker et al. (2023) identificaron diferencias en la composición del microbiota endometrial entre vacas sanas, gestantes y diagnosticadas con endometritis, relación que confirma la necesidad de valorar la presencia bacteriana junto con la condición reproductiva del animal.

Escherichia coli habita normalmente en el intestino de los bovinos, aunque puede alcanzar el útero mediante contaminación durante el parto, los procedimientos reproductivos o la manipulación de la cavidad uterina; su recuperación es más frecuente en animales con signos de enfermedad uterina que en vacas sin secreciones anormales. Basbas et al. (2022) encontraron que las vacas con metritis presentaron una probabilidad 2,16 veces mayor de obtener aislamientos intrauterinos de *E. coli* frente a las vacas del grupo de control, aun cuando la bacteria también fue recuperada en animales sin metritis.

La permanencia de *E. coli* en la superficie endometrial depende de las propiedades de cada cepa, la cantidad de bacterias presentes, la disponibilidad de nutrientes y la capacidad defensiva del animal. Wei et al. (2024) identificaron una alta frecuencia de genes relacionados con adhesión, protección frente a la respuesta inmunitaria y formación de estructuras superficiales, entre ellos *fimH, papC, ompF, ompC* y *traT*, características que pueden favorecer la fijación bacteriana al tejido uterino y su persistencia durante el periodo puerperal.

Los análisis genómicos muestran que no todas las cepas intrauterinas pertenecen a un grupo exclusivamente adaptado al útero, debido a que pueden compartir características con aislamientos recuperados de otros sitios corporales. Garzon et al. (2024) determinaron que los aislamientos obtenidos de vacas con infección uterina presentaban diversidad genética, genes de virulencia y perfiles de resistencia variables, razón por la cual la identificación de colonias compatibles en un medio de cultivo no permite establecer por sí sola su capacidad patógena.

La recuperación de *E. coli* en una muestra endometrial demuestra que la bacteria estaba presente al momento de la recolección, pero no confirma que sea la causa única de los días abiertos prolongados, los abortos, la repetición de servicios o la reducción de la fertilidad. La interpretación microbiológica debe considerar el momento de muestreo, los signos clínicos, los antecedentes reproductivos y la ausencia o presencia de otros microorganismos, debido a que la salud uterina depende de varios factores relacionados con el animal y su manejo (Becker et al., 2023).

6.15 Respuesta del endometrio bovino frente a *Escherichia coli*

El endometrio interviene en la reproducción y actúa como una barrera inmunitaria frente al ingreso de agentes bacterianos, mediante células epiteliales capaces de reconocer componentes microbianos y activar señales inflamatorias. La superficie endometrial responde ante el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, compuesto presente en la membrana externa de *E. coli*, mediante la producción de mediadores que favorecen el reclutamiento de células inmunitarias hacia el sitio afectado.

Ma et al. (2021) comprobaron que la exposición de células epiteliales endometriales bovinas al lipopolisacárido incrementó la expresión de las citocinas IL-6, TNF-α, IL-1β e IL-18, además de activar componentes inflamatorios asociados con NLRP3, caspasa-1, caspasa-4 y gasdermina D. La activación de dichas rutas forma parte de la defensa frente a bacterias Gram negativas, aunque una respuesta intensa o prolongada puede favorecer daño celular, ruptura de membranas y alteración de la integridad del epitelio uterino.

La inflamación posparto participa en la eliminación de microorganismos y en la recuperación del útero, pero su persistencia puede retrasar la regeneración endometrial y modificar las condiciones necesarias para una nueva gestación. Las vacas con endometritis presentan cambios en la diversidad bacteriana y mayor abundancia de determinados grupos asociados con procesos inflamatorios, mientras los animales sanos o gestantes mantienen comunidades microbianas diferentes (Becker et al., 2023).

La respuesta inmunitaria también se relaciona con los factores de virulencia expresados por cada aislamiento, dado que las adhesinas favorecen el contacto con las células endometriales, mientras determinadas proteínas de membrana pueden intervenir en la invasión, la obtención de nutrientes o la evasión de los mecanismos defensivos. Wei et al. (2024) encontraron que los

aislamientos uterinos analizados portaban varios genes de virulencia de manera simultánea, distribución que demuestra la heterogeneidad biológica de *E. coli* recuperada de vacas con metritis puerperal.

La inflamación persistente puede alterar las secreciones uterinas, interferir en la reparación tisular y prolongar la recuperación reproductiva, aunque tales efectos no deben atribuirse automáticamente a una única bacteria sin pruebas clínicas y microbiológicas complementarias. Basbas et al. (2022) comprobaron una mayor recuperación de *E. coli* en vacas con metritis, pero también identificaron aislamientos en animales sin dicha enfermedad.

El aislamiento en agar eosina azul de metileno proporciona una identificación presuntiva basada en la fermentación de lactosa y la apariencia de las colonias, pero no determina la presencia de genes de virulencia ni permite diferenciar cepas comensales de aislamientos con mayor capacidad de producir daño endometrial. Los análisis genómicos desarrollados por Garzon et al. (2024) muestran que la relación entre genotipo, virulencia, resistencia antimicrobiana y condición clínica es compleja, por cuanto la confirmación bioquímica o molecular mejora la interpretación de los cultivos uterinos.

6.16 Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos actúan sobre la síntesis de la pared bacteriana mediante su unión a proteínas encargadas de formar y estabilizar el peptidoglicano, proceso que debilita la estructura celular durante el crecimiento bacteriano. Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas y las cefalosporinas, entre ellas ampicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima.

La resistencia puede expresarse mediante la producción de enzimas capaces de inactivar el antibiótico antes de que alcance su sitio de acción, además de modificaciones que reducen el ingreso del compuesto o alteran su unión con las estructuras bacterianas. Agrawal et al. (2021) registraron porcentajes elevados de resistencia a ampicilina, cefpodoxima, cefotaxima y ceftriaxona en aislamientos uterinos bovinos, mientras la resistencia frente a cefoxitina, amoxicilina con ácido clavulánico y ceftazidima presentó valores menores.

Las betalactamasas hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, acción que impide su unión efectiva con las proteínas responsables de la construcción de la pared bacteriana. Las

enzimas de espectro extendido pueden afectar penicilinas y cefalosporinas de generaciones avanzadas, mientras el ácido clavulánico inhibe la actividad de varias de ellas y favorece la recuperación del efecto antimicrobiano durante las pruebas fenotípicas.

La detección de resistencia a ampicilina o cefazolina no confirma por sí sola la producción de BLEE, puesto que el comportamiento bacteriano puede responder a enzimas con diferente espectro de acción u otros mecanismos de resistencia. Agrawal et al. (2021) combinaron antibiograma, pruebas fenotípicas y PCR para relacionar la expresión observada con genes específicos, procedimiento que permitió diferenciar la sospecha inicial de la confirmación enzimática y molecular.

6.17 Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido

La evaluación fenotípica de BLEE según Menocal 2024 suele comenzar con una prueba de susceptibilidad antimicrobiana, mediante la cual se mide el diámetro de los halos producidos alrededor de discos que contienen cefalosporinas de espectro extendido. Una reducción de la susceptibilidad frente a cefotaxima o ceftazidima permite seleccionar aislamientos sospechosos, pero la clasificación inicial requiere una prueba confirmatoria que valore la respuesta ante un inhibidor de betalactamasas.

Agrawal et al. (2021) emplearon difusión en disco para el tamizaje inicial y utilizaron pruebas de combinación y doble disco para confirmar fenotípicamente los aislamientos sospechosos. El estudio incorporó posteriormente PCR múltiple para detectar genes BLEE, procedimiento que permitió comparar la expresión de resistencia con la información genética presente en cada aislamiento.

La prueba de sinergia de doble disco utiliza una placa de agar Müeller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana estandarizada, en cuya superficie se coloca amoxicilina con ácido clavulánico cerca de cefotaxima y ceftazidima. La ampliación o deformación del halo de una cefalosporina en dirección al disco con clavulanato representa una interacción positiva, debido a que el inhibidor bloquea la actividad enzimática y restablece parcialmente la acción del antibiótico.

La distancia entre los discos, la densidad del inóculo, el espesor del agar, la temperatura, el tiempo de incubación y la potencia de los antimicrobianos pueden modificar la forma y el tamaño de los halos, razón por la cual el procedimiento debe mantenerse bajo condiciones

estandarizadas (Agrawal et al., 2021). Un resultado positivo demuestra un comportamiento compatible con la producción de una enzima inhibible por ácido clavulánico, pero no identifica la familia enzimática responsable.

La ausencia de sinergia tampoco descarta otros mecanismos de resistencia a los betalactámicos, debido a que algunas enzimas presentan escasa inhibición frente al clavulanato o pueden coexistir con alteraciones adicionales. La interpretación debe integrar el perfil completo de susceptibilidad, la respuesta frente a las cefalosporinas, el comportamiento ante cefoxitina y los resultados de la prueba confirmatoria, evitando clasificar como negativas las muestras que no fueron sometidas a la evaluación de sinergia.

7 VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

¿Cuál es la frecuencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en muestras uterinas de bovinos posparto?

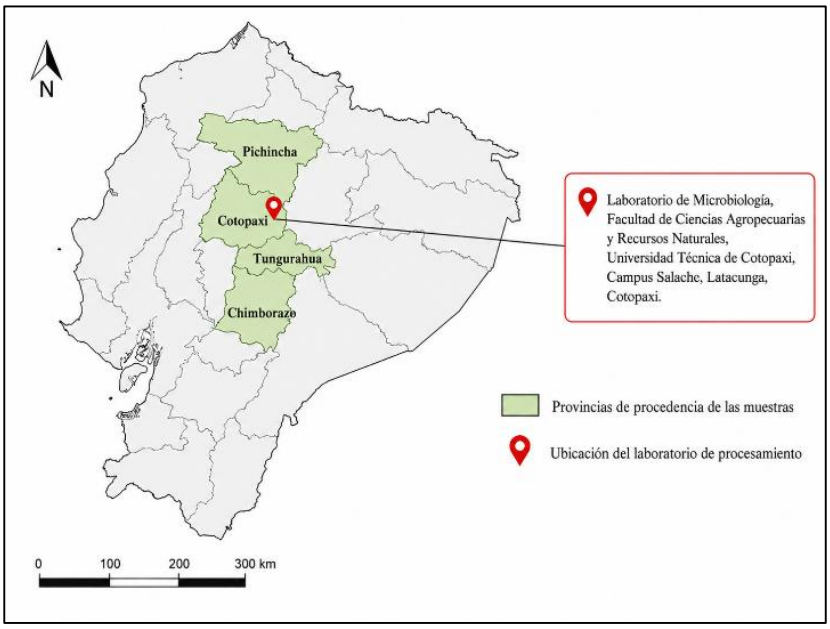
La frecuencia de detección fenotípica de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras uterinas de bovinos posparto fue del 7.84 % (4/51 aislamientos), habiéndose confirmado el mecanismo mediante la prueba de sinergia de doble disco en el 66.67 % (4/6) de las cepas identificadas preliminarmente como sospechosas en la fase de tamizaje. Estos resultados confirman la presencia fenotipica de *E. coli* productora de BLEE en las muestras uterinas analizadas

8 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Área de investigación

El estudio se desarrolló en la región interandina del Ecuador; las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo**,** fueron de donde procedieron las muestras uterinas de bovinos con alteraciones reproductivas. Estos hatos lecheros presentan una importante actividad ganadera orientada principalmente a la producción lechera (Figura 1).

Figura 1. *Distribución geográfica de las provincias de procedencia de las muestras y la ubicación del laboratorio de procesamiento*



Nota: Provincias de Estudio: Pichincha Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo.

El procesamiento microbiológico de las muestras, el aislamiento de *Escherichia coli*, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y la detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi**,** ubicado en el Campus Salache, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi (Osorio, 2026).

9.2 Tipo de investigación

La investigación fue aplicada, descriptiva, no experimental y de corte transversal, debido a que empleó procedimientos microbiológicos para obtener información sobre la frecuencia de aislamientos compatibles con *Escherichia coli*, su perfil de susceptibilidad antimicrobiana y la detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido. El carácter aplicado respondió a la utilización práctica de técnicas de cultivo, aislamiento bacteriano, difusión en disco y sinergia con ácido clavulánico, mientras el alcance descriptivo se centró en registrar y presentar las características observadas sin establecer relaciones causales tal como menciona Hernández & Mendoza (2018)

El diseño fue no experimental porque las variables se examinaron bajo las condiciones presentes en los animales y en los aislamientos obtenidos, sin administrar tratamientos, modificar la exposición a antimicrobianos ni intervenir sobre las condiciones reproductivas de los bovinos. La investigación se consideró transversal porque cada animal fue evaluado una sola vez durante el periodo de recolección, procedimiento similar al utilizado en estudios sobre recuperación intrauterina de *E. coli* y resistencia antimicrobiana en bovinos, en los cuales las muestras se obtuvieron en un momento determinado para describir su comportamiento microbiológico (Basbas et al., 2022).

Las actividades se desarrollaron en dos fases complementarias: durante el trabajo de campo se verificó la identificación de los bovinos, se recopiló la información productiva y reproductiva, además de recolectar las muestras endometriales; en la fase de laboratorio se efectuó el enriquecimiento, aislamiento presuntivo, purificación, conservación, antibiograma y confirmación fenotípica de BLEE.

8.2 Enfoque metodológico

9.3.1 Enfoque cuantitativo

La investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, dado que las variables se registraron mediante valores numéricos y categorías susceptibles de medición, clasificación y comparación. El número de bovinos muestreados, la cantidad de muestras con crecimiento compatible con *E. coli*, los diámetros de los halos de inhibición expresados en milímetros, las

categorías de susceptibilidad y los resultados de la prueba fenotípica de BLEE integraron la base utilizada para el análisis.

Los datos del antibiograma se clasificaron como susceptibles, intermedios o resistentes según los puntos de corte seleccionados para cada antimicrobiano, mientras los resultados de la prueba de sinergia se registraron como positivos o negativos de acuerdo con la presencia de ampliación o deformación del halo hacia el disco de amoxicilina con ácido clavulánico. La medición cuantitativa de halos, frecuencias y proporciones se empleó en esta investigación para describir el aislamiento de E. coli de muestras uterinas y su comportamiento frente a los antimicrobianos (Basbas et al., 2022).

La información fue ingresada en una base de datos y revisada para identificar códigos duplicados, valores fuera de rango, errores de transcripción o registros incompletos. El análisis se efectuó mediante estadística descriptiva, con frecuencias absolutas, porcentajes, tablas de distribución y representaciones gráficas, sin aplicar pruebas destinadas a demostrar asociaciones o relaciones de causa y efecto.

8.3 Población y muestra

8.3.1 Población

La población de referencia correspondió a bovinos pertenecientes a unidades de producción ganadera ubicadas en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, cuyas características reproductivas se ajustaron a los criterios establecidos para el estudio. Los animales procedieron de los hatos autorizados y con antecedentes reproductivos registrados en la ficha de campo. La delimitación de la población consideró: la disponibilidad de los animales, la autorización de los propietarios y la posibilidad de realizar la toma endometrial sin comprometer el bienestar animal (Kudo et al., 2021).

8.3.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por los 92 bovinos que integraron la población accesible y cumplieron los criterios de selección durante el periodo de ejecución. Se aplicó un muestreo censal porque se incluyó la totalidad de los animales elegibles y disponibles en las unidades productivas participantes, razón por la cual el tamaño muestral no se calculó mediante una fórmula estadística.

Cada bovino aportó una muestra de cepillado endometrial, de manera que se obtuvieron 92 unidades microbiológicas para el procesamiento inicial. La cantidad analizada respondió a la disponibilidad real de animales durante las jornadas de campo y no a una selección parcial de la población accesible.

8.3.3 Unidad de observación y unidad de análisis

La unidad de observación correspondió a cada bovino incluido en la investigación, del cual se recopilaron datos de identificación, procedencia, edad aproximada, número de partos, días abiertos, producción de leche, antecedentes reproductivos y administración previa de antimicrobianos.

La unidad de análisis microbiológico estuvo integrada inicialmente por cada muestra endometrial recolectada y, después del cultivo, por cada aislamiento con características presuntivamente compatibles con *E. coli*. La diferenciación entre ambas unidades permitió analizar la frecuencia de muestras positivas respecto de los 92 bovinos, además de evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y el resultado fenotípico de BLEE en los aislamientos recuperados.

8.4 Criterios de selección

La selección y caracterización de los animales se respaldó mediante la metadata individual presentada en el Anexo 2, en la cual se registró la información reproductiva y productiva disponible, obtenida de los propietarios o responsables de las unidades productivas y complementada con los antecedentes disponibles durante el seguimiento veterinario.

Este registro permitió documentar la procedencia de la información utilizada para determinar la elegibilidad de cada bovino, en concordancia con las recomendaciones de STROBE-Vet sobre la descripción de los criterios de selección y las fuentes de obtención de los datos en

estudios observacionales veterinarios (O'Connor et al., 2016). Asimismo, durante las jornadas de campo se contó con el acompañamiento del médico veterinario zootecnista (MVZ) cotutor o de su delegado, responsable del criterio profesional relacionado con la condición reproductiva y la viabilidad de efectuar el procedimiento; por tanto, la toma endometrial se realizó únicamente cuando las condiciones del animal permitían su inmovilización y manipulación segura, priorizando su bienestar y evitando procedimientos que pudieran representar un riesgo innecesario para el bovino.

8.4.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron vacas pertenecientes a unidades de producción ganadera ubicadas en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, disponibles durante las jornadas de muestreo y con al menos una condición reproductiva registrada, como periodo posparto, presencia de días abiertos o antecedente de aborto (60,90,120 dias o mayor). La incorporación de cada animal requirió su identificación individual, la posibilidad de realizar la toma endometrial sin comprometer su bienestar y la autorización del propietario o responsable de la unidad productiva.

La información reproductiva fue obtenida mediante diálogo con los propietarios, responsables de los animales o revisión de los registros disponibles en cada hato. Basbas et al. (2022) consideraron la condición posparto, las características reproductivas y los antecedentes sanitarios de los bovinos antes de la obtención de muestras intrauterinas, mientras Becker et al. (2023) diferenciaron a los animales según su estado reproductivo y condición uterina para interpretar los resultados microbiológicos.

8.4.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron las vacas que habían recibido tratamiento antimicrobiano reciente, debido a que dicha exposición podía disminuir la recuperación bacteriana o modificar el perfil de susceptibilidad obtenido en el laboratorio. También se descartaron los animales que presentaban alteraciones físicas, conductuales o reproductivas que impidieran la inmovilización, palpación rectal o introducción segura del dispositivo de muestreo.

Los animales sin autorización del propietario o que no se encontraban disponibles durante las jornadas de recolección tampoco fueron considerados para el estudio. El registro del

tratamiento antimicrobiano previo resulta necesario en investigaciones de resistencia bacteriana, dado que puede modificar tanto el crecimiento de los microorganismos como la interpretación de los resultados fenotípicos (Basbas et al., 2022).

8.4.3 Determinación de la condición reproductiva

La condición reproductiva de los bovinos se estableció mediante la información proporcionada por los propietarios o responsables de las unidades productivas, complementada con los registros disponibles en cada hato. Se consideraron antecedentes como periodo posparto, días abiertos, abortos y otras dificultades reproductivas registradas antes de la toma de la muestra.

Cuando existió un diagnóstico veterinario previo, se registraron la condición identificada, la fecha aproximada de evaluación y el profesional responsable. En los animales sin diagnóstico clínico confirmado, la clasificación se efectuó únicamente con base en los antecedentes reproductivos disponibles, por cuanto no se atribuyeron enfermedades uterinas específicas sin una valoración profesional.

8.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de información

8.5.1 Observación directa

La observación directa se empleó para comprobar la identificación del bovino, valorar su estado general y verificar que pudiera someterse a la recolección endometrial sin comprometer su bienestar. Durante esta revisión se consideraron la postura, movilidad, comportamiento, condición aparente del aparato reproductor y cualquier situación que impidiera la ejecución segura del procedimiento.

La observación también permitió contrastar la información aportada por el propietario con las condiciones presentes durante la jornada de campo. En investigaciones uterinas bovinas, la revisión clínica previa facilita la clasificación de los animales y la aplicación uniforme de los criterios de selección antes de introducir el dispositivo de muestreo (Basbas et al., 2022).

8.5.2 Diálogo con los propietarios y revisión de registros

La información productiva y reproductiva se obtuvo mediante conversación directa con los propietarios o responsables de los animales, complementada con la revisión de registros físicos o digitales cuando se encontraron disponibles. La aplicación conjunta de ambas fuentes permitió recuperar datos que no podían verificarse únicamente mediante observación, como la fecha del último parto, antecedentes de aborto, tratamientos anteriores o duración aproximada de los días abiertos.

Los datos recopilados comprendieron procedencia, edad aproximada, número de partos, fecha del último parto, días posparto o días abiertos, producción diaria de leche, antecedentes reproductivos y administración previa de antimicrobiano (Basbas et al. 2022).

La información fue consignada en una ficha de registro de campo vinculada con el código asignado a cada animal, sin utilizar el nombre del propietario como identificador microbiológico. La codificación facilitó la relación entre los antecedentes del bovino, el resultado del cultivo, los diámetros de inhibición y la clasificación fenotípica de BLEE.

8.6 Registro de campo y laboratorio

En campo, se registraron los siguientes datos:

- Código de la muestra.
- Lugar de muestreo.
- Información productiva y reproductiva.
- Fecha de recolección.

En laboratorio, se registraron los siguientes datos correspondientes a cada muestra:

- Resultados del cultivo.
- Diámetros de los halos de inhibición.
- Categoría de susceptibilidad.
- Resultado de la prueba fenotípica de BLEE.

8.7 Técnicas microbiológicas

Las técnicas microbiológicas aplicadas en la presente investigación se describen a continuación:

- Muestreo endometrial mediante cytobrush.
- Enriquecimiento bacteriano con caldo nutritivo.
- Siembra en medio de cultivo selectivo EMB.
- Identificación fenotípica de *E. coli*.
- Aislamiento y purificación bacteriana en Agar Nutritivo.
- Conservación de los aislamientos en crioviales.
- Difusión en disco en agar Mueller-Hinton.
- Medición de halos de inhibición.
- Prueba de sinergia de doble disco.

8.8 Descripción de las técnicas de laboratorio

8.8.1 Recolección de las muestras endometriales

Antes de cada toma se verificó el código asignado al bovino y se efectuó la limpieza de la región perineal y vulvar, con el propósito de disminuir la presencia de material contaminante durante la introducción del dispositivo. Cada muestra se obtuvo mediante un cytobrush estéril de uso individual, acoplado a una pistola de inseminación artificial y recubierto con una camisa sanitaria estéril.

El dispositivo se introdujo por vía vaginal y se guió mediante palpación rectal hasta atravesar el cérvix y alcanzar el cuerpo uterino. Una vez ubicado en la cavidad uterina, el cytobrush se expuso fuera de la camisa sanitaria y se rotó suavemente 360° sobre la superficie endometrial para recuperar células, secreciones y microorganismos presentes.

Después de la recolección, el cepillo se retrajo dentro de la camisa sanitaria antes de retirar el dispositivo, medida destinada a limitar el contacto de la muestra con las paredes del cérvix y la vagina (Deza Calsin et al., 2020; Becker et al., 2023).

El extremo del cytobrush se transfirió de forma aséptica a un tubo estéril que contenía caldo nutritivo, utilizado para conservar temporalmente la muestra y favorecer la recuperación bacteriana durante el procesamiento posterior. Cada tubo fue identificado con el código correspondiente al animal, colocado en una gradilla y mantenido bajo refrigeración hasta su traslado al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

8.8.2 Enriquecimiento bacteriano

Se favoreció en crecimiento microbiano en el caldo nutritivo. Al colocar los tubos con las muestras en incubación a 37°C en condiciones aeróbicas durante 24 horas.

8.8.3 Aislamiento de *Escherichia coli*

Después del enriquecimiento, se introdujo un hisopo esterilizado la muestra y se tomó frotó sobre un tercio de la caja que contení agar eosina azul de metileno (EMB); a continuación se realizó la siembra por agotamiento utilizando un asa bacteriológica. La siembre se realizó por triplicado. Las placas fueron incubadas en condiciones aerobias a 37°C durante 24 horas.

Una vez finalizada la incubación, se evaluaron las características macroscópicas de las colonias. Se seleccionaron las cajas de las muestras que presentaron coloración oscura y brillo verde metálico, características presuntivamente compatibles con *E. coli* fermentadora de lactosa.

8.8.4 Purificación de cepas Escherichia coli

Una vez identificados los cultivos consistentes y positivos para *E. coli*, se realizó un pase a un agar EMB para obtener un cultivo con colonias aisladas, posteriormente se realizó un repique de una sola colonia, que presentaba las características morfológicas compatibles con *E. coli,* a un agar nutritivo en donde se sembró por agotamiento y se dejó incubar a 37°C por 24 horas.

8.8.5 Conservación de los aislamientos

Los cultivos puros fueron conservados en crioviales. Para ello, se preparó una mezcla de caldo nutritivo y glicerol en proporción 1:1, en la cual se suspendió el crecimiento bacteriano.

Los crioviales fueron correctamente codificados y almacenados bajo congelación para mantener la viabilidad de los aislamientos.

8.8.6 Reactivación de las cepas conservadas

Los aislamientos conservados fueron reactivados mediante siembra en agar nutritivo por estriado de agotamiento y se cultivaron a 37°C por 24 horas.

8.8.7 Preparación del inóculo bacteriano

Se seleccionaron varias colonias morfológicamente similares y se suspendieron en solución salina estéril al 0,85 % a una turbidez equivalente a 0.5 McFarland que corresponde a $1 * 10^8$ UFC/mL para *E.coli* (Bauer et al., 1966; Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

8.8.8 Siembra en agar Mueller-Hinton

Se introdujo un hisopo estéril en el inóculo preparado y el exceso de líquido se retiró presionándolo suavemente contra la pared interna del tubo. Posteriormente, se inoculó toda la superficie del agar en cuatro direcciones, rotando la placa entre cada aplicación para obtener una distribución homogénea y un crecimiento bacteriano confluente en toda la placa.

8.8.9 Colocación de los discos antimicrobianos

Los discos fueron colocados con una pinza estéril sobre el agar Müeller Hinton previamente inoculado y a continuación fueron presionados suavemente para asegurar un su contacto. Las placas se incubaron de manera invertidas, a 37°C por 18 horas (Menocal, 2022). Los discos de antibióticos utilizados fueron los siguientes:

- Ampicilina $10ug$ (AMP)
- Amoxicilina más ácido clavulánico $30ug$; 2:1 (AMC)
- Cefazolina $30ug$ (KZ)
- Cefotaxima $30ug$ (CTX)
- Ceftazidima $30ug$ (CAZ)
- Cefoxitina $30ug$ (FOX)

8.8.10 Lectura de los halos de inhibición

Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición el cual fue estimado en milímetros, cuando no tiene halo se interpreta con 6 mm el diámetro del disco. Según el EUCAST (2026) y el CLSI (2026), los diámetros deben medirse al milímetro más próximo y compararse con las tablas vigentes.

8.8.11 Interpretación del perfil de susceptibilidad

Los diámetros obtenidos se compararon con los puntos de corte disponibles para la combinación microorganismo–antimicrobiano y se clasificaron como:

S: susceptible a exposición.

I: susceptible con aumento de la exposición.

R: resistente.

Los criterios de CLSI (2026) se utilizaron como referencia microbiológica, reconociendo que corresponden principalmente al ámbito clínico humano y que no existen puntos de corte veterinarios específicos para todas las combinaciones de *E. coli*, antimicrobiano y muestra uterina bovina evaluadas (Tabla 2).

Tabla 2. *Puntos de corte para interpretar la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos compatibles con Escherichia coli, según CLSI M100.*

Antibiótico (código, disco)	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Cefotaxima — CTX (30 µg)	≥26	23–25	≤22
Amoxicilina/ác. clavulánico — AMC (20/10 µg)	≥18	14–17	≤13
Ceftazidima — CAZ (30 µg)	≥21	18–20	≤17
Ampicilina — AMP (10 µg)	≥17	14–16	≤13
Cefazolina — KZ (30 µg, sistémica)	≥23	20–22	≤19
Cefoxitina — FOX (30 µg)	≥18	15–17	≤14

Nota: Para los aislamientos de *E. coli* , los diámetros de inhibición obtenidos con discos de cefotaxima (30 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), ceftazidima (30 µg), ampicilina (10 µg), cefazolina (30 µg) y cefoxitina (30 µg) se interpretaron como S, I o R según los puntos de corte de CLSI. M100. Las mediciones se realizaron mediante difusión en disco conforme a CLSI M02 y se expresaron en mm. El punto de corte de cefazolina indicado como "sistémico" no debe presentarse como un punto de corte específico para muestras urinarias (Chester R. & Cooper, Jr., 2019; CLSI, 2026; Dhurba Giri, 2025; EUCAST, 2025)

8.8.12 Selección de aislamientos sospechosos de BLEE

Se consideraron a los aislados sospechosos de BLEE a aquellos aislamientos que presentaron disminución de la susceptibilidad o resistencia frente a cefalosporinas de espectro extendido, principalmente cefotaxima y ceftazidima. Un perfil de resistencia por sí solo no fue considerado suficiente para confirmar la producción de BLEE, por lo que se realizaron la prueba de sinergia de doble disco.

Los resultados obtenidos frente a ampicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefazolina y cefoxitina se utilizaron como información complementaria del perfil de resistencia a betalactámicos. La resistencia individual a uno o varios antimicrobianos se interpretó únicamente como una señal de sospecha, por cuanto la confirmación de BLEE requirió demostrar una interacción positiva entre las cefalosporinas evaluadas y el ácido clavulánico.

8.8.13 Confirmación fenotípica de BLEE

La confirmación fenotípica se efectuó mediante la prueba de sinergia de doble disco, para la cual se preparó una nueva suspensión bacteriana con turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland y se inoculó uniformemente la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton. El disco de amoxicilina con ácido clavulánico se colocó en la parte central, mientras los discos de cefotaxima y ceftazidima se ubicaron a una distancia aproximada de 25 mm de centro a centro respecto al disco central, siguiendo el procedimiento utilizado para detectar fenotipos compatibles con BLEE (Agrawal et al., 2021).

El resultado se consideró positivo cuando se observó ampliación, expansión o deformación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en dirección al disco de amoxicilina con ácido clavulánico. Los aislamientos con interacción positiva se clasificaron como productores fenotípicos de BLEE, mientras aquellos sin sinergia se registraron como negativos en la prueba aplicada.

8.9 Análisis estadístico

Se aplicó estadística descriptiva mediante frecuencias absolutas, porcentajes, tablas de distribución y gráficos. Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular las frecuencias:

- La frecuencia de aislamiento de *E. coli*.

$$\text{Frecuencia de } E.coli(\%) = \left(\frac{numero\ de\ muestras\ compatibles\ para\ E.coli}{numero\ total\ de\ muestras}\right) \times 100$$

- El perfil de susceptibilidad.

$$\text{Susceptibilidad } (\%) = \left(\frac{\text{Número de aislamientos susceptibles al antimicrobiano}}{\text{Número total de aislamientos evaluados}}\right) \times 100$$

- La frecuencia de detección fenotípica de BLEE se determinó mediante:

$$\text{BLEE } (\%) = \left(\frac{Numero\ \text{Número de cultivos presuntivos con prueba de sinergia positiva}}{numero\text{Número total de cultivos presuntivos sometidos a la prueba de sinergia}}\right) \times 100$$

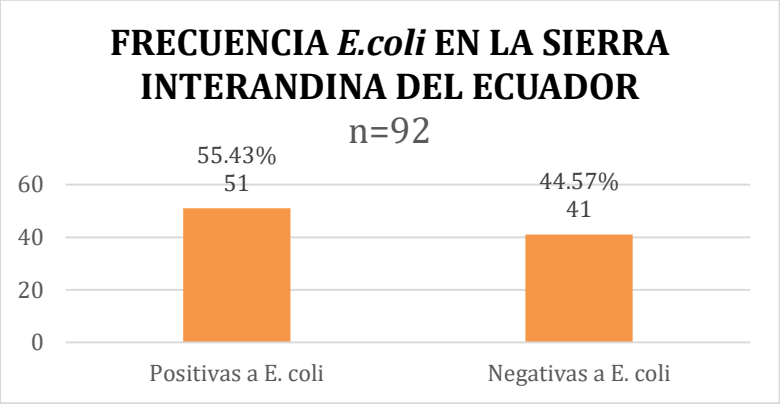
9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se organizaron de acuerdo con los objetivos específicos: frecuencia de crecimiento compatible con *Escherichia coli*, distribución de las muestras según las variables registradas, perfil de susceptibilidad antimicrobiana y detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido. Las comparaciones por provincia se analizaron de manera descriptiva, considerando el tamaño desigual de los grupos. Para los días abiertos, edad, número de partos y producción de leche, además del análisis descriptivo, se aplicó la prueba de chi-cuadrado de Pearson para evaluar su asociación con la presencia de *Escherichia coli*. El análisis se realizó tanto excluyendo los registros no determinados (ND) como incorporándolos como una categoría adicional, con el propósito de evaluar si su inclusión modificaba la interpretación estadística. En ninguna de las variables evaluadas se evidenció asociación estadísticamente significativa con la presencia de *E. coli* ($p > 0,05$), y esta interpretación se mantuvo al incluir los registros ND. Los resultados detallados de la prueba de chi-cuadrado se presentan en el Anexo 1.

9.1 Frecuencia de crecimiento compatible con *Escherichia coli*

De las 92 muestras uterinas procesadas, 51 presentaron crecimiento presuntivamente compatible con E. coli, equivalente al 55,43 %, mientras 41 muestras, correspondientes al 44,57 %, no mostraron colonias con las características consideradas durante la lectura del agar EMB. La distribución revela una presencia frecuente dentro del grupo evaluado, aunque el resultado debe entenderse como identificación compatible y no como confirmación definitiva de la especie (Figura 2)

Figura 2. *Frecuencia de muestras uterinas con aislamiento de Escherichia coli en agar EMB.*



Nota. La categoría positiva corresponde a colonias de *E. coli* aisladas en agar EMB.

Basbas et al. (2022) recuperaron *E. coli* en el 53 % de los hisopados intrauterinos obtenidos de vacas posparto, proporción cercana a la registrada en esta investigación. Zhang et al. (2024) comunicaron una frecuencia de 39,14 % en vacas con endometritis clínica, mientras Shafique et al. (2021) reportaron 72,18 % entre animales con endometritis confirmada, diferencias asociadas con la selección clínica, el periodo de muestreo y los procedimientos de identificación empleados, validando la presencia de *E. coli* en muestras uterinas.

Las 41 muestras negativas no deben interpretarse como úteros libres de bacterias, pues el cultivo estuvo dirigido a reconocer colonias de *E. coli* bajo condiciones específicas. Mekibib et al. (2024) recuperaron diversas especies bacterianas en muestras uterinas, mientras Becker et al. (2023) describieron comunidades endometriales variables según el estado reproductivo y sanitario, antecedentes que respaldan una lectura limitada al microorganismo y al método evaluado.

9.2 Distribución de las muestras positivas según la provincia de procedencia

Tungurahua presentó la mayor proporción de muestras positivas, con 83,33 % (5/6), seguida de Chimborazo con 66,67 % (24/36), Pichincha con 57,14 % (4/7) y Cotopaxi con 41,86 % (18/43). Chimborazo reunió el mayor número absoluto de muestras positivas, mientras el porcentaje de Tungurahua se obtuvo a partir del grupo provincial más pequeño (Tabla 3).

Tabla 3. *Distribución de las muestras con aislamiento de Escherichia coli según la provincia.*

Provincia	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia dentro de la provincia (%)
Cotopaxi	43	18	41,86
Chimborazo	36	24	66,67
Pichincha	7	4	57,14
Tungurahua	6	5	83,33
Total	**92**	**51**	**55,43**

Nota. Los porcentajes se calcularon dentro de cada provincia. Las cantidades de muestras fueron desiguales, por tanto, la tabla no establece diferencias estadísticas entre territorios debido a que se realizó un muestreo censal.

La distribución territorial debe interpretarse como una descripción de los animales disponibles durante el muestreo, sin atribuir las diferencias a prácticas productivas o condiciones sanitarias específicas. Basbas et al. (2022) observaron variación entre explotaciones y relacionaron determinados patrones de resistencia con prácticas de manejo a escala de granja, pero el presente estudio no recopiló información estandarizada suficiente para realizar una comparación equivalente. Además, la cantidad desigual de bovinos por provincia limitó el ordenamiento territorial por lo que se debe evitar afirmaciones sobre una mayor exposición regional.

9.3 Distribución según los días abiertos

La mayor frecuencia se observó en vacas con 60 días abiertos o menos, con 69,57 % (16/23), para el rango de días abiertos de 61-91 días se observó una frecuencia de 50%, mientras que para el rango de 91 a 120 días presentó el valor menor, con 40,00 % (2/5). las vacas con más de 120 días registraron 53,85 %, y el grupo no determinado alcanzó el 50,00 %.

Tabla 4. *Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según los días abiertos*

Días abiertos	Positivas	Negativas	Total	Frec. (%)	Part. (%)
≤60 días	16	7	23	69,57	31,37
61–90 días	6	6	12	50,00	11,76
91–120 días	2	3	5	40,00	3,92
>120 días	14	12	26	53,85	27,45
No determinado	13	13	26	50,00	25,49
Total	**51**	**41**	**92**	**55,43**	**100,00**

Nota. La frecuencia dentro del grupo se calculó con el total de bovinos de cada intervalo; la distribución de positivos expresa la participación (Part.) de cada categoría dentro de las 51 muestras positivas.

Basbas et al. (2022) encontraron que el incremento de los días en leche o días abiertos se relacionó con menores probabilidades de recuperar *E. coli* en vacas con metritis o secreción purulenta, resultado parcialmente compatible con la mayor proporción observada en el intervalo de hasta 120 días abiertos.

La presencia de 26 registros sin determinación de días abiertos, equivalente al 28,26 % de la muestra, reduce la precisión de la comparación entre intervalos. Es preciso tomar en cuenta que los animales no contaron con una clasificación clínica uniforme de metritis o endometritis y que los datos reproductivos procedieron de registros con diferente nivel de disponibilidad.

9.4 Distribución según la edad de los bovinos

Las vacas mayores de cinco años presentaron la frecuencia más alta, con 80,95 % (17/21), mientras los grupos menores de tres años y de tres a cinco años alcanzaron 50,00 % (1/2) y 48,00 % (12/25), respectivamente. El grupo sin edad determinada reunió 44 animales y presentó el 47,73 % de positividad, por tanto, la elevada cantidad de registros incompletos impide establecer una tendencia firme asociada con la edad (Tabla 5).

Tabla 5. *Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según la edad.*

Edad	Positivas	Negativas	Total	Frec. (%)	Part. (%)
< 3 años	1	1	2	50,00	1,96
3–5 años	12	13	25	48,00	23,53
> 5 años	17	4	21	80,95	33,33
No determinada	21	23	44	47,73	41,18
Total	**51**	**41**	**92**	**55,43**	**100,00**

Nota. La edad no estuvo disponible en 44 bovinos, cantidad equivalente al 47,83 % del total analizado.

Mekibib et al. (2024) documentaron asociaciones de la infección uterina con antecedentes como retención de membranas fetales, distocia y aborto, factores que pueden coexistir con la edad sin depender exclusivamente de ella. Los datos presentados permiten describir una proporción mayor en vacas de más de cinco años, pero no demuestran que la edad haya aumentado la probabilidad de crecimiento bacteriano.

9.5 Distribución según el número de partos

Las vacas de segundo parto registraron 72,73 % de muestras positivas, seguidas por aquellas con cinco o más partos, con 70,00 %, y por el grupo de tres a cuatro partos, con 64,29 %. Las primíparas presentaron 40,00 %, aunque la ausencia del número de partos en 42 bovinos limita la representatividad de las diferencias observadas (Tabla 6)

Tabla 6. *Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según el número de partos.*

Número de partos	Positivas	Negativas	Total	Frec. (%)	Part. (%)
1 parto	6	9	15	40,00	11,76
2 partos	8	3	11	72,73	15,69
3–4 partos	9	5	14	64,29	17,65
≥5 partos	7	3	10	70,00	13,73
No determinado	21	21	42	50,00	41,18
Total	**51**	**41**	**92**	**55,43**	**100,00**

Nota. El número de partos no se determinó en 42 bovinos, equivalente al 45,65 % de las unidades estudiadas.

La literatura reconoce la paridad como una variable que puede acompañar otros factores predisponentes de infección uterina, entre ellos las dificultades del parto, la retención placentaria y el estado inmunitario (Mekibib et al., 2024).

9.6 Distribución según la producción diaria de leche

El nivel de producción alta registró 69,23 % de muestras positivas, mientras los niveles medio y bajo presentaron 58,33 % y 57,14 %, respectivamente. La diferencia fue descriptiva y no permite establecer una relación entre mayor producción y presencia bacteriana, en especial porque más de la mitad de los animales careció de un registro productivo disponible (Tabla 7)

Tabla 7. *Frecuencia de muestras con aislamiento de Escherichia coli según el nivel de producción de leche.*

Nivel de producción	Positivas	Negativas	Total	Frec. (%)	Part. (%)
Baja(<10L)	4	3	7	57,14	7,84
Media(10-20L)	14	10	24	58,33	27,45
Alta (>20)	9	4	13	69,23	17,65
No determinada	24	24	48	50,00	47,06
Total	**51**	**41**	**92**	**55,43**	**100,00**

Nota. Los niveles bajo, medio y alto corresponden a la clasificación utilizada en la base de datos del estudio. La producción no estuvo determinada en 48 bovinos, equivalente al 52,17 % del total.

Basbas et al. (2022) describieron que la metritis puede acompañarse de reducción en la producción de leche y deterioro del desempeño reproductivo, pero la presente investigación midió la producción junto con el resultado microbiológico en un único periodo. El diseño transversal impide determinar si el nivel productivo precedió a la presencia de *E. coli,* si fue una consecuencia de la condición uterina o si dependió de otros factores del hato.

9.7 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

La totalidad de los aislamientos fue susceptible a cefotaxima y cefoxitina, mientras amoxicilina con ácido clavulánico y ceftazidima alcanzaron 98,04 % de susceptibilidad. Ampicilina presentó cinco aislamientos resistentes, equivalentes al 9,80 %, mientras cefazolina mostró la mayor variabilidad, con 23,53 % de resultados intermedios y 3,92 % de resistencia (Tabla 8).

Tabla 8. *Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los 51 aislamientos de Escherichia coli.*

Antimicrobiano	Susceptible n (%)	Intermedio n (%)	Resistente n (%)
Cefotaxima (CTX)	51 (100,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC)	50 (98,04 %)	1 (1,96 %)	0 (0,00 %)
Ceftazidima (CAZ)	50 (98,04 %)	0 (0,00 %)	1 (1,96 %)
Ampicilina (AMP)	46 (90,20 %)	0 (0,00 %)	5 (9,80 %)
Cefazolina (KZ)	37 (72,55 %)	12 (23,53 %)	2 (3,92 %)
Cefoxitina (FOX)	51 (100,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)

Nota. La clasificación S, I y R se realizó con los puntos de corte consignados en la metodología. Los resultados describen el comportamiento fenotípico de los aislamientos bajo las condiciones del ensayo.

Agrawal et al. (2021) encontraron resistencia de 95,00 % a ampicilina, 87,50 % a cefotaxima, 17,50 % a ceftazidima, 20,00 % a amoxicilina con ácido clavulánico y 25,00 % a cefoxitina en aislamientos uterinos de vacas con infección posparto. La menor resistencia registrada en esta investigación puede relacionarse con una población sin diagnóstico clínico uniforme, el uso de identificación presuntiva en EMB y la inclusión de todos los aislamientos recuperados, no solo de cepas previamente seleccionadas por resistencia.

Basbas et al. (2022) clasificaron como resistentes a ampicilina todos los aislamientos intrauterinos evaluados, mientras Zhang et al. (2024) informaron resistencia a ampicilina y multirresistencia en la totalidad de sus cepas productoras de BLEE. La diferencia confirma que un conjunto general de aislamientos presuntivos no debe compararse de forma directa con colecciones integradas únicamente por bacterias con endometritis clínica o producción confirmada de BLEE.

La respuesta favorable frente a cefotaxima y ceftazidima en la mayoría de las muestras no excluye otros mecanismos de resistencia, pues la clasificación dependió de los halos obtenidos y de los criterios de interpretación adoptados. La identificación bioquímica o molecular de *E. coli*, junto con controles de calidad y confirmación genética, aumentaría la precisión de las comparaciones posteriores.

9.8 Selección de aislamientos para la prueba fenotípica de BLEE

Seis aislamientos presentaron resistencia o disminución de susceptibilidad frente a uno o más betalactámicos y fueron seleccionados para la prueba de sinergia. M18 reunió el patrón más amplio, con resistencia a ceftazidima y ampicilina, además de categorías intermedias frente a amoxicilina con ácido clavulánico y cefazolina (Tabla 9)

Tabla 9. *Aislamientos seleccionados para la prueba de sinergia según el patrón fenotípico observado*

Código	Patrón observado en el antibiograma
U10	Resistencia a cefazolina
M15	Resistencia a ampicilina y susceptibilidad intermedia a cefazolina
M18	Resistencia a ceftazidima y ampicilina; susceptibilidad intermedia a amoxicilina con ácido clavulánico y cefazolina
M23	Resistencia a ampicilina y cefazolina
T5	Resistencia a ampicilina y susceptibilidad intermedia a cefazolina
C1	Resistencia a ampicilina

Nota. Perfiles de resistencia de los aislados seleccionados para la prueba de sinergia.

La resistencia aislada a ampicilina o cefazolina no confirma la producción de BLEE, pues puede asociarse con enzimas de espectro diferente u otros mecanismos bacterianos. Agrawal et al. (2021) aplicaron un tamizaje inicial y posteriormente utilizaron métodos de disco combinado y doble disco, secuencia metodológica que diferencia la sospecha fenotípica de la confirmación mediante inhibición por clavulanato.

9.9 Resultados individuales de la prueba de sinergia

Las muestras U10, M18, T5 y C1 presentaron interacción hacia el disco de amoxicilina con ácido clavulánico, razón por la cual fueron clasificadas como productoras fenotípicas de BLEE. M15 y M23 no mostraron sinergia, aunque conservaron perfiles de resistencia frente a determinados betalactámicos, resultado que confirma que el antibiograma inicial funciona como tamizaje y no como prueba confirmatoria (Tabla 10).

Tabla 10. *Halos e interacción con ácido clavulánico en los aislamientos sometidos a la prueba de sinergia*

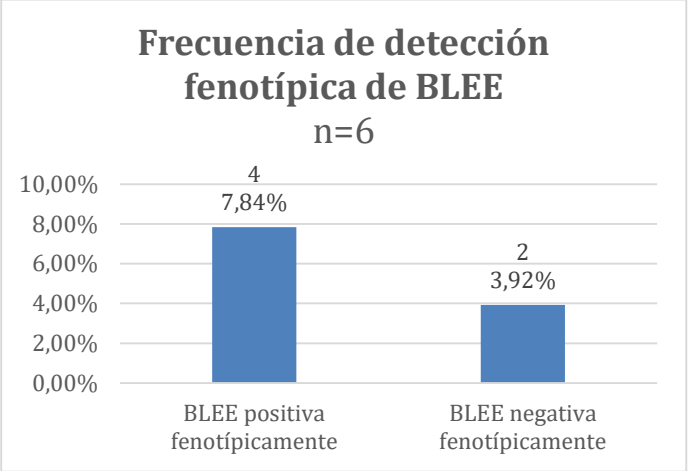
Código	CTX (mm)	AMC (mm)	CAZ (mm)	Sinergia con AMC	Estado
M18	35	30	35	Presente	Positiva
U10	40	30	32	Presente	Positiva
T5	40	30	25	Presente	Positiva
M23	30	20	26	Ausente	Negativa
M15	29	21	27	Ausente	Negativa
C1	39	30	33	Presente	Positiva

Nota. La positividad fenotípica se estableció por la ampliación o deformación del halo de cefotaxima o ceftazidima en dirección al disco de amoxicilina con ácido clavulánico.

La respuesta positiva demuestra una actividad enzimática compatible con inhibición por ácido clavulánico, pero no identifica la familia genética responsable. Zhang et al. (2024) complementaron la detección de BLEE mediante medios selectivos, PCR y secuenciación, mientras el presente estudio se limitó a la expresión fenotípica observada durante la prueba de sinergia.

La positividad fenotípica fue de 66,67 % entre las seis muestras sometidas a sinergia y de 7,84 % respecto de los 51 aislamientos compatibles con *E. coli*. El segundo porcentaje debe presentarse como proporción identificada mediante el procedimiento aplicado, debido a que 45 aislamientos no ingresaron a la prueba confirmatoria y no pueden considerarse negativos.

Figura 3 *Frecuencia de detección fenotípica de BLEE*



Nota. Las 45 muestras no sometidas a sinergia no se clasificaron como negativas para BLEE. El 7,84 % corresponde a los cuatro resultados positivos dentro de los 51 aislamientos evaluados mediante antibiograma, según el esquema de selección aplicado.

Zhang et al. (2024) informaron 23,04 % de productores de BLEE en aislamientos procedentes de vacas con endometritis clínica, mientras Agrawal et al. (2021) confirmaron 39 de 40 aislamientos uterinos como productores de BLEE mediante pruebas fenotípicas y genotípicas. La proporción menor de esta investigación puede relacionarse con diferencias en la población, el algoritmo de selección, la ausencia de confirmación molecular y la inclusión de bovinos con antecedentes reproductivos diversos, sin un diagnóstico uniforme de enfermedad uterina.

En el ámbito nacional, Calvopiña Montenegro et al. (2024) documentaron una prevalencia marcadamente mayor en hatos lecheros de Pichincha, identificando Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el 51.1 % (93/182) de muestras fecales. La discrepancia observada con respecto al 7.84 % registrado en la presente investigación obedece fundamentalmente a divergencias en el nicho ecológico y la metodología de muestreo: la gastroenterología fecal representa un reservorio comensal de alta densidad microbiana que favorece la recuperación de bacterias resistentes, a diferencia de los aislamientos uterinos procedentes de hembras bovinas con patologías reproductivas evaluados en este trabajo.

Tendencias epidemiológicas elevadas han sido reportadas también en Perú por Salgado-Caxito et al. (2025), quienes estimaron una tasa de portación fecal cercana al 75 % en bovinos lecheros de pequeña escala, detectando la bacteria en la casi totalidad de los predios. Si bien el procedimiento de aislamiento e inoculación selectiva fecal explica tal diferencia cuantitativa, ambos hallazgos concuerdan en posicionar a la ganadería bovina como un reservorio crítico de enterobacterias con resistencia mediada por betalactamasas.

En Brasil, Palmeira et al. (2020) reportaron un 17.8 % (34/191) de aislamientos BLEE distribuidos en el 68.2 % de los establecimientos muestreados, caracterizando el gen blaCTX-M-8 ligado al plásmido IncI1/pST113 en linajes poliglonales. La transferencia horizontal de estos elementos genéticos móviles justifica la diseminación entre predios no vinculados epidemiológicamente, un mecanismo molecular cuya caracterización trascendió el alcance fenotípico de este estudio. Complementariamente, Sartori et al. (2024) demostraron en ese mismo país la colonización endémica de E. coli BLEE de alto riesgo bajo el enfoque One Health en hatos con presión de selección por uso profiláctico de antimicrobianos, lo que remarca que el perfil de sinergia evaluado localmente confirma la expresión del fenotipo, pero requiere secuenciación genómica para precisar el linaje y sus determinantes de resistencia.

En Chile, Benavides et al. (2021) evidenciaron la presencia del grupo blaCTX-M en el microbiota fecal de rumiantes domésticos. La detección fenotípica mediante combinación de discos realizada en esta investigación confirma el mecanismo enzimático de inactivación, pero exige la futura implementación de métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para precisar la variante génica participante (blaCTX-M, blaSHV o blaTEM).

Por su parte, la evidencia generada en Argentina por Agostina et al. (2025) en 545 cepas de E. coli demostró una mayor probabilidad de multirresistencia en la categoría de terneros en comparación con vacas en lactancia. Aunque el parámetro analizado no fue estrictamente la producción de BLEE, reafirma la distribución heterogénea de la resistencia según el grupo etario y el manejo del hato, condicionando la extrapolación de los resultados de este estudio hacia la totalidad de la cabaña bovina de la Sierra Centro ecuatoriana.

La diferenciación entre multirresistencia y producción específica de BLEE constituye un aspecto crítico documentado por Custódio et al. (2024) en terneros brasileños. Los autores identificaron que el patrón de resistencia múltiple no implica necesariamente la presencia de

betalactamasas de espectro extendido. Esta premisa justificó el empleo obligatorio de la prueba confirmatoria con ácido clavulánico sobre la fase de tamizaje por antibiograma en esta investigación, previniendo falsos positivos por mecanismos alternativos de resistencia a β-lactámicos.

Esta aproximación metodológica coincide con los hallazgos experimentales de Patricio et al. (2022) en Brasil, donde solo el 36.8 % (7/19) de las cepas con perfiles de resistencia compatibles fueron confirmadas fenotípicamente mediante la técnica de doble disco. Tal comportamiento concuerda con la dinámica observada en esta serie, donde cuatro de los seis aislamientos sospechosos confirmaron la sinergia con el inhibidor enzimático, respaldando la necesidad de este paso confirmatorio.

10 IMPACTOS

10.1 Impacto técnico

La investigación generó información microbiológica sobre 92 muestras uterinas de bovinos con antecedentes reproductivos, entre las cuales 51 presentaron crecimiento compatible con *Escherichia coli* en agar EMB; el antibiograma permitió reconocer seis aislamientos con patrones de sospecha frente a los betalactámicos, de los cuales cuatro mostraron sinergia positiva con el ácido clavulánico. Es decir, a través de la presente investigación se generó información microbiológica sobre la presencia de *E. coli* productora de BLEE en muestras uterinas de bovinos con alteraciones reproductivas, generando una línea base del perfil de susceptibilidad antimicrobiana en animales de producción, sin atribuir una identificación bacteriana definitiva ni la presencia de genes específicos de resistencia. Esta evidencia resulta útil para el futuro establecimiento de programas de vigilancia bajo el enfoque One Health (Agrawal et al., 2021; Zhang et al., 2024). Además, los procedimientos empleados pueden servir como referencia para nuevas investigaciones sobre resistencia antimicrobiana en muestras uterinas bovinas. La conservación de los aislamientos también ofrece la posibilidad de repetir las pruebas fenotípicas o desarrollar análisis genéticos posteriores.

10.2 Impacto social

La investigación contribuyó a examinar la resistencia antimicrobiana en aislados de muestras uterinas de bovinos y permite ser la base para estudios mediante el enfoque de Una Sola Salud, bajo el cual la sanidad animal mantiene una relación estrecha con la salud humana y ambiental. La Organización Mundial de la Salud (2023) reconoce que el uso inadecuado de antimicrobianos favorece la selección y propagación de microorganismos resistentes, razón por la cual la vigilancia microbiológica en los sistemas pecuarios constituye una medida necesaria para orientar prácticas sanitarias responsables. La información obtenida favorece una mayor comprensión de la necesidad de realizar cultivos y pruebas de susceptibilidad antes de seleccionar un tratamiento, debido a que la administración empírica de medicamentos puede reducir la eficacia terapéutica y favorecer la permanencia de bacterias resistentes.

10.3 Impacto económico

La detección de crecimiento compatible con *E. coli* y la determinación de su perfil de susceptibilidad aportaron información que puede orientar la selección de tratamientos en bovinos con antecedentes reproductivos, reduciendo la administración repetida de medicamentos sin una respuesta favorable. La aplicación de tratamientos basados en resultados microbiológicos podría disminuir los gastos asociados con fármacos ineficaces, consultas veterinarias sucesivas, prolongación de los días abiertos, descarte anticipado de animales y reducción de la eficiencia productiva.

Botero et al. (1987) determinaron que la producción disminuyó aproximadamente 3,8 L de leche por cada día abierto adicional después de los 100 días, relación que permite dimensionar la repercusión productiva de los retrasos reproductivos. Bajo dicha estimación, una prolongación de 10 días representaría cerca de 38 L de leche menos por vaca, mientras que 30 días equivaldrían a 114 L y 50 días a 190 L; por consiguiente, la identificación oportuna de alteraciones uterinas, junto con la selección apropiada del tratamiento, podría contribuir a reducir pérdidas productivas en los hatos evaluados.

11 PRESUPUESTO DEL PROYECTO

El presupuesto para el presente proyecto fue detallado en el Anexo 2.

12 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.1 Conclusiones

La frecuencia de muestras uterinas con crecimiento compatible con *Escherichia coli* fue del 55,43 %, correspondiente a 51 de los 92 bovinos evaluados. La distribución presentó variaciones entre provincias, días abiertos, edad, número de partos y producción de leche.

El perfil de susceptibilidad mostró predominio de aislamientos sensibles frente a los antimicrobianos evaluados, con 100 % de susceptibilidad a cefotaxima y cefoxitina, 98,04 % a amoxicilina más ácido clavulánico y ceftazidima, además de 90,20 % a ampicilina. Cefazolina presentó la mayor variabilidad, con 72,55 % de susceptibilidad, 23,53 % de resultados intermedios y 3,92 % de resistencia, mientras ampicilina concentró la mayor resistencia, con 9,80 %.

Seis aislamientos fueron seleccionados para la prueba de sinergia según los patrones fenotípicos observados, de los cuales U10, M18, T5 y C1 presentaron interacción positiva con el ácido clavulánico, mientras M15 y M23 fueron negativos. Las cuatro muestras positivas representaron el 66,67 % de los aislamientos sospechosos y el 7,84 % de los 51 aislados evaluados mediante antibiograma.

12.2 Recomendaciones

Confirmar la identidad de los aislamientos compatibles con *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas, sistemas automatizados o técnicas moleculares, con el propósito de aumentar la precisión microbiológica y diferenciar esta especie de otras enterobacterias con características semejantes en agar EMB.

Incorporar la detección molecular de los genes blaCTX-M, blaTEM y blaSHV en los aislamientos con sinergia positiva, además de examinar otros mecanismos de resistencia en las muestras con perfiles alterados y resultado negativo para BLEE. La comparación entre fenotipo y genotipo facilitaría una caracterización más precisa de la resistencia a los betalactámicos.

Fortalecer el registro de tratamientos antimicrobianos, antecedentes reproductivos y producción de leche en las unidades ganaderas, debido a que la ausencia de información completa limita el análisis de posibles factores relacionados con la recuperación de bacterias uterinas.

Promover el cultivo microbiológico y la evaluación de susceptibilidad antes de administrar antibióticos a vacas con alteraciones reproductivas, evitando tratamientos repetidos sin respaldo de laboratorio. La selección dirigida del medicamento puede disminuir gastos veterinarios, retrasos reproductivos y pérdidas productivas asociadas con la prolongación de los días abiertos y, por ende, ayudará a controlar indirectamente la RAM.

13 BIBLIOGRAFIA

Agostina, P., Boidi, F. J., Welschen, N., Cicotello, J., Alvarado, W., Aliprandi, D., et al. (2025). Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from dairy farms (Santa Fe province, Argentina). Brazilian Journal of Microbiology, 56(3), 2133–2142.

Agrawal, S., Singh, A. P., Singh, R., Prabhu, S. N., & Agrawal, J. (2023). RECOVERY OF CARBAPENEM RESISTANT ENDOMETRIAL BACTERIAL ISOLATES FROM POSTPARTUM ENDOMETRITIS IN DAIRY CATTLE. JIVA, 21(3), 20-33. https://doi.org/10.55296/JIVA/21.3.2023.20-33

Agrawal, S., Singh, A. P., Singh, R., Saikia, R., Choudhury, S., Shukla, A., Prabhu, S. N., & Agrawal, J. (2021). Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli isolated from postpartum uterine infection in dairy cattle in India. Veterinary World, 14(1), 200-209. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.200-209

Al Amin, Md., Pasha, M. H., Hoque, M. N., Siddiki, A. Z., Saha, S., & Kamal, Md. M. (2022). Methodology for laboratory-based antimicrobial resistance surveillance in animals. Veterinary World, 1066-1079. https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1066-1079

American Type Culture Collection. (2025). ATCC: The Global Bioresource Center. https://www.atcc.org. https://www.atcc.org/

Anand, U., Vaishnav, A., Sharma, S. K., Sahu, J., Ahmad, S., Sunita, K., Suresh, S., Dey, A., Bontempi, E., Singh, A. K., Proćków, J., & Shukla, A. K. (2022). Current advances and research prospects for agricultural and industrial uses of microbial strains available in world collections. Science of The Total Environment, 842, 156641. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156641

Baba, M. S., Mohamad Zin, N., Ahmad, S. J., Mazlan, N. W., Baharum, S. N., Ahmad, N., & Azmi, F. (2021). Antibiotic Biosynthesis Pathways from Endophytic Streptomyces SUK 48 through Metabolomics and Genomics Approaches. Antibiotics, 10(8), 969. https://doi.org/10.3390/antibiotics10080969

Basbas, C., Garzon, A., Silva-del-Rio, N., Byrne, B. A., Karle, B., Aly, S. S., Champagne, J. D., Williams, D. R., Lima, F. S., Machado, V. S., & Pereira, R. V. (2022a). Evaluation of

antimicrobial resistance and risk factors for recovery of intrauterine Escherichia coli from cows with metritis on California commercial dairy farms. Scientific Reports, 12, 13937. https://doi.org/10.1038/s41598-022-18347-w

Bastidas-Caldes, C., Romero-Alvarez, D., Valdez-Vélez, V., Morales, R. D., Montalvo-Hernández, A., Gomes-Dias, C., & Calvopiña, M. (2022). Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Escherichia coli in South America: A Systematic Review with a One Health Perspective. Infection and Drug Resistance, Volume 15, 5759-5779. https://doi.org/10.2147/IDR.S371845

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology, 45(4_ts), 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493

Becker, A. A. M. J., Munden, S., McCabe, E., Hurley, D., Fanning, S., Chapwanya, A., & Butaye, P. (2023). The endometrial microbiota: 16S rRNA gene sequence signatures in healthy, pregnant and endometritis dairy cows. Veterinary Sciences, 10(3), 215. https://doi.org/10.3390/vetsci10030215.

Benavides, J. A., Salgado-Caxito, M., Opazo-Capurro, A., González Muñoz, P., Piñeiro, A., Otto Medina, M., et al. (2021). ESBL-producing Escherichia coli carrying CTX-M genes circulating among livestock, dogs, and wild mammals in small-scale farms of central Chile. Antibiotics, 10, 510.

Calvopiña Montenegro, P. C., de Janon González, D. S., Medina Santana, J. L., Vargas, R. J., Ron Garrido, L., Proaño Pérez, F., & Vinueza, C. (2024). Presencia y resistencia antimicrobiana de Escherichia coli BLEE en muestras fecales de bovinos productores de leche al norte de Ecuador. Siembra, 11(2), 7.

CDC. (2025, diciembre 1). Outbreak Specimen Collection. Foodborne Outbreaks. https://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/php/confirming-cause/specimen-collection.html

Champ, C. W., & Sills, A. V. (2022). Process, Population, and Sample: The Researcher's Interest (arXiv:2206.08376). arXiv. https://doi.org/10.48550/arXiv.2206.08376

Chaudhary, M. K., Jadhav, I., & Banjara, M. R. (2023). Molecular detection of plasmid mediated blaTEM, blaCTX−M,and blaSHV genes in Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Escherichia coli from clinical samples. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 22(1), 33. https://doi.org/10.1186/s12941-023-00584-0

Chester R. & Cooper, Jr. (2019). Tabla de diámetro de la zona de difusión del disco. https://crcooper01.people.ysu.edu/microlab/ast-chart.pdf

CLSI. (2026). Breakpoint Implementation Toolkit (BIT) | Resources | CLSI. https://clsi.org/resources/breakpoint-implementation-toolkit/

Collis, R. M., et al. (2022). Prevalence and distribution of extended-spectrum β-lactamase and AmpC-producing Escherichia coli in two New Zealand dairy farms. Frontiers in Microbiology, 13, 960748.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. (2014). 7.6. Momento del servicio y fertilidad. https://repository.agrosavia.co/server/api/core/bitstreams/9db14364-1ad7-42af-8d19-c7856b17ecac/content

Custódio, D. A., Pereira, C., Gonçalves, M., Costa, A. C. T. R. B., de Oliveira, P. D., da Silva, B. H. P., et al. (2024). Antimicrobial resistance and public and animal health risks associated with pathogenic Escherichia coli isolated from calves. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.

Dameanti, F. N. A. E. P., Akramsyah, M. A., Hasan, C. S. Y., Amanda, J. T., Pratama, A. R., Fahmiantika, R., et al. (2022). Risk factors and incidence of Escherichia coli producing extended-spectrum β-lactamase (ESBL) in dairy cattle. Jurnal Medik Veteriner, 5(2), 213–218.

Deza Calsin, H. W., Mamani, G. E., Macedo, R., Alencastre, R. G., & Gomez, C. A. (2020). Evaluación de la salud uterina por citología endometrial y ultrasonografía en el posparto y su relación con la concepción en alpacas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 30(4), 1619-1628. https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.15549

Dhurba Giri. (2025). CLSI M100 Ed36—Referencia de antibióticos e intérprete de difusión en disco. https://laboratorytests.org/block.php

EUCAST. (2025). EUCAST: Disk Diffusion and Quality Control. https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/

Garzon, A., Basbas, C., Schlesener, C., Silva-del-Rio, N., Karle, B. M., Lima, F. S., Weimer, B. C., & Pereira, R. V. (2024). WGS of intrauterine E. coli from cows with early postpartum uterine infection reveals a non-uterine specific genotype and virulence factors. mBio, 15(6), e01027-24. https://doi.org/10.1128/mbio.01027-24

Gelalcha, B. D., et al. (2023). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in dairy cattle. Frontiers in Veterinary Science.

Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A., & Sota, R. L. de la. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. Journal of Dairy Science, 96(6), 3621-3631. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5922

Gobikrushanth, M., Dos Santos, S. J., Champika, F., Hill, J. E., & Dadarwal, D. (2024). Uterine microbial profiles in healthy postpartum dairy cows do not vary with sampling techniques or phases of estrous cycle. Theriogenology, 214, 298-306. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.11.004.

Hernández-Sampieri, R. (2022). Metodología de la investigación – 6ta edición – AAGG. https://aagg.org.ar/index.php/2022/09/20/metodologia-de-la-investigacion-6ta-edicion/

Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. Mc Graw Hill Education. https://virtual.cuautitlan.unam.mx/rudics/?p=2612

Hossain, M. K., Uddin, A., Yasmin, N., Hossain, M. M., Lucky, N. S., Haque, M. M., Aktaruzzaman, M., & Alam, S. (2015). Risk factors of postpartum uterine infection and its subsequent effect on fertility of crossbred dairy cows in Bangladesh. International Journal of Natural Sciences, 5(2), 107-111. https://doi.org/10.3329/ijns.v5i2.28634

Human Foods Program. (2024). BAM Media M192: Buffered Peptone Water (BPW). FDA. https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m192-buffered-peptone-water-bpw

Jason Tuner. (2014). Reproductive Tract Anatomy and Physiology of the Cow.

Jaureguiberry, M., Madoz, L. V., Giuliodori, M. J., Wagener, K., Prunner, I., Grunert, T., Ehling-Schulz, M., Drillich, M., & de la Sota, R. L. (2016). Identification of Escherichia coli and Trueperella pyogenes isolated from the uterus of dairy cows using routine bacteriological testing and Fourier transform infrared spectroscopy. Acta Veterinaria Scandinavica, 58, 81. https://doi.org/10.1186/s13028-016-0262-z

Jiménez Mejía, R., Gudiño Sosa, L. F., Aguilar López, J. A., Loeza Lara, P. D., Jiménez Mejía, R., Gudiño Sosa, L. F., Aguilar López, J. A., & Loeza Lara, P. D. (2017). Caracterización molecular de Escherichia coli resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 8(4), 387-396. https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251

Khehra, N., Padda, I. S., & Zubair, M. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). En StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/

Kholik, K. (2022). DETECTION OF ANTIBIOTIC RESISTANT IN Escherichia coli FROM THE REPRODUCTIVE TRACT OF BALI CATTLE ON SMALLHOLDER FARM. Jurnal Biosains Pascasarjana, 24(1SP), 44-53. https://doi.org/10.20473/jbp.v24i1SP.2022.44-53

Koirala, N., Khusro, A., & Malla, S. (2022). Editorial: Trends in applications and improved production of biologically active metabolites using microbial fermentations. Frontiers in Microbiology, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1065888

Kudo, H., Sugiura, T., Higashi, S., Oka, K., Takahashi, M., Kamiya, S., Tamura, Y., & Usui, M. (2021). Characterization of reproductive microbiota of primiparous cows during early postpartum periods in the presence and absence of endometritis. Frontiers in Veterinary Science, 8, 736996. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.736996.

Lee, S., Teng, L., DiLorenzo, N., Weppelmann, T. A., & Jeong, K. C. (2020). Prevalence and molecular characteristics of extended-spectrum and AmpC β-lactamase-producing Escherichia coli in grazing beef cattle. Frontiers in Microbiology, 10, 3076.

Ma, Z., Ginn, A., Kang, M., Galvão, K. N., & Jeong, K. C. (2018). Genomic and Virulence Characterization of Intrauterine Pathogenic Escherichia coli With Multi-Drug Resistance

Isolated From Cow Uteri With Metritis. Frontiers in Microbiology, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03137

Marín-Campos, Y. (2004). III. Estrategias instruccionales para la enseñanza de las ciencias básicas. Gaceta médica de México, 140(3), 309-311.

Mekibib, B., Belachew, M., Asrade, B., Badada, G., & Abebe, R. (2024). Incidence of uterine infections, major bacteria and antimicrobial resistance in postpartum dairy cows in southern Ethiopia. BMC Microbiology, 24(1), 4. https://doi.org/10.1186/s12866-023-03160-w

Menocal, A. (2022). Antibiograma de Escherichia coli y Salmonella Enterococcus spp. Campylobacter spp. https://rr-americas.woah.org/app/uploads/2022/12/sp_antibiograma_menocal_17-8-22.pdf

MERCK. (2026). Nutrient Broth—Standard 1 NB. https://www.merckmillipore.com/VE/es/product/sial/70122?utm_source=chatgpt.com

Montegu, J., Saporito, N. F., & Polakiewicz, Z. (2026). The evolution of the biotechnology sector: Implications for FDI and SME linkages across Europe (75.a ed., OECD SME and Entrepreneurship Papers) [OECD SME and Entrepreneurship Papers]. https://doi.org/10.1787/420bb546-en

Montenegro, P. C. C., González, D. S. de J., Santana, J. L. M., Vargas-Estrella, J., Ron-Garrido, L., Proaño-Pérez, F., & Vinueza-Burgos, C. (2024). Presencia y resistencia antimicrobiana de Escherichia coli BLEE en muestras fecales de bovinos productores de leche al norte de Ecuador. Siembra, 11(2), e6542-e6542. https://doi.org/10.29166/siembra.v11i2.6542

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. (2023, octubre 23). Una sola salud. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health

Palmeira, J. D., Haenni, M., Métayer, V., Madec, J. Y., & Ferreira, H. M. N. (2020). Epidemic spread of IncI1/pST113 plasmid carrying the extended-spectrum beta-lactamase blaCTX-M-8 gene in Escherichia coli of Brazilian cattle. Veterinary Microbiology, 243, 108629.

Patricio, T. C. C., Farias, B. O., Santiago, G. S., Souza, V. R. S., Pimenta, R. L., Oliveira, C. C., et al. (2022). Production of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated

from poultry in Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, 44, e001722.

Penati, M., Musa, L., Filippone Pavesi, L., Guaraglia, A., Ulloa, F., Moroni, P., Piccinini, R., & Addis, M. F. (2024). Multidrug-resistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in a dairy herd: Distribution and antimicrobial resistance profiles. Antibiotics, 13(3), 241.

Petrin, S., Orsini, M., Massaro, A., Olsen, J. E., Barco, L., & Losasso, C. (2023). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance correlation and plasmid characterization in Salmonella spp. Isolates from Italy reveal high heterogeneity among serovars. Frontiers in Public Health, 11. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1221351

R Core Team. (2026). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing

Rhea, S., Gensler, C., Atlaw, N., Pairis-Garcia, M., Lewbart, G. A., Valentine, A., Cruz, M., Castillo, P., Vélez, A., Trueba, G., & Jacob, M. E. (2024). Presence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Food-Producing and Companion Animals and Wildlife on Small-Holder Farms of Floreana Island, Galápagos Islands. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 24(1), 36-45. https://doi.org/10.1089/vbz.2023.0044

Salgado-Caxito, M., Léon, D., Bardales, O., Jara, L. M., Medrano, P., Murga, C., et al. (2025). Unexplained high prevalence of ESBL-Escherichia coli among cattle and pigs in Peru. Antibiotics, 14(9), 867.

Sartori, L., et al. (2024). Gut colonization by extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in dairy herd in Brazil: Successful dissemination of a One Health clone.

Senaratne, W. M. T. N., & Jayaweera, J. A. A. S. (2024). Comparison of Microbial Preservation Methods: A Narrative Review. Germs, 14(4), 375-386. https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447

Shafique, L., Wu, S., Ali, M. M., Ijaz, M., Muhammad Aamir Naseer, Sarwar, Z., Ahmed, R., Arslan Saleem, Qudratullah, Abdullah Saghir Ahmad, Pan, H., & Liu, Q. (2021). Seguimiento basado en la evidencia de E. coli multirresistente en la endometritis bovina y

su eliminación mediante terapias novedosas y eficaces—PMC. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8388920/?utm_source=chatgpt.com

Snow, L. C., Warner, R. G., Cheney, T., Wearing, H., Stokes, M., Harris, K., Teale, C., & Coldham, N. (2012). Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase Escherichia coli (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. Preventive Veterinary Medicine

TermoFisher SCIENTIFIC. (2026). McConkey Agar No. 3 (Dehydrated) 2.5kg | Contact Us | Thermo ScientificTM | thermofisher.com. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0115R

Thompson, W. L., White, G. C., & Gowan, C. (1998). Chapter 3—Enumeration Methods. En Monitoring Vertebrate Populations (pp. 75-121). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012688960-4/50003-4

Wei, S., Ding, B., Wang, G., Luo, S., Zhao, H., & Dan, X. (2024). Population characteristics of pathogenic Escherichia coli in puerperal metritis of dairy cows in Ningxia region of China: A systemic taxa distribution of virulence factors and drug resistance genes. Frontiers in Microbiology, 15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1364373

Werner, A., Suthar, V., Plöntzke, J., & Heuwieser, W. (2012). Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. Journal of Dairy Science, 95(12), 7105-7114. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5627

WOAH. (2024). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2021—6ème dition. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm

Yadav, V., Joshi, R. K., Joshi, N., Kumar, A., Singh, S. V., & Niyogi, D. (2022). Detection and Molecular Characterization of Extended-spectrum β-lactamase Producing E. coli and Klebsiella spp. Isolates of Cattle Origin in Eastern Plain Zone of Uttar Pradesh. Indian Journal of Animal Research, (Of). https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4762

Zhang, K., Feng, H., Zhang, J., Guo, Z., Yan, Z., Wang, G., Wang, X., Wang, L., & Li, J. (2024). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β–lactamase—

Producing Escherichia coli isolates from dairy cattle with endometritis in Gansu Province, China. BMC Veterinary Research, 20(1), 19. https://doi.org/10.1186/s12917-023-03868-x