



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARA

**Presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y
betalactámicos en *Proteus mirabilis* aislados en carne de pollo en el
cantón Ambato**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO
AGRÓNOMO/MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

Fiallos Barros Lizbeth Estefanía

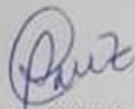
TUTOR:

Dra. SANDRA CRUZ, PhD

CEVALLOS, 2024

"Presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en *Proteus mirabilis* aislados en carne de pollo en el cantón Ambato"

REVISADO Y APROBADO POR:

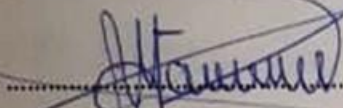


Dra. Sandra Cruz PhD.

TUTORA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

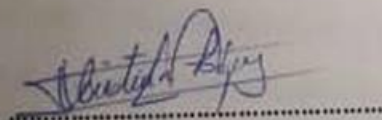
FECHA:



Ing. Patricio Nuñez, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

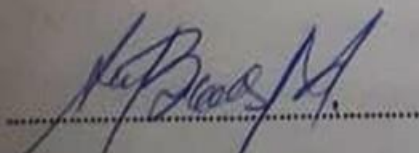
08/08/2024



BOF. Mg. Isabel Cristina López Villacis

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

08/08/2024



MVZ. Mg. Ana Rafaela Burgos Mayorga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

08/08/2024

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, Lizbeth Estefanía Fiallos Barros, portador de cédula de ciudadanía número: 1850041045, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "Presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en *Proteus mirabilis* aislados en carne de pollo en el cantón Ambato" es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



Lizbeth Estefanía Fiallos Barros

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "Presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en *Proteus mirabilis* aislados en carne de pollo en el cantón Ambato" como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico veterinario ,en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



Lizbeth Estefanía Fiallos Barros

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, quien ha sido mi guía constante, mi fuerza en los momentos de debilidad y mi luz en la oscuridad.

A mis padres, Rosa Barros y Héctor Fiallos, pero sobre todo a mi mamá por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificios infinitos que hizo posible mi educación y formación personal y profesional, a mis hermanos Ana y Javier cuya presencia y apoyo absoluto han sido un constante recordatorio de la importancia del trabajo en equipo y la solidaridad familiar. A mi familia extendida y amigos cercanos, por su aliento y comprensión en cada etapa de este viaje.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujete, que la libertad sea nuestra propia sustancia”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han sido parte de este increíble viaje.

A mis padres por su apoyo incondicional, su confianza en mí y su constante aliento han sido mi mayor fortaleza en los momentos de duda y desafío. Gracias por sus sacrificios, por siempre estar a mi lado y por creer en mis sueños.

Este logro no habría sido posible su amor y respaldo.

A mi tutora de tesis Dra. Sandra Cruz, por su dedicación incansable, su orientación experta y su apoyo constante a lo largo de este proceso que han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo. A mis profesores y mentores, por su influencia positiva en mi crecimiento académico y personal ¡Gracias a todos por ser parte de este importante capítulo en mi vida!

ÍNDICE GENERAL

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	ii
DERECHO DE AUTOR	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	14
MARCO TEÓRICO	15
<i>Antecedentes Investigativos</i>	15
<i>Categorías fundamentales</i>	20
1.1.1 Carne de pollo	20
1.1.2 Generalidades y taxonomía de <i>Proteus mirabilis</i>	22
1.1.3 Morfología de <i>Proteus mirabilis</i>	24
1.1.4 Habitación de <i>Proteus mirabilis</i>	24
1.1.5 Resistencia de <i>Proteus mirabilis</i> a los antibióticos.....	25
1.1.6 Resistencia a las fluoroquinolonas	26
1.1.7 Resistencia a β -lactámicos	28
1.1.8 Tipo TEM.....	29
1.1.9 Gen HMS-1.....	30
1.1.10 Tipo SHV	30
1.1.11 Enzimas CARB RGT	30
1.1.12 Oxacilinasas de espectro estrecho	31
1.1.13 β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)	31
1.2. <i>Objetivos</i>	32
Objetivo general:.....	32
Objetivos específicos:.....	32
CAPÍTULO II	33
METODOLOGÍA	33

2.1.	<i>Ubicación del estudio</i>	33
2.2.	<i>Caracterización del lugar.</i>	33
2.3.	<i>Equipos y materiales.</i>	33
2.3.1.	<i>Equipos.</i>	33
2.3.2.	<i>Materiales.</i>	34
2.3.3.	<i>Material de oficinas.</i>	35
2.3.4.	<i>Reactivos</i>	35
2.4.	<i>Factores de Estudio:</i>	36
2.4.1	<i>Factor 1:</i>	36
2.4.2	<i>Factor 2</i>	37
2.5	<i>Manejo del experimento</i>	37
2.5.1	<i>Reactivación de la bacteria</i>	37
2.5.2	<i>Preparación de Agar tripticasa de soya</i>	38
4.3.3	<i>Siembra de <i>Proteus</i> en el agar tripticasa de soya</i>	39
4.3.4	<i>Tinción Gram</i>	39
4.3.5	<i>Segunda preparación de Agar tripticasa de soya</i>	42
4.3.6	<i>Segunda siembra de <i>Proteus</i> spp. en Agar tripticasa de soya</i>	42
4.3.7	<i>Preparación de infusión Cerebro – Corazón</i>	42
4.3.8	<i>Siembra de las colonias de <i>Proteus</i> en la infusión cerebro-corazón.</i>	43
4.3.9	<i>Extracción del ADN</i>	43
4.3.10	<i>Medición de la concentración de ADN</i>	44
4.3.11	<i>Preparación de la master mix</i>	45
4.3.10	<i>PCR convencional</i>	47
4.3.11	<i>Purificación de ADN</i>	50
4.3.12	<i>Solución de trabajo de TBE 1X</i>	51
4.3.13	<i>El gel de agarosa</i>	51
4.3.13	<i>Electroforesis</i>	52
4.3	<i>Tamaño de la muestra (si aplica)</i>	53
4.4	<i>Variables respuestas.</i>	53
4.5	<i>Diseño experimental</i>	53
CAPÍTULO III.....		54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		54
3.1.	<i>Demostrar la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas.</i>	54
3.2.	<i>Determinar la presencia de resistencia a betalactámicos.</i>	59
3.3.	<i>Mecanismos moleculares resistentes de <i>Proteus mirabilis</i> a fluoroquinolonas y betalactámicos.</i>	64
3.3.1	<i>Mecanismo de resistentes de <i>Proteus mirabilis</i> a fluoroquinolonas...</i>	64
3.3.2	<i>Mecanismo de resistencia de <i>Proteus mirabilis</i> betalactámicos</i>	66

3.4. Comprobación de la hipótesis	67
CAPÍTULO IV	68
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
4.1. CONCLUSIONES	68
4.2 RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de <i>Proteus mirabilis</i>	24
Tabla 2 Condiciones meteorológicas del cantón Cevallos	33
Tabla 3 Muestras de <i>Proteus mirabilis</i> utilizadas en el estudio	41
Tabla 4 Componentes y volúmenes para la realización de la master mix para el gen <i>gyrA</i>	46
Tabla 5 Componentes y volúmenes para la realización de la master mix para el gen <i>blaTEM-1</i>	47
Tabla 6 Cebadores utilizados en el estudio para <i>blaTEM1</i>	48
Tabla 7 Condiciones para la realización del PCR para <i>blaTEM-1</i>	49
Tabla 8 Cebadores utilizados en el estudio para <i>GyrA</i>	49
Tabla 9 Condiciones para la realización del PCR para <i>gyrA</i>	50
Tabla 10 Calidad y concentración del ADN de cada una de las muestras	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de <i>Proteus mirabilis</i>	23
Figura 2 Diagrama esquemático de resistencia a los antibiótico en <i>Proteus mirabilis</i>	25
Figura 3 Esquema de los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en <i>Proteus mirabilis</i>	27
Figura 4 Diagrama de los mecanismos de resistencia a cefalosporinas y β -lactámicos en <i>Proteus mirabilis</i>	29
Figura 5 Ilustración amplificada del gen <i>gyrA</i>	55
Figura 6 Ilustración amplificada del gen <i>blaTEM1</i>	60

RESUMEN

Este estudio se centró en la identificación y análisis de genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Proteus mirabilis* aisladas de muestras de carne de pollo de la ciudad de Ambato. En particular se investigaron dos genes clave: *gyrA* asociado con la resistencia a fluoroquinolonas, y *bla_{TEM-1}*, relacionado con la resistencia a betalactámicos, para la detección y análisis de estos genes, se emplearon técnicas moleculares avanzadas, incluyendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel de agarosa. En primer lugar, se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando métodos estandarizados que aseguran la pureza y la concentración adecuada de ADN para su posterior amplificación, en la fase de PCR se utilizaron cebadores específicos para amplificar las secuencias objetivo de los genes *gyrA* y *bla_{TEM-1}*. Los resultados mostraron una amplificación exitosa del gen *gyrA* en todas las muestras analizadas, con un tamaño de base de 850 pb, confirmando una prevalencia del 100% de este gen en las cepas de *Proteus mirabilis*. Por otro lado, la amplificación del gen *bla_{TEM-1}* no fue universal en todas las muestras, se detectó en el 58.3% de las cepas analizadas. Este hallazgo sugiere la presencia de una variabilidad en la resistencia a los betalactámicos en las muestras, indicando que, aunque *bla_{TEM-1}* es un gen prevalente no es el único mecanismo de resistencia presente. Este resultado subraya la necesidad de considerar otros genes de resistencia a betalactámicos y otros mecanismos de resistencia en futuros estudios. Esta investigación proporciona una visión detallada de la resistencia antimicrobiana, la alta prevalencia del gen *gyrA* y la considerable presencia del gen *bla_{TEM-1}* indican una significativa resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos, respectivamente. Estos hallazgos enfatizan la importancia de un monitoreo continuo y detallado de la resistencia antimicrobiana en la cadena alimentaria para implementar estrategias de control efectivas y proteger la salud pública.

Palabras clave: *Proteus mirabilis*, fluoroquinolonas, β -lactactámicos, resistencia, *bla_{TEM-1}*, *gyrA*.

ABSTRACT

This study focused on the identification and analysis of antimicrobial resistance genes in *Proteus mirabilis* strains isolated from chicken meat samples from the city of Ambato. In particular, two key genes were investigated: *gyrA* associated with resistance to fluoroquinolones, and *bla*TEM-1, related to beta-lactam resistance. For the detection and analysis of these genes, advanced molecular techniques were used, including Polymerase Chain Reaction (PCR) and gel electrophoresis. First, DNA extraction from the samples was performed using standardized methods that ensure purity and adequate concentration of DNA for subsequent amplification, in the PCR phase, specific primers were used to amplify the target sequences of the *gyrA* and *bla*TEM-1 genes. The results showed successful amplification of the *gyrA* gene in all samples analyzed, with a base size of 850 bp, confirming a 100% prevalence of this gene in *Proteus mirabilis* strains. On the other hand, the amplification of the *bla*TEM-1 gene was not universal in all samples, it was detected in 58.3% of the strains analyzed. This finding suggests the presence of variability in beta-lactam resistance in the samples, indicating that although *bla*TEM-1 is a prevalent gene it is not the only resistance mechanism present. This result underscores the need to consider other beta-lactam resistance genes and other resistance mechanisms in future studies. This research provides detailed insight into antimicrobial resistance, the high prevalence of the *gyrA* gene and the considerable presence of the *bla*TEM-1 gene indicate significant resistance to fluoroquinolones and beta-lactams, respectively. These findings emphasize the importance of continuous and detailed monitoring of antimicrobial resistance in the food chain to implement effective control strategies and protect public health.

Keywords: *Proteus mirabilis*, fluoroquinolones, β -lactactamides, resistance, *bla*TEM-1, *gyrA*

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y la propagación de genes de resistencia por parte de bacterias patógenas existentes en carne de pollo, son temas de investigación que preocupan a la comunidad científica dentro y fuera del país, existe un bacilo pequeño gramnegativo llamado *Proteus mirabilis*, el cual tiene la capacidad de vivir en ambientes con o sin oxígeno emergiendo, como un patógeno oportunista significativo, capaz de causar infecciones tanto en humanos como en animales, comprometiendo la eficacia de los tratamientos médicos y veterinarios, se han convertido en bacterias resistentes antimicrobianas generando preocupación en la comunidad científica y en los sistemas de salud existentes **(Tormo, 2019)**.

En el contexto de la cadena alimentaria, la carne de pollo representa un reservorio importante de bacterias patógenas y potencialmente resistentes a los antimicrobianos, el uso indiscriminado de antibióticos en la producción avícola, contribuye al surgimiento y la difusión de la resistencia, lo que resulta el surgimiento de patógenos resistentes a múltiples antimicrobianos, que a su vez puede transmitirse a los seres humanos por medio de la propagación cruzada **(Lara, 2018)**. Entre los antibióticos usados tenemos los betalactámicos y las fluoroquinolonas, estos son ampliamente empleados en el tratamiento de infecciones debido a su amplio espectro de acción **(Coka, 2023)**.

Esta investigación surge a raíz de la carencia de estudios previos, centrados específicamente en examinar la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en *Proteus mirabilis*. La falta de información subraya la importancia de realizar un estudio exhaustivo, con el fin de comprender y abordar la posible amenaza que la resistencia genera a los antimicrobianos, lo que representa en términos de seguridad alimentaria, salud pública y así poder prevenir la transmisión de bacterias y resistencias a los antibióticos en la cadena alimentaria.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes Investigativos

La resistencia a los antimicrobianos representa una creciente amenaza para la salud pública en todo el mundo. Los patógenos resistentes a los antimicrobianos, incluidos los genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos, plantean un desafío significativo en la lucha contra las infecciones bacterianas. A medida que esta problemática se expande, se vuelve esencial abordarla a nivel local. En el cantón Ambato, Ecuador, un área con una destacada producción de carne de pollo, la presencia y diseminación de estos genes en aislados de *Proteus mirabilis* no ha sido suficientemente explorada hasta el momento. Bajo esta perspectiva, se han identificado algunas investigaciones que se detallan a continuación.

López et al. (2022) en su investigación titulada “Genes de resistencia de *Escherichia coli* aislados en pollos de engorde” detalla una problemática similar a la encontrada en el cantón Ambato, sobre la presencia de genes de resistencia en carne de pollo para ello se tomaron 200 pollos de engorde, posteriormente fueron aislados 35 cepas de la bacteria *Escherichia coli* con un fenotipo de resistencia a los betalactámicos de amplio espectro, observado en cepas aisladas de pollos saludables criados en granjas de producción ubicadas en Santander, Colombia, siendo así se encontró el gen AmpC que se pudo detectar en el 83% de los casos, mientras que el gen *blaCTXM* se encontró presente en el 86%. En relación al gen *blaSHV*, se identificó en el 54% de los casos, y el gen *blaTEM* se observó en el 57% de las muestras analizadas, con respecto a los genes responsables de la resistencia a las quinolonas, el gen *qnrB* se identificó en el 94% de las muestras, el gen *qnrC* se encontró en el 9% de los casos, y no se detectó el gen *qnrA* en ninguna de las muestras analizadas, concluyendo así que la presencia simultánea de genes que confieren resistencia a los antibióticos es un asunto crítico que demanda una supervisión constante (**López et al., 2022**).

En la Universidad Técnica de Ambato se evaluó la resistencia a los antibióticos de 18 cepas *Proteus* spp utilizando el método Kirby Baueer, los antibióticos evaluados incluyen ciprofloxacina, ceftriaxona, amoxicilina + ácido clavulánico, amikacina y gentamicina, obteniendo como resultado los siguientes porcentajes de antibióticos ciprofloxacina el 27,7%, la ceftriaxona el 16,6%, el ácido clavulánico + amoxicilina el 22,2%, la amikacina y gentamicina el 0% (**Coka, 2023**). Siendo así *Proteus mirabilis* fue evidenciado con una resistencia significativa hacia las fluoroquinolonas, siendo este grupo particularmente afectado debido a la presencia de mutaciones cromosómicas. Además, se observó una resistencia destacada a BLEE en relación con los antibióticos betalactámicos (**Coka, 2023**).

La presente investigación, tuvo como objetivo determinar la sensibilidad y la resistencia a los antimicrobianos, en cepas aisladas de urocultivos en pacientes que visitan el laboratorio de la UNAM, para esto se revisó los urocultivos que tuvieron crecimiento de bacterias en 901 pacientes (**Mayorga, 2017**). Las cepas predominantes identificadas fueron de *E. coli* con 69,1%, *Proteus mirabilis* con 7,9%, *Klebsiela* spp con 5,8%, *Streptococcus agalactiae* con 4,8% y por último *Staphylococcus* spp con un 2,3%, de acuerdo con los patrones de susceptibilidad y resistencia *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiela* spp y *Enterobacter* spp fueron resistente a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, también a varias fluoroquinolonas además presentaron sensibilidad a los aminoglucósidos, imipenem, nitrofurantoína y amoxicilina. Con respecto a las bacterias Gram positivas fueron resistentes a eritromicina, oxacilina y penicilina, mientras que mostraron sensibilidad a la gentamicina, trimetropin y la clindamicina (**Mayorga, 2017**).

Según el estudio realizado por **Rodríguez et al. (2020)** en su investigación analizaron 99 cepas (2 de *Proteus penneri*, 10 de *Proteus vulgaris* y 87 de *Proteus mirabilis*) que fueron aislados de un hospital universitario de Argentina, las respectivas pruebas de susceptibilidad a antibióticos, fueron realizadas conforme a las directrices establecidas por el NCCLS. Se detectó cepas de *Proteus mirabilis*, estas clasificaron en tres grupos según su respuesta a los antibióticos betalactámicos, de las 87 cepas analizadas el 54

% mostraron sensibilidad a todos los antibióticos betalactámicos evaluados, con respecto a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación fueron resistentes en un 18%. *Proteus vulgaris* detectó resistencia a la cefotaxima, en un porcentaje reducido y *Proteus penneri* presentó una susceptibilidad reducida a la cefotaxima (**Rodríguez et al., 2020**)

En el estudio de **Abdelkreem et al. (2020)** titulado “Mutaciones en el ADN girasa y la topoisomerasa IV, y su impacto en la resistencia a quinolonas, en *Proteus mirabilis* aislado en pacientes con infecciones urinaria” se realizó un estudio en Jartum en diferentes hospitales de las universidades desde el 2016 hasta el 2017, aquí se examinaron 120 aislados de *Proteus mirabilis*, en pacientes con ITU, este estudio tuvo como propósito destacar la relevancia de las mutaciones en el genoma de *Proteus mirabilis*, que están asociadas con la resistencia a las fluoroquinolonas para llevar a cabo este estudio se realizó un método llamado, Kurby Bauer seguidamente se hizo una cadena de polimerasa – polimorfismo para seguir con la secuenciación y así detectar las mutaciones de los genes *GyrA*, *GyrB*, *ParC* y *ParE*, para este estudio se realizaron cebadores de oligonucleótidos que fueron diseñados en primer3plus, estos cebadores estaban degenerados en regiones conservadas de los genes nombrados anteriormente, detectando las siguientes amplificaciones 937 pb, 822pb, 992pb y 972 pb respectivamente, teniendo como resultado mutaciones en todas las muestras del gen *GyrA* y *Par C* (**Abdelkreem et al., 2020**).

En un estudio realizado por **Weigel et al. (2002)** se determinaron mutaciones vinculados a la resistencia de las fluoroquinolonas, en varios aislados clínicos del género *Proteus mirabilis*, por medio de un análisis genético de la región determinante de resistencia a las quinolonas, incluyendo a los genes *gyrB*, *gyrA*, *parE* y *par C*. Para cada uno de los genes se realizaron sus respectivos cebadores de oligonucleótidos en la base de datos GenBank, las condiciones para el PCR fueron desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, desnaturalización 95°C por 45 segundos, recocido 54 °C por 20 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y extensión final 72°C durante 7 minutos. Obteniendo como resultado que el gen *gyrA* se amplificó a 335 pares de bases

que fue lo esperado, a diferencia de otras especies bacterianas estudiadas hasta ahora en los aislados clínicos de *Proteus mirabilis*, la mutación en el gen *gyrA* parece ser un evento común en la adquisición de resistencia a las fluoroquinolonas **Weigel et al. 2002**).

Kim et al. (2005) en su investigación titulada “Caracterización de cepas de *Proteus mirabilis* a múltiples fármacos aisladas múltiples tipos de proteína cárnica”, se recolectaron 64 aislados resistentes a *Proteus mirabilis*, de productos cárnicos de ventas al por menor en Oklahoma, para este estudio se diseñaron los cebadores (59-ACTGAAGCCAGTACA CCG-39 y 59-CAAATCCGCCAGCAGTTC-39), estos presentaron cuatro patrones distintos de resistencia a los antibióticos, determinados por su genotipo y fenotipo de resistencia. La mayoría de estas cepas mostraron resistencia a la ampicilina, tetraciclina, la gentamicina y la kanamicina, también se encontraron mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, ya que fueron resistentes al ácido nalidíxico que está dentro del grupo de las fluoroquinolonas **(Kim et al., 2005)** .

Se realizó una investigación en Sudáfrica en 2020, donde el propósito del estudio fue analizar el perfil de resistencia a los antimicrobianos en las Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, que anteriormente fueron aislados de las heces de bovinos, para detectar la presencia de genes que codifican carbapenemasas y BLEE, se recolectaron 233 muestras fecales de bovinos, y se analizaron para identificar la presencia de Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, los aislados de CRE mostraron fenotipos de resistencia frente a cefuroxima (47,7%), imipenem (42%), ertapenem (35%), doripenem (30%), meropenem (28%), cefotaxima (59,6%) y aztreonam (54,3%), los fenotipos de multirresistencia variaron entre el 1,4% y el 27%, mientras que el índice de multirresistencia antibiótica (RAM) fluctuó entre 0,23 y 0,69, con una media de 0,40, las especies más frecuentemente detectadas mediante el análisis PCR, específico de género fueron *Escherichia coli* (34,4%), *Klebsiella pneumoniae* (43,7%), *Proteus mirabilis* (1,3%) y *Salmonella* (4,6%), la detección de los genes que codificaron las carbapenemasas varió, entre el 35% y el 3,3% dentro de estos blaKPC, blaNDM, blaGES, blaOXA-48, blaVIM y blaOXA-23. También todos los aislados de

CRE tenían genes como blaOXA (11,3%) blaSHV (33,1%), blaTEM (22,5%) y blaCTX-M (20,5%) (**Tshitshi et al., 2020**) . En conclusión, los resultados indicaron que el ganado tiene CRE con determinantes ESBL por lo cual se deben implementar todas las medidas higiénicas para así mitigar la propagación las cepas en los productos alimentarios (**Tshitshi et al., 2020**) .

Ahmed et al. (2007) en su investigación titulada “Animales de zoológico como reservorio de bacterias Gram-negativas que contienen integrones y genes de resistencia a los antimicrobianos” se recolectaron 232 aislados, de bacterias gramnegativas como: aves, reptiles y mamíferos que se alojaban en el parque zoológico de Asia prefectura de Hiroshima en Japón, cuarenta y nueve aislados (21,1%) resultaron fenotipos de resistencia a varios antibióticos, y albergaron por lo menos un gen de resistencia a los antibióticos, se utilizó el PCR y la secuenciación del ADN, para detectar los genes que codifican lactamasas, además se identificó el gen *blaTEM* el cual tiene resistencia contra las cefalosporinas y las penicilinas de un espectro estrecho, este gen se encontró en 19 aislados (8,2%) que incluyeron 16 aislados de *E. coli*, y 1 aislado de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *A. baumannii* para este gen para esto se utilizaron las siguientes secuencias TEM- F (ATAAAATTCTTGAAGACGAAA) y TEM-R (GACAGTTACCAATGCTTAATC). Además, se identificó un nuevo gen de lactamasa blaCMY-26 y genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos qnr y acac (6-)-Ib-cr (**Ahmed et al., 2007**).

En un estudio realizado en la India se recuperó 16 aislados de *Proteus mirabilis*, de 80 muestras de pollo (8 aislados de 25 muestras), de cerdo (2 aislados de 10 muestras) e hisopos cloacales de pollo (6 aislados de 45 muestras) (**Sajjan et al., 2022**). Las muestras fueron sometidas a pruebas bioquímicas y culturales estándar para comprobar la sensibilidad a los antibióticos se utilizó el método de difusión de disco, obteniendo como resultado un patrón de resistencia a tetraciclina un 100%, amoxicilina más ácido clavulánico un 45%, cefotaxima un 38% y ciprofloxacina un 44%. Por otro lado, se detectaron genes de B-lactamasa TEM (800 pb), CTXM-gp2 (404 pb), CTXM-gp9 (561 pb) y ACC (346 pb) en seis, siete, uno y cuatro aislados

respectivamente de los dieciséis aislados de *Proteus mirabilis* por medio del PCR (Sajjan et al., 2022). El alto nivel de resistencia a los antimicrobianos de *Proteus mirabilis*, de los aislados de cerdos y pollos puede representar una amenaza potencial para la seguridad alimentaria y la salud pública (Sajjan et al., 2022).

De acuerdo con Girlich et al. (2020) *Proteus mirabilis* es resistente a diversos antibióticos, como la colistina y una marcada disminución en la sensibilidad al 9 imipenem. Además, se observó niveles altos de resistencia continua al imipenem en cepas aisladas de *Proteus mirabilis*, los cuales están asociados de manera consecutiva a la pérdida de porinas, esta resistencia se atribuye a la expresión reducida de proteínas de unión a penicilina (PBP), como PBP1a y PBP2, también puede deberse a la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos, como son los genes de las carbapenemasas (Girlich et al., 2020). Igualmente se reporta con mucha frecuencia la resistencia a los antibióticos no β -lactámicos, destacando principalmente los empleados para tratar enfermedades o infecciones del sistema urinario, por ejemplo, los nitrofuranos y fluroquinolas, además se observó un aumento constante en los informes sobre la presencia y difusión de cepas de *Proteus mirabilis*, resistentes a varios medicamentos, que incluyen aquellas que generan BLEE, carbapenemasas y cefalosporinas AmpC (Girlich et al., 2020).

Categorías fundamentales

1.1.1 Carne de pollo

La carne de pollo es una fuente primordial de proteínas, contiene una alta cantidad de nutrientes como vitaminas, minerales, aminoácidos, agua entre otros componentes como también carbohidratos en diminutas cantidades, el consumo es muy amplio por su singular sabor, versatilidad y el perfil nutricional, a nivel mundial la carne de pollo es la más consumida superando a otros productos cárnicos, incluyendo América Latina, en el Ecuador es la proteína más explotada e incluso dejando atrás a la carne de cerdo,

esta industria ha tenido un crecimiento bastante rápido en este país, ya que se evidenció en el marcador per cápita mostrando, que por cada persona se consume 22kg de carne de pollo en el Ecuador **(Lara, 2018)**.

La crianza de aves juega un papel muy importante en la economía del Ecuador, ya que cuenta con miles de granjas que están distribuidas por todo el país **(CONAVE, 2022)**. Menciona el INEC que entre el año 2019 y 2014 se evidenció que la crianza de estas aves se encuentra dentro de las 24 provincias, pero solo en 9 provincias se focaliza el 80% de la producción de aves, siendo Tungurahua la provincia más representativa contando con un 60% en la producción y la venta de aves **(Sánchez et al., n.d)**.

La calidad o la excelencia de alimentos se ve afectada, por las transformaciones químicas y físicas vinculadas a sus características propias, o condiciones ambientales variables. Asimismo, la pérdida de calidad se da también por las modificaciones, enzimáticas inducidas por las enzimas internas o los factores microbianos **(Tormo, 2019)**. Los productos de procedencia animal se contaminan fácilmente, por microorganismos, la presencia de estos al concluir el proceso de elaboración de la carne y los productos avícolas, pueden tener repercusiones significativas en su deterioro y calidad **(Lara, 2018)**.

La presencia de microorganismo en la carne de pollo, aunque no es deseada, resulta inevitable y está directamente vinculada a la calidad microbiológica, de las carcasas empleados como materia prima, la aplicación de buenas prácticas de higiene en la manipulación, junto con la gestión adecuada del tiempo y la temperatura al momento de almacenar, desempeñan un papel crucial en el control del desarrollo microbiano **(Fandos et al., 2014)**. Se reporta con mayor frecuencia la carne de pollo, como el medio de transmisión de patógenos, seguida de cerca por la carne roja **(Salazar, 2019)**. En la carne de pollo se ha identificado diferentes tipos de microorganismos, estos se pueden dividir en dos grupos por un lado los que producen enfermedades a los seres

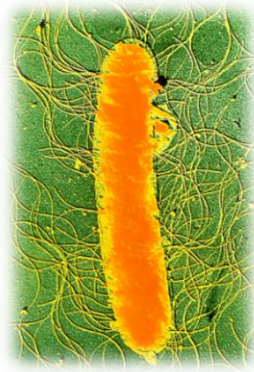
humanos, y en su mayoría son patógenos, y por otro lado los microorganismos que alteran la carne **(Salazar, 2019)**.

Diversos estudios muestran la presencia de microorganismos en la carne de pollo, se han identificado bacterias como: *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp entre otras bacterias, en este tipo de carne, ya que se encuentran en la flora microbiana de los pollos; en otros casos, su presencia puede estar vinculada a la contaminación de una manipulación inadecuada del alimento **(Braña et al., 2013)**. En la ciudad de Ambato se realizó un estudio, en donde se recolectaron muestras de carne de pollo de diferentes puntos de expendio, y se identificó la bacteria *Proteus mirabilis* de 17 cepas diferentes **(Cortez, 2023)**.

1.1.2 Generalidades y taxonomía de *Proteus mirabilis*

El primer reconocimiento del género *Proteus* se lo atribuye a Gustav Hauser en el año 1885, quien separó las especies en dos *P. mirabilis* y *P. vulgaris* **(Fallah et., 2021)**. Todas las especies de *Proteus*, tienen la capacidad de infectar a los humanos, siendo responsable principalmente de las heridas en la piel, infección en el tracto respiratorio, en los ojos, oídos, cuello, nariz, dolor de garganta e infecciones del tracto urinario **(Fallah et., 2021)**.

Figura 1 Morfología de *Proteus mirabilis*



Fuente: (Castro et al., 2006)

P. mirabilis está dentro del grupo de las bacterias gramnegativas, es destacada por su habilidad de movimiento y su destacada aptitud para desarrollar colonias en forma de enjambres (Velandia et al., 2022). Este dentro de las Enterobacteriaceae, la cual engloba patógenos reconocidos como; *Salmonella* y *E. coli*, esta bacteria es común en el tracto gastrointestinal tanto en seres humanos como en animales (Velandia et al., 2022). *Proteus mirabilis* posee la capacidad de auto alargarse y su motilidad es en enjambre, cuando se encuentra en superficies sólidas, es capaz de secretar un polisacárido, ayudándolo así a moverse fácilmente y permitiéndole una fijación firme en superficies, este fenómeno no solo promueve la colonización, si no también ha sido vinculado a su habilidad para generar biopelículas, sugiriendo así que contribuye a la resistencia frente a ciertos tipos de antibióticos y a las defensas de los hospedadores (Velandia et al., 2022).

Tabla 1 Taxonomía de *Proteus mirabilis*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Proteus
Especie	mirabilis

Fuente: (Faife et al., 2020)

1.1.3 Morfología de *Proteus mirabilis*

P. mirabilis es una bacteria dimórfica es decir que posee dos formas morfológicas diferentes, cuando está en entornos líquidos o cultivos muestra una forma móvil, de natación cuyas dimensiones varían entre 1.5 y 2 micrones, además cuenta con 10 a 6 flagelos (Di Conza et al., 2014) . Por otro lado, al ser colocada sobre una superficie sólida, genera la mencionada estructura o colonias de enjambre, que es una característica distintiva de esta especie, este tipo de morfo es una célula alargada y multinucleada, significativamente más grande que la anteriormente mencionada, con longitudes que oscilan entre 80 y 60 micrones, presentando una abundancia de flagelos, alcanzando una cifra de miles (Di Conza et al., 2014).

1.1.4 Habitación de *Proteus mirabilis*

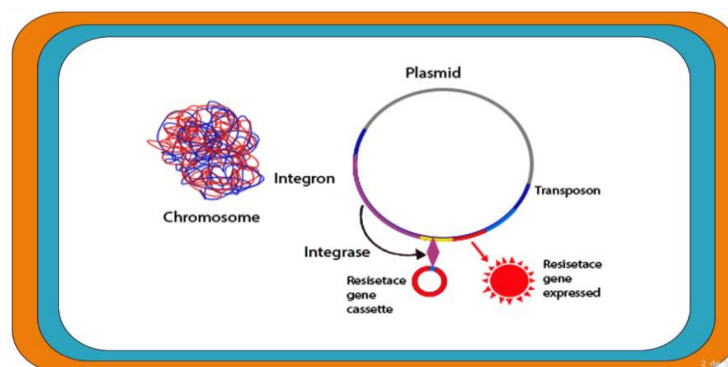
P. mirabilis se le puede encontrar en suelo y en el agua, en el suelo desempeña un papel muy importante ya que descompone la materia orgánica, se ha detectado en las heces de muchos animales, como también en aguas contaminadas, además se ha identificado esta bacteria en la microbiota del intestino de diversos mamíferos como; pollos, porcinos y vacunos, en animales de compañía como gatos y perros en las personas

(Báez et al., 2017). En la clínica es muy común encontrar esta bacteria y se la encuentra en la piel, el sistema urinario, mucosas, como también en el personal de salud (Báez et al., 2017).

1.1.5 Resistencia de *Proteus mirabilis* a los antibióticos

Girlich et al. (2020) afirma que *Proteus mirabilis* obtiene genes que confieren resistencia a los antimicrobianos mediante plásmidos transferibles, las secuencias de inserción, integrones y transposones, los integrones que están dentro de estos materiales genéticos, que no son transferibles pero se encuentran en los plásmidos móviles, tiene un papel muy importante al facilitar la transferencia horizontal, de casetes genéticos que contienen genes de resistencia, en otras palabras los integrones facilitan la incorporación de casetes de los genes, que son los que codifican la resistencia a β -lactámicos, quinolonas mediadas por los plásmidos y aminoglucósidos en las células receptoras, de *Proteus mirabilis*, los integrones poseen un gen de integrasa, un sitio de recombinación (attI), también poseen un promotor de PC que sirve para la transcripción de los genes que han capturado. En el estudio de **Jove et al. (2017)** encontró que los integrones pueden asociarse con materiales móviles de ADN, como; los transposones y los plásmidos para así propagar los genes de resistencia.

Figura 2 Diagrama esquemático de elementos de resistencia a los antibióticos en *Proteus mirabilis*



Fuente: (Alqurashi et al., 2022)

1.1.6 Resistencia a las fluoroquinolonas

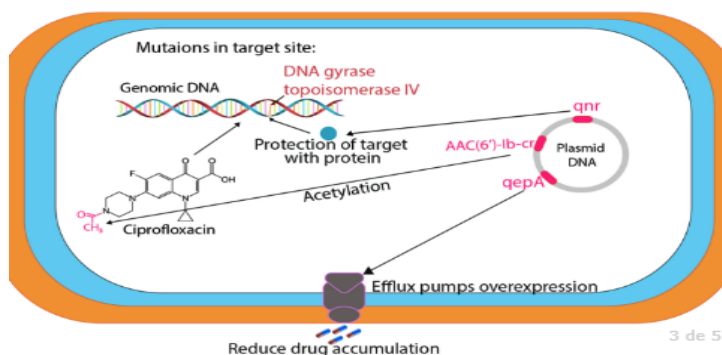
Las fluoroquinolonas son antibióticos frecuentemente empleados a nivel mundial, para tratar diversas infecciones ya sea en humanos o en animales. Según el **EARS (2021)**, descubrió varios mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas como ; alteraciones en la membrana externa, que disminuye la acumulación del fármaco por medio de la bomba de flujo, y modificaciones de la enzima diana en la topoisomera IV que es codificada por los siguientes genes *parE* y *parC*, el ADN girasa que codifica los genes *gyrB* y *Gyr*. En el estudio de **Nakano (2019)**, detectó que las bacterias gramnegativas, están enfocadas en el ADN girasa, y la topoisomera IV, apuntan a las bacterias grampositivas. **Hu (2020)**, afirma que el gen *gyrA* es un objetivo importante, en las fluoroquinolonas en muchas especies de Enterobacteriaceae, y las mutaciones están relacionadas a la resistencia a las fluoroquinolonas, el ADN girasa y la topoisomerasa IV, causan otras mutaciones mayores en la resistencia de las fluoroquinolonas (**Varugese et al .,2017**).

En estudios recientes han arrojado datos importantes como la investigación de **Farzad et al. (2021)** afirman que las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) son muy conservadas, dichas regiones (QRDR) están íntimamente relacionadas a la resistencia de *Proteus mirabilis*, en las fluoroquinolonas mostrando sustituciones en el (S80) *parC* y en *gyrA* (S83) por otro lado, la mutación en *gyrB* podría causar resistencia aumentada a las fluoroquinolonas. Según **Piekarska (2015)**, argumentan que los QRDR en la resistencia a *Proteus mirabilis* en fluoroquinolonas no ha sido indagado lo suficiente, por lo cual es necesario más datos para crear un mecanismo de resistencia específico. En muchos estudios se ha encontrado resistencia de levofloxacina, en *Proteus mirabilis* resultando mutaciones en los genes *parE* (D420) y *gyrA*(E87), cada uno de estos genes son imprescindible para una resistencia marcada en el género *Proteus mirabilis*. Se han identificado por diferente técnica espectroscópicas, nuevos derivados del ciprofloxacino como ácidos hidroxámicos, amidas e hidrazidas, así como análogos del levofloxacino, varios de estos componentes

presentaron eficacia significativa contra la división de ureasa en *Proteus mirabilis* (Nakano et al., 2019). Igual que *GyrA*, el gen *ParC* es importante en la resistencia de ciprofloxacina, si existe mutaciones en algunos de estos genes mencionados anteriormente puede existir resistencia a ciprofloxacina (Piekarska, 2015). Por lo cual es necesario hacer pruebas de sensibilidad a los medicamentos antes de iniciar un tratamiento específico (Abdelkreem et., 2015).

Se han realizado estudios para identificar las mutaciones en las enzimas diana, (los codones *ParC* (Ser-80) y *GyrB* (Ser-464)) y las bombas de eflujo (*AcrAB*) con relación a la resistencia a *Proteus mirabilis*, frente a las fluoroquinolonas (Piekarska, 2015). En el estudio de Piekarska (2015), se evaluaron el rol de las bombas de eflujo en la resistencia a las fluoroquinolonas, midiendo las concentraciones mínimas inhibitorias o CIM, por medio de inhibidor de la bomba eflujo CCCP, este mismo se disolvió con el agar Mueller Hinton, de un total de 100 asilamientos se seleccionaron 50 aislados cuya sensibilidad a fluoroquinolonas no fue afectada por el CCCP y se fueron caracterizando en término de CIM y genotipo para la levofloxacina (Nakano et al., 2019).

Figura 3 Esquema de los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en *Proteus mirabilis*



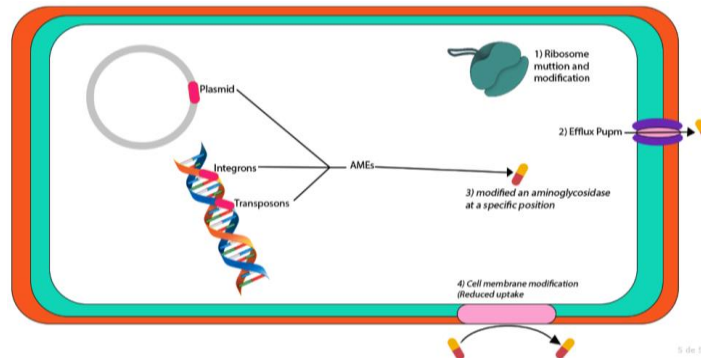
Fuente: (Alqurashi et al., 2022)

1.1.7 Resistencia a β -lactámicos

En el cromosoma de *Proteus mirabilis* no están presentes los genes de lactamasa, por otro lado, la producción de β -lactamasas abarca tanto las β -lactamasas de espectro extendido como β -lactamasas AmpC (Yang et al., 2020). Según Yang et al. (2020) en su estudio analizaron pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, en aislados clínicos en el análisis de las secuencias de los casets genéticos, no se relacionaron los patrones de resistencia como tampoco el contenido de los casets genéticos, los patrones de resistencia a los antibióticos betalactámicos, fueron más variados que los representados por los casetes integrados en integrones. En cuanto al análisis genético se observó genes de *bla*_{TEM} en los dos genomas, las β -lactamasas codificadas por *bla* TEM-2, son efectivas contra las cefalosporinas tempranas y las penicilinas, por lo tanto, no pueden ser atribuidas al fenotipo BLEE. Ye et al. (2019) mencionan la participación de otra enzima en cepas que son positivas para BLEE, *Proteus mirabilis* es conocido por tener genes que codifican β -lactamasas AmpC parecidas a CMY-2, que facilita la resistencia a las cefalosporinas y cefamicinas. Se ha reportado que la secuencia de *bla* CMY se ajusta a *bla* CMY-15 en *Proteus mirabilis* (Ye et al., 2019).

Ahn et al. (2017) informaron sobre los genes transmitidos por los cromosomas, que codifican CMY-15 en aislados de *Proteus mirabilis* en Polonia, la colistina es un fármaco que se utiliza para las infecciones provocadas por las bacterias gramnegativas, pero este fármaco es naturalmente resistente hacia *Proteus mirabilis* por la presencia de los genes *mcr* que son mediados por plásmidos, *P. mirabilis* puede transmitir estos genes (*mcr*), hacia otras bacterias que sean susceptibles a este fármaco. Cuando existe la presencia de las enzimas BLEE se confirma la resistencia a los β -lactámicos, que son de amplio espectro (Tseng et al., 2013). Al principio el gen CTX-M se representó con el gen TEM, pero después que el gen predomina, se difunde y suplantando a otros (Musa et al., 2019). El uso inapropiado de antibióticos puede crear una presión selectiva que favorece la propagación de BLEE en las Enterobacteriaceae (Musa et al., 2019).

Figura 4 Diagrama de los mecanismos de resistencia a cefalosporinas y β -lactámicos en *Proteus mirabilis*



Fuente: (Alqurashi et al., 2022)

1.1.8 Genes tipo *TEM*

El gen *bla*_{TEM-1} es la primera penicilinas β -lactamasa que se encontró mediada por plásmidos, se descubrió en las bacterias Gram-negativas en 1960, está dentro de la clase A o también llamada clasificación de Ambler (Ambler, 1980) y en el grupo 2b de Bush y Jacoby (Bush y Jacoby, 2010). En *Proteus mirabilis* se han descubierto muchas variantes del género TEM incluyendo las penicilinasas TEM-1 y TEM-2 (Pagani et al., 2003), algunas β -lactamasa de tipo TEM son resistentes a inhibidores como es el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam, que incluyen TEM-74, TEM-73, TEM-67 y TEM-65 (Champs et al., 2000) y finalmente, las enzimas TEM de espectro extendido (Bush y Jacoby, 2010). En general TEM-1 es una de las enzimas más compuesta de cepas de *Proteus mirabilis*, que producen penicilinas, en esta bacteria las enzimas IRT están derivados del TEM-2 compuesta por una cisteína/serina que es capaz de reemplazar a la arginina 244. En *Proteus mirabilis* la IRT-2 tiene una mayor resistencia a amoxicilina, y también la combinación amoxicilina – clavulánico pero en menor resistencia a tetraciclina (Bret et al., 2010). Según Bret et., (1996) mencionan que la cepa de *Proteus mirabilis* ocasiona el derivado de ITR -1, TEM-67, fue transportado el gen por un plásmido que no es auto transferibles, de al menos 48 kb que se encontró dentro de un transposón igual a Tn1.

1.1.9 Gen HMS-1

Esta es una β -lactamasa que se reconoció por primera vez en cepas de *Proteus mirabilis*, por Thomson en el año 1999 (Thomson et al., 1999). Este gen tiene resistencia a tetraciclina y clavulanato, y una pequeña sensibilidad a las combinaciones de cefoperazona y sulbactam (Thomson et al., 1999). Este gen *bla*_{HMS-1} se encuentra en la isla SXT/R39 y se ha identificado por Li et al. (2010) en aislados de *Proteus mirabilis*, que fueron recuperados de los hisopos del recto de pacientes, que tenían síntomas de diarrea, como también de la carne cruda entre los años 2008 y 2015 en tres ciudades importantes de China.

1.1.10 Gen tipo SHV

El tipo SHV es una β -lactamasa de *K. pneumoniae* natural, por lo cual es una cepa que también produce BLEE del tipo SHV, por medio de la mutación muy puntual en el sitio activo, de esta misma enzima (Perilli et al., 2002) a pesar de ello se ha reportado muy pocos aislados en *Proteus mirabilis* productores de SHV (Chanal et al., 2000).

1.1.11 Enzimas CARB RGT

Estas carbenicilinasas, del grupo CARB se reportaron inicialmente en cepas de *Proteus aeruginosa* (Labia et al., 1981) posteriormente en muchas especies como *Acinetobacter calcoaceticus*, en *Vibrio cholerae* y en *Proteus mirabilis* (Choury et al., 2000). Todas estas enzimas que son codificadas por los plásmidos están dentro del grupo funcional 2C, ya que son capaces de hidrolizar ampicilina, bencilpenicilina y la carbenicilina (Bush y Jacoby, 2010). La mayor parte son de muy baja prevalencia, y de espectro restringido principalmente en las Enterobacterales (Bush y Jacoby, 2010).

1.1.12 Oxacilinasas de espectro estrecho

Las oxacilinas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar la oxacilina y cloxacilina, son inhibidas por el tazobactam y el ácido clavulánico pero muy poco, en *Proteus mirabilis* los aislados de oxacilinasas más representativas son OXA-10, OXA-9, OXA-1, todos estos genes se transmiten por integrones, por lo cual están asociados a otros genes que generan resistencia como el cloranfenicol, los aminoglucósidos, tetraciclinas entre otros, como también los genes de BLEE, y muchas veces están asociados con los genes carbapenemasas como es *bla*_{VIM-1} (Papagiannitsis et al., 2010). Se ha reportado otros genes de BLEE en *Proteus mirabilis* como TEM-28, SHV-12, CTX-M-15 y carbapenemasas como el NDM-1 (Dortet et al., 2012).

1.1.13 β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)

Cuando se descubrieron por primera vez las BLEE fueron reportadas de tipo TEM, pero en la década del 2000, estas BLEE se diversificaron con la aparición de las enzimas CTX-M (Champs et al., 2000). Como se observó simultáneamente en otras bacterias como, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Estas enzimas de CTX-M se dividen en cinco distintos grupos, según sea la secuencia de aminoácido primario (grupo 25,9,8,2 y 1), principalmente la creación de BLEE ocasiona un nivel de resistencia bastante alto, a cefotaxima, aztreonam y ceftazidima en *Proteus* spp, la primera vez que se descubrió las BLEE, en *Proteus mirabilis* fue en el año 1999 en Francia, la prevalencia de las productoras de BLEE se incrementó en 1999 de 0% al 18,5% en el 2001 y en 2002 al 25,8% de (Champs et al., 2000). En el estudio de Castanheira et al. (2010) predominaron las BLEE en *E. coli* un 49,5%, *K. pneumoniae* un 40,1% y *P. mirabilis* 5,2%. Según Girlich et al. (2015) mencionan que existe la presencia de mecanismos de resistencia, como son los aminoglucósidos (*aphA6*, *aacA4* y *aadB*), carbapenémicos y β -lactámicos, de espectro extendido en cepas de *Proteus mirabilis*.

1.2.Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en *Proteus mirabilis* aislados en la carne de pollo que se expende en la ciudad de Ambato.

Objetivos específicos:

- Demostrar la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas.
- Determinar la presencia de genes de resistencia a betalactámicos.
- Identificar los mecanismos moleculares resistentes a *Proteus mirabilis* aislados en la carne de pollo que se expende en la ciudad de Ambato.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El presente estudio se va a realizar en la Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias en el laboratorio de Biología Molecular situado en Tungurahua cantón Cevallos, sus coordenadas son 1°21'0" S y 78°37'0" Oeste. Con una extensión de 19,000 km², su latitud de 1°22'08.7", su longitud 78° 36'23.8" y su altitud de 2.882 msnm (GAD Cevallos, 2011).

2.2. Caracterización del lugar.

Tabla 2 Condiciones meteorológicas del cantón Cevallos

Parámetros	Descripción
Clima, mm	Ecuatorial Meso – Térmico Seco
Humedad relativa, %	60-75
Velocidad del viento, m/s	2.1 – 8.9
Precipitación, mm	200-500
Temperatura, °C	13-16

Fuente: (GAD Cevallos, 2011)

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipos

- Cámaras de electroforesis
- Espectrofotómetro

- Termociclador (máquina de PCR) para realizar ciclos de amplificación de ADN
- Centrifuga
- Balanza de precisión
- Refrigeradora
- Incubadora
- Microscopio
- Vórtex
- Autoclave
- Baño ultrasónico
- Agitador de tubos
- Agitador
- Plancha de calentamiento
- Transiluminador de mesa

2.3.2. Materiales

- Guantes de látex
- Gradillas
- Micropipetas
- Tubos de PCR 0,2 ml
- Puntas blancas, amarillas y azules
- Pinzas
- Mascarillas
- Cofia
- Zapatones
- Mandil
- Cintas
- Gafas de seguridad
- Tubos PCR y tapas
- Tubos eppendorf
- Hisopos

- Placas Petri
- Mechero
- Azas de siembra

2.3.3. Material de oficinas

- Cuaderno de apuntes
- Cámara de fotografías
- Computadora
- Esferos
- Cinta adhesiva
- Marcadores
- Impresora
- Papel aluminio
- Papel kraft

2.3.4. Reactivos

- Alcohol
- Primers
- Proteinasa K
- Agarosa
- Taq ADN polimerasa
- Dreem Taq
- Marcador de peso molecular
- Agua libre de endonucleasas
- SDS
- Agua destilada
- Isopropanol

2.4. Factores de Estudio:

2.4.1 Factor 1:

- **Gen *bla_{TEM-1}***

El gen *bla_{TEM-1}* es uno de los genes más comúnmente asociados con la resistencia a los antibióticos betalactámicos, codifica una enzima beta-lactamasa tipo TEM, que es capaz de hidrolizar el anillo betalactámico presente en muchos antibióticos, como las penicilinas y algunas cefalosporinas, lo que anula su efecto antimicrobiano (**Bradford, 2001**). Las enzimas beta-lactamasas tipo TEM derivan su nombre de la primera cepa de *Escherichia coli*, en la que se encontró esta enzima, denominada Temoniera (**Datta y Kontomichalou, 1965**). Estas enzimas han evolucionado mediante mutaciones puntuales, que amplían su espectro de actividad para incluir una gama más amplia de antibióticos betalactámicos, incluyendo aquellos con inhibidores de beta-lactamasa como el ácido clavulánico (**Livermore, 1995**).

La prevalencia de *bla_{TEM-1}* es alta en diferentes especies bacterianas, especialmente en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. La presencia de este gen en estas bacterias representa un desafío significativo, para el tratamiento de infecciones debido a la capacidad de este gen, para conferirse resistencia a una amplia variedad de antibióticos comúnmente utilizados (**Bush y Medeiros, 1995**).

En estudios recientes, la detección de *bla_{TEM-1}* en *Proteus mirabilis* ha sido una indicación de la persistencia y diseminación, de este gen de resistencia en diferentes entornos, incluyendo fuentes de alimentos como la carne de pollo (**Sajhan, 2022**). La heterogeneidad en la distribución de *bla_{TEM-1}*, y otros genes de resistencia a betalactámicos, sugiere la existencia de múltiples mecanismos de resistencia que necesitan ser monitorizados y gestionados, adecuadamente para controlar la

propagación de cepas resistentes, en la cadena alimentaria y proteger la salud pública **(Bradford, 2001)**.

2.4.2 Factor 2

- **Gen *gyrA***

El gen *gyrA* es crucial para la resistencia a las fluoroquinolonas, en diversas especies bacterianas, incluyendo *Proteus mirabilis* **(Hooper, 2000)**. Este gen codifica una subunidad de la ADN girasa, una enzima esencial en el superenrollamiento del ADN bacteriano, proceso vital para la replicación y transcripción del ADN **(Hooper, 2000)**.

Las mutaciones en el gen *gyrA*, pueden alterar el sitio de unión de las fluoroquinolonas, impidiendo que estos antibióticos se unan eficazmente al ADN girasa y, por lo tanto, inhiban su función **(Ruiz, 2003)**. Esta resistencia mediada por mutaciones en *gyrA*, ha sido ampliamente documentada y representa una amenaza significativa, para el tratamiento de infecciones bacterianas **(Ruiz, 2003)**.

2.5 Manejo del experimento

2.5.1 Reactivación de la bacteria

Cuando hablamos de reactiva de una bacteria nos referimos al proceso de revivir o restaurar la actividad metabólica, y el crecimiento de una bacteria que ha estado en un estado inactivo, todo esto implica devolver a la bacteria a un estado en el que pueda comenzar a reproducirse, y llevar a cabo sus funciones biológicas normales **(Violeta y Espinel, 2018)**. Este proceso implica proporcionar las condiciones adecuadas para

que la bacteria recupere su actividad metabólica y se multiplique **(Violeta y Espinel, 2018)**.

1. Para comenzar se saca los crioviales que están mantenidos a -20 °C y esperar que se descongele
2. Una vez que se descongele los crioviales y utilizando un asa que este estéril, se inocula una asada de cada macroorganismo.
3. Cuando haya transcurrido el tiempo designado, se procederá a sembrar mediante estrías en los medios selectivos con el propósito de evaluar la viabilidad, seguido de la incubación a la temperatura óptima. **(Violeta y Espinel, 2018)**.

2.5.2 Preparación de Agar tripticasa de soya

El agar tripticasa de soya se utilizó para que las bacterias puedan refrescarse, ya que este agar no puede ser un medio selectivo, pero para los microorganismos que son exigentes contienen en su interior sangre peptonada de soya, lo que facilita su crecimiento, también el NaCl ayuda al balance osmótico. Por lo cual todo esto ayuda al desarrollo y al aislamiento de las bacterias, ya sea anaerobio o aerobios. (Ver anexo 2).

1. Primero esterilizamos el material que vamos a utilizar en la autoclave a una temperatura de 120°C.
2. Se debe pesar en la balanza analítica lo que se va a utilizar, eventualmente se pesa 38 gramos.
3. Se debe añadir 38 gramos de tripticasa de soya en 500 gramos de agua destilada en un vaso de precipitación, se debe seguir todas las recomendaciones que indique la casa comercial.
4. Seguidamente el vaso de precipitación es llevado a un agitador magnético por lo menos unos 5 minutos para que sea homogénea la mezcla.
5. Cuando la mezcla ya se encuentre bien homogenizada se transfiere a la botella de vidrio de borosilicato, es importante dejar entreabierta la tapa y colocar

papel aluminio en la misma, posteriormente se debe llevar a la autoclave 20 minutos a 120°C.

6. Cuando el tiempo de la autoclave se haya terminado se debe placar, utilizando las placas Petri posteriormente esterilizadas, seguidamente de terminar de placar se debe esperar por al menos 30 minutos para voltear todas las placas.
7. Se debe dejar 24 horas reposar las placas para obtener un aspecto muy sólido y posteriormente sembrar las cepas.

4.3.3 Siembra de *Proteus* en el agar tripticasa de soya

1. Comprobar que en las cepas que se va a utilizar no haya una vez identificadas se debe dejar en el cuarto estéril para que se ambienten por lo menos 10 minutos, cerca del mechero.
2. Se debe rotular todas las placas Petri para que no haya confusiones.
3. Posteriormente se coloca una gota de estas cepas en las placas por medio de un palillo o un asa de siembra, es muy importante que este alado del mechero para evitar contaminaciones.
4. Se debe esperar al menos 1 o 2 horas, esto para que la gota se seque bien y proceder a estriar mediante un asa.
5. Después se procede a voltear las placas y dejar en el incubador por 24 horas a 37 °C.

4.3.4 Tinción Gram

1. Sacamos las placas con TS previamente sembradas para que se ambientes (Ver anexo 3).
2. Sacar el portaobjeto y rotularlos muy bien para evitar confusiones.
3. En el portaobjetos se coloca una gota de agua destilada, es preferibles que sea pequeña para que no se demore en secar.
4. Se debe coger una muestra de la cepa con la ayuda del asa de siembra, esta debe estar esterilizada, para esto se debe prender el mechero y poner el asa de

siembra en forma vertical hasta que el hilo, del extremo del asa de siembra este incandescente.

5. Se debe esperar que se enfrié el asa de siembra, porque si topamos el asa de siembra incandescente podemos matar a las colonias y a los microorganismos.
6. Se abre las placas con las colonias y con el asa de siembra topamos al borde de la placa, para saber si ya se encuentra fría.
7. Cuando ya esté frío se coge colonias y se las homogeniza en la gota de agua destilada.
8. Después, se debe dejar secar esta mezcla en el porta objetos, se puede dejar a temperatura ambiente o por medio del calor.
9. Una vez que la gota este totalmente seca se procede a realizar las tinciones.
10. Se debe añadir cristal de violeta por un minuto, después lavar con agua destilada.
11. Posteriormente añadir Lugol por un minuto y volver a lavarlo.
12. A continuación, añadir acetona por 10 segundo y lavar la muestra.
13. Finalmente añadir safranina por 1 minuto y lavar.
14. Posteriormente se observa en el microscopio la muestra.
15. Después de observar en el microscopio se eligió las muestras que tenga forma de bacilos, de 18 muestras solo trabajamos con 12 muestras, ya que estas eran las que se visualizan de mejor manera los bacilos y no hubo contaminación.

Tabla 3 Muestras de *Proteus mirabilis* utilizadas en el estudio

	Muestra	Nombre de la muestra	Código
1	N6	NCTC 11938 16S	MN749808.1
2	N13	AA5 16S	KJ459008.1
3	N19	HAMBI 91	LT899945.1
4	N23	MM2 16S	MK847258.1
5	N24	HN2P	CP046048.1
6	N27	UFV 131 16S	MN546001.1
7	N28	BLPS5 16S	ON460264.1
8	N29	10B 16S	KY964505.1
9	N30	M17_J16	MK426652.1
10	N33	NCTC 11938 16S	MN749808.1
11	N35	NCTC 11938 16S	MN749808.1
12	N44	MPE0346	CP053719.1

4.3.5 Segunda preparación de Agar tripticasa de soya

Después de seleccionar las muestras, con las cuales trabajamos, se procede a preparar más TS con las cepas seleccionadas, y se realiza los pasos que se nombró anteriormente.

4.3.6 Segunda siembra de *Proteus mirabilis* spp. en Agar tripticasa de soya

En esta etapa se sembraron las 12 cepas seleccionadas, se procede a cultivar en nuevos agares, y se sigue las mismas condiciones y los mismos pasos que se nombró anteriormente.

4.3.7 Preparación de infusión Cerebro – Corazón

Se utilizó infusión cerebro -corazón porque es un cultivo muy nutritivo, esta infusión contiene: corazón de vaca y también cerebros de terneros, por medio de esto y otros componentes permite el rápido crecimiento de los microorganismos, contiene peptona que ayuda a la producción de nitrógeno, de carbono, de péptidos, de aminoácidos y muchas vitaminas que ayudan al desarrollo de varias colonias.

1. Se debe esterilizar todos los materiales que vamos a utilizar en el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Seguidamente se debe pesar 37 gramos de infusión cerebro corazón, por medio de la balanza analítica, después se debe poner en un vaso de precipitación y llenarlo con agua destilada hasta llegar a 1000ml.
3. Se debe homogenizar muy bien la mezcla.
4. Después que la mezcla este bien homogenizada, se debe colocar en el frasco de vidrio, dejar la tapa entreabierta, colocar papel aluminio y llevarlo a la autoclave a una temperatura de 120 °C por 20 minutos.
5. Cuando ya haya transcurrido los 20 minutos en la autoclave, se debe sacar la mezcla y dejar que se atempere en el cuarto estéril.

6. Se debe rotular los tubos falcón y poner el número de muestras, para evitar posibles equivocaciones (Ver anexo 1).
7. Después que estén bien rotulados los tubos falcon, se debe llenar con 15 ml de infusión cerebro corazón y taparlos.

4.3.8 Siembra de las colonias de *Proteus* en la infusión cerebro-corazón.

1. Por medio del asa de siembra se debe coger colonias que estén asiladas de preferencia 5 o 6, que fueron sembradas anteriormente en el Agar TS, todo este procedimiento se debe hacer cerca del mechero.
2. Colocar las cepas recolectadas en los tubos falcon, que se llenaron con infusión cerebro-corazón.
3. Después de terminar de colocar las colonias en los tubos falcon se debe llevar a la incubadora a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

4.3.9 Extracción del ADN

Este paso inicial constituye el punto de partida para la identificación molecular. Es crucial destacar que la calidad del ADN, resultante depende tanto de la técnica empleada como del tiempo invertido en el proceso (**Aljanabi y Martínez 1997**). Una vez que se han logrado aislar las colonias deseadas, se procede a extraer una muestra de su ADN, siguiendo meticulosamente los pasos descritos por (**Aljanabi y Martínez 1997**) :

1. El proceso inicio sacando los tubos falcon de la incubadora, se debe dejar atemperar por al menos 5 minutos.
2. Después que este atemperado se procede a poner los tubos falcon en la centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos (Ver anexo 4).
3. Cuando ya pasé los 15 minutos, se debe sacar y quitar el sobrenadante con mucho cuidado, solo se debe dejar las colonias en la parte inferior del tubo.
4. Seguidamente se re suspende con infusión cerebro-corazón a 500 ml, y se debe pasar a tubos eppendorf previamente rotulados.

5. Agregar 40 μ l de SDS al 20% μ l.
6. Posteriormente se debe agregar 8 μ l de proteinasa K, a 20 mg /ml se debe mezclar muy bien
7. Después se debe llevar a la incubadora a una temperatura de 50 a 60 °C ,por toda la noche o una hora
8. Posteriormente se debe añadir 300 μ l de cloruro de sodio 6 molar NaCl 6M
9. Se centrifuga por 30 segundos a una velocidad máxima
10. Una vez más se debe centrifugar, por 30 minutos a una velocidad de 10,000 revoluciones.
11. Después sacar el sobrenadante a tubos nuevos.
12. Después se debe añadir el volumen de isopropanol y mezclar bien, se debe incubar lo tubos en -20 °C por al menos 1 hora
13. Sacar de la incubadora y se debe centrifugar por 20 minutos a una temperatura de 4 °C a 10, 0000 revoluciones
14. Se debe lavar con alcohol a un porcentaje del 70% y se debe dejar secar.
15. Finalmente se debe re suspender en agua estéril en 300 a 500.

4.3.10 Medición de la concentración de ADN

Medir la concentración de ADN es crucial, porque asegura la precisión y reproducibilidad de los experimentos en biología molecular, tales como PCR, secuenciación y clonación, optimizando las reacciones y evitando el desperdicio de reactivos, costosos además permite verificar la pureza y calidad del ADN, detectar contaminantes, evaluar la degradación de las muestras y asegurar la consistencia en estudios comparativos, lo que es vital para obtener resultados fiables y biológicamente relevantes. Una vez que terminamos de extraer el gen todas las cepas, procedemos a la medición del ADN.

1. Sacamos las cepas del congelador, y la dejamos atemperar en el cuarto estéril por al menos 5 minutos
2. Seguidamente, mezclamos bien cada una de las muestras, por medio del vórtex.
3. Después se debe calibrar el nanoDrop, para lo cual se debe añadir 0.5 μ L de agua destilada y se procede a medir el resultado nos debe salir todo en 0.5 μ L

4. A continuación, debemos limpiar la gota de agua destilada y añadimos los 0,5 μ L de las muestras en el nanoDrop, este nos indicara la concentración y la calidad del ADN. (Ver anexo 5)

4.3.11 Preparación de la master mix

Una vez extraído el ADN se procede a realizar la master mix, que se utiliza para realizar el PCR y la electroforesis, de cada uno de las muestras de genes. Antes de preparar la master mix se debe disolver el ADN de las muestras, para dejarlo 1 en 10. Pero hay que tener en cuenta los resultados que nos arrojó el nanoDrop, si la concentración de ADN fue menor a 800 ng/ μ l, no se debe disolver y se trabaja directo con el ADN. Este paso se debe realizar con muestras de ADN que tengan más de 1000 ng/ μ l.

1. Colocamos 5ml de ADN en un eppendor ya rotulado.
2. Después añadimos 45 ml de agua libre de endonucleasas.
3. Finalmente se debe mezclar muy bien por medio del vortex por 1 minuto.

- **Gen *bla_{TEM}***

Para realizar la master mix de este gen para realizar la PCR se utilizó la *Taq Polimerasa*, recombinante de invitrogen y las condiciones se las preparo según la casa comercial.

Tabla 4 Componentes y volúmenes para la realización de la master mix para el gen *gyrA*

Componente	Volumen según el fabricante (1 muestra).	Volumen final de la muestra (14 muestras).
ADN	1 µl	14 µl
Taq Polimerasa	5 µl	70 ml
Primer forward	1 µl	14 µl
Primer reverse	1 µl	14 µl
Buffer	5 µl	70 µl
Mag SO₄	1 µl	14 µl
DNTPs	1 µl	14 µl
H₂O	5 µl	70 µl
Volumen final	20 µl	

Fuentes : **(Invitrogen, 2012)**

1. En un eppendorf se prepara la master mix, con los volúmenes finales de la parte derecha de la tabla.
2. Después, se rotula los eppendorf y se coloca 1 µl de ADN .
3. A continuación, se añade 19 µl de master mix en los eppendorf de PCR y se disuelve bien con ayuda del vortex .
4. Finalmente, se introduce al termociclador los eppendorf de PCR con las condiciones adecuadas.

- **Gen GyrA**

Para realizar la master mix de este gen se utilizó los volúmenes fueron los siguientes.

Tabla 5 Componentes y volúmenes para la realización de la master mix para el gen *blaTEM-1*

Componente	Volumen según el fabricante (1 muestra).	Volumen final de la muestra (14 muestras).
ADN	2 µl	28 µl
Dreem Taq Green	12,5 µl	175 µl
Primer forward	1 µl	14 µl
Primer reverse	1 µl	14 µl
H₂O	8,5 µl	119 ml
Volumen final	25 µl	

Fuente : **(Invitrogen, 2012)**

1. En un eppendorf se prepara la master mix, con los volúmenes que está en la parte derecha de la tabla.
2. Seguidamente, se coloca 23 µl de master mix en los eppendorfs de PCR previamente rotulados.
3. A continuación, se añade 2 µl de ADN en la master mix que se encuentra en los eppendorfs de PCR, y se mezcla por medio del vortex.
4. Finalmente, se coloca en el termociclador según sean las condiciones de PCR.

4.3.10 PCR convencional

Esta prueba se realiza en tres fases durante cada ciclo, las que se presenta a continuación, alrededor de 30 repeticiones (Ver anexo 6):

- Desnaturalización inicial: En esta fase, el ADN se desnaturaliza, separando su doble hélice por medio del calentamiento de la muestra. Este proceso tiene como objetivo proporcionar un molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN (**Moposita David, 2017**).
- Desnaturalización: Similar a la desnaturalización inicial, este paso asegura que el ADN de doble cadena se separe en hebras simples antes de la etapa de recocido (**Moposita David, 2017**).

- Alineamiento o hibridación: En esta fase, los iniciadores se alinean con los sitios específicos complementarios, que posteriormente se van a amplificar para este paso, lo que facilita la unión de los iniciadores **(Moposita David, 2017)**.
- Extensión: Durante esta fase, se va a sintetizar una cadena nueva de ADN que va en dirección 5' a 3'. para lograr es ideal para la unión de los iniciadores y la ejecución de la replicación **(Moposita David, 2017)**.
- Extensión final: Asegura que todas las cadenas de ADN sean completamente replicadas, permite a la ADN polimerasa completar la síntesis de cualquier fragmento de ADN, que no haya sido terminado durante los ciclos anteriores **(Moposita David, 2017)**.
- **Primers para el gen *bla_{TEM1}***

Tabla 6 *Cebadores utilizados en el estudio para *bla_{TEM1}**

Gen	Secuencia
bla_{TEM1}	CATTTCGTCGCGCCCTTATTC
	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC

Fuente: **(Sajhan et al., 2022)**

- **Condiciones de PCR para el gen *bla_{TEM}***

Tabla 7 *Condiciones para la realización del PCR para blaTEM-1*

Pasos	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos	1
Desnaturalización	94°C	40 segundos	30
Alineamiento	60 °C	40 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	7 minutos	1

Fuente: (Sajhan et al., 2022)

- **Primers GyrA**

Tabla 8 *Cebadores utilizados en el estudio para GyrA*

Gen	Primers Sequence
gyrA	F 5'- AGCGACATTGCCAGAGAAAT -3'
	R 5'- CACCGACTGCATCACGTTT -3'

Fuente: (Abdelkreem et al., 2020)

- **Condiciones de PCR para el gen *GyrA***

Tabla 9 Condiciones para la realización del PCR para *gyrA*

Pasos	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	30
Alineamiento	54 °C	20 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	7 minutos	1

Fuente: **(Weigel et al., 2002)**

4.3.11 Purificación de ADN

La purificación de ADN es esencial para eliminar contaminantes, y obtener ADN de alta calidad, lo que es crucial para el éxito de una variedad de procedimientos en biología molecular y genética. Este proceso asegura que el ADN sea adecuado, para aplicaciones como la PCR, secuenciación, clonación, y análisis de expresión génica, proporcionando resultados precisos y reproducibles. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Añada 4 volúmenes de Binding Buffer (B2) a un volumen de 80 µL.
2. Extraer una columna de PureLink® Clean-up.
3. Anadir la muestra en el Binding Buffer del paso numero 1 a la columna.
4. Centrifugar la columna de PureLink® a 3000 por un 1 minuto.
5. Seguidamente sacar de la centrifuga, y desechar el sobrenadante y volver a colocar la columna de PureLink® en el tubo.
6. Anadir 650de Wash Buffer a la columna de PureLink®.

7. Centrifugar la columna de PureLink® a 3000 revoluciones durante 1 minuto, desechar el tubo de Wash Buffer, y colocar la columna de PureLink® en el tubo.
8. Centrifugar la columna de PureLink® a máxima velocidad, durante 3 minutos.
9. Colocar la columna de PureLink® en un tubo de elución de PureLink® limpio de 1,7 ml.
10. Colocar, 50µL de Elution Buffer o agua destilada estéril, en el centro de la columna de PureLink®
11. Incube la columna de PureLink® a temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Centrifugar, la columna de PureLink® a máxima velocidad por 1 minutos.
13. El tubo de elución tiene el producto purificado, sacar y desechar la columna de PureLink®.

4.3.12 Solución de trabajo de TBE 1X

En este paso, se preparó la solución de trabajo de TBE 1X combinando, la solución madre TBE 5X mencionada previamente con agua desionizada en una proporción de 1:4.

4.3.13 El gel de agarosa al 1,5%

La cantidad de cámaras de electroforesis a preparar se calculó según la cantidad de buffer TBE 1X y agarosa, se colocó 30ml y 0.44 gr respectivamente. Ambos compuestos se dispusieron en un recipiente de vidrio, se mezcla bien para después colocar en el microondas durante 30 a 40 segundos, hasta lograr una mezcla homogénea. Posteriormente que el preparado se haya enfriado un poco se le debe colocar safe green 0,3 µL, homogenizar bien para colocar en la cámara de electroforesis, que anteriormente se colocó el peine respectivo. Al final se deja secar a temperatura ambiente, no debe tener contacto con los rayos del sol, evitar las burbujas en el gel y si las hubiera quitarlas por medio de unas pipetas **(Moposita David, 2017)**.

1. Se inició quitando los pines que se colocaron en el gel de agarosa, y se depositan dentro del gel de la cámara de electroforesis horizontal, y también se rebosa con el TBE 1X.
2. Se añadió 0.5 μ L del marcador de peso molecular, en el primer pocillo y posteriormente se cargan los demás pocillos, con las muestras a una concentración de 0.5 μ L.
3. Después se cierra la cámara, y se conecta los electrodos de una manera idónea esto en dirección al ánodo.
4. Para finalizar es necesario ajustar la fuente de poder, de 100 a 80 voltios por al menos 30 min o una hora. El voltaje y el tiempo pueden variar dependiendo del tamaño de cada uno de los fragmentos, de los respectivos ácidos nucleicos (Ver anexo 7).

4.3.13 Electroforesis

Esta técnica se encuentra entre las más empleadas para analizar, y describir los ácidos nucleicos de diversas fuentes. En esta situación, se emplean geles que funcionan como tamices moleculares, para separar las moléculas según su forma y tamaño. En consecuencia, durante la electroforesis en gel de agarosa, las moléculas de ADN de distintos tamaños migran de manera dispar, posibilitando la identificación de fragmentos de ADN previamente conocidos (**Alberto, 2020**).

1. Una vez que el tiempo en la cámara de electroforesis haya, terminado se debe apagar y sacar el gel.
2. El gel es llevado a la máquina de lectura de electroforesis, utilizamos ChemiDoc de bio rad, debemos quitar el exceso de agua y verificar que no haya burbujas, para no tener una lectura errónea de las muestras.
3. Después se procede a colocar la respectiva información, en la máquina de lectura y se espera alrededor de 2 a 1 minuto para que nos arroje los resultados.

4.3 Tamaño de la muestra (si aplica)

Esta investigación se realizó utilizando 12 muestras de *Proteus mirabilis* que fueron identificadas en anteriores estudios, por medio de procedimientos moleculares, estas muestras se encuentran en la Universidad Técnica de Ambato, dentro del Laboratorio de Biología molecular y Microbiología.

4.4 Variables respuestas

Para verificar si existe genes de resistencia tanto en quinolonas y betalactámicos, vamos a realizar el PCR convencional y electroforesis, para ello trabajamos con dos genes y sus respectivos cebadores.

- Gen *GyrA*
 - F5'-AGCGACATTGCCAGAGAAAT-3'
 - R5'-CACCGACTGCATCACGTTT -3'
- Gen *bla_{TEM-1}*
 - F '-CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC-3'
 - R5'- CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC -3'

4.5 Diseño experimental

En el estudio se emplearon diversas técnicas microbiológicas, moleculares y bioquímicas. Se iniciaron con cultivos convencionales, donde se cultivaron los microorganismos en los medios de cultivo previamente mencionados, para la identificación de los microorganismos previamente aislados se utilizó microscopia. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN, seguida de la amplificación específica de genes mediante PCR y análisis mediante electroforesis, para detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos, específicamente *bla_{TEM-1}* y *gyrA*

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de la extracción de ADN se procedió a medir la cantidad y concentración de cada una de las muestras utilizando el NanoDrop. Los resultados indicaron una concentración adecuada de ADN sin contaminaciones de proteínas, contaminantes químicos u otros contaminantes, bacterianos como se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 10 *Calidad y concentración del ADN de cada una de las muestras*

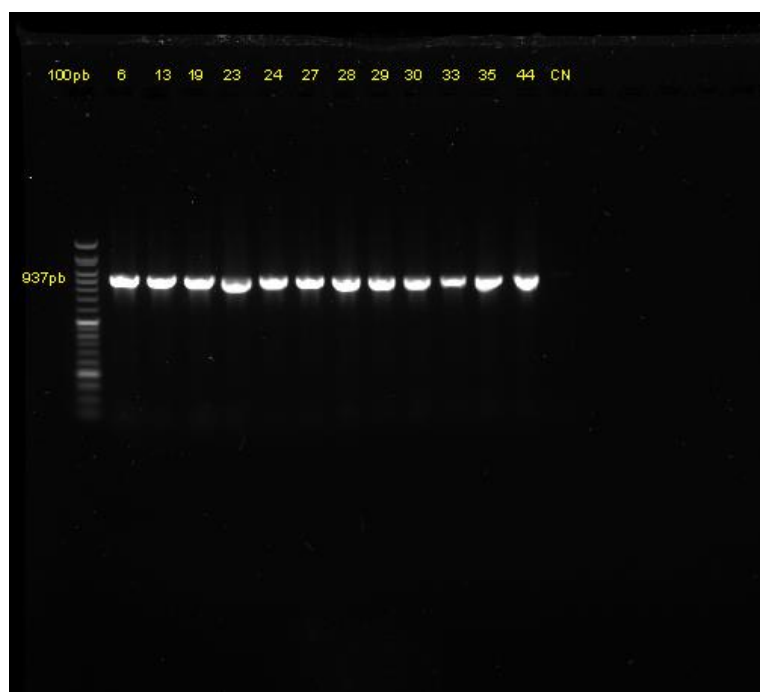
	Muestra	Unidad	Concentración de ADN
1	NCTC 11938 16S	ng/μl	1893
2	AA5 16S	ng/μl	2096
3	HAMBI 91	ng/μl	1724
4	MM2 16S	ng/μl	1960
5	HN2p	ng/μg	718
6	UFV 131 16S	ng/μl	1632
7	BLPS5 16S	ng/μl	1491
8	10B 16S	ng/μl	2432
9	M17_J16	ng/μl	1183
10	NCTC 11938 16S	ng/μl	1544
11	NCTC 11938 16S	ng/μl	1378
12	MPE0346	ng/μl	2183

3.1. Demostrar la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas.

En la última década se ha observado un incremento en los casos de la resistencia, a las fluoroquinolonas entre las bacterias Gram negativas anaeróbicas facultativas. No obstante, aún se están investigando completamente los informes sobre las apariciones de cepas de *Proteus mirabilis* resistentes a fluoroquinolonas.

Una vez realizada la medición del ADN, y confirmada su calidad óptima se procedió a realizar la PCR y la electroforesis, los primers fueron diseñados de acuerdo a la investigación de **Weigel et. (2002)** y se obtuvo los siguientes resultados.

Figura 5 Ilustración amplificada del gen *gyrA* mediante PCR



En la figura 5 se observa que la amplificación del fragmento para el gen *gyrA* originó el producto esperado de 937 pb al final del proceso de electroforesis. Esto demuestra que las cepas tomadas para el estudio son 100% resistentes a las fluoroquinolonas, confirmando que todas las cepas de *Proteus mirabilis* fueron positivas para el gen *gyrA*. Comparativamente, la investigación realizada por **Abdelkreem et al. (2020)** detectó resistencia a las fluoroquinolonas en un 80% de las cepas de *Proteus mirabilis*, con un tamaño de banda para el gen *gyrA* de 937 pb. Estos resultados sugieren una homogeneidad en los hallazgos entre ambos estudios.

En la investigación se utilizaron las condiciones de PCR descritas por **Weigel et al. (2002)**, seleccionando 29 aislados con diferentes niveles de susceptibilidad a la ciprofloxacina, ya sea disminuida o resistente. Como resultado, se identificaron genes

de resistencia a fluoroquinolonas como *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*. Para el gen *gyrA*, el fragmento amplificado fue de 335 pb, ya que los cebadores de oligonucleótidos fueron diseñados en regiones de ADN que contienen secuencias de aminoácidos conservadas en las proteínas GyrA y ParC en diversas especies de enterobacterias.

En la investigación realizada por **Kim et al. (2005)** se analizaron sesenta y cuatro aislamientos resistentes a *Proteus mirabilis* obtenidos de muestras de productos cárnicos, la mayoría de estos aislados fueron resistentes a ciprofloxacina, ampicilina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, también se detectó genes de resistencia a antibióticos como *aadA2*, y *aadB*. De la misma manera se identificó una cantidad menor de aislados con resistencia en *gyrA* y *parC* debido a la resistencia al ácido nilidíxico, a comparación de mi investigación se tuvo una variación con los resultados por razón que se presentó un porcentaje menor en el gen *gyrA* debido a que fueron utilizados diferentes cebadores y diferentes condiciones de PCR.

Tomando en consideración la investigación realizada por **López et al. (2022)**, se identificaron varios genes como *AmpC*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *GyrA* y el gen *qnrB* en pollos de engorde, los cuales mostraron la presencia simultánea de genes que otorgan resistencia a los antibióticos. En otra investigación, se evaluaron pacientes que podrían estar siendo afectados por estos genes, encontrándose de igual manera un elevado índice de resistencia a las fluoroquinolonas (**Montúfar et al., 2017**). En el estudio realizado por **Coka (2023)** sobre *Proteus mirabilis*, se evidenció una resistencia significativa hacia las fluoroquinolonas, observándose mutaciones cromosómicas que afectaron directamente a los genes identificados. Además, se detectó una notable resistencia a BLEE en relación con los antibióticos betalactámicos.

Con el fin de complementar los resultados se expone el trabajo investigativo de **Yu et al. (2017)** donde se aislaron a 22 especies pertenecientes a 15 géneros entre las más representativas se encontraron las siguientes bacterias *E. coli*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, los cuales presentaron porcentajes de aislamientos multirresistentes en la carne de res con 39,1%, en la carne

de cerdo con 37,5%, carne de pollo con 19,1% y finalmente en la carne de pato con 9,1% , además de ello se observó el gen *qnrB* , este gen está asociado con un nivel bajo de resistencia a quinolonas. Así mismo se detectó que todos los aislados resistentes a las fluoroquinolonas y quinolonas mostraban mutaciones en los genes *gyrA*, *parC*, esto sugiere que las mutaciones cromosómicas tienen un papel crucial en la tenacidad a las fluoroquinolonas de alto nivel.

Por otro lado en el su estudio de **Saito et al. (2005)** se investigó genéticamente las mutaciones que están asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas en las regiones determinantes de la resistencia a las quinolonas de topoisomerasa y del ADN girasa en aislados clínicos de *Proteus mirabilis* obteniendo resistencia en dos aislados a fluoroquinolonas en un 16% mostrando mutaciones en *ParC*, *GyrB* y *GyrA* además de ello se identificó una nueva mutación con *Glu* en *GyrA* donde se sospecha que fue responsable de la resistencia a las fluoroquinolonas. Estos resultados obtenidos demuestran la presencia de una mutación en *Glu* en el gen *GyrA* que se puede atribuir a la resistencia de las fluoroquinolonas de alto nivel. En mi estudio difiere significativamente del realizado por Saito el cual encontró un porcentaje menor en las muestras mientras que en resultados obtenidos se detectó el 100% de las muestras analizadas, esta discrepancia de los datos se debe a las técnicas de PCR utilizadas y las muestras estudiadas provienen de una región diferente.

En el estudio de **Nakano et al. (2019)** investigaron la resistencia a las fluoroquinolonas en *Proteus mirabilis* detectando mutaciones específicas en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parE*. Los hallazgos obtenidos en mi estudio corroboran estos resultados al mostrar que el gen *gyrA* estaba presente en todas las muestras. Ambos estudios subrayan la importancia de las mutaciones en la resistencia a las fluoroquinolonas, indicando la necesidad de una vigilancia continua y un análisis más profundo de estas mutaciones para desarrollar estrategias efectivas contra la resistencia bacteriana.

Weigel et al. (2002) investigó la resistencia a las fluoroquinolonas en aislados de *Proteus mirabilis* por medio de un análisis genético de la región determinante de la resistencia a las quinolonas de los genes *gyrA*, *parE*, *parC* y *gyrB*, se utilizó 29 aislados con una susceptibilidad resistente (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) y reducida (CIM 0,5 a 2 $\mu\text{g/ml}$) a ciprofloxacina. Los perfiles de sensibilidad a ciprofloxacina, trovafloxacino, moxifloxacino, levofloxacino y gemifloxacino fueron analizados en relación con las variaciones de aminoácidos de QRDR, la disminución de la susceptibilidad y la resistencia vinculada a mutaciones dobles en el gen *gyrA* y *parC*, además encontraron mutaciones en el gen *gyrB* con un alto grado de resistencia a fluoroquinolonas 12 de 20 aislados resistentes a ciprofloxacina, también se detectó la inserción de tres nucleótidos, resultando en la adición de lisina en las posiciones K455 y A456 en el gen *gyrB* de una cepa. A diferencia de todas las especies bacterianas analizadas las mutaciones en el gen *gyrB* parece ser un evento común en la adquisición de resistencia a las fluoroquinolonas entre los aislados clínicos de *Proteus mirabilis*.

En este estudio todas las muestras presentaron amplificación del gen *gyrA* lo cual es consistente con las observaciones de **Weigel et al. (1998)** donde reportó la presencia de mutaciones en el gen *gyrA*, además menciona que este gen es un mecanismo común de resistencia a fluoroquinolonas en varias especies de Enterobacteriaceae. Aunque nuestro estudio se centró en la amplificación del gen *gyrA*, es importante considerar otros mecanismos de resistencia como la disminución de la acumulación intracelular de las fluoroquinolonas también señalados por estos autores.

Todas las muestras de *Proteus mirabilis* aisladas de carne de pollo mostraron una amplificación exitosa del gen *gyrA* con los tamaños de fragmentos esperados. Estos resultados confirman la presencia del gen *gyrA* en todos los aislados estudiados, respaldando su papel esencial en la replicación del ADN bacteriano, y su conocida asociación con la resistencia a las fluoroquinolonas, específicamente a la ciprofloxacina. Además del gen *gyrA*, es importante señalar que existen otros genes

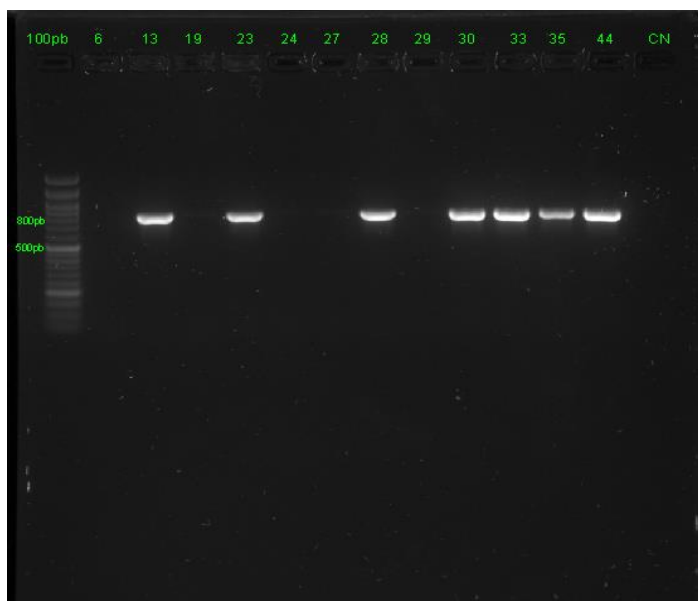
asociados con la resistencia a las fluoroquinolonas, como son los genes *gyrB*, *parC* y *parE* entre otros, además hay que señalar que existe otros mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas. Estos hallazgos subrayan la complejidad de la resistencia, a las fluoroquinolonas en *Proteus mirabilis* y la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos involucrados.

3.2.Determinar la presencia de genes de resistencia a betalactámicos.

Los genes betalactámicos juegan un papel crucial en la resistencia bacteriana, permitiendo a las bacterias degradar antibióticos betalactámicos como penicilina y sus derivados. En este estudio se investigó la presencia del *bla_{TEM-1}* en cepas de *Proteus mirabilis* que fueron aislados anteriormente en carne de pollo, utilizamos la técnica de amplificación por PCR y electroforesis.

Se diseñaron primers específicos para amplificar fragmentos de 800 pares de bases correspondientes al gen de interés. Sin embargo, como se observa en la figura 6, los resultados revelaron que no todas las muestras se amplificaron a los 800 pb esperados estos resultados muestran que las cepas analizadas tuvieron un porcentaje significativo esperado. En la figura 5 se muestra el gel de electroforesis representativo, donde se observa las bandas correspondientes en los siete carriles se evidencian las amplificaciones del gen *bla_{TEM-1}* (58,3%), mientras que en los 5 restantes no se encontró amplificación, sin embargo, la ausencia de estos genes no excluye la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos, dado que existe otros genes que confieren resistencia a estos medicamentos.

Figura 6 Ilustración ampliada del gen *bla*_{TEM1}



Estos resultados son consistentes con los hallazgos reportados en estudios previos, como la investigación de **Sajhan et al. (2022)**, que analizó antibiogramas y detecciones moleculares de betalactamasas en *Proteus mirabilis* de aislados en carne de cerdo. En dicho estudio, se encontró el gen *bla*_{TEM1} en seis muestras (37,5%) con un tamaño de 800 pb, mientras que los genes *bla*_{OXA} y *bla*_{SHV} no se encontraron en ninguna de las muestras, y el gen *bla*_{CTX-M} se evidenció en siete muestras (43,75%). Este patrón de resistencia a la amoxicilina más ácido clavulánico, tetraciclina, ciprofloxacina y gentamicina refuerza la necesidad de un monitoreo continuo y una evaluación profunda de la resistencia antimicrobiana en *P. mirabilis*. La variabilidad del porcentaje de *bla*_{TEM1} en comparación con nuestro estudio, se debe a que en la investigación mencionada se utilizaron muestras de carne de cerdo y diferentes reactivos para la realización del PCR. Similarmente, en el estudio de **Torres et al. (2020)** se encontró la presencia de *bla*_{TEM1} como el gen predominante en las muestras, alineándose con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

De manera similar en el estudio de **Papagiannitsis et al. (2020)** documentaron la presencia de *bla*_{TEM-1}, que codifica una β -lactamasa capaz de conferir resistencia a diversos antibióticos β -lactámicos, este estudio encontró que el gen *bla*_{TEM-1} estaba

presente en el 56% de las muestras, indicando una prevalencia significativa, aunque no universal de este mecanismo de resistencia.

A mismo en otro estudio realizado por **Wong et al. (2020)** detectaron varios genes de β -lactamasas en muestras de *Proteus mirabilis*, entre ellos *bla_{TEM1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M-9}* y *bla_{CMY-2}*, estos genes solo se encontraron en cepas resistentes a los β -lactactámicos, por lo cual el gen *bla_{TEM1}* y *bla_{OXA-1}* se evidenciaron en 12 aislados, el gen *bla_{CMY-2}* y *bla_{TEM1}* en otros 4 aislados y en solo en dos aislados se encontró *bla_{TEM1}*, *bla_{CMY-2}* y *bla_{OXA-1}*, además se observó que todas las cepas de *Proteus mirabilis* que fueron portadoras de CTMX-19 y CMY-2, presentaban un elemento de superintegrón SXT y los múltiples intentos de transferir la resistencia a ceftriaxona, de *Proteus mirabilis* a *E. coli* J53 no fueron exitosos.

De igual manera estos resultados se ven reforzados por la investigación realizada por **Tshitshi et al. (2014)**, donde detectó en las heces de bovinos Enterobacteriaceae las más frecuentes aisladas fueron *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *K. pneumoniae*, además se encontró por medio del PCR genes de carbapenemasas como ; *bla_{SEM}* con un 17,9% *bla_{KPC}* en un 35,8, y *bla_{NDM}* 20,5% siendo los genes detectados con más frecuencia, por otro lado los genes detectados en proporciones bajas fueron *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-23}* y *bla_{OXA-48}*. Conjuntamente se detectaron genes como ; *bla_{CTX-M}* con 20,5%, *bla_{TEM}* con 22,5% y *bla_{SHV}* con 33,1%, el gen *bla_{OXA}* se encontró con menor frecuencia con un 11.3%, así mismo en *Proteus mirabilis* se encontró que el 50% de los genes fueron de *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*, en *E. coli* se detectó los genes *bla_{TEM}* (3,8%) y *bla_{SHV}* (3,8%), en *K. pneumoniae* se encontró *bla_{OXA}* (3,0%) y *bla_{CTM-X}* (12,1%), igualmente se detectó una alta prevalencia de genes de resistencia incluyendo *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*, en bacterias aisladas de heces de bovinos. Estos resultados subrayan la importancia de la vigilancia y control de la resistencia antibiótica en entornos agrícolas.

Además, en el estudio de **Ibrahim et al. (2021)** se realizó un análisis de secuenciación revelando genes como *bla_{TEM-1}* y *bla_{CTMX-M-15}*, estos fueron variantes predominantes de *bla_{TEM}* y *bla_{CTMX}*, así mismo se encontró varios genes de BLEE en aislados bacterianos gram-negativos, detectando que *bla_{TEM}* era el más prevalente con una frecuencia significativa del 80% en *Proteus mirabilis*, *A.baumannii* con un (78,9%) y *K. pneumoniae* con un 60,7%. La detección del gen *bla_{TEM1}* en nuestro estudio es similar al documentado por **You et al. (2015)** donde detectó el mismo gen en muestras de carne de cerdo y de pollo.

En el trabajo de **Chanal et al. (2000)** se encontró resultados similares en cuanto a la detección del gen *bla_{TEM-1}*, ya que en las muestras asiladas presentaron resistencia a la amoxicilina en *Proteus mirabilis*, esta estuvo asociada al gen TEM o β -lactamasas derivadas de TEM, la mayoría de estas evolucionaron en TEM-1 y TEM-2. Este patrón de resistencia también fue observado por **Liu et al. (2000)** quienes reportaron una prevalencia del gen *bla_{TEM-1}* en *Proteus mirabilis* en un porcentaje significativo de sus muestras.

Kim et al. (2005) identificó el gen *bla_{TEM1}* en cepas de *Proteus mirabilis*, por medio del PCR convencional este gen se amplificó a 861 pares de bases, además en el estudio se menciona que TEM-1 es una de las enzimas más producidas, y comunes en *P. mirabilis* siendo encontrada en al menos el 58,6% de las cepas productoras de penicilinas, el gen *bla_{TEM1}* estaba presente en todas las cepas que fueron resistentes a ampicilina controlados por promotores de Pb y Pa, estos promotores dan un aumento de al menos 10 veces en los niveles de transcripción a diferencia del promotor P3 que es medianamente lento. No obstante, las CMI para el antibiótico de ampicilina fueron bajas, por lo cual sugiere que son muchos los factores que atribuyen la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias.

Respecto a los resultados obtenidos al evaluar los genes betalactámicos hubieron presencias en varias muestras, sin embargo en algunos casos no se pudo encontrar

dicha presencia del gen, esto puede explicarse a trabajos referentes como el de **Girlich et al. (2020)** donde en pruebas realizadas, por parte de un grupo de estudio existían factores donde los niveles altos de resistencia continua en cepas aisladas de *Proteus mirabilis*, esta resistencia se atribuye a la expresión reducida de proteínas de unión a penicilina (PBP), como PBP1a y PBP2 y se reporta con mucha frecuencia la resistencia a los antibióticos no β -lactámicos, debido a enfermedades o infecciones del sistema urinario, los nitrofuranos y fluoroquinolas. Además, se nota un aumento constante en los informes sobre la presencia de cepas de *Proteus mirabilis* resistentes a varios medicamentos. Al igual que en el estudio de **Elbanna y Abulreesh (2022)** donde mencionan otro factor de resistencia a los betalactámicos, como la pérdida de porinas lo cual provoca una reducción en la permeabilidad de los antibióticos. Estos pueden ser algunos de los factores por los cuales en nuestro estudio, no se amplificaron todas las muestras para el gen *bla_{TEM-1}*. De igual manera en el estudio presentado por **Seibor y Neuwirth, (2014)** mencionan, que la resistencia a los betalactámicos también se da por la existencia de las proteínas de unión a las penicilinas.

Por el contrario, con nuestros resultados en el estudio de **Noruyuki et al. (2003)** encontraron productos de amplificación de 780 bp, para los genes *bla_{CTX-M-2}*, mientras que no se observaron ampliaciones para *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CX-M-1}* o *bla_{CTX-M-9}* esto se debió al uso de cebadores más específicos para *bla_{CTX-M-2}*, M-2-F y M-2-R, y se secuenciaron en ambas hebras. Donde tuvo como consecuencias proteínas deducidas mostrando aislamientos de *P. mirabilis* que producían CTX-M-2.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión detallada sobre la resistencia a los antibióticos en aislados de *Proteus mirabilis*, particularmente en relación con el gen *bla_{TEM-1}*. La amplificación exitosa de *bla_{TEM-1}* en nuestras muestras confirma la presencia de este gen de resistencia, aunque no fue detectado en todas las muestras. Este hallazgo sugiere la existencia de una heterogeneidad genética significativa dentro de la población de *P. mirabilis*.

3.3. Mecanismos moleculares de resistencia de *Proteus mirabilis* a fluoroquinolonas y betalactámicos.

3.3.1 Mecanismo de resistencia de *Proteus mirabilis* a fluoroquinolonas.

Ryuichi et al. (2019) realizó una investigación sobre la prevalencia y mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas, en aislados clínicos de *Proteus mirabilis* en Japón se encontró que uno de los mecanismos que ocasionan resistencia son las alteraciones a las células de proteínas, además del cambio a las membranas externas durante el uso de algún antibiótico o fármaco. Finalmente, el mecanismo que también altera la resistencia son las bombas de flujo ya que dificulta el acceso del antibiótico al sitio objetivo.

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV, que son esenciales para la replicación y transcripción del ADN bacteriano. Las bombas de eflujo expulsan las fluoroquinolonas, fuera de la célula bacteriana, reduciendo así su concentración intracelular y permitiendo que las bacterias sobrevivan y se multipliquen a pesar de la presencia del antibiótico (**Shirram et al.,2018**). Existen diversos tipos de bombas de eflujo, las que se ha encontrado hasta ahora en *Proteus mirabilis* son las bombas de Eflujo de Tipo AcrAB-TolC, estas son capaces de expulsar una amplia variedad de antibióticos incluyendo β -lactámicos y fluoroquinolonas, además posee un sistema de tres componentes que atraviesa ambas membranas bacterianas, y utiliza la energía del gradiente de protones para expulsar sustancias tóxicas fuera de la célula (**Fanelli et al.,2018**).

Ryuichi et al. (2019) menciona que *Proteus mirabilis* los cambios en las membranas externas son cruciales para su adaptación y supervivencia en diversos entornos. Estos cambios incluyen, ajustes en la composición lipídica para modular la fluidez y permeabilidad de la membrana, la modificación de proteínas de membrana que

facilitan la adhesión y la interacción con el sistema inmunológico del huésped, y la variación en la estructura del lipopolisacárido (LPS), que puede conferir resistencia a antibióticos y proteger contra la respuesta inmune. Estas adaptaciones son fundamentales para la formación de biopelículas, en superficies bióticas y abióticas, lo que contribuye a la persistencia y virulencia de *Proteus mirabilis* en entornos clínicos y ambientales

En la investigación de **Piróg et al. (2013)** encontraron resistencia a medicamentos β -lactámicos como ciprofloxacina y ceftazidima por la producción de biopelículas en *Proteus mirabilis*, con una resistencia del 40% y 64. % respectivamente. Las biopelículas son estructuras microbianas complejas formadas por comunidades de bacterias adheridas a una superficie y envueltas en una matriz extracelular. Estas biopelículas juegan un papel crucial en la patogenicidad de *Proteus mirabilis*, ya que protegen a las bacterias de factores externos, como los antibióticos y el sistema inmunológico del huésped. Además, las biopelículas facilitan la colonización de superficies bióticas y abióticas lo que puede contribuir a infecciones persistentes y recurrentes en entornos clínicos y ambientales.

Existen diversos genes dentro de las fluoroquinolonas que confieren resistencia antibiótica, como el estudio de **Donati et al. (2014)** donde analizaron los principales genes de resistencia a fluoroquinolonas, mediada por plásmidos mediante reacción en cadena de la polimerasa, seguido de secuenciación de ADN. Ninguno de los aislados fue positivo para los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *aac (6')-Ib-cr*, mientras que dos de 105 (1,9 %) cepas fueron positivas para el gen *qnrD*. Varios de estos genes han sido identificados en animales de compañía en otros países. Los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *aac (6')-Ib-cr* se identificaron en animales de compañía en Italia (**Donati et al., 2014**); los genes *qnrB*, *qepA* y *aac (6')-Ib-cr* en China (**Ma et al., 2009**); los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* y *aac (6')-Ib-cr* en Australia (**Gibson et al., 2010**) y los genes *qnrS*, *qepA* y *aac(6')-Ib-cr* en EE. UU (**Shaheen et al. , 2013**) .

3.3.2 Mecanismo de resistencia de *Proteus mirabilis* betalactámicos

Para **Elbanna y Abulreesh, (2022)** durante su investigación mencionan, que uno de los mecanismos que ocasionan resistencia al *Proteus mirabilis* en las β -lactamasas y las enzimas modificadoras de antibióticos se debe a la resistencia al hidrolizar los antibióticos. Además, otro mecanismo se debe a la pérdida de porina lo que podría provocar una permeabilidad reducida de los antibióticos, esto ocasiona una mayor actividad de la bomba de flujo que dificulta el acceso del antibiótico al sitio objetivo, una falla del antibiótico para unirse al sitio objetivo debido a la modificación del objetivo, y modificaciones en el lipopolisacárido que causa resistencia contra los antibióticos de polimixina (**Elbanna y Abulreesh, 2022**) .

Para los antibióticos β -lactámicos, las bombas de eflujo contribuyen a la resistencia bacteriana al disminuir la concentración intracelular del antibiótico, aunque los β -lactámicos generalmente actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, las bombas de eflujo reducen la eficacia de estos antibióticos expulsándolos fuera de la célula antes de que puedan alcanzar su sitio de acción (**Elbanna y Abulreesh, 2022**).

Según **Elbanna y Abulreesh (2022)** las bacterias pueden reducir la expresión de porinas o modificar su estructura para disminuir el número de canales disponibles en la membrana externa, esto puede ser el resultado de mutaciones en los genes que codifican para las porinas o de cambios en la regulación genética de su expresión, las bacterias pueden modificar la estructura del liposacárido (LPS) para alterar la permeabilidad de la membrana externa, estos cambios pueden incluir la adición o eliminación de grupos químicos específicos en los componentes del LPS, como el lípido A, los oligosacáridos del núcleo y la cadena O-antigénica , las modificaciones en el liposacárido pueden reducir la permeabilidad de la membrana externa, dificultando la entrada de los antibióticos β -lactámicos en la célula bacteriana. Este mecanismo de resistencia es particularmente importante para los β -lactámicos que

deben penetrar en la célula para inhibir las enzimas de transpeptidación, y así interrumpir la síntesis de la pared celular **(Kim et al., 2005)**. Aunque no se ha documentado ampliamente en *Proteus mirabilis*, estudios en otras bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* han demostrado que las modificaciones en el LPS pueden jugar un papel significativo en la resistencia a los β -lactámicos **(Kim et al., 2005)**.

Girlich et al. (2020) mencionan que uno de los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos es la unión a penicilina, este es un mecanismo de resistencia bacteriana que implica cambios en las moléculas objetivo de los antibióticos dentro de las bacterias. Estas moléculas objetivo o blanco son componentes bacterianos específicos que los antibióticos intentan inactivar o destruir para ejercer su efecto antibacteriano, al modificar estas moléculas, las bacterias pueden reducir la efectividad de los antibióticos, la resistencia mediante modificación de blancos, ocurre cuando las bacterias alteran las proteínas de unión a penicilina (PBPs, por sus siglas en inglés), estas PBPs son las dianas naturales de los antibióticos betalactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Las modificaciones en las PBPs ya sea por mutaciones puntuales o por adquisición de genes que codifican PBPs con baja afinidad por los betalactámicos, resultan en una disminución de la efectividad del antibiótico, esto permite que las bacterias continúen sintetizando su pared celular y sobrevivan a la exposición al antibiótico **(Goodman y Gilman, 2015)**.

3.4.Comprobación de la hipótesis

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis planteada ya que se detectó gen *gyrA* en todas las muestras y del gen *bla_{TEM-1}* en el 58,2 % de las mismas, esto indica una clara presencia de genes de resistencia a quinolonas y β -lactámicos en *Proteus mirabilis*, aislados en carne de pollo en el cantón Ambato. Sin embargo, la variabilidad en la presencia de *bla_{TEM-1}* sugiere que existen otros factores o mecanismos que también podrían estar contribuyendo a la resistencia a los β -lactámicos en estas cepas.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- El presente estudio ha demostrado con éxito la presencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas en *Proteus mirabilis* aislados de carne de pollo en la ciudad de Ambato. La amplificación del gen *gyrA* a 900 pb en todas las muestras analizadas confirma la prevalencia de este determinante genético en los aislamientos. Estos hallazgos subrayan la importancia de monitorear y controlar la resistencia a fluoroquinolonas en la cadena alimentaria para mitigar los riesgos asociados con la diseminación de cepas resistentes.
- La investigación reveló la existencia de genes de resistencia a los betalactámicos en *Proteus mirabilis*, detectando el gen *bla_{TEM1}* en un 58,7% de las muestras, estos hallazgos sugieren la existencia de otros mecanismos de resistencia y la presencia de otros genes en los betalactámicos.
- Existe otros mecanismos de resistencia a *Proteus miribilis* como son las bombas de eflujo, alteraciones en la zona de proteínas, cambios en las membranas externas y la existencia de otros genes de resistencia.

4.2 RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios para incluir la investigación de otros genes de resistencia a β -lactámicos, como *blaSHV*, *blaOXA*, y *blaCTX-M*, que también pueden contribuir a la resistencia en *Proteus mirabilis*.
- Extender la investigación sobre otros genes de resistencia en fluoroquinolonas, para incluir otros genes relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas, como *parC* y *parE*, así como otros mecanismos como las bombas de eflujo y la modificación de las proteínas blanco.
- Implementar protocolos de higiene en la producción avícola y en la manipulación de alimentos para reducir la propagación de bacterias resistentes. Limitar el uso de fluoroquinolonas en la medicina veterinaria y fomentar la investigación de alternativas a estos antibióticos puede disminuir la presión selectiva que favorece la resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelkreem, R. H., Yousuf, A. M., Elmekki, M. A., & Elhassan, M. M. (2020). DNA Gyrase and Topoisomerase IV Mutations and their effect on Quinolones Resistant *Proteus mirabilis* among UTIs Patients. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 36(6), Article 6. <https://doi.org/10.12669/pjms.36.6.2207>
- Ahn, J. Y., Ann, H. W., Jeon, Y., Ahn, M. Y., Oh, D. H., Kim, Y. C., Kim, E. J., Song, J. E., Jung, I. Y., Kim, M. H., Jeong, W., Ku, N. S., Jeong, S. J., Choi, J. Y., Yong, D., Song, Y. G., & Kim, J. M. (2017). The impact of production of extended-spectrum β -lactamases on the 28-day mortality rate of patients with *Proteus mirabilis* bacteremia in Korea. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2431-8>
- Ambler, R. P., Baddiley, J., & Abraham, E. P. (1997). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Bret, L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., & Sirot, J. (1996). Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(2), 183-191. <https://doi.org/10.1093/jac/38.2.183>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. <https://doi.org/10.1128/aac.01009-09>
- Castanheira, M., Mills, J. C., Costello, S. E., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2015). Ceftazidime-Avibactam Activity Tested against Enterobacteriaceae Isolates from U.S. Hospitals (2011 to 2013) and Characterization of β -Lactamase-Producing Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3509-3517. <https://doi.org/10.1128/aac.00163-15>
- Castro, S. T., Rodriguez, C. R., Perazzi, B. E., Radice, M., Sticotti, M. P., Muzio, H., Juarez, J., Gutkind, G., Famiglietti, A. M. R., Santini, P. I., & Vay, C. A. (2006). Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Chanal, C., Bonnet, R., De Champs, C., Sirot, D., Labia, R., & Sirot, J. (2000). Prevalence of β -Lactamases among 1,072 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*:

- A 2-Year Survey in a French Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1930-1935. <https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1930-1935.2000>
- Choury, Szajnert, Azibi, & Paul. (200d. C.). *Nucleotide Sequence of the blaRTG-2 (CARB-5) Gene and Phylogeny of a New Group of Carbenicillinases | Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.44.4.1070-1074.2000>
- de Champs, C., Bonnet, R., Sirot, D., Chanal, C., & Sirot, J. (2000). Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: A two year survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(4), 537-539. <https://doi.org/10.1093/jac/45.4.537>
- Dortet, L., Poirel, L., Al Yaqoubi, F., & Nordmann, P. (2012). NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), E144-E148. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03796.x>
- Farzad, F., Maarofi, K., Arzanlou, M., Peeri-Dogaheh, H., & Sahebkar, A. (2021). ¿Qué mutaciones de cambio de sentido asociadas con la ADN girasa y la topoisomerasa IV están involucradas en la resistencia clínica de *Pseudomonas aeruginosa* a ciprofloxacino en Ardabil? *Gene Reports*, 24, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101211>
- Hu, Y., Shi, H., Zhou, M., Ren, Q., Zhu, W., Zhang, W., Zhang, Z., Zhou, C., Liu, Y., Ding, X., Shen, H. C., Yan, S. F., Dey, F., Wu, W., Zhai, G., Zhou, Z., Xu, Z., Ji, Y., Lv, H., ... Tan, X. (2020). Discovery of Pyrido[2,3-b]indole Derivatives with Gram-Negative Activity Targeting Both DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(17), 9623-9649. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00768>
- Ibrahim, M. E., Algak, T. B., Abbas, M., & Elamin, B. K. (2021). Emergence of blaTEM, blaCTX-M, blaSHV and blaOXA genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(6), 1450. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10885>
- Invitrogen. (2012). *Recommended Protocols | SCBT - Santa Cruz Biotechnology*. <https://www.scbt.com/es/resources/protocols>

- Jové, T., Da Re, S., Tabesse, A., Gassama-Sow, A., & Ploy, M.-C. (2017). Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two Pc Promoters. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01499>
- Kim, S.-H., Wei, C.-I., & An, H. (2005). Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1408-1413. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.7.1408>
- Li, Du, Dai, Colmillo, Zhu, & Kan. (s. f.). *Los elementos integradores y conjugativos de SXT/R391 en especies de Proteus revelan una abundante diversidad genética y resistencia a múltiples fármacos | Informes Científicos*. Recuperado 27 de junio de 2024, de <https://www.nature.com/articles/srep37372>
- Liu, P. Y. F., Gur, D., Hall, L. M. C., & Livermore, D. M. (1992). Survey of the prevalence of β lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30(4), 429-447. <https://doi.org/10.1093/jac/30.4.429>
- Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Nagano, N., Asahara, M., Furukawa, T., Ono, Y., Yano, H., & Okamoto, R. (2019). Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Japan. *Heliyon*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01291>
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., & Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4264-4269. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4264-4269.2003>
- Papagiannitsis, C. C., Miriagou, V., Kotsakis, S. D., Tzelepi, E., Vatopoulos, A. C., Petinaki, E., & Tzouvelekis, L. S. (2012). Characterization of a Transmissible Plasmid Encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 4024-4025. <https://doi.org/10.1128/aac.00470-12>
- Perilli, M., Dell'Amico, E., Segatore, B., de Massis, M. R., Bianchi, C., Luzzaro, F., Rossolini, G. M., Toniolo, A., Nicoletti, G., & Amicosante, G. (2002). Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases Produced by

- Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from an Italian Nationwide Survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 611-614. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.2.611-614.2002>
- Piekarska, K., Wołkowicz, T., Zacharczuk, K., Rzeczkowska, M., Chróst, A., Bareja, E., Olak, M., & Gierczyński, R. (2015). Coexistencia de determinantes de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos y mutaciones en *gyrA* y *parC* entre enterobacterias clínicas resistentes a fluoroquinolonas aisladas en un hospital terciario de Varsovia, Polonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(3), 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.019>
- Shriram, V., Khare, T., Bhagwat, R., Shukla, R., & Kumar, V. (2018). Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>
- Siebor, E., & Neuwirth, C. (2014). Proteus genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two Proteus mirabilis French clinical isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(12), 3216-3220. <https://doi.org/10.1093/jac/dku314>
- Thomson, K. S., Weber, D. A., C Sanders, C., & Sanders, W. E. (1990). Beta-lactamase production in members of the family Enterobacteriaceae and resistance to beta-lactam-enzyme inhibitor combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(4), 622-627. <https://doi.org/10.1128/aac.34.4.622>
- Torres, D. E. C. (s. f.). *ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*.
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J., Singh, P. K., Chopp, D. L., Packman, A. I., & Parsek, M. R. (2013). The extracellular matrix protects Pseudomonas aeruginosa biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2865-2878. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12155>
- Varughese, L. R., Rajpoot, M., Goyal, S., Mehra, R., Chhokar, V., & Beniwal, V. (2018). Analytical profiling of mutations in quinolone resistance determining region of *gyrA* gene among UPEC. *PLOS ONE*, 13(1), e0190729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190729>
- Weigel, L. M., Anderson, G. J., & Tenover, F. C. (2002). DNA Gyrase and

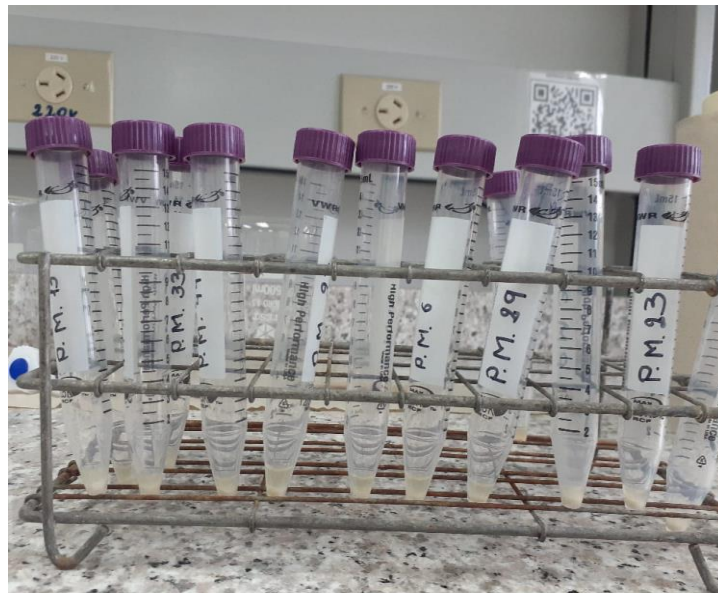
- Topoisomerase IV Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2582-2587. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2582-2587.2002>
- Weigel, L. M., Mayordomo, C. D., & Diezmo, F. C. (1998). *gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Eight Species of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2661-2667. <https://doi.org/10.1128/aac.42.10.2661>
- Weigel, L. M., Steward, C. D., & Tenover, F. C. (1998). *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2661-2667. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2661>
- Yang, J.-H., Sheng, W.-H., & Hsueh, P.-R. (2020). Susceptibilidad antimicrobiana y distribución de β -lactamasas de espectro extendido, AmpC β -lactamasas y carbapenemasas entre *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* aisladas de pacientes hospitalizados en todo el mundo con infecciones intraabdominales y del tracto urinario: Resultados del estudio para el seguimiento de las tendencias de resistencia a los antimicrobianos (SMART), 2008-2011. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 398-407. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.011>
- Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, J., Xue, L., & Chen, M. (2018). Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae From Retail Food in China. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01709>
- Yu, T., Jiang, X., Liang, Y., Zhu, Y., Tian, J., Ying, H., Wang, X., & Shi, L. (2017). Characterization and Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes and Integrins in Bacteria Isolated from Cooked Meat Products in China. *Journal of Food Protection*, 80(12), 2048-2055. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-119>

ANEXOS

Anexo 1: Rotulación de los eppendorfs **Anexo 2:** Pesar el agar tripticasa de soya



Anexo 3: Muestras ya centrifugadas para realizar la tinción Gram.



Anexo 4 : Centrifugación de las muestras a 3000 revoluciones por 20 minutos.



Anexo 5: Medición de la concentración de ADN utilizando el NanoDrop



Anexo 6: Muestras corriendo a 80 voltios en la cámara de electroforesis por una hora.



Anexo 7 : Programa instalado en el termociclador para la realización del PCR.

