UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

"Valoración de los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en Ambato"

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

AUTOR:

DAVID ISAAC ARÁUZ PAREDES

TUTOR:

Dra. SANDRA CRUZ

CEVALLOS, 2024

"Valoración de los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en Ambato"

REVISADO Y APROBADO POR:

.....

Tutor

Dra. Sandra Cruz

APROBADO POR LO MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

FECHA:

.....

Ing. Patricio Nuñez, PhD

PRESIDENTE DEK TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

08/08/2024

.....

Mvz. Mg. Jenny Lozada

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

08/08/2024

.....

MvZ. Mg. Ana Burgos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

08/08/2024

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **David Isaac Aráuz Paredes**, portador de cédula de ciudadanía número: **1726632191**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "**Valoración de los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en 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.



David Isaac Aráuz Paredes

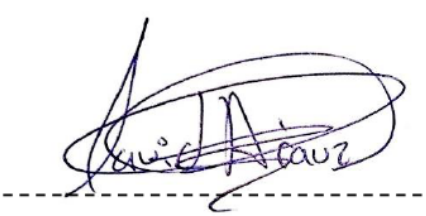
1726632191

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "**Valoración de los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en 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, autorizó 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.



David Isaac Aráuz Paredes

1726632191

DEDICATORIA

A mis padres, Sandra Paredes y Diego Aráuz, pero en especial a mi mamá por ayudarme siempre que la necesito y estar para mí en cada momento de la vida y guiarme para salir adelante.

A mi segundo papá, Gonzalo Cárdenas, que de igual manera a estado ahí para apoyarme y encaminarme hacia mis metas.

A mis hermanos, Esteban y Diego Aráuz, que han sido los pilares e inspiración en mi vida.

A mi persona favorita, Dayana Inca, por estar ahí empujándome para seguir adelante y el cariño que me brinda siempre.

A mis mascotas, Wisy, Dama y Symour, por brindarme su cariño y amor puro.

A mis pacientes, quienes tienen todo mi esfuerzo y entrega para tratar sus malestares.

AGRADECIMIENTO

A mi mamá Sandra, por estar incondicionalmente apoyándome y luchando para que siga adelante. Gracias mami por todo tu esfuerzo y amor, te amo con gran infinidad.

A Gonzalito que, aunque no sea mi padre de sangre siempre ha estado ahí en las buenas y malas, y por esa razón lo considero mi papá. Gracias por tu cariño y cuidado.

A mi hermano Esteban, por ser el pilar de mi inspiración y apoyo. Gracias ñaño por todo el cariño y paciencia.

A mi hermano Diego, por ser el segundo pilar de mi dedicación. Gracias ñaño por todo tu apoyo.

A mi tutora de tesis, Dra. Sandra Cruz, por ayudarme y guiarme con amabilidad y paciencia en todo este tramo del proyecto de investigación. Gracias por brindarme todos sus conocimientos.

A Daya por estar ahí para mí cuando lo necesitaba. Gracias por regañarme para seguir adelante y superarme siempre, te amo mucho.

A mis docentes, por enseñarme con dedicación y firmeza. Gracias por formarme como un buen profesional que pueda ejercer de la manera correcta esta hermosa carrera de Medicina Veterinaria.

A mis amigos que conocí durante toda la carrera, por compartir y vivir experiencias que siempre voy a recordar toda la vida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN XIII

ABSTRACT XIV

CAPITULO I. 1

INTRODUCCIÓN 1

MARCO TEÓRICO 3

1.1. Antecedentes Investigativos 3

1.2. Categorías Fundamentales. 9

1.2.1. Salmonella enterica. 9

1.2.2. Importancia en la salud "*One Health*" 11

1.2.3. Resistencia bacteriana 11

1.2.4. Mecanismos de resistencia 12

1.2.5. Dispersión de la resistencia bacteriana 13

1.2.6. Promotores de crecimiento 15

1.3. Objetivos 15

1.3.1. Objetivo General 15

1.3.2. Objetivos Específicos 16

1.4. Hipótesis 16

1.4.1. Hipótesis Nula 16

1.4.2. Hipótesis Alternativa 16

CAPÍTULO II 17

METODOLOGÍA 17

2.1. Ubicación del estudio. 17

2.2. Características del lugar 17

2.3. Equipos y materiales 18

2.4. Factores de estudio. 19

2.5. Manejo del Experimento 22

2.5.1. Tamaño de la muestra 22

2.5.2. Diseño experimental 22

2.6. Metodología 23

2.6.1. Fase 1. Refrescamiento de cepas de *Salmonella enterica* en Agar Tripticasa de soya (TS)..... 24
2.6.1.1. Preparación del Agar TS..... 24
2.6.1.2. Siembra de las cepas de *Salmonella enterica* en Agar TS..... 25
2.6.2. Siembra de colonias de *Salmonella enterica* en Infusión Cerebro-Corazón 26
2.6.2.1. Preparación de la Infusión Cerebro-Corazón..... 26
2.6.2.2. Siembra de las colonias de *Salmonella enterica* en Infusión Cerebro-Corazón……26
2.6.3. Siembra de *Salmonella enterica* en Müller Hinton (MH) 26
2.6.3.1. Preparación del Agar Müller Hinton (MH) 27
2.6.3.2. Medición de la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro 27
2.6.3.3. Siembra de *Salmonella enterica* previamente ajustada la densidad bacteriana en Agar MH..... 28
2.6.3.4. Posicionamiento de los discos de antibióticos en el Agar MH..... 28
2.6.3.5. Lectura de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano 29
2.6.4. Fase 2. Determinación de la presencia de genes de resistencia en *Salmonella enterica*..... 29
2.6.4.1. Protocolo de Extracción de ADN de las cepas de *Salmonella enterica* 30
2.6.4.1.1. Procesamiento por Extracción Salina 30
2.6.4.1.2. Evaluación del ADN en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000) .. 31
2.6.4.2. Protocolo de PCR..... 31
2.6.4.2.1. Preparación del Master Mix 31
2.6.4.2.2. Condicionamiento de la PCR 32
2.6.4.3. Método de Electroforesis 33
2.6.4.3.1. Preparación de Agarosa al 1%..... 33
2.6.4.3.2. Procesamiento de la Electroforesis 34
2.6.4.3.3. Visualización del gel en el transiluminador..... 34
2.6.4.4. Fase 3. Establecer bibliográficamente los mecanismos moleculares por los cuales se confiere resistencia antimicrobiana a las cepas de *Salmonella enterica* 35
2.7. Variable respuesta..... 35
2.7.1. Cuantitativa..... 35
2.7.2. Cualitativa..... 36
2.8. Procesamiento de datos..... 36

CAPÍTULO III 37

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37

3.1. Prueba de resistencia antimicrobiana a los antibióticos 37

3.2. Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina 41

3.3. Mecanismos moleculares que confieren resistencia bacteriana a *Salmonella enterica* 44

3.3.1. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Tetraciclinas. 44

3.3.2. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Fluoroquinolonas 46

3.3.3. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Aminoglucósidos 47

3.3.4. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Betalactámicos 48

3.3.5. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Sulfonamidas 49

3.4. Verificación de la Hipótesis 50

CAPÍTULO IV 51

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 51

4.1. Conclusiones 51

4.2. Recomendaciones 52

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

ANEXOS 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 10
Categoría taxonómica de Salmonella enterica 10
Tabla 2 17
Características del lugar de estudio 17
Tabla 3 18
Equipos y Materiales 18
Tabla 4 19
Discos de antibióticos 19
Tabla 5 21
Primers y secuencia genómica 21
Tabla 6 22
Cepas de Salmonella enterica 22
Tabla 7 29
Medida de los halos de inhibición por resistencia bacteriana (mm) 29
Tabla 8 33
Condiciones de PCR para el gen tet(A) 33
Tabla 9 39
Cepas de Salmonella identificadas si son Resistentes, Intermedias o Sensibles a los antibióticos 39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1..... 9
Morfología microscópica de la Salmonella enterica..... 9
Figura 2.....13
Principales mecanismos de resistencia bacteriana 13
Figura 3.....14
Esquema de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos. 14
Figura 4.....38
Halos de inhibición bacteriana de las réplicas de la muestra ATCC 13076 38
Figura 5.....38
Halos de inhibición bacteriana de las réplicas de la muestra FDAARGOS_768..... 38
Figura 6.....42
Gel de electroforesis con muestras negativas para el gen tet(A) 42
Figura 7.....43
Patrones genéticos donde se observan la prevalencia del gen tet(A) en distintas serovariedades de Salmonella enterica..... 43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS 59

Anexo 1 59

Tabulación de resultados de la resistencia bacteriana en la Fase 1 59

Anexo 2 59

Actividades realizadas durante la Fase 1 de la investigación 59

Anexo 3 62

Actividades realizadas durante la Fase 2 de la investigación 62

RESUMEN

Salmonella enterica es una bacteria versátil que percibe mecanismos de resistencia antimicrobiana muy refinada, provocando una problemática a nivel mundial en lo que concierne a la salud pública, por lo cual se lo debe investigar de acuerdo al enfoque "*One Health"*, el cual une a los profesionales de salud humana, animal y ambiental para mitigar el desarrollo de resistencia bacteriana, debido a que las vías de contaminación de estas bacterias es a través de los alimentos de origen animal, cuya propagación es más eficaz por las deficientes normas de higiene implementadas en los sitios de faenamiento. El objetivo de esta investigación fue valorar los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en Ambato. Se utilizó una cepa de *Salmonela enterica*, de la cual se obtuvo dos cepas (*Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Enteritidis strain ATCC 13076 y *Salmonella enterica* strain FDAARGOS_768), en donde fueron desarrolladas en dos fases de estudio. En la primera fase, se destacó la utilización del método de Kirby Bauer para evaluar la antibiorresistencia de la cepa frente a un grupo de 5 antibióticos, siendo estos Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GM), Oxitetraciclina (OT) y Sulfametoxazol más trimetoprim (SXT), de los cuales se los clasificó de acuerdo con el tamaño de su halo de inhibición en Resistentes, Intermedios y Sensibles, siguiendo las normativas impuestas por el CLSI. Los resultados obtenidos fueron resistencia total para OT, resistencia intermedia para CIP y sensibilidad para GM, AMC y SXT, este último, actuando de manera eficaz contra la *Salmonella enterica.* En la segunda fase, se tomó solo a la Oxitetraciclina para observar la presencia de genes de resistencia, ya que fue el único antibiótico que resulto resistente. Para visualizar los genes de resistencia se utilizó los primers de gen *tet(A)*, debido a la alta tasa de prevalencia en investigaciones anteriores, además se aplicó las mismas condiciones de PCR con las que se obtuvo el gen. Sin embargo, los resultados fueron negativos sin la presencia del gen escogido, por tal motivo se consideró pertinente explicar los mecanismos moleculares que confieren resistencia a la bacteria frente a cada grupo de antibióticos, comenzando con las tetraciclinas hasta terminar con las sulfonamidas.

Palabras clave: *Salmonella enterica,* resistencia antimicrobiana, genes de resistencia, mecanismos de resistencia, antibióticos.

ABSTRACT

Salmonella enterica is a versatile bacteria that perceives very refined antimicrobial resistance mechanisms, causing a worldwide problem with regard to public health, which is why it should be investigated according to the "*One Health*" approach, which unites human, animal and environmental health professionals to mitigate the development of bacterial resistance, because the routes of contamination of these bacteria are through foods of animal origin, whose spread is more effective due to the poor hygiene standards implemented in slaughter sites. The objective of this research was to assess the antimicrobial profiles and resistance genes of *Salmonella enterica* isolated in chicken meat sold in Ambato. A *Salmonella enterica* strain was used, from which two samples were obtained (*Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Enteritidis strain ATCC 13076 and *Salmonella enterica* strain FDAARGOS_768), where they were developed in two study phases. In the first phase, the use of the Kirby Bauer method was highlighted to evaluate the antibioresistance of the strain against a group of 5 antibiotics, these being Amoxicillin plus clavulanic acid (AMC), Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (GM), Oxytetracycline (OT) and Sulfamethoxazole plus trimethoprim (SXT), of which were classified according to the size of their inhibition zone into Resistant, Intermediate and Sensitive, following the regulations imposed by the CLSI. The results obtained were total resistance to OT, intermediate resistance to CIP and sensitivity to GM, AMC and SXT, the latter acting effectively against *Salmonella enterica*. In the second phase, only Oxytetracycline was taken to observe the presence of resistance genes, since it was the only antibiotic that was resistant. To visualize the resistance genes, the *tet(A)* gene primers were used, due to the high prevalence rate in previous research, and the same PCR conditions with which the gene was obtained were also applied. However, the results were negative without the presence of the chosen gene, for this reason it was considered pertinent to explain the molecular mechanisms that confer resistance to the bacteria against each group of antibiotics, starting with tetracyclines and ending with sulfonamides.

Keywords: *Salmonella enterica,* antimicrobial resistance, resistance genes, resistance mechanisms, antibiotics.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La posible principal causa de resistencia bacteriana en el sector avícola se puede deber al uso indiscriminado de promotores de crecimiento, los cuales su venta es libre y no regularizada, provocando que países de la Unión Europea y Estados Unidos prohíban el uso de antibióticos en forma desmedida, en donde estos promotores de crecimiento han ido desapareciendo de su mercado (Mestorino, 2009).

Un claro ejemplo de la creación de esta resistencia bacteriana se da en los años 60, en donde surge la resistencia a la penicilina, provocando el nacimiento de la combinación de ciertas penicilinas con inhibidores de betalactamasas, los cuales permitieron el tratamiento eficaz de infecciones causadas por enterobacterias; dando como resultado, que en los años 70 se buscaran más alternativas de antibióticos para evitar la resistencia bacteriana, por lo cual se empezó a usar más a los aminoglucósidos y cefalosporinas; sin embargo, las cepas de bacterias siguieron desarrollándose por sus genes de resistencia y en la década de los 2000 se determinó que la administración de antibióticos en sistemas de producción era una práctica sin regularización y desmedida que ocasiona el surgimiento de cepas multirresistentes (López et al., 2021).

Por consiguiente, en este trabajo, se medirá la resistencia de 4 grupos de antibióticos que mayormente se usan en producción, las cuales son Aminoglucósidos (Gentamicina), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Tetraciclinas (Oxitetraciclina) y Sulfonamidas (Sulfametoxazol más Trimetoprima); sin embargo también se evaluará a las Penicilinas (Amoxicilina) combinadas con inhibidores de betalactamasas (Ácido clavulánico), pero este grupo va a hacer más énfasis en el tratamiento terapéutico de animales de compañía y salud pública, ya que pueden ser catalogados como vectores que puedan transmitir genes de resistencia.

La presencia de microorganismos en los productos cárnicos representa un desafío significativo para la salud pública en el país. Investigaciones realizadas por diversas

universidades y publicaciones a nivel nacional y local han documentado un incremento en la cantidad de microorganismos presentes en las carnes. Esto se atribuye a la falta de medidas de inocuidad durante el proceso de producción y posterior al sacrificio del animal, lo que conlleva a la pérdida de las características físicas y bioquímicas de la carne, resultando en su contaminación. Este crecimiento microbiano puede provocar enfermedades en las personas que consumen estos productos cárnicos (Melgarejo-Touchet et al., 2022).

La inocuidad de los productos cárnicos en la ciudad de Ambato suele ser deficiente, especialmente desde el momento del sacrificio y el procesamiento del animal hasta su transporte; estos procesos pueden alterar el pH y la composición bioquímica de la carne, lo que facilita el crecimiento bacteriano, por lo cual se realizó un estudio que incluyó la recolección de 90 muestras, divididas en 45 tomadas de establecimientos certificados y las restantes de lugares de venta informal en Ambato, en donde los establecimientos certificados se identificaron bacterias como: *Enterococcus faecalis, Lactococcus garvieae, Enterococcus gallinarum* y *Pseudomonas aureginosa,* mientras que en los puntos de venta informales se detectaron *Aeromonas veronii, Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (Gómez, 2023).

En resumen, la evaluación de la sensibilidad a los antibióticos y la presencia de genes de resistencia en *Salmonella enterica* aislados en carnes de pollo es una medida crucial para proteger la salud pública, garantizar el tratamiento efectivo de las infecciones bacterianas y mejorar la seguridad alimentaria (Escobar, 2023).

Por lo cual, este trabajo tiene como objetivo evaluar la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de resistencia en *Salmonella enterica* aislados en carnes de pollo que se expende en Ambato, lo que actualmente contribuye un problema de salud pública en la ciudad, debido a su potencial capacidad para causar enfermedades transmitidas por alimentos en los consumidores.

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Según Villacis-Jara et al., (2019), en su investigación de "Determinación del perfil de sensibilidad antibiótica en *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. aisladas de carne aviar en el Ecuador" se manejaron 20 cepas de *Salmonella* spp. a las cuales se les sometió a la prueba de Kirby Bauer para medir la sensibilidad hacia los antibióticos, los cuales fueron gentamicina (GN -10µg), cloranfenicol (CL - 30µg), ceftriaxona (CRO - 30µg), eritromicina (E - 15µg) ampicilina (AM - 10µg), amoxicilina (AM - 30µg), ampicilina – sulbactam (SAM - 30µg), amoxicilina – ácido clavulánico (AUG - 30µg), ciprofloxacina (CIP - 5µg), trimetoprim – sulfametoxazol (STX - 25µg), meropenem (MEM - 10µg) y tetraciclina (TE - 30µg).

Los resultados arrojados de los halos de inhibición fueron medidos de acuerdo con las tablas reglamentarias del CLSI, en donde se obtuvo resistencia hacia tres de doce antibióticos empleados, los cuales fueron: eritromicina (100%), tetraciclina (90%), ceftriaxona (80%), ampicilina (75%), amoxicilina (75%), trimetoprim-sulfametoxazol (70%); seguidos de gentamicina (65%) y cloranfenicol (50%) (Villacis-Jara et al., 2019).

En la investigación propuesta por Rivera, (2021), la cual trata sobre "Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. en pollo crudo comercializado en mercados de Veracruz, México y el riesgo a la salud pública", en la cual se utilizaron 8 cepas de *Salmonella* spp. que fueron sometidas a la técnica de Kirby Bauer, evaluando los siguientes antimicrobianos: ampicilina (AM 10 µg), amikacina (AMK 30 µg), gentamicina (GTN 10 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloranfenicol (C 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT 23.75/1.25 µg), cefotaxima (CFT 30 µg), amoxicilina–ácido clavulánico (AAC 20/10 µg) y azitromicina (AZT 15 µg).

Dando como resultado según los estándares del CLSI, el 100% de las cepas fueron resistentes hacia azitromicina y amoxicilina – ácido clavulánico, el 62.5% fue resistente al cloranfenicol, el 50% fue resistente a la ciprofloxacina y el 12.5% fue resistente a la ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol (Rivera, 2021).

Según Lossio, (2023), en su estudio "Evaluación de la resistencia antibacteriana de *Salmonella enterica* aisladas de aves de combate de un galpón del distrito de Carabayllo en el año 2021", en donde se aisló 3 colonias de *Salmonella enterica* que luego fueron utilizadas en el método de Kirby Bauer para obtener la sensibilidad antimicrobiana, haciendo uso de los siguientes fármacos: eritromicina, penicilina, clindamicina, estreptomicina, oxitetraciclina, ampicilina, doxiciclina, levofloxacina, ceftazidima, ceftriaxona, enrofloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, cefatoxime y gentamicina. Los resultados de resistencia antimicrobiana obtenidos en la investigación fueron del 100% hacia la a eritromicina, penicilina, clindamicina y estreptomicina, mientras que el 66.67% fueron resistentes a oxitetraciclina, ampicilina y doxiciclina (Lossio, 2023).

En la investigación de Ortiz et al., (2021), que habla sobre "Resistencia a múltiples antibióticos en serovariedades de *Salmonella* aisladas de muestras clínicas y alimentos", se utilizó 668 cepas de *Salmonella* que fueron obtenidas a partir de muestras clínicas humanas y de alimentos, estas fueron sometidas a pruebas para validar la susceptibilidad antimicrobiana de cada uno mediante el método de Kirby Bauer, haciendo uso de antimicrobianos los cuales fueron: Ampicilina 10 µg (AMP), Amoxicilina-ácido clavulánico 20/10 µg (AMC), Cefixima 5 µg (CFM), Cefotaxima 30 µg. (CTX), Ácido nalídixico 30 µg (NAL), Ciprofloxacina 5 µg (CIP), Cloranfenicol 30 µg (CHL), Gentamicina 10 µg. (GEN), Nitrofurantoína 300 µg (NIT), Tetraciclina 30 µg (TCY), y Trimetoprim-Sulfametoxazol 0.125/23.75 µg (SXT).

Los resultados fueron analizados por medio de las normativas del CLSI, arrojando valores de resistencia más elevada fue para Tetraciclina, Ac. Nalidíxico y Ampicilina, es importante mencionar que en el 27,5% de las cepas estudiadas presentó sensibilidad intermedia a ciprofloxacina (Ortiz et al., 2021).

Según Quino et al., (2020), en su estudio sobre "Patrones de resistencia a los antimicrobianos en serovares de *Salmonella enterica* en Perú", analizó 540 cepas de *Salmonella enterica* aisladas en muestras humanas y no humanas (aves, alimentos y ambiental), las cuales fueron utilizadas para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, mediante el método de Kirby Bauer y haciendo el uso de los siguientes antibióticos: ampicilina (10 µg), amoxicilina/clavulánico (20/10 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg), cotrimoxazol (1,25/23,75 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), cefoxitina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg) y nitrofurantoína (300 µg).

De las 540 cepas utilizadas en el estudio, las muestras humanas tuvieron resistencia a nitrofurantoína (74%), ácido nalidíxico (64%), ciprofloxacina (63%), tetraciclina (63%), ampicilina (56%), cotrimoxazol (56%), cefotaxima (53%) y cloranfenicol (50%); mientras que las muestras no humanas, las cuales el 75% fueron obtenidas de aves de corral, se obtuvo resistencia hacia ácido nalidíxico (55%), ciprofloxacina (45%), cotrimoxazol, nitrofurantoína y tetraciclina (40%) (Quino et al., 2020).

El estudio realizado por Adame, (2023), el cual trata sobre "Identificación de los patrones de resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de productos cárnicos avícolas de importancia en salud pública", en donde se trabajó con 88 cepas de *Salmonella enterica* obtenidas en productos cárnicos de origen avícola, las cuales fueron sometidas al método de Kirby Bauer para obtención de susceptibilidad antimicrobiana.

Los resultados fueron estandarizados mediante el CLSI, en donde se muestra resistencia hacia los siguientes fármacos: colistina (100%), ácido nalidíxico (71.59%), ciprofloxacino (62.5%), ampicilina (79.5%), trimetoprim con sulfametoxazol (71.59%) y tetraciclina (76.14%) (Adame, 2023).

Según Lombao, (2022), en su estudio sobre "Análisis fenotípico y genómico de una cepa multirresistente de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium perteneciente al clon

pandémico DT104", en el cual utilizo dos cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium para encontrar resistencia antimicrobiana y genes de resistencia, dando como resultado resistencia hacia a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, estreptomicina, cloranfenicol y sulfonamidas.

Mientras que, los genes encontrados fueron *blaPSE-1* (*blaCARB-2*), que confiere resistencia frente a β-lactámicos como la ampicilina o la amoxicilina, aadA2, frente a estreptomicina, *floR,* frente a cloranfenicol, *sul1*, frente a sulfonamidas, *tet(G),* frente a tetraciclinas y *qacEΔ1*, frente a desinfectantes y compuestos de amonio cuaternarios (Lombao, 2022).

La investigación de García Prada, (2023) sobre "Identificación, tipificación y estudios de resistencia/virulencia de una cepa multirresistente de *Salmonella enterica* serotipo Choleraesuis: análisis fenotípico y genómico", el cual hizo uso de una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Choleraesuis que presentó resistencia a la ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprima, estreptomicina y cloranfenicol.

En cuanto a los genes de resistencia, se encontraron amplicones para los genes *aadA2, blaTEM-1B, cmlA1, sul3, sul1, dfrA1* y *tet(B)* (García Prada, 2023).

Según Sánchez, (2022), en su investigación sobre "Análisis comparativo de secuencias de genoma completo de *Salmonella enterica* serovar Infantis de origen humano y animal", en la cual hace una comparación de 5 secuencias genómicas de *Salmonella enterica* serovar Infantis encontradas en distintas partes del mundo con las de origen ecuatoriano.

Los resultados que se encontraron en la investigación sostienen la persistencia de grandes variedades de genes de resistencia para aminoglucósidos, especialmente para los genes *aadA1, aac(3)-IV, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia, aac(6')-Iaa,* para fosfomicinas, *fosA3,* aminociclitol con el gen *aadA1,* tetraciclinas *tet(A),* fenicol *floR*, antagonistas del folato

dfrA14, sul1 y compuestos de amonio cuaternario *qacE*; mientras que, a la familia de betalactamasas, el gen primordial se destaca como el *blaCTX-M* (Sánchez, 2022).

En el estudio de Molina, (2021) sobre "Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* de carne de ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones y los mecanismos de resistencia", en donde analizo la resistencia antimicrobiana en 64 cepas de *Salmonella enterica* frente a 16 antibióticos, dando como resultado porcentajes más altos de resistencia frente a la estreptomicina (39,06% de las cepas), el ácido nalidíxico (35,94%), las sulfonamidas (25%), y la ampicilina y tetraciclina (17,2%); los porcentajes más altos en cuanto a resistencias intermedias se han obtenido frente a la estreptomicina (53,13%), a las sulfonamidas (23,44%), a la ciprofloxacina, amikacina y amoxicilina-clavulánico (17,2%).

En los genes de resistencia se evaluó la presencia de los genes implicados en la resistencia a β-lactámicos (*blaTEM, blaSHV, blaCMY, blaCTX-M9, blaCTX-MU, blaCTX-M3G, blaOXA-1, blaPSE-1, ampC*), tetraciclina (*tet(A), tet(B), tet(G)),* aminoglucósidos (*aadA, strA, strB, aac(3)-II, aac(3)- IV*), sulfonamidas (*sul1, sul2, sul3*), cloranfenicol (*cmlA, floR*) y quinolonas (*gyrA* y *parC*) (Molina, 2021). En cuanto, a las betalactamasas se detectaron los genes *blaTEM* y *blaPSE-1* en un 64,64% y 36,36%; el gen sul1 se detectó en un 75%; los genes *aac(3)- II* y *aac(3)-IV* se encontraron en el 100% de las cepas resistentes a la gentamicina; para las quinolonas y fluoroquinolonas se encontraron los genes de resistencia *gyraA* y *parC*, siendo el 100% de aparición del primer gen frente al 51.56% del segundo gen; en las cepas resistentes a tetraciclinas se encontró el 40% de los genes de resistencia a *tet(A),* mientras que el otro 40% se encontró el *tet(G)* y el 20% con el *tet(B)* (Molina, 2021).

Según Khan et al., (2019), en su investigación sobre "Phentotypic, gentotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typimurium and Enteriditis in poultry and poultry products", el cual utilizo 234 cepas de *Salmonella* frente a los siguientes fármacos: Ceftriaxone (CRO, 30 µg), Amoxicillin (AMX, 20 µg), Gentamycin (GEN, 10 µg), Streptomycin (STR, 10 µg), Tetracycline (TET, 30 µg), Chloramphenicol (CHL, 30 µg), Clarithromycin (CLR, 15 µg), Levofloxacin (LVX, 5

µg), Ofloxacin (OFX, 5 µg), Gatifloxacin (GAT, 5 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Suphamethoxazole + Trimethpram (SXT, 25 µg), Ampicillin (AMP, 10 µg), Lincomycin (LIN, 2 µg) and Azithromycin (AZM, 15 µg); en donde se dio como resultado resistencia a LIN (93.1%, 218/234), AMX (80%, 187/234), AMP (74.3%, 174/234), TET (64.5%, 151/234) y STR (64.5%, 151/ 234).

Para la detección de los genes de resistencia se utilizaron: tetracycline [*tet(A), tet(B), tet(C)],* streptomycin (*strA/strB, aadA y (aac(3) IV*), gentamycin (*aac(3)IV, aadB*), sulfonamides (*sul1, sul2 and sul3*), y b-lactamases (*blaCMY-2, blaTEM, blaSHV*); dando como resultado la presencia de los siguientes genes de resistencia: *blaTEM* (76%, 178/234), *blaSHV* (71.7%, 168/234), *tet(A)* (64%, 151/234) y *tet(B)* (64%, 150/234) (Khan et al., 2019).

Para el estudio de Pezzella et al., (2004) sobre "Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy", se usó 392 cepas en pruebas de resistencia bacteriana frente a 16 antibióticos: colistin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), enrofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), sulfonamides (300 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim y sulfamethoxazole (1.25 y 23.75 µg), amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), cephalothin (30 µg), y neomycin (30 µg); dando como resultado mayor porcentaje de resistencia hacia tetraciclina y estreptomicina.

Mientras que, en el mismo estudio, se identificó la presencia de genes de resistencia para *tet(A)* en un 68% de las cepas de *Salmonella enterica*, mientras que para estreptomicina se encontró los genes *strA* y *strB* en un 84% de las cepas (Pezzella et al., 2004).

1.2. Categorías Fundamentales.

1.2.1. Salmonella enterica.

Generalidades



Fuente: (Sanz García, 2020).

Figura 1

Morfología microscópica de la Salmonella enterica.

La *Salmonella enterica* es una bacteria patógena Gram negativa, flagelada y anaerobia facultativa. Con forma de bastón, habita principalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Se transmite por alimentos contaminados, especialmente carne, huevos y productos lácteos. Al infectar al organismo, causa salmonelosis, una enfermedad gastrointestinal caracterizada por diarrea, fiebre, dolor abdominal y vómitos; el control de su propagación requiere medidas de higiene adecuadas en la manipulación de alimentos y estrategias de prevención en la producción animal (Villacis-Jara et al., 2020).

La *Salmonella enterica* representa una significativa preocupación para la salud pública debido a su capacidad de causar enfermedades transmitidas por alimentos en humanos, ya que esta bacteria puede contaminar una amplia variedad de alimentos, incluyendo carne de pollo, huevos, productos lácteos y vegetales, lo que puede resultar en brotes de enfermedades gastrointestinales, en donde los síntomas de la infección por *Salmonella enterica* pueden variar desde leves, como diarrea o malestar estomacal, hasta severos,

incluyendo deshidratación, fiebre alta y en casos extremos, incluso la muerte. Además, esta bacteria puede causar complicaciones graves en ciertos grupos de riesgo, como niños pequeños, ancianos y personas con sistemas inmunitarios debilitados (Wessels et al., 2021).

El control adecuado de la *Salmonella enterica* es esencial para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y proteger la salud pública, por lo cual esto implica implementar medidas de seguridad alimentaria en todas las etapas de la cadena de producción, desde la granja hasta la mesa, incluyendo prácticas de higiene durante la manipulación y preparación de alimentos, así como también regulaciones estrictas en la producción animal y en la industria alimentaria. La detección temprana de brotes de *Salmonella enterica* y la rápida intervención son fundamentales para limitar su propagación y prevenir la aparición de enfermedades graves, destacando así la importancia de la vigilancia y el control continuo de esta bacteria en la salud pública (Fegan et al., 2022).

Taxonomía

Tabla 1

Categoría taxonómica de Salmonella enterica

Dominio	Bacteria
Filo	Pseudomonadota
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	*Salmonella*
Especie	*Salmonella enterica*

Fuente: (NIH, 2024).

1.2.2. Importancia en la salud "*One Health*"

El término de *One Health,* se describe en el glosario científico como el planteamiento que identifica a la relación que existe entre la salud de las personas, fauna, flora y al ecosistema; por lo cual esta perspectiva se basa en la cooperación de agentes de la salud, tanto humana como veterinaria, para mitigar el desarrollo de la dispersión de la resistencia hacia los antimicrobianos (Cruz, 2022).

Este enfoque tomo más fuerza y relevancia con el surgimiento de una alianza entre la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y Organización Mundial de la Salud (OMS), cuya formación busca incentivar la unión multisectorial para así evitar, descubrir, interrumpir, suprimir y contestar a los peligros para la salud humana y animal que son provocados en su mayoría por zoonosis e inocuidad alimentaria (Osburn et al., 2009; White y Hughes, 2019).

1.2.3. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana surge cuando una cepa bacteriana desarrolla la capacidad de reproducirse incluso en presencia de concentraciones de antibióticos superiores a las que normalmente se encuentran en dosis terapéuticas. Esta resistencia puede originarse a través de la transferencia de genes de resistencia o por mutaciones que se encuentran tanto en el cromosoma bacteriano como en los plásmidos (Jaimes-Dueñez et al., 2022).

Los genes de resistencia bacteriana pueden surgir tanto de manera natural como adquirida, y su expresión se lleva a cabo mediante procesos bioquímicos específicos. Estos genes pueden originarse a través de mutaciones en genes específicos de bacterias susceptibles o ser adquiridos a través de plásmidos, que son fragmentos de ADN adicionales que se replican de forma independiente. Los plásmidos son portadores de expresión genética que contienen genes sin promotores específicos (Hernández-Barrera et al., 2017).

1.2.4. Mecanismos de resistencia

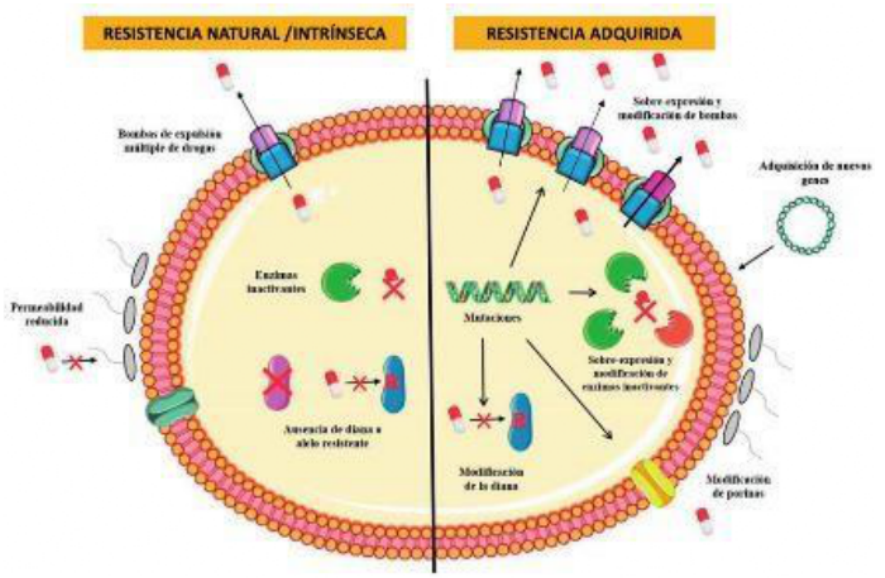
La resistencia bacteriana puede producirse de dos formas iniciales, de manera natural o adquirida, siendo la resistencia natural un mecanismo propio de cada microorganismo y era el único mecanismo que se tenía registro antes de la aplicación de los antibióticos; mientras que, la resistencia adquirida es un mecanismo versátil, ya que los microorganismos mutan a nivel genómico, dando como resultado genes de resistencia, los cuales pueden ser transmitidos a otra generación de forma vertical (Células hijas) o a otro especie de forma horizontal (Natalia y Molina, 2022). Los principales mecanismos de resistencia bacteriana adquirida son:

- **Inactivación enzimática,** mecanismo que se encarga de hidrolizar al antimicrobiano para modificar su función y este no alcance el lugar de acción (Lirola-Andreu et al., 2022; Natalia y Molina, 2022).

- **Impermeabilidad,** es un mecanismo casi obligatorio de las bacterias gram negativas, este se encarga de modificar la expresión genética de las porinas para mutar su estructura, impidiendo el ingreso del antibiótico (Lirola-Andreu et al., 2022; Natalia y Molina, 2022).

- **Modificación del sitio blanco,** este mecanismo se encarga de codificar el sitio de unión del antimicrobiano con la bacteria, incluso desapareciendo esta unión y ocasionando que el antibiótico no pueda ejercer su función (Lirola-Andreu et al., 2022; Natalia y Molina, 2022).

- **Bombas de eflujo,** son mecanismos basados en proteínas de membrana cuya función es el transporte de los metabolitos y agregados tóxicos, desde dentro de la bacteria hacia el exterior, lo cual contribuye con la expulsión del antibiótico, no en su totalidad, pero si disminuyendo su concentración inhibitoria (Lirola-Andreu et al., 2022; Natalia y Molina, 2022).



Fuente: (Sanz García, 2020).

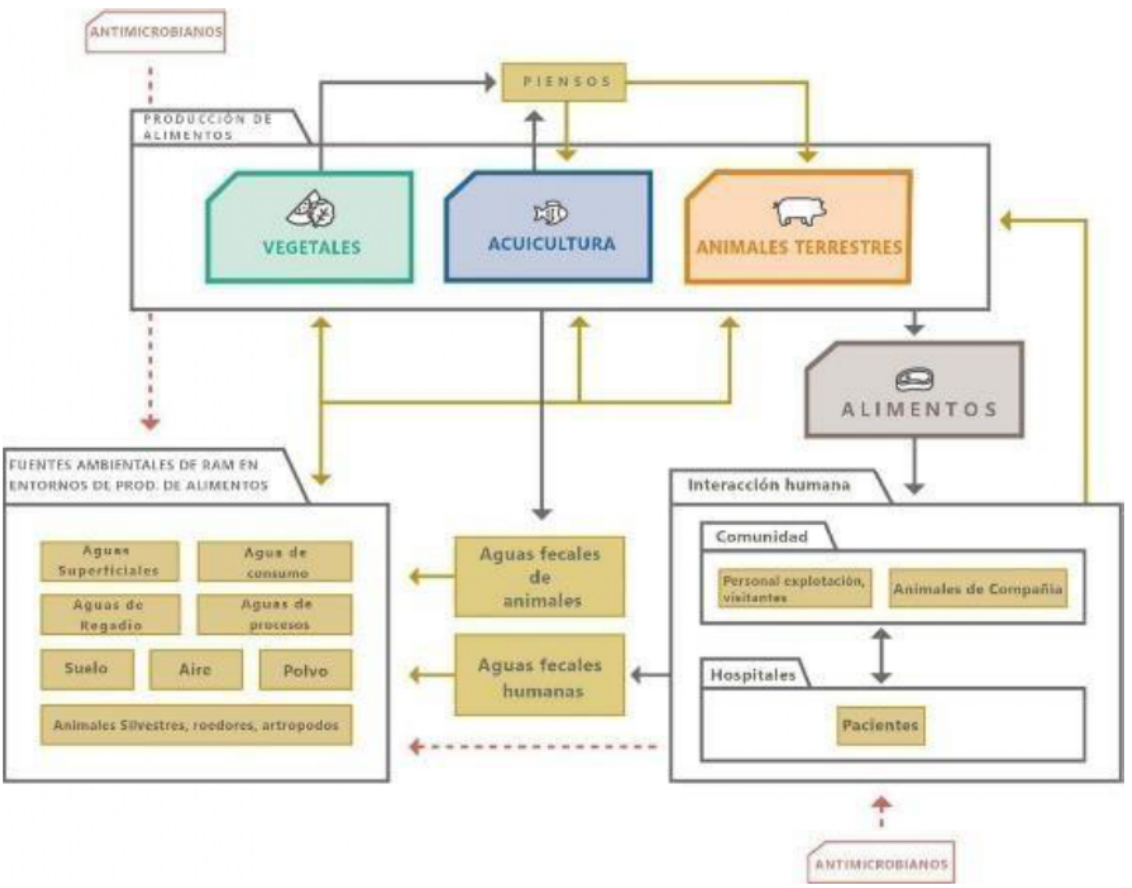
Figura 2

Principales mecanismos de resistencia bacteriana

1.2.5. Dispersión de la resistencia bacteriana

La diseminación de la resistencia bacteriana contribuye una crisis a nivel mundial que tiene un impacto a la salud, tanto humana como animal, ya que principalmente el consumo de antibióticos en la producción animal desencadena el desarrollo de cepas multirresistentes hacia el ambiente y en la cadena alimentaria para el consumo de personas (Giono-Cerezo et al., 2020). Esto se debe a que los sistemas de producción utilizan a los antimicrobianos como promotores de crecimiento, justificándose en la prevención de estrés patológico por enfermedades, lo cual promovió un llamado de atención hacia la iniciativa *One Health,* en donde los entes relacionados a la salud como la OMS. OIE y FAO, tomaron medidas que limitan esta práctica en muchos países, especialmente en Europa y Estados Unidos, mientras que, en los países tercermundistas, esta limitación no es bien regulada y la administración de antibióticos en animales enfermos y sanos es de manera simultánea (Espinosa Castaño et al., 2019).

Esto provoca que los antimicrobianos que son excretados por los animales puedan llegar hacia varios medios ambientales, como son suelos, agua, flora y fauna, alterando estructural y funcionalmente a las sociedades bacterianas que allí se encuentran, dando como resultado el desarrollo, selección y difusión de resistencia antimicrobiana (González A., 2002).



Fuente: (White & Hughes, 2019).

Figura 3

Esquema de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos.

1.2.6. Promotores de crecimiento

El uso de los promotores de crecimiento se tenía como justificación el aumento en la eficacia de la producción animal, empezando en 1940, en donde se reconoció que el uso de antibióticos debía ser indispensable, ya que al alimentar a los animales con dosis bajas de antibióticos les permitía ganar peso adicional, aunque no tenían la justificación exacta de como estos ayudaban en su crecimiento, más bien suponían que actuaban como inhibidores de cuadros subclínicos que podían ocasionar los patógenos mientras estos se inoculaban en el sistema del animal y dado que los patógenos se pueden encontrar en el medio ambiente del sistema de producción, surge la urgencia de aplicar dosis subterapéuticas para crear un entorno saludable (Mestorino, 2009).

Este hecho de usar dosis bajas de antibióticos de forma "eficiente" fue muy aceptable en varios países del mundo por el incremento de la ganancia diaria de peso; sin embargo, el gran obstáculo de este uso es la formación de cepas multirresistentes a estos fármacos, los cuales ponen en riesgo la salud pública, en donde se señala que es un lujo no se puede seguir permitiendo en los aditivos alimenticios, ya que la mayoría de patógenos se pueden controlar con un adecuado plan de inocuidad en las instalaciones de producción y controlando la cadena de producción de manera eficiente (Ardoino et al., 2017).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Valorar los perfiles antimicrobianos y genes de resistencia de *Salmonella enterica* aislada en carne de pollo expendida en Ambato.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Analizar la capacidad de la *Salmonella enterica* para resistencia o sensibilidad a los antibióticos utilizando el método de difusión en agar.

- Detectar la existencia de genes que confieren resistencia a los antibióticos en la *Salmonella enterica* utilizando la técnica de PCR en muestras de carne de pollo distribuidas en Ambato.

- Describir los procesos moleculares que permiten a la *Salmonella enterica* resistir los efectos de los antibióticos.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis Nula

Los aislados de *Salmonella enterica* que fueron encontrados en la carne de pollo que se expende en Ambato, no presentan genes de resistencia.

1.4.2. Hipótesis Alternativa

Los aislados de *Salmonella enterica* que fueron encontrados en la carne de pollo que se expende en Ambato, presentan genes de resistencia.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El presente estudio se lo realizara en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicado en la Provincia de Tungurahua, Cantón Cevallos, con una extensión de 19.000 km2, latitud 2.882 msnm. 1°22"08.7" y longitud 78° 36'23.8".

2.2. Características del lugar

Tabla 2

Características del lugar de estudio

Parámetro	**Valor**
Clima	Ecuatorial Meso Térmico Seco
Temperatura °C	13 a 16
Humedad Relativa %	60 a 75
Velocidad del viento m/s	2.1 a 8.9
Precipitación mm	200 a 500

Fuente: (GAD Cevallos, 2024).

2.3. Equipos y materiales

Tabla 3

Equipos y Materiales

Materiales de Laboratorio	
- Gradilla	- Portaobjetos
- Cajas Petri	- Asa de siembra
- Tubos de ensayo	- Cofia
- Varilla de agitación	- Bata quirúrgica
- Cuchara de medición	- Papel Kraft
- Micropipeta	- Mechero bunsen
- Papel aluminio	- Zapatones
- Guantes de látex	- Cinta
- Cuvets	- Matraz Erlenmeyer
- Tubos Eppendorf	- Bolsa ziploc
- Palillos de cultivo	- Tampones
- Puntas de micropipeta	- Vasos de precipitación
- Probeta	- Cubetas
Reactivos	
- Agua destilada	- Agar Tripticasa de Soya
- Alcohol	- Discos de antibiograma
- Agua UltraPura	- Amoxicilina + Ác. Clavulánico
- Safe Green	- Ciprofloxacina
- Agarosa	- Gentamicina
- Infusión cerebro-corazón	- Oxitetraciclina
- Agar Müller Hilton	- Sulfametoxazol + Trimetoprima
- Taq Polimerasa	
Equipos	
- Balanza Analítica FC 2000 (2000 g: 0,01 g)	- Refrigerador - Autoclave

- Baño María	- Vortex
- Microscopio	- Nanodrop
- Incubadora	- Transiluminador
- Termociclador	- Cámara de electroforesis
Insumos Extra	
- Computadora	- Cámara
- Rotulador	- Cuaderno de apuntes
- Cinta adhesiva	- Esferos

2.4. Factores de estudio.

Tabla 4

Discos de antibióticos

Fármaco	Simbología	Descripción	Genes de Resistencia
Amoxicilina más Ácido Clavulánico	AMC 30µg	Betalactámico unido con un inhibidor de betalactamasa, la amoxicilina ataca y mata las bacterias al interferir con la síntesis de su pared celular mientras que el ácido clavulánico previene la degradación de la amoxicilina por parte de las enzimas bacterianas, lo que aumenta la efectividad del antibiótico.	*blaTem*
Ciprofloxacina	CIP 5µg	Fluoroquinolona, actúa bloqueando la actividad de una enzima llamada ADN girasa, que es crucial para la replicación y reparación del ADN bacteriano. Al inhibir esta enzima, impide que las	*gyrA*

		bacterias infectadas puedan dividirse y multiplicarse.	
Gentamicina	GM 10µg	Aminoglucósido, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en las bacterias. Se une a los ribosomas bacterianos, interfiriendo con la capacidad de las bacterias para producir proteínas esenciales para su supervivencia y reproducción. Al detener la síntesis proteica, impide el crecimiento y la reproducción bacteriana.	*aac(3)-IV*
Oxitetraciclina	OT 30µg	Tetraciclina, interrumpe la capacidad de las bacterias para producir proteínas esenciales para su crecimiento y supervivencia. Esto detiene la reproducción de las bacterias y eventualmente lleva a su muerte. Además, puede interferir con la capacidad de las bacterias para adherirse a las células huésped y penetrar en ellas.	*tet(A)*
Sulfametoxazol más Trimetoprima	SXT 25µg	Sulfonamida combinada con trimetoprima, actúan en sinergia para inhibir dos pasos consecutivos en la síntesis del ácido fólico en las bacterias. Esta interrupción en la producción de ácido fólico, esencial para la síntesis de ADN, ARN y proteínas bacterianas, conduce a la muerte de las bacterias	*sul1*

Tabla 5

Primers y secuencia genómica

Fármaco	Primers	Secuencia 5´ a 3´	Gen Objetivo	Amplicón
Amoxicilina más Ácido Clavulánico	*blaTEM-f* *blaTEM-r*	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	*blaTem*	1150pb
Ciprofloxacina	*gyrA-f* *gyrA-r*	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC TACCGTCATAGTTATCCACG	*gyrA*	417pb
Gentamicina	*aac(3)-IV-f* *aac(3)-IV-r*	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	*aac(3)-IV*	286pb
Oxitetraciclina	*tet(A)-f* *tet(A)-r*	GTAATTCTGAGCACTGTCGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	*tet(A)*	937pb
Sulfametoxazol más Trimetoprima	*sul1-f* *sul1-r*	TGGTGACGGTGTTCGGCATTC GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	*sul1*	789pb

Fuente: (de Toro, 2014; Molina, 2021).

2.5. Manejo del Experimento

2.5.1. Tamaño de la muestra

Se trabajó con 2 cepas que fueron identificadas de forma molecular como *Salmonella enterica*, de las cuales estas se encuentran conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular correspondientes al área de investigación en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Tabla 6

Cepas de Salmonella enterica

Número de cepa	Nombre de la cepa	Código de la cepa
N21	*Salmonella enterica* strain FDAARGOS_768	CP041005.1
N37	*Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Enteritidis strain ATCC 13076	EU014687.1

Fuente: (NIH, 2024).

2.5.2. Diseño experimental

Este trabajo de carácter investigativo se lo llevará a cabo en tres fases:

Fase 1: En esta primera fase, se va a establecer la resistencia antimicrobiana de cada muestra de *Salmonella enterica* frente a los cinco antibióticos en sus diferentes discos antimicrobianos mediante el método de Kirby Bauer, en donde la variable a tomar en cuenta será los halos de inhibición que estos van a producir y se los clasificará dependiendo de su tamaño en Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R), siguiendo las normativas impuestas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Fase 2: En la segunda fase, se va a utilizar los antibióticos que fueron resistentes hacia las dos muestras de *Salmonella enterica* empleada, estos se determinaran si existen o no genes de resistencia frente a los antibióticos en estas cepas. Esta determinación se lo realizara por medio de extracción de ADN con el método descrito por (Doellinger et al., 2020).

Seguidamente, las muestras serán usadas para la preparación del "Master Mix" en conjunto con los primers del antibiótico resistente, para así proseguir con la PCR, por medio de las estándares de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión propuestas por (Zhu et al., 2020); finalmente, se correrán las muestras por la técnica de electroforesis y se observará los resultados en el transiluminador.

Fase 3: En la tercera y última fase, con los resultados que fueron obtenidos se va a explicar por medio de la descripción bibliográfica, los mecanismos moleculares que les confieren resistencia a los antibióticos catalogados como intermedios y resistentes frente a la *Salmonella enterica.*

2.6. Metodología

Las dos cepas de *Salmonella enterica* que se trabajaron para el desarrollo del proyecto investigativo se mantienen conservadas y etiquetadas en tubos eppendorfs sobre las gradillas crioviales, además están cubiertas por papel aluminio a una temperatura constate de -20 °C en el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.6.1. Fase 1. Refrescamiento de cepas de *Salmonella enterica* en Agar Tripticasa de soya (TS)

Se trata de un medio de cultivo a bases de peptona y tripteína, el cual destaca por su aportación de nutrientes altos en aminoácidos libres, péptidos, minerales y vitaminas; además, este logra garantizar el crecimiento de una enorme cantidad de microorganismos, tanto gran positivos como negativos, y se puede suplementar con adiciones de sangre ovina al 5% para visualizar reacciones hemolíticas en los diferentes microorganismos (TM MEDIA, 2014).

2.6.1.1. Preparación del Agar TS

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Sobre la balanza analítica, se pesó 40 gramos del Agar TS.
3. Una vez pesado la cantidad necesaria, se añadió 1000 mL de agua destilada hacia una botella de vidrio, en donde se mezcló con el Agar TS.
4. La mezcla se esterilizó en el autoclave con una temperatura de 120 °C y por un tiempo de 30 minutos.
5. Luego de la esterilización, se administró la mezcla en cada una de las cajas Petri, previamente se dejó enfriar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Después que la mezcla se colocó en las cajas Petri, se dejó reposar 15 minutos hasta solidificar y se voltearon las cajas.
7. Ya completamente solido el Agar TS, se envolvieron las cajas Petri con aluminio y se conservaron en el refrigerador.
8. Se va a dejar reposar las cajas Petri por 24 hrs para luego realizar la siembra de las cepas.

2.6.1.2. Siembra de las cepas de *Salmonella enterica* en Agar TS

1. Se buscó las cepas de *Salmonella enterica* en el Laboratorio de Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Ambato, estas estaban conservadas en los tubos eppendorf y se las acercó al mechero bunsen en un cuarto esterilizado.
2. Mientras la cepa se acondicionaba, se rotularon las cajas Petri con los códigos de cada cepa.
3. Para sembrar la bacteria, se tomó una cantidad menor de la muestra con un palillo de siembra, para así colocar una pequeña gota de muestra bacteriana sobre cada caja Petri con Agar TS.
4. Una vez colocada la gota, se esperó un tiempo de aproximadamente 10 minutos para que se seque por completo.
5. Ya seca la gota sobre el Agar TS, se procedió a estriarla por medio de una asa de siembra que se esterilizó con el mismo mechero bunsen.
6. Para finalizar, se incubaron las cajas Petri ya sembradas en la incubadora por un tiempo de 24 horas y con una temperatura de 37 °C.

2.6.2. Siembra de colonias de *Salmonella enterica* en Infusión Cerebro-Corazón

Este es un medio completamente líquido de un gran enriquecimiento nutritivo que se destaca por la infusión de cerebro de una ternera y la infusión de corazón de un vacuno; además, esta suplementado con peptona que confiere una fuente de carbono, aminoácidos, péptidos y vitaminas, lo cual permite el crecimiento de microorganismos con requerimientos nutricionales pobres (TM MEDIA, 2019)

2.6.2.1. Preparación de la Infusión Cerebro-Corazón

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Sobre la balanza analítica, se pesó 37 gramos de la Infusión Cerebro-Corazón.
3. Una vez pesado la cantidad necesaria, se añadió 1000 mL de agua destilada hacia una botella de vidrio, en donde se mezcló con la Infusión Cerebro-Corazón.
4. La mezcla se esterilizó en el autoclave con una temperatura de 120 °C y por un tiempo de 30 minutos.
5. Luego de la esterilización, se administró 5 mL de la mezcla en cada uno de los tubos de ensayo ya etiquetados previamente y se le colocó un tapón estéril.
6. Después que la mezcla se colocó en las cajas Petri, se dejó reposar 15 minutos hasta solidificar y se voltearon las cajas.
7. Para finalizar se dejaron reposar 5 minutos sobre las gradillas.

2.6.2.2. Siembra de las colonias de *Salmonella enterica* en Infusión Cerebro-Corazón

1. Se tomó una cantidad considerable de colonias de *Salmonella enterica*, alrededor de 5 a 6 colonias, que previamente fueron sembradas y aisladas por estriación en el Agar TS.
2. Se añadió las colonias a los tubos de ensayo que contenían la Infusión Cerebro-Corazón.
3. Una vez las colonias fueron puestas en la Infusión Cerebro-Corazón, se mezclaron bien con el Vortex por un tiempo aproximado de 30 segundos.
4. Ya bien homogeneizada la muestra, los tubos de ensayo se incubaron por un tiempo de 3 horas a una temperatura de 37 °C.

2.6.3. Siembra de *Salmonella enterica* en Müller Hinton (MH)

Este medio de cultivo es esencial en el método de Kirby Bauer, ya que permite la

susceptibilidad de crecimiento hacia a agentes antimicrobianos, siendo de esta manera un procedimiento estándar de dicho método (TM MEDIA, 2020).

2.6.3.1. Preparación del Agar Müller Hinton (MH)

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Sobre la balanza analítica, se pesó 38 gramos del Agar MH.
3. Una vez pesado la cantidad necesaria, se añadió 1000 mL de agua destilada hacia una botella de vidrio, en donde se mezcló con el Agar MH.
4. La mezcla se esterilizó en el autoclave con una temperatura de 120 °C y por un tiempo de 30 minutos.
5. Luego de la esterilización, se vertió la mezcla en cada una de las cajas Petri y se dejó reposar.
6. Ya solidificado el Agar MH, se voltearon las cajas Petri.
7. Bien solidificadas y secas las cajas Petri con el Agar MH, se las envolvió en aluminio y se conservó 24 horas antes de poder sembrar en ellas.

2.6.3.2. Medición de la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro

Volvemos a la muestra preparada con la Infusión Cerebro-Corazón, ya que cuando haya pasado el tiempo de incubación de 3 horas, se procedió a medir el nivel de turbidez en los tubos de ensayo; por lo cual, para medir dicha turbidez primero se evaluó un tubo control que se lo programo a una densidad óptica de 0,5 en el espectrofotómetro, ya que esto nos indica una densidad celular de 1,5 $x10^8$ UFC/mL.

Este valor se lo comparó con todas las muestras de los tubos de ensayo que se prepararon con la Infusión Cerebro-Corazón, para de esta manera ajustar la concentración bacteriana de la muestra antes de sembrarla en el Agar MH, si el valor era mayor o menor al esperado de 0,5, esta muestra se debía ajustar ya sea añadiendo más colonias bacterianas o más Infusión Cerebro-Corazón.

2.6.3.3. Siembra de *Salmonella enterica* previamente ajustada la densidad bacteriana en Agar MH

1. Se tomó la muestra de *Salmonella enterica* ajustada a 0,5 por medio de un hisopo estéril, pero sin sobrecargar a este con demasiada muestra, por lo cual se escurrió el hisopo en los bordes del tuyo de ensayo.
2. Ya con la debida cantidad de muestra en el hisopo se procedió a estriar hacia 4 direcciones diferentes para homogeneizar en el Agar MH, este proceso se realizó en 3 cajas Petri previamente rotuladas el código de cada sepa, ya que se van a trabajar con 3 réplicas de cada una para asegurar los resultados.
3. Una vez aplicadas las muestras en el Agar MH, se va a dejar reposar por un tiempo de 15 minutos antes de colocar los discos de antibióticos.

2.6.3.4. Posicionamiento de los discos de antibióticos en el Agar MH

1. Una vez que pasaron los 15 minutos de reposo, se van a situar los discos antimicrobianos por medio de una pinza estéril, siguiendo las normativas impuestas por el CLSI; además, se va a empezar por posicionar al disco blanco en el centro de cada caja Petri.
2. Los demás discos se van a ordenar alrededor del disco blanco con una ligera distancia de aproximadamente 2 cm entre cada disco y borde de cada caja Petri.
3. Una vez aplicadas los cinco discos de antibióticos (AMC, CIP, GM, OT, SXT), se van a asentar con una ligera presión de la pinza estéril y se va a voltear las cajas Petri.
4. Ya con las cajas Petri volteadas nos aseguramos de que todos los discos estén fijos y se procede a incubar por 24 horas a una temperatura de 37°C.

2.6.3.5. Lectura de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano

1. Para la lectura de cada caja Petri, se las colocó en una superficie oscura para así lograr medir cada halo de inhibición de forma sencilla.
2. Ya posicionadas las cajas Petri en la superficie oscura, se iluminó por encima con una luz reflectante y se procedió a medir por medio de una regla en una escala de mm.
3. Los datos obtenidos de las 3 réplicas por la medición de los halos de cada disco se trasladaron a Excel para obtener la media de cada antibiótico en la cepa de *Salmonella enterica*.
4. Una vez con los resultados de cada halo de inhibición, se procedió a estandarizar según las medidas impuestas por el CLSI.

Tabla 7

Medida de los halos de inhibición por resistencia bacteriana (mm)

Discos de Antibióticos	Siglas	Sensible	Intermedio	Resistente
Amoxicilina + ácido clavulánico 30 µg	AMC	≥ 18	14 – 17	≤ 13
Ciprofloxacina 5 µg	CIP	≥ 31	21 – 30	≤ 20
Gentamicina 10 µg	GM	≥ 16	13 – 15	≤ 12
Oxitetraciclina 30 µg	OT	≥ 15	12 – 14	≤ 11
Sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg	SXT	≥ 16	11 – 15	≤ 11

Fuente: (CLSI, 2024).

2.6.4. Fase 2. Determinación de la presencia de genes de resistencia en *Salmonella enterica*

Para esta segunda fase de investigación se tomó en cuenta solo los antibióticos resistentes obtenidos en la primera fase, por lo cual para determinar la presencia de genes de resistencia primero se va a extraer el ADN de las muestras de *Salmonella enterica*, para luego realizar la técnica de PCR y finalizar con el método de electroforesis para observar los resultados en el transiluminador.

2.6.4.1. Protocolo de Extracción de ADN de las cepas de *Salmonella enterica*

Es un método de separación y purificación de ADN sobre una muestra, para esto existen varios procedimiento para la obtención de este, siendo el más universal y simple la extracción a base salina, logrando obtener un buen índice de pureza (Doellinger et al., 2020).

2.6.4.1.1. Procesamiento por Extracción Salina

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Se va a centrifugas las cepas de *Salmonella enterica* a 3000 rpm durante 5 minutos.
3. Una vez centrifugado, se va a refrescar la cepa en 500 mL de Infusión Cerebro-Corazón y pasar luego a tubos eppendorf.
4. Ya en los tubos eppendorf, se va a administrar 40 µl de SDS al 20% y después de va a añadir 8 µl de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL.
5. Seguidamente la mezcla se va a pasar por el vortex para homogeneizar bien la muestra.
6. Ya con la muestra uniforme, se va a incubar por 24 horas a una temperatura de 65 °C.
7. Después de que se haya incubado la muestra, se va a añadir 300 µl de solución NaCl 6M, la cual es una solución saturada en cloruro de sodio.
8. Luego se va a centrifugar la muestra durante un tiempo aproximado de 30 segundos a velocidad máxima.
9. Pasado ese tiempo, se va a dejar la muestra centrifugando durante 30 minutos a una velocidad de 10000 g.
10. Ya centrifugado, se va a transferir el sobrenadante de la muestra a un nuevo tubo eppendorf y se añadirá isopropanol al volumen del sobrenadante para luego mezclarlo bien en el vortex.
11. Se volverá a centrifugar la muestra a 10000 g, pero ahora por un tiempo de 20 minutos y en este caso se eliminará el sobrenadante.
12. Una vez eliminado el sobrenadante, se añadirá 500 µl de etanol y se lo mezclará

en el vortex.

13. Bien mezclada la muestra, se centrifugará una última vez a 10000 g por 20 minutos.

14. Ya la muestra centrifugada, se va a eliminar nuevamente el sobrenadante y se dejará secar.

15. Para finalizar, con la muestra ya seca, se la va a resuspender en 500 µl de agua estéril y se lo conservará a una temperatura de -20 °C.

2.6.4.1.2. Evaluación del ADN en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000)

Se trata de un espectrofotómetro de UV con espectro completo, el cual se encarga de cuantificar y evaluar la pureza de las moléculas, ya sea ADN, ARN o proteínas; en el cual se debe realizar primero un blanqueo con agua estéril, dando un resultado menor a 0.04ª y después se correrá cada muestra de ADN.

2.6.4.2. Protocolo de PCR

Se basa en un método para obtener varias copias de un fragmento de ADN, el cual se desarrolla en varias fases o etapas. **Fase de desnaturalización:** en donde se rompen los puentes de hidrogeno que mantiene unido a las hebras de ADN, resultando en dos cadenas a las cuales se unen los primers. **Fase de apareamiento:** seguidamente de la rotura, se unen a los primers con una secuencia específica, ajustando la temperatura en condición al primer. **Fase de extensión o elongación:** ya que se unieron los primers a la cadena de ADN, actúa el ADN polimerasa para adicionar nuevos nucleótidos para moldearse a la hebra reconstruida, dando como resultado una molécula de ADN de cadena doble (Zhu et al., 2020).

2.6.4.2.1. Preparación del Master Mix

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.

2. Por medio de la micropipeta, se va a añadir a un nuevo eppendorf, 2 µl de ADN previamente extraído.
3. Con la misma micropipeta, pero con distinta punta, se va a añadir al mismo tubo eppendorf, 3,75 µl de la Taq Polimerasa.
4. Así mismo, se va a añadir 2 µl de los dNTPs.
5. Siguiendo el mismo proceso, se añadirá 2,5 µl del Buffer, para luego añadir 2,5 µl de MgSO4.
6. Seguidamente, se incluirán los primers de los antibióticos, tanto el "Forward" como "Reverse", pero previamente se los resuspenderán con 100 µl de agua ultra purificada, de estos se añadirá 0,75 µl de cada uno de ellos.
7. Como ultimo reactivo a añadir se pondrá 10,75 µl de agua ultra purificada, de esta manera tendremos un volumen final de 25 µl y se lo pasará al vortex para homogeneizar.
8. Este proceso se realizará con cada cepa de *Salmonella enterica* y con cada antibiótico que salga resistente en el antibiograma de la primera fase.

2.6.4.2.2. Condicionamiento de la PCR

Ya preparado el Master Mix, se enviarán los tubos eppendorf al termociclador para configurarlo con las mismas condiciones con las que trabajaron los autores (Molina, 2021; Pezzella et al., 2004) de investigaciones previas, ya que en este caso se usará la condición de PCR que se utilizaron para los primers de *tet(A)*, debido a que este fue el antibiótico que presento resistencia, el cual será mostrado más adelante.

Tabla 8

Condiciones de PCR para el gen tet(A)

Antibiótico	Gen	Condición PCR			Referencia
Oxitetraciclina	*tet(A)*	95°C	5 min	1 ciclo	(Molina, 2021; Pezzella et al., 2004)
		95°C	30 sg	23 ciclos	
		62°C	30 sg		
		72°C	45 sg		
		72°C	7 min	1 ciclo	

2.6.4.3. Método de Electroforesis

Esta técnica se utiliza para la separación de moléculas, ya sean ADN, ARN o proteínas, el método se basa en el movimiento de cargas opuestas, es decir que se aplica corriente a un campo líquido a una superficie porosa, esto provoca que las moléculas con carga negativa se direccionen hacia el ánodo y viceversa (Polo-Álvarez, 2021).

2.6.4.3.1. Preparación de Agarosa al 1%

1. Antes de empezar, se esterilizó todo el material de laboratorio necesario para la preparación mediante el autoclave a una temperatura de 120 °C.
2. Se pesará en la balanza analítica 1 gramo de Agarosa, la cual se disolverá en 100 mL de TAE.
3. La mezcla se pasará al microondas para que se disuelva bien, se programará al microondas en intervalos cortos de 30 segundos para que no haga ebullición.
4. Una vez ya disuelto, se dejará enfriar por 10 minutos y se añadirá 2 µl de SYBR ® Green a la mezcla.
5. Antes de poner la muestra sobre el campo, se va a armar la caja del campo y se va a introducir los peines; con esto ya listo, se verterá la muestra sobre la caja y se eliminaran las burbujas si es que hubiera.

6. Ya con la muestra sobre la caja, se va a esperar alrededor de 15 minutos para que solidifique bien y se extraerán con cuidado los peines.

2.6.4.3.2. Procesamiento de la Electroforesis

1. Ya con el gel de Agarosa al 1% listo, se trasladará a la cámara para correr la electroforesis, esta cámara es especial, ya que posee dos cargas opuestas en cada extremo.
2. Posicionar bien el gel de Agarosa al 1%, es decir los pocillos del gel estén orientados hacia el electrodo negativo (Negro), para así las moléculas de ADN corran en dirección al electrodo positivo (Rojo).
3. Ya con el gel de Agarosa al 1% bien posicionado, se llenará la cámara con Tris acetato EDTA (TAE) hasta cubrir por completo el gel.
4. Con el gel de Agarosa al 1% cubierto por el TAE, se añadirá en el primer pocillo 10 µl de peso molecular, y del segundo pocillo en adelante se cargará cada uno con 10 µl de cada muestra procesada en el PCR.
5. Una vez cargados todos los pocillos, se conectarán los cables de alimentación a la cámara y a la fuente de alimentación, teniendo cuidado en no conectar polo opuestos sino a la misma carga.
6. Después de verificar que todo esté bien conectado, se programará la fuente de alimentación a 100 voltios durante 1 hora y se esperará a que corra todo el ADN de los pocillos.

2.6.4.3.3. Visualización del gel en el transiluminador

1. Una vez que haya corrido todo el ADN por el gel de Agarosa al 1%, se sacará con cuidado el gel de la cámara de electroforesis para trasladarlo al transiluminador.
2. Se va a posicionar bien el gel en el transiluminador para que quede recto y se pueda observar de mejor forma.

3. Ya con el gel posicionado, se correrá el programa del transiluminador para observar los resultados.
4. Con el transiluminador, se podrá observar el tamaño del Amplicón del gen en cada cepa si es que hubiese.

Nota: Este proceso se realizará con cada antibiótico que haya dado resistencia en la primera fase.

2.6.4.4. Fase 3. Establecer bibliográficamente los mecanismos moleculares por los cuales se confiere resistencia antimicrobiana a las cepas de *Salmonella enterica*

Los mecanismos moleculares de las bacterias son complicados, ya que llegan a evolucionar frente a la resistencia antimicrobiana por medio de mutaciones y la aparición de genes de resistencia, los cuales evitan la codificación de la función antibiótica; además, estos genes de resistencia se pueden transferir entre bacterias de esta o distinta especie y serovariedad (Lirola-Andreu et al., 2022). Además, se van a describir de forma bibliográfica, todos los mecanismos moleculares de los antibióticos elegidos, empezando desde el antibiótico que generó mayor índice de resistencia hasta el antibiótico que fue más sensible a las cepas de *Salmonella enterica*.

2.7. Variable respuesta

2.7.1. Cuantitativa

- **Diámetro del Halo de Inhibición**

El diámetro del halo de inhibición se realizó por medio de la mensuración, haciendo uso de una regla, del diámetro total y tomando como consideración a los 6 mm que miden los discos antimicrobianos, por lo cual un halo de inhibición de 6 mm

demuestra realmente que no hay inhibición.

2.7.2. Cualitativa

- **Resistencia a Antibióticos evaluada mediante el método de Kirby Bauer.**

Se clasifican las cepas de *Salmonella enterica* como Sensibles (S), Intermedia (I) o Resistente (R), tomando en cuenta el tamaño de los halos (mm) que presenten y comparándolas con directrices expuestas por la CLSI.

- **Presencia del Amplicón o Gen de resistencia**

El tamaño del Amplicón se refiere al peso molecular de la banda de ADN amplificada, expresada en pb, la cual es necesario para distinguir la presencia de los genes de resistencia de *Salmonella enterica*.

2.8. Procesamiento de datos

Los datos colectados se registrarán en una base en Excel ® 2016, se efectuará el análisis exploratorio de los datos de cada variable para determinar si tienen sensibilidad o resistencia hacia los antibióticos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este capítulo, se va a presentar los hallazgos que se adquirieron en las distintas fase de la investigación, la cual duro 5 semanas, en donde se analizó 2 cepas de *Salmonella enterica* (ATCC 13076 y FDAARGOS_768), de las cuales se obtuvieron la categorización de las mismas en Sensibles, Intermedio y Resistentes frente a los 5 antibióticos propuestos (AMC, CIP, GM, OT y SXT); estos resultados fueron presentados mediante el método de Kirby Bauer, el cual se basa en mensuración de los halos de inhibición y clasificados siguiendo los puntos propuestos por el manual de CLSI 2024.

Para realizar el procesamiento estadístico en la primera fase de la investigación, se recolectó los datos con el método de Kirby Bauer antes ya mencionado, del cual se tomaron 3 réplicas de cada cepa de *Salmonella enterica* para mayor especificidad.

3.1. Prueba de resistencia antimicrobiana a los antibióticos

De las 2 muestras de la cepa de *Salmonella enterica,* ambas tuvieron el 100% de resistencia frente a la oxitetraciclina; mientras que el antibiótico que mayor sensibilidad se obtuvo en ambas muestras fue el sulfametoxazol más trimetoprim. En cuanto a los demás antimicrobianos, se obtuvo porcentajes intermedios a ciprofloxacina en ambas muestras; en cambio, la amoxicilina más ácido clavulánico y gentamicina fueron variables entre ambas (Figura 4 y 5).



Figura 4

Halos de inhibición bacteriana de las réplicas de la muestra ATCC 13076

Como se muestra en la Figura 4, en la réplica ATCC 13076 no existió halo de inhibición para oxitetraciclina (OT), obteniendo un valor de resistencia hacia la muestra; mientras que, la medición de los halos inhibitorios para ciprofloxacina (CIP) y gentamicina (GM), se los categorizó como intermedios; sin embargo, los halos de inhibición para amoxicilina más ácido clavulánico (AMC) y sulfametoxazol más trimetoprim (SXT), mostraron valores que los catalogan como sensibles.

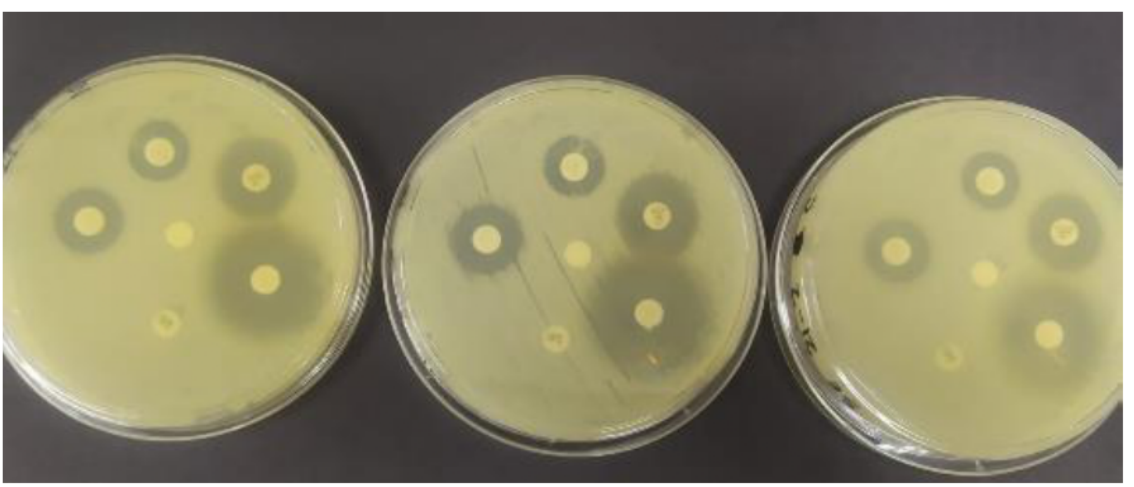


Figura 5

Halos de inhibición bacteriana de las réplicas de la muestra FDAARGOS_768

En la Figura 5, podemos observar que en la réplica FDAARGOS_768 tampoco existió

halo de inhibición para oxitetraciclina (OT), por lo cual es así mismo catalogada como resistente; igualmente, para la ciprofloxacina (CIP), el valor del halo fue clasificado como intermedio, pero el halo inhibitorio de la gentamicina (GM) se lo catalogó como sensible, contrario a la muestra ATCC 13076; así mismo con el halo de inhibición de la amoxicilina más ácido clavulánico (AMC) que varió su valor, clasificándolo como intermedio, pero el valor del halo de sulfametoxazol más trimetoprim (SXT) se lo marco como sensible al igual que la anterior muestra.

Tabla 9

Cepas de Salmonella identificadas si son Resistentes, Intermedias o Sensibles a los antibióticos

Cepas	Antibióticos				
	Amoxicilina + ácido clavulánico	Ciprofloxacina	Gentamicina	Oxitetraciclina	Sulfametoxazol + trimetoprim
FDAARGOS_768	S	I	I	R	S
ATCC 13076	I	I	S	R	S

Los resultados obtenidos en la tabla 9, coinciden con el trabajo de Ortiz et al., (2021), el cual presentó de la misma forma una resistencia mayoritariamente elevada hacia tetraciclina; además sus cepas de *Salmonella enterica*, mostraron igualmente una resistencia intermedia a ciprofloxacina, cabe destacar que la resistencia intermedia es un desarrollo hacia la resistencia total al antimicrobiano, ya que para inhibir la bacteria se necesitaría usar las dosis máximas del antibiótico.

De la misma forma Villacis-Jara et al., (2019) en su investigación, con la que trabajó con 20 cepas de *Salmonella* spp. obtuvo una resistencia antimicrobiana del 90% frente a tetraciclina; sin embargo, en el mismo estudió difiere con esta investigación, ya que en su estudió presenta también resistencia hacia gentamicina y sulfametoxazol-trimetoprim, cuyo resultado más cercano es con la muestra ATCC 13076 que mostró resistencia intermedia a la gentamicina, pero en ninguna muestra hubo resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim, sino al contrario, las cuales mostraron sensibilidad.

Mientras que en el mismo estudio de Villacis-Jara et al., (2019), esta muestra sensibilidad hacia ciprofloxacina, en nuestra investigación obtuvimos tanto en la muestra FDAARGOS_768 como ATCC 13076, valores de resistencia intermedia a la ciprofloxacina; aunque si podemos coincidir que en la muestra ATCC 13076, se obtuvo sensibilidad para amoxicilina más ácido clavulánico, pero en la muestra FDAARGOS_768 en cambio resulto con resistencia intermedia al mismo.

No obstante, la resistencia intermedia a ciprofloxacina en ambas muestras coincide con los propuesto por Rivera, (2021), ya que en su trabajo con 6 cepas de *Salmonella* spp. y 2 cepas de *Salmonella enterica*, este mostró la presencia de resistencia intermedia a ciprofloxacina en las 2 cepas de *Salmonella enterica*; aunque aquí mismo presenta resistencia total de amoxicilina más ácido clavulánico por el contrario de nuestra investigación, pero si se asemeja a los resultados obtenidos de la muestra FDAARGOS_768 con la presencia de sensibilidad frente a gentamicina y sulfametoxazol.

Para Lossio, (2023), en su estudio con 3 cepas de *Salmonella enterica* coincide con este trabajo, ya que presenta mayor resistencia a oxitetraciclina en 2/3 cepas, pero si difiere en ambas muestras, debido a que muestra sensibilidad a gentamicina como la muestra FDAARGOS_768, al contrario que la muestra ATCC 13076 donde esta muestra resistencia intermedia; aunque es su investigación también obtiene sensibilidad a ciprofloxacina, lo cual es inverso a este estudio que mostro resistencia intermedia a amabas muestras.

En la investigación de Quino et al., (2020), el cual trabajó con 20 cepas de *Salmonella* de origen no humano (aves de corral), este también identifico los serovares, de los cuales halló *S.* Infantis, *S.* Typhimurium y *S.* Enteritidis; en estos serovares obtuvo resistencia completa hacia tetraciclinas como en esta investigación y además presentó resistencia intermedia a ciprofloxacina, coincidiendo con los valores de ambas muestras.

En cuanto, lo propuesto por Adame, (2023), que utilizó 88 cepas de *Salmonella enterica*, coincide con los valores obtenidos a resistencia total y resistencia intermedia para

tetraciclina y ciprofloxacina, pero difiere entre ambas muestras por la presencia de sensibilidad para gentamicina y amoxicilina más ácido clavulánico, ya que la muestra FDAARGOS_768 mostro resistencia intermedia para AMC y sensibilidad para GM, mientras que la muestra ATCC 13076 mostro resistencia intermedia para GM y sensibilidad para AMC; aunque también varía el resultado obtenido de resistencia hacia sulfametoxazol más trimetoprim, debido a que en ambas muestras SXT fue sensible.

La resistencia hacia tetraciclinas y fluoroquinolonas, en donde coinciden los autores (Adame, 2023; Lossio, 2023; Ortiz et al., 2021; Quino et al., 2020; Rivera, 2021; Villacis-Jara et al., 2019), se debe a que son una familia de antimicrobianos que se utilizan como la primera línea farmacológica de forma empírica y su uso terapéutico no es individual, sino que es de manera grupal, sea que este o no el individuo enfermo; además estos suelen estar complementados en los alimentos como un método profiláctico y como promotores de crecimiento en el sector avícola, ya que al inhibir a los patógenos ambientales se eliminan la competición de los microorganismos, haciendo que estos animales de producción mejoren su porcentaje de engorde. Sin embargo, esto ha traído problemas de resistencia antimicrobiana, provocando que los microorganismos puedan mutar a nivel genómico y estos sean transferibles no solo entre colonias hijas sino también a colonias de distinta especie; por lo cual, esta práctica ha sido prohibida en el continente europeo y países como Estados Unidos, mientras que en los países latinoamericanos sigue siendo un problema persistente por el deficiente control empleado al sector avícola.

3.2. Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina

Para esta fase de la investigación, se tomó en cuenta a la oxitetraciclina, ya que fue el único antimicrobiano que presentó resistencia total en ambas muestra de *Salmonella enterica*, por lo cual se utilizaron los primers y condiciones propuestas por (Molina, 2021; Pezzella et al., 2004), ya que estos mostraron valores de incidencia altos de resistencia a tetraciclina y en sus estudios presentaron al *tet(A)* como el principal gen de resistencia para este antimicrobiano.

En la Figura 6, se muestra al gel de Agarosa al 1% en el transiluminador, en donde en esta investigación no existe la presencia del gen de resistencia *tet(A),* lo cual nos podría indicar que su resistencia sea innata y no adquirida; aunque también nos recomendaría trabajar con otro gen de resistencia a la tetraciclina, pudiendo ser *tet(B)* o *tet(G),* genes de resistencia con altos índices de prevalencia después del gen *tet(A).*

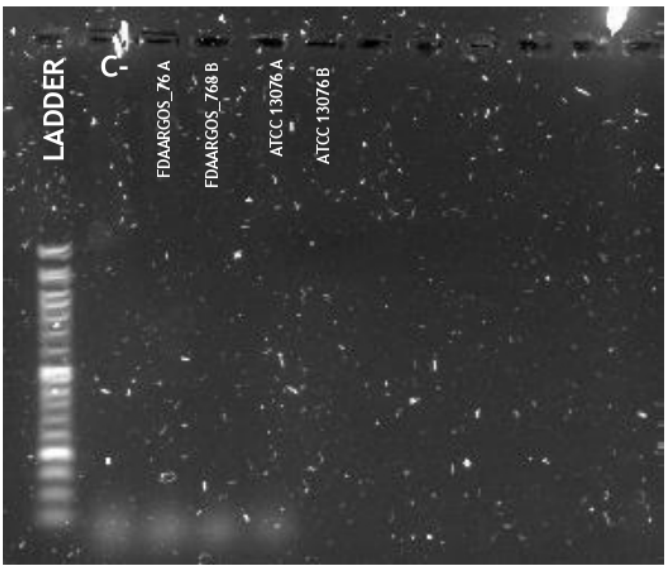


Figura 6

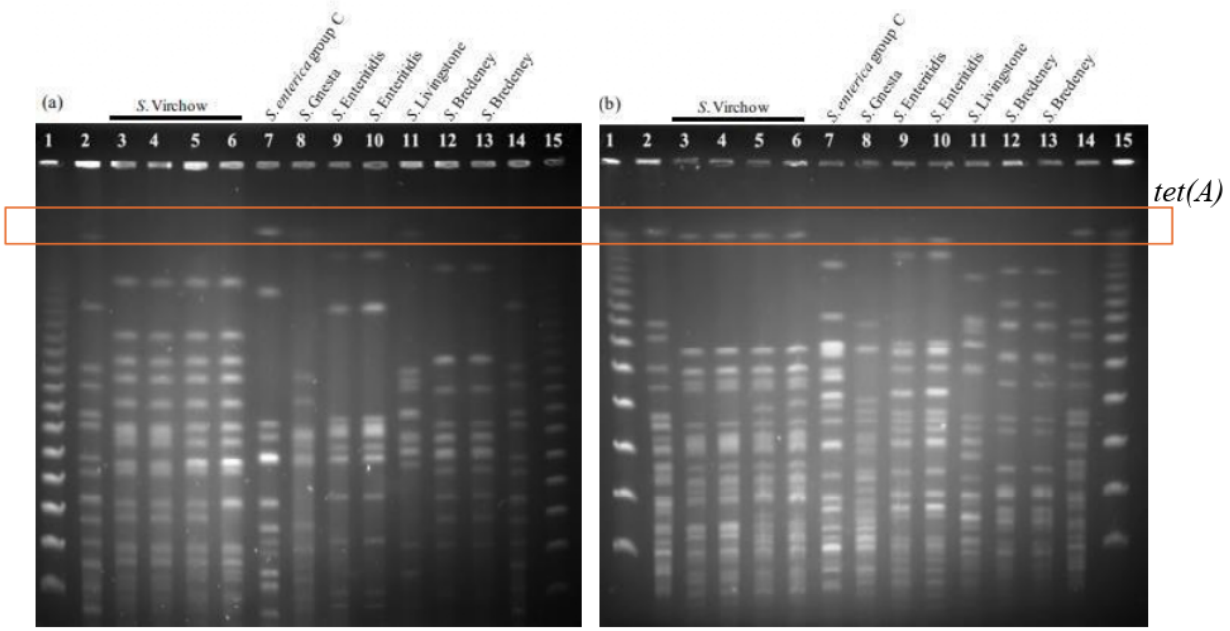
Gel de electroforesis con muestras negativas para el gen tet(A)

Este resultado difiere con lo expuesto por los mismos autores (Molina, 2021; Pezzella et al., 2004), ya que estos presentaron persistencia elevada sobre el *tet(A)* ya antes mencionado; sin embargo Molina, (2021), también nos menciona que el gen *tet(A)* es regularmente encontrado en su mayoría en los plásmidos, pero cuando las mutaciones son en el cromosoma, los genes que suelen presentarse son el *tet(B), tet (C)* y *tet(D),* siendo el *tet(B)* el gen más frecuente; no obstante, cuando la transmisión de resistencia genética se halla en las islas genómicas, el gen con mayor prevalencia viene a ser el *tet(G).*

Estos hallazgos se muestran en el mismo trabajó expuesto por Molina, (2021), en donde se hallaron genes de resistencia tet en 26/64 cepas de *Salmonella enterica*, de las cuales el 40% obtuvo presencia de *tet(A),* el otro 40% presento genes de *tet(G)* y solo 20% mostró genes de resistencia para *tet(B);* porcentajes que se asimilan con lo descrito por Khan et al., (2019), el cual al trabajar con 234 cepas de *Salmonella enterica* obtuvo 64%

de presencia para el gen *tet(A),* pero en su estudio tipifico a sus muestras de *Salmonella enterica*, presentado 139 cepas de serovariedad *S.* Typhimurium, mientras que las otras 95 cepas fueron de los serovares *S.* Enteritidis; siendo las cepas del serovar *S.* Typhimurium, en donde se hallaron la mayoría del gen *tet(A),* con un porcentaje del 84,1%, aunque el gen *tet(B),* también presento una prevalencia alta del 84%.

Los resultados del anterior autor son parecidos a de Toro, (2014), la cual en su investigación trabajó en su mayoría con *S.* Typhimurium, encontrando una elevada presencia de genes *tet(B)* en un 55,9% y *tet(G)* en un 34,1%, pero discrepando de la prevalencia de *tet(A),* en donde se presentó solo en un 7,1%.



Fuente: (de Toro, 2014).

Figura 7

Patrones genéticos donde se observan la prevalencia del gen tet(A) en distintas serovariedades de Salmonella enterica

Sin embargo, en el estudio de García Prada, (2023), el trabajo con cepas de *Salmonella enterica*, pero con el serotipo Choleraesuis, mostró prevalencia del 100% para tet(B), mientras que hubo una nula presencia del gen *tet(A);* al contrario que Sánchez, (2022), el cual trabajó con *Salmonella enterica* serotipo Infantis, en el cual si presentaron genes de resistencia para *tet(A)* en su totalidad.

Estos resultados nos incitan a tipificar nuestra cepa de *Salmonella enterica,* ya que los

resultados hallados por los autores que trabajaron con serotipos diferentes a *S.* Typhimurium, estos encontraron la presencia del *tet(A),* mientras que los demás que trabajaron con este serotipo hallaron otro gen prevalente, el cual es el gen *tet(B);* aunque Khan et al., (2019) sería la excepción, ya que este si mostró tanto genes *tet(A)* como *tet(B)* con porcentajes similares del 80%.

Otro motivo de la ausencia del gen *tet(A)* lo explica de Toro, (2014), en donde trabajó con cepas transconjugantes de *S.* Typhimurium, de las cuales ninguna mantuvo la presencia del *gen tet(A),* es decir que, al transferir la información genética por medio de los plásmidos, este gen se perdió e inhibiendo su mutación genética, pero en cuanto a los *genes tet(B)* y *tet(G*), estos si mantuvieron su prevalencia en la transconjugación.

3.3. Mecanismos moleculares que confieren resistencia bacteriana a *Salmonella enterica*

Como finalización de este trabajo investigativo, se describirán los mecanismos moleculares de resistencia bacteriana de la cepa de *Salmonella enterica*, comenzando desde el antibiótico que presento mayor resistencia hasta el que fue más sensible, en este caso el orden será OT, CIP, GM, AMC y SXT, de forma que se presentará los diferentes métodos de evasión que muestra la cepa de *Salmonella enterica* para restringir, inhibir o alterar los mecanismos de acción de cada antimicrobiano que se usó durante esta investigación.

3.3.1. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Tetraciclinas

La oxitetraciclina fue el antibiótico utilizado en esta investigación, perteneciente a la familia de las tetraciclinas, cuyo principal mecanismo de resistencia para *Salmonella enterica,* se basa en dos formas, la inhibición de la síntesis de proteínas, la cual no es muy común, y la expulsión del antimicrobiano mediante bombas de eflujo.

No obstante, las tetraciclinas destacan por ser los primeros antimicrobianos de amplio espectro registrado, por lo cual su uso fue explotado a nivel mundial, aunque también se lo administró por su bajo costo, provocando de esta manera que sea catalogado como "Gran importancia médica" según la OMS (Adame, 2023). Mientras que, en medicina veterinaria, esta explotación fue mayor, ya que se lo administraba en forma desmedida en sistema de producción animal, en donde, por ejemplo, en los sistemas avícolas se la administra a los pollos en dosis únicas, mediante inyección intramuscular o de forma oral por bebederos (Molina, 2021).

Para la inhibición de la síntesis de proteínas, estas actúan sobre la subunidad 30S del ribosoma a nivel bacteriano, evitando la transducción del ARNm, dando como resultado la producción de proteínas no funcionales, siendo este mecanismo de resistencia innato y no transmitido por genes de resistencia (Adame, 2023).

Mientras que, la acción de las bombas de eflujo, son los mecanismos mayormente descritos de la resistencia antimicrobiana, ya que en este se ha encontrado más de 40 genes diferentes, pero para la resistencia frente a *Salmonella enterica* se han encontrado solo 5 genes de resistencia, siendo *tet(A), tet(B), tet(C), tet(D)* y *tet(G),* de los cuales el *te t(A),* es capaz de exportar tetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina, en cambio, el gen *tet(B)*, es apto para exportar minociclina; por este motivo, tanto el gen *tet(A)* y *tet(B)* son los genes encontrados con alta frecuencia para *Salmonella* (Líbero Grossi, 2021).

No obstante, el mecanismo de bombas de eflujo se basa en la eyección de sustratos del medio intracelular por medio de moléculas de señalización, actuando de forma constitutiva, de las cuales su codificación se expresa mayoritariamente en el cromosoma, aunque también puede ser expresada por los plásmidos; este mecanismo no elimina la totalidad del antimicrobiano sino más bien reduce la concentración de este, logrando que la bacteria sea menos susceptible a este (Lantmann et al., 2022).

Sin embargo, estas bombas de eflujo se dividen en 5 grupos primordiales, siendo la familia RND (Resistance Nodulation-Cell Division), familia MFS (Major Facilitator

Superfamily), familia SMR (Staphylococcal Multiresistance), familia MATE (Multidrug and Toxic compund Extrusion) y familia ABC (ATP Binding Cassette), de las cuales el 60% de los genes *tet* pertenecen a la familia MFS, en donde se basan en un mecanismo de antiporte para ingresar protones y eyectar moléculas de tetraciclinas, para de esta manera obtener energía (Líbero Grossi, 2021).

3.3.2. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Fluoroquinolonas

Para este estudio, se tomó a elección a la ciprofloxacina como parte de la familia de las quinolonas y fluoroquinolonas, ya que es un antimicrobiano usado en medicina veterinaria empíricamente para el tratamiento de salmonelosis tanto sistémica como invasiva, provocando cepas resistentes, en donde se ha encontrado tasas de resistencia desde el 25% hasta el 60% (Ortiz et al., 2021; Rivera, 2021).

Los mecanismos de resistencia de las fluoroquinolonas se pueden dividir en 2 grupos, los mecanismos cromosómicos y los mecanismos plasmídicos (Adame, 2023).

Por parte de los mecanismo cromosómicos encontramos a las mutaciones en las topoisomerasas diana, en donde las mutaciones se desarrollan principalmente en la subunidad GyrA, perteneciente al gen *gyrA*, del cual actúa en el extremo amino-terminal de los aminoácidos 67-106 de la proteína en cuestión; esta mutación desencadena reemplazos de aminoácidos que forman los lugares de anclaje para el antibiótico, como Ser83 a *Tyr, Phe, Ala* y Asp87 a *Asn, Gly, Tyr, Lys*; mientras que, también existen mutaciones a nivel de la subunidad B de la girasa, la cual es mediada por el gen *gyrB*, pero no es muy frecuente (de Toro, 2014)

Sin embargo, estas mutaciones pueden darse en una área diana secundaria, la cual es la topoisomerasa IV, cuya modificación es codificada por los genes *parC y parE*, pero esta mutación no aparecerá sin antes haber mutado primero el gen *gyrA*, ya que actúan por efectos aditivos, generando concentraciones mínimas inhibitorias (Miró et al., 2004).

Siguiendo con los mecanismos cromosómicos, tenemos al mecanismo de pérdida de porinas, en donde este muta la entrada del canal proteico denominado porina, evitando que el antimicrobiano entre al interior celular, pero inactivando sus genes codificantes (F. Sun et al., 2021); mientras que el ultimo mecanismo cromosómico, es decir la eyección activa por bombas de eflujo, se basa en la expulsión de compuestos ya sean tóxicos como metabolitos secundarios producidos por la misma bacteria, de los cuales son codificados por los genes *mar y sox*, pero en cambio, estas bombas de eflujo son pertenecientes a la familia RND y mediadas por las bombas AcrAB y AcrEF (T. Sun et al., 2021).

Para finalizar con la resistencia de las fluoroquinolonas, tenemos a los mecanismo plasmídicos (PMQR), de los cuales se basan por 3 métodos de codificación; siendo el primer método mediante las proteínas Qnr, cuya función es la protección de los lugares diana de topoisomerasas II, por el cual modifican a una proteína con 218 aminoácidos; mientras que, el segundo método es a través de la enzima amoniglucósida acetiltransferasa *aac(6')-lb-cr*, la cual provoca mutaciones hacia Trp102Arg y Asp179Tyr para así elevar la concentración mínima inhibitoria hasta cuatro veces lo normal; por último, tenemos al método mediado por las bombas de eflujo *QepA y OepAB*, donde la primera es perteneciente a la familia MFS y codificada por los genes *qepA1 y qepA2*, en cambio, la segundo pertenece a la familia RND y no se codifica por genes; sin embargo, ambas actúan diluyendo las concentraciones mínimas inhibitorias de 8 a 16 veces lo normal (de Toro, 2014; Miró et al., 2004).

3.3.3. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Aminoglucósidos

Para esta familia de antibióticos, se utilizó a la gentamicina, ya que es otro antimicrobiano catalogado por la OMS como importancia crítica, debido a que su uso es empírico similar a las tetraciclinas, mientras que en el ámbito veterinario se lo puede encontrar como medicamento ideal en una segunda lineal de acción para su uso terapéutico.

Al igual que las tetraciclinas, los aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en la subunidad 30S del ribosoma a nivel bacteriano, por lo cual el principal

mecanismo de resistencia que posee la *Salmonella enterica* se basa en la inactivación enzimática, por medio de 3 tipos de enzimas codificadoras, siendo O-fosfotransferasa (*aphA, strA, strB*), N-acetiltransferasas (*aac(3), aac(6')*) y O-adeniltransferasas (*aadA, aadB*) (Molina, 2021).

Este mecanismo de resistencia consiste en la hidrolización, acetilación, fosforilación y adenilación, en donde las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) codifican los grupos ya sean amino o hidroxilo, para de esta manera inhibir su funcionalidad antimicrobiana en el ribosoma (Flórez et al., 2024).

No obstante, también poseen otros mecanismos de resistencia, como la mutación de la diana, la cual es controlada por las enzimas metiltransferasas del ARNr 16S, en donde van a sumar un grupo metilo a los nucleótidos del sitio de anclase del ARNr, para así evitar la interacción del antibiótico con el ribosoma (Adame, 2023).

3.3.4. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Betalactámicos

Los betalactámicos utilizados para la investigación fueron la amoxicilina, la cual pertenece a la familia de las aminopenicilinas, pero con la combinación de un inhibidor de las betalactamasas, el cual viene a ser el ácido clavulánico; esta combinación de antimicrobianos se empleó por la creciente tasa de resistencia, que viene a ser preocupante y es debido al uso empírico para el tratamiento de salmonelosis, aunque este viene a ser usado mayormente en especies menores, pero la transmisión de resistencia se da por la cadena de contagio por la exposición con animales de producción.

Como principal mecanismo molecular de resistencia bacteriana de *Salmonella enterica* frente a los betalactámicos, tenemos a la hidrolización de las enzimas para los enlaces de amidas en el núcleo betalactámico, provocando que el antimicrobiano sea incapacitado y no pueda bloquear la comunicación entre péptidos, para de esta manera no se pueda desarrollar la pared celular, logrando protección para la bacteria (Molina, 2021).

Este proceso es mediado por la codificación tanto en el cromosoma como los plásmidos, en donde son controlador por las enzimas BLEE de espectro extendido, pero para las bacterias de tipo gram negativa es más comúnmente encontrar las enzimas TEM-1, mediadas por los genes *blaTEM* (de Toro, 2014; Molina, 2021).

Como es en el caso del estudio de Molina, (2021), la cual describe que la resistencia de los betalactámicos es principalmente mediada por la presencia de betalactamasas, ya que esta trabajó con 64 cepas de *Salmonella enterica* con un porcentaje de resistencia del 17,2% para amoxicilina-ácido clavulánico, en donde se hallaron los genes *blaTEM* con una tasa del 64,64%.

3.3.5. Mecanismos de resistencia de *Salmonella enterica* frente a Sulfonamidas

Para la representación de esta familia de antibióticos, se tomó en cuenta a la sulfametoxazol más trimetoprim, ya que diversos estudios hallaron una resistencia alta de hasta el 70% hacia la *Salmonella enterica*, como es el caso de Villacis-Jara et al., (2019), con la que trabajó con 20 cepas de *Salmonella* spp. y obtuvo una resistencia del 70% para SXT. Resultados que coinciden con Adame, (2023), la cual estudió 88 cepas de *Salmonella enterica*, obteniendo una tasa de resistencia del 72,59% para sulfametoxazol más trimetoprim.

No obstante, este trabajo de investigación discrepa estos resultados, ya que en nuestras muestras de *Salmonella enterica* se obtuvieron valores de sensibilidad frente a SXT, esto puede ser debido a que, en el ámbito veterinario, la sulfametoxazol-trimetoprim no es comúnmente usada como terapia empírica por su precio en el mercado.

Sin embargo, las sulfonamidas presentan mecanismos de acción que fueron descubiertos en los años 30, por lo cual se comenzó a combinar con trimetoprim, provocando mayor eficacia bactericida, ya que las sulfas son morfológicamente similares al ácido p-aminobenzoico (PABA), el cual destaca en la ruta sintética del ácido fólico, siendo

imprescindible en la asimilación de bases nitrogenadas y aminoácidos, en donde son mediados por los genes codificantes *folP* que regulan la enzima DHPS (Adame, 2023).

No obstante, los mecanismo de resistencia adquiridos que poseen las sulfonamidas es más complicada, ya que codifican constantemente la enzima DHPS, acción mediada por los genes *sul1, sul2* y *sul3*, pero siendo el sul1 con mayor presencia, debido a que se sitúa en el segmento 3´ en donde se conservan los integrones de clase 1, los cuales están enormemente distribuidos en las bacterias gram negativas (Adame, 2023).

Como es el caso de la investigación de García Prada, (2023), en donde trabajó con una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Choleraesuis, de la cual obtuvo resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim y halló genes de resistencia sul1. Así mismo, en el trabajo Molina, (2021), al utilizar 64 cepas de *Salmonella enterica* encontró al gen *sul1* con un porcentaje del 75%.

3.4. Verificación de la Hipótesis

Con los resultados obtenidos en esta investigación se puede decir que cumplen con la hipótesis nula, debido a que las cepas de *Salmonella enterica* que fueron aisladas en carne de pollo que se expende en la ciudad de Ambato, no presentan genes de resistencia.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Las cepas de *Salmonella enterica* aisladas en la carne de pollo expendida en la ciudad de Ambato, manifestaron una relevante resistencia antimicrobiana frente a las tetraciclinas, seguidamente mostraron una notable resistencia intermedia hacia fluoroquinolonas y una mayor sensibilidad a aminoglucósidos, betalactámicos y sulfonamidas, siendo este último grupo los más eficiente para mitigar a la *Salmonella enterica*.

- Los hallazgos de resistencia bacteriana intermedia para las fluoroquinolonas son un llamado de atención sobre el uso desmedido de los mismos, además que se debe hacer énfasis en la prohibición de estos como promotores de crecimiento, en donde son mayormente utilizados; sin embargo, también tenemos que tener en cuenta que hubo la presencia de resistencia intermedia para amoxicilina más ácido clavulánico en una de las muestras de *Salmonella enterica*, pudiendo de las misma forma ir en desarrollo a una resistencia bacteriana más completa, ya que la resistencia intermedia nos indica que el fármaco puede inhibir la bacteria, pero a dosis altas del mismo.

- La presencia nula de genes de resistencia *tet(A)* para tetraciclina discrepa de los autores, los cuales obtuvieron tasas de prevalencia de hasta el 80%; sin embargo, tenemos que tomar en cuenta que estos tipificaron sus cepas y no solo usaron un gen, sino que también usaron genes como *tet(B)* y *tet(G)*, lo cual nos indica que otro gen pueda estar actuando en la cepa de *Salmonella enterica* utilizada.

4.2. Recomendaciones

- En estudios futuros para esta cepa de *Salmonella enterica*, se recomienda utilizar otros genes de resistencia si se va a trabajar con tetraciclinas, priorizando la tipificación de esta, ya que entre serotipos los genes de resistencia antimicrobiana varían con gran significancia.

- Se sugiere recolectar un mayor número de muestras para lograr una estadística de resistencia y prevalencia de genes resistencia más exacta, además de comparar con las distintas serovariedades la presencia de estos genes.

- Se recomienda un llamado de atención al uso indiscriminado de antibióticos, en especial en sistemas de producción animal y trabajar con de la mano con el término "*One Health"*, el cual incentiva el trabajo en equipo de profesionales de la salud humana, animal y ambiental, para mitigar el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana que puedan perjudicar la salud global.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adame, L. (2023). *Identificación de los patrones de resistencia antimicrobiana de aislamientos de Salmonella enterica obtenidos a partir de productos cárnicos avícolas de importancia en salud pública*. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ardoino, S. M., Toso, R. E., Alvarez, H. L., Mariani, E. L., Cachau, P. D., Mancilla, M. V., & Oriani, D. S. (2017). Antimicrobial as growth promoters (AGP) in poultry balanced feed: use, bacterial resistance, new alternatives and replacement options. *Ciencia Veterinaria*, *19*(1), 50–66. https://doi.org/10.19137/cienvet-20171914

CLSI. (2024). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI.

Cruz, I. (2022). La importancia del concepto One Health. *Ambienta*, *133*(2605–4787), 18–27.

de Toro, M. (2014). *Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en Salmonella enterica. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica*. Universidad de la Rioja.

Doellinger, J., Schneider, A., Hoeller, M., & Lasch, P. (2020). Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction. *Molecular & Cellular Proteomics*, *19*(1), 209–222. https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001616

Escobar, S. (2023). *Identificación molecular de aislados bacterianos contaminantes de carne de pollo (Gallus gallus) expendida en puntos de venta del cantón Ambato*. Universidad Técnica de Ambato.

Espinosa Castaño, I., Arias, M. B., Elena Hernández Fillor, R., López Dorta, Y., Rivero, E. L., & Corona-González, B. (2019). Antimicrobial resistance in bacteria from animals, challenges for their contention from laboratory. *Revista de Salud Animal*, *41*(3). http://opn.to/a/6fQBe

Fegan, N., McAuley, C. M., Gray, J. A., Duffy, L. L., Namvar, A., & Warriner, K. (2022). Current trends in zoonoses and foodborne pathogens linked to the consumption of meat. En *New Aspects of Meat Quality* (pp. 717–754). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85879-3.00020-9

Flórez, N. Y., Silva, C., Villarreal, J. M., & Wiesner, M. (2024). Presence of integrons and their correlation with multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Exploratory systematic review. *Biomedica*, *44*(2), 258–276. https://doi.org/10.7705/biomedica.6816

GAD Cevallos. (2024). *GAD Municipal Cevallos*. Página Oficial GAD Cevallos.

García Prada, C. (2023). *Identificación, tipificación y estudios de resistencia/virulencia de una cepa multirresistente de Salmonella enterica serotipo Choleraesuis: análisis fenotípico y genómico*. Universidad de Oviedo.

Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. del R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, *156*(2). https://doi.org/10.24875/GMM.20005624

Gómez, J. (2023). *Detección de Salmonella spp y Escherichia coli en muestras de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato*. Universidad Técnica de Ambato.

González A., P. (2002). Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos. *Revista chilena de infectología*, *19*. https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200014

Hernández-Barrera, J. C., Angarita-Merchán, M., & Prada-Quiroga, C. F. (2017). Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria. *Ciencia y Agricultura*, *14*(2), 27–38. https://doi.org/10.19053/01228420.v14.n2.2017.7146

Jaimes-Dueñez, J., Ramírez-Villamizar, L. H., Barragán-Díaz, C. A., Cárdenas, E., & Niño-Bayona, J. V. (2022). Review: antibiotic residues in meat, a public health problem in Colombia. *Spei Domus*, *18*(1), 1–26. https://doi.org/10.16925/2382-4247.2022.01.06

Khan, S. B., Khan, M. A., Ahmad, I., ur Rehman, T., Ullah, S., Dad, R., Sultan, A., & Memon, A. M. (2019). Phentotypic, gentotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typimurium and Enteriditis in poultry and poultry products. *Microbial Pathogenesis*, *129*, 118–124. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.046

Lantmann, T. L., Simonetti, T., Kindlein, L., & Mello, J. R. B. de. (2022). Resistência antimicrobiana da *Salmonella spp*. em suínos: Revisão. *Research, Society and Development*, *11*(2), e29611225777. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25777

Líbero Grossi, J. (2021). C*aracterização do perfil de resistência a antibióticos em Salmonella enterica da cadeia produtiva de aves*. Universidade Federal de Viçosa.

Lirola-Andreu, L., Ávila-Jiménez, Á., Fernández-Mariscal, M., Reinoso-Espín, Á., & Martínez-Martínez, S. (2022). *La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa*.

Lombao, R. S. (2022). *Análisis fenotípico y genómico de una cepa multirresistente de Salmonella enterica serotipo Typhimurium perteneciente al clon pandémico DT104*. Universidad de Oviedo.

López, V., Guerriero, L., Elorza, V., Kruger, A., Colello, R., Medici, S., Espinosa, M., Casado, P., Recavarren, M., & Keller, L. (2021). Resistance to antimicrobials in poultry production chain isolated bacteria. *InVet*, *23*(2), 01–08.

Lossio, A. (2023). *Evaluación de la resistencia antibacteriana de Salmonella enterica aisladas de aves de combate de un galpón del distrito de Carabayllo en el año 2021* [Universidad Científica del Sur]. https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

Melgarejo-Touchet, N., Busignani, S., Dunjo, P., Brítez, M., Weiler, N., Orrego, V., Alonzo, M., & Martínez-Mora, M. (2022). Resistencia antimicrobiana en Escherichia coli de muestras cecales de bovinos para carne faenados en frigoríficos de la zona del arroyo Mburicao, Asunción-Paraguay. Año 2021.

Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, *20*(3), 51–59. https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.03.51

Mestorino, N. (2009). *Antimicrobianos en avicultura*. https://www.researchgate.net/publication/305592763

Miró, E., Vergés, C., García, I., Mirelis, B., Navarro, F., Coll, P., Prats, G., & Martínez-Martínez, L. (2004). Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *22*(4), 204–211. https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73067-0

Molina, D. (2021). *Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de Salmonella enterica de carne de ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones y los mecanismos de resistencia*. Universidad de León.

Natalia, T., & Molina, N. B. (2022). *Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana*.

NIH. (2024). *National Center for Biotechnology Information*.

Ortiz, F., Weiler, N., Alvarez, M., Orrego, M. V., Kawabata, A., Riera, E., López, C., Acosta, L., Nagai, M., Portillo, R., Argüello, R., & Mereles, E. (2021). Resistencia a múltiples antibióticos en serovariedades de *Salmonella* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, *19*(1), 37–47. https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.01.37

Osburn, B., Scott, C., & Gibbs, P. (2009). One World-One Medicine-One Health: emerging veterinary challenges and opportunities. En *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 28, Número 2).

Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I., & Carattoli, A. (2004). Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(3), 903–908. https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.903-908.2004

Polo-Álvarez, A. (2021). *Electroforesis de ácidos nucleicos*.

Quino, W., Hurtado, C., Meza, A. M., Zamudio, M. L., & Gavilan, R. (2020). Patrones de resistencia a los antimicrobianos en serovares de *Salmonella enterica* en Perú. *Rev Chilena Infectol*, *37*(4), 395–401.

Rivera, K. (2021). *Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Salmonella spp. en pollo crudo comercializado en mercados de Veracruz, México y el riesgo a la salud pública*. Universidad Veracruzana.

Sánchez, A. (2022). *Análisis comparativo de secuencias de genoma completo de Salmonella enterica serovar Infantis de origen humano y animal*. Universidad Técnica de Ambato.

Sanz García, F. (2020). *Predicción de la resistencia a antibióticos, intrínseca y adquirida, en pseudomonas aeruginosa*.

Sun, F., Li, X., Wang, Y., Wang, F., Ge, H., Pan, Z., Xu, Y., Wang, Y., Jiao, X., & Chen, X. (2021). Epidemic patterns of antimicrobial resistance of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum isolates in China during the past half-century. *Poultry Science*, *100*(3). https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.007

Sun, T., Liu, Y., Qin, X., Aspridou, Z., Zheng, J., Wang, X., Li, Z., & Dong, Q. (2021). The prevalence and epidemiology of *Salmonella* in retail raw poultry meat in china: A systematic review and meta-analysis. En *Foods* (Vol. 10, Número 11). MDPI. https://doi.org/10.3390/foods10112757

TM MEDIA. (2014). *Agar tripticasa de soya*. https://labsupply.com.ec/producto/agar-tripticasa-soya/.

TM MEDIA. (2019). *Brain heart infusion broth*. https://www.tmmedia.in/wpcontent/uploads/TD/TD-TM-362.pdf.

TM MEDIA. (2020). *Mueller hinton agar*. https://www.tmmedia.in/wpcontent/uploads/TD/TD-TRM-339.pdf.

Villacis-Jara, K., Granda, E., & Irazabal, J. (2019). Determinación del perfil de sensibilidad antibiótica en *Escherichia coli* y *Salmonella spp*. aisladas de carne aviar en el Ecuador. En *Villacis-Jara, Karla*. PUCE.

Wessels, K., Rip, D., & Gouws, P. (2021). *Salmonella* in chicken meat: Consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. En *Foods* (Vol. 10, Número 8). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/foods10081742

White, A., & Hughes, J. M. (2019). Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth*, *16*(3), 404–409. https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques*, *69*(4), 317–325. https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057

ANEXOS

Anexo 1

Tabulación de resultados de la resistencia bacteriana en la Fase 1

CEPA	DISCO	ORIGINAL mm	R1 mm	R2 mm	MEDIA mm	RESULTADO
SE21-2	AMC	16	16	16	16	I
	CIP	26	26	26	26	I
	GM	18	18	18	18	S
	OT	0	0	0	0	R
	SXT	20	20	20	20	S
CEPA	DISCO	ORIGINAL mm	R1 mm	R2 mm	MEDIA mm	RESULTADO
SE37-1	AMC	20	20	20	20	S
	CIP	22	22	22	22	I
	GM	14	14	14	14	I
	OT	0	0	0	0	R
	SXT	18	18	18	18	S

Anexo 2

Actividades realizadas durante la Fase 1 de la investigación



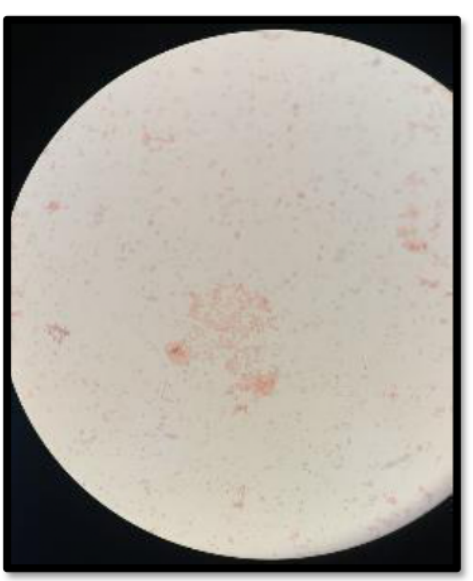
Refrescamiento de las cepas de *Salmonella enterica*



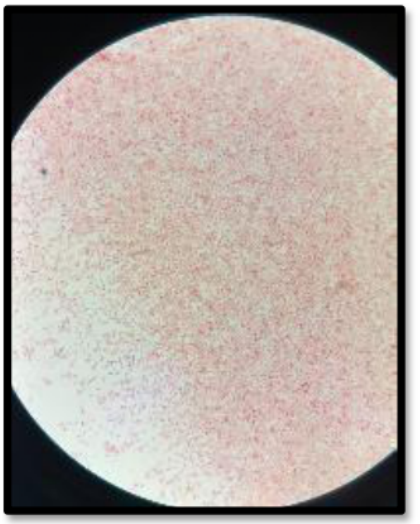
Obtención de la muestra FDAARGOS_768



Obtención de la muestra ATCC 13076



Verificación gram de la muestra FDAARGOS_768



Verificación gram de la muestra ATCC 13076



Medición de la densidad bacteriana de la muestra FDAARGOS_768



Medición de la densidad bacteriana de la muestra ATCC 13076



Aplicación de los discos antimicrobiales (AMC, CIP, GM, OT, SXT)



Medición de los halos de inhibición

Anexo 3

Actividades realizadas durante la Fase 2 de la investigación



Obtención de ADN de la muestra FDAARGOS_768



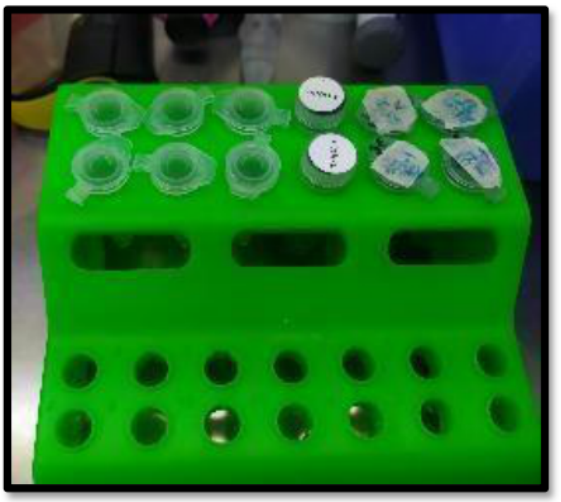
Obtención de ADN de la muestra ATCC 13076



Verificación de la pureza de ADN en el NanoDrop 2000

	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260
1		usuario1	05/04/2024 10:52:34	-0,1	ng/µl	-0,002
2	s ent 211	usuario1	05/04/2024 10:55:42	1443,9	ng/µl	28,877
3	s ent 212	usuario1	05/04/2024 10:59:19	1887,5	ng/µl	37,751
4	s ent 371	usuario1	05/04/2024 11:01:09	1183,3	ng/µl	23,666
5	s ent 372	usuario1	05/04/2024 11:02:36	1619,7	ng/µl	32,394
		A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
		0,007	-0,23	-1,16	DNA	50
	s ent 211	14,657	1,97	1,53	DNA	50
	s ent 212	19,042	1,98	1,53	DNA	50
	s ent 371	12,044	1,96	1,55	DNA	50
	s ent 372	16,036	2,02	1,64	DNA	50

Resultados de las pureza de ambas muestras de *Salmonella enterica* con una réplica de cada una



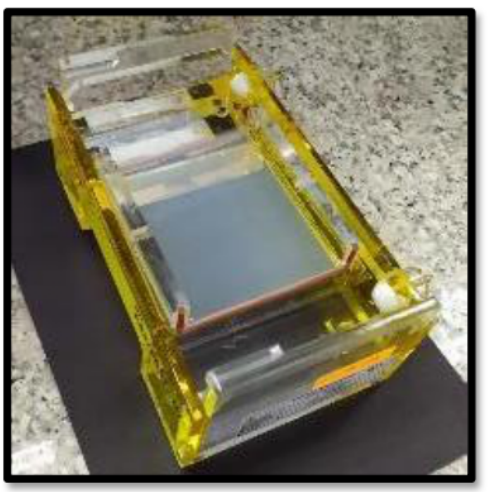
Preparación del Master Mix



Configuración del Termociclador con las condiciones de PCR



Aplicación del gel de Agarosa al 1% y posicionamiento del peine



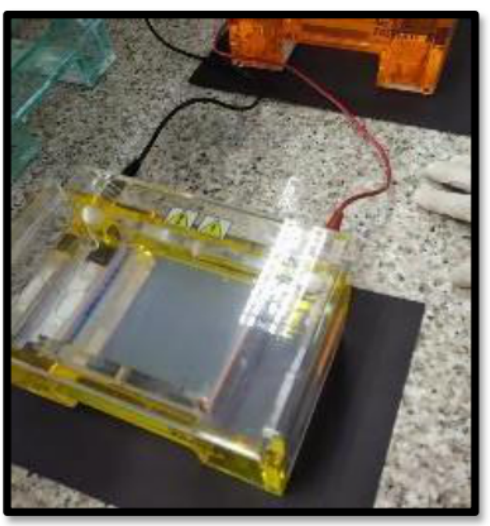
Posicionamiento del gel de Agarosa al 1% en la cámara de electroforesis



Aplicación de las muestras en los pocillos del gel de Agarosa al 1%



Visualización de las muestras en los pocillos



Conexión de la cámara de electroforesis a la fuente de energía



Observación del gel de Agarosa al 1% en el transiluminador