



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de
resistencia en *Lactococcus garvieae* aislado en carne de pollo que se
expende en Ambato**

AUTOR:

Anderson Xavier Chávez Romero

TUTOR:

Sandra cruz PhD

CEVALLOS, 2024

**Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de resistencia en
Lactococcus garvieae aislado en carne de pollo que se expende en Ambato**

REVISADO POR:



Sandra Cruz PhD

Tutor

APROBADOS POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha

07-08-2024



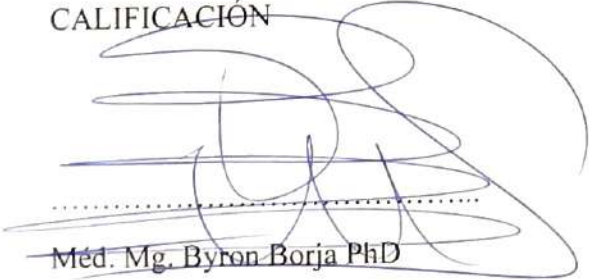
Ing. Patricio Núñez

PRESIDENTE DE TRIBUNAL



MVZ. Mg. Ana Burgos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN

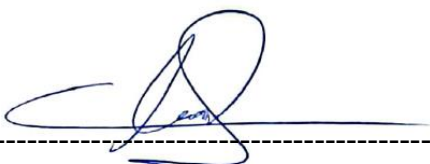


Méd. Mg. Byron Borja PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Anderson Xavier Chávez Romero**, portador de cédula de ciudadanía número: **2200507099**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “**Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de resistencia en *Lactococcus garvieae* aislado en carne de pollo que se expende 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.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'A' followed by 'X', 'C', 'R', and 'R' in a cursive script. The signature is written over a horizontal dashed line.

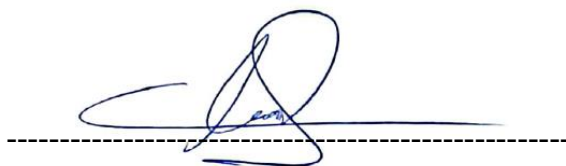
Anderson Xavier Chávez Romero

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de resistencia en *Lactococcus garvieae* aislado en carne de pollo que se expende 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, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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



Anderson Xavier Chávez Romero

DEDICATORIA

A mis padres, en especial a mi madre Elizabeth Romero por el apoyo en todo momento, por su sabiduría, por estar conmigo en cada momento, por el amor incondicional y que siempre será la fuerza impulsadora de cada logro.

A mis hermanos por apoyarme, a mis abuelitos y a toda mi familia.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a mi madre por siempre apoyarme y poder cumplir todos mis objetivos académicos.

A mi familia, docentes que me apoyaron y fueron de ayuda en toda la carrera.

En especial agradezco a mi tutora de tesis la Dra. Sandra Cruz por guiarme e instruirme con paciencia que ha sido fundamentales en el desarrollo de esta investigación. De igual forma a la Dra. Andrea Vela por su tiempo y conocimiento compartidos a lo largo del trabajo investigativo.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ASBTRACT.....	2
CAPITULO I.....	3
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Antecedentes investigativos	5
1.2 Categorías fundamentales.....	9
1.2.1 <i>Lactococcus garvieae</i>	9
1.2.2 Sensibilidad a los antibióticos.....	12
1.2.3 Mecanismo de resistencia en bacterias	12
1.2.4 Resistencia adquirida por bacterias.....	13
1.2.5 Genes de resistencia	13
1.3 Objetivos	14
1.3.1 Objetivo general	14
1.3.2 Objetivos específicos	14
CAPÍTULO II	15
METODOLOGÍA	15
2.1 Ubicación del estudio	15
2.2 Características del lugar	15
2.3 Equipos y materiales	16
2.3.1 Equipos.....	16
2.3.2 Reactivos	16
2.3.3 Materiales de laboratorio.....	17

2.3.4	Fármacos	17
2.4	Factores de estudio	18
2.4.1	Factor 1.....	18
2.4.2	Factor 2.....	19
2.5	Manejo del experimento	19
2.6	Tamaño de la muestra.....	20
2.7	Variable Respuesta	20
2.7.1	Cuantitativa	20
2.7.2	Cualitativa	20
2.8	Metodología.....	21
2.8.1	Fase 1. Refrescar la cepa de <i>L. garvieae</i> en tripticasa de soya (TS)	21
2.8.2	Siembra de las colonias en la Infusión Cerebro-Corazón	22
2.8.3	Método de sensibilidad a los antibióticos en <i>L. garvieae</i>	23
2.8.4	Fase 2 Extracción del ADN de la cepa <i>L. garvieae</i>	24
2.8.5	Protocolo de PCR.....	25
2.8.6	Protocolo de Electroforesis	28
CAPITULO III		29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
3.1	Prueba de sensibilidad a los antibióticos	29
3.2	Identificación de genes de resistencia por PCR	34
3.3	Mecanismos moleculares de resistencia de <i>L. garvieae</i> a OT, CRO, LNZ, L2	39
3.3.1	Mecanismos moleculares de resistencia de <i>L. garvieae</i> a tetraciclinas	40
3.3.2	Mecanismos moleculares de resistencia de <i>L. garvieae</i> al Linezolid	41
3.3.3	Mecanismos moleculares de resistencia de <i>L. garvieae</i> a β -lactámicos	43
3.3.4	Mecanismos moleculares de resistencia de <i>L. garvieae</i> a lincosamidas	46

3.4 Comprobación de la hipótesis	47
CAPÍTULO IV	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
4.1 CONCLUSIONES.....	48
4.2 RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Categoría taxonómica de <i>L. garvieae</i>	11
Tabla 2 Características del lugar de estudio.....	15
Tabla 3 Equipos.....	16
Tabla 4 Reactivos	16
Tabla 5 Materiales de laboratorio	17
Tabla 6 Fármacos	17
Tabla 7 Fármacos y su descripción	18
Tabla 8 Primers y secuencia de genes.....	19
Tabla 9 Sensibilidad, intermedio, resistente y Fármacos	21
Tabla 10 Condiciones de PCR para el gen (tetD)	26
Tabla 11 Condiciones de PCR para el gen (tetD)	27
Tabla 12 Condiciones de PCR para el gen (tetA)	27
Tabla 13 Sensibilidad in vitro de la cepa <i>L. garvieae</i> aislada en carne de pollo frente a cinco antibióticos (amoxicilina+ ácido clavulánico, ceftriaxona, linezolid, oxitetraciclina y lincomicina).....	30
Tabla 14 Calidad del ADN, medido en concentración (ng/μl), la pureza (260/280) contaminantes (260/230).....	34
Tabla 15 Patrón genotípico de genes de resistencia.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Lactococcus garvieae</i>	9
Figura 2 Placas de sensibilidad invitro en <i>L. garvieae</i>	29
Figura 3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos para bacterias probióticas. R: Resistente. S: Sensible. I: intermedio.....	33
Figura 4 Técnica de PCR con primers	35
Figura 5 Aislados bacterianos que muestran patrones anti- <i>Streptococcus agalactiae</i> , y detección de genes de resistencia a los antibióticos.....	36
Figura 6 Aislados bacterianos que muestran patrones anti- <i>Streptococcus agalactiae</i> , y detección de genes de resistencia a los antibióticos.....	37
Figura 7 Objetivos de los antibióticos y mecanismos de resistencia	39
Figura 8 Distribución geográfica de bacterias portadoras de cfr, los países en azul son aquellos en los que la ocurrencia de Se han informado bacterias portadoras de cfr	43

RESUMEN

Lactococcus garvieae es una bacteria patógena Gram positiva, considerado un patógeno zoonótico emergente, ya que están aumentando los informes de infección humana. En el presente trabajo investigativo se evaluó la antibiorresistencia de la cepa *L. garvieae* y la presencia de genes de resistencia en *L. garvieae* aislado en carnes de pollo que se expenden en Ambato, se identificó la sensibilidad mediante el método de Kirby Bauer para los antibióticos: Linezolid, Ceftriaxona, Amoxicilina+ ácido clavulánico, Lincomicina y Oxitetraciclina. Después de obtener los resultados donde cuatro de los cinco antibióticos fueron resistentes: Linezolid, Ceftriaxona Lincomicina y Oxitetraciclina donde escogimos la oxitetraciclina, donde fue la que presentó mayor resistencia y es el antibiótico más utilizado en la ganaderías. De realizó una ardua investigación para identificar genes de resistencia, tetD y tetA posteriormente se extrajo el ADN del *L. garvieae* por el método de Aljanabi & Martínez modificada, se realizó la técnica de PCR con los primers correspondientes de los genes y se finalizó con una electroforesis donde no se identificó que posea genes tetD y tetA de resistencia a oxitetraciclina y al final se investigó sobre los mecanismos moleculares de resistencia del *L.garvieae* a los diferentes antibióticos resistentes.

Palabras clave: *Lactococcus garvieae*, antibiótico, oxitetraciclina, genes de resistencia, mecanismos moleculares de resistencia

ASBTRACT

Lactococcus garvieae is a Gram-positive pathogenic bacterium, considered an emerging zoonotic pathogen, as reports of human infection are increasing. In the present research work, the antibioresistance of the *L. garvieae* strain and the presence of resistance genes in *L. garvieae* isolated from chicken meat sold in Ambato were evaluated. Sensitivity was identified using the Kirby Bauer method for the following antibiotics: Linezolid, Ceftriaxone, Amoxicillin+clavulanic acid, Lincomycin and Oxytetracycline. After obtaining results where four of the five antibiotics were resistant: Linezolid, Ceftriaxone Lincomycin and Oxytetracycline where we chose oxytetracycline, which showed the highest resistance and is the most widely used antibiotic in livestock farming. An arduous investigation was carried out to identify resistance genes, tetD and tetA, then the DNA of *L. garvieae* was extracted by the method of Aljanabi & Martinez modified, the PCR technique was carried out with the corresponding primers of the genes and ended with an electrophoresis where it was not identified that it has tetD and tetA genes of resistance to oxytetracycline and finally it was investigated on the molecular mechanisms of resistance of *L. garvieae* to the different resistant antibiotics.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, antibiotic, oxytetracycline, resistance genes, molecular mechanisms of resistance

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El incremento de la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud pública mundial, se ha considerado que el uso indiscriminado de fármacos es uno de los factores más importantes que conduce a la resistencia. Los medicamentos antimicrobianos son utilizados en varios entornos asociados a la medicina humana y en animales como en hospitales veterinarios, granjas, corales de engorde y en camales **(Lees et al., 2021)**.

Las resistencias hacia los antibióticos son una cualidad de microorganismos patógenos y no patógenos, debido a su supervivencia y la constante evolución de las bacterias en el entorno. Los principales mecanismos de la resistencia microbiana son la impermeabilidad de la célula bacteriana hacia la molécula del antibiótico (propiedades fisicoquímicas de las moléculas, la presencia de bomba de eflujo), la inactivación del compuesto antibiótico por medio de enzimas degradantes **(Odonkor et al., 2022)**.

El aumento de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos (RAM) genera un descontrol a enfermedades infecciosas, se han identificado bacterias resistentes a los antibióticos en medios acuáticos, productos cárnicos, etc. Esto contribuye a problemas de salud pública. La investigación de **(Odonkor et al., 2022)** realizó un estudio de campo en el cual tomaron muestras en fuente a agua potable, centrándose en pozos, presas, arroyos. En el cual se obtuvieron 67 muestras de agua para identificar su susceptibilidad a los antimicrobianos y determinar si son portadores de genes de resistencia. Los resultados indicaron que las fuentes de agua eran de mala calidad por la presencia de organismos fecales, las bacterias encontradas fueron *Klebsiella spp.* (21.8%), seguido de *E. coli* (20.9%), y se presentaron los genes de resistencia: blaMDM-1, tet(O) y tet(W).

La contaminación de los productos cárnicos contribuye a problemas de salud pública en el país, aumentando la cantidad de microorganismos debido a la falta de inocuidad de las carnes al momento y después del faenamiento, provocando la pérdida de las características físicas y bioquímicas, presentando así una contaminación, la distribución de productos cárnicos en la ciudad de Ambato generalmente no presenta una inocuidad eficiente. Esto se da inicio al momento del sacrificio, el faenamiento y el transporte del animal, alterando el pH de la carne y su bioquímica, dando paso al crecimiento de bacterias. Se llevó a cabo una investigación donde recolectaron 90 muestras que se dividieron en 45 en establecimientos certificados y las restantes en lugares de expedición informales en la ciudad de Ambato. En los establecimientos certificados encontraron las siguientes bacterias: *Enterococcus faecalis* , *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus gallinarum* y *Pseudomonas aureginosa*, mientras en los puntos de ventas informales encontraron: *Aeromonas veronii* y *Escherichia coli* **(Osorio, 2023)**.

La presente investigación busca evaluar la sensibilidad a los antibióticos y la presencia de genes de resistencia en *Lactococcus garvieae* aislado en carnes de pollo que son expandidas en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua. Con los objetivos de determinar a qué antibióticos son sensibles por el método de difusión de Kirby Bauer en donde identificaremos si la bacteria es Resistente, Intermendio o Sensible, los resultados obtenidos serán comparados con el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute), la identificación de genes de resistencia por PCR y la lectura por medio de electroforesis.

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

(Handrova & Kmet, 2019) realizó una investigación sobre la resistencia a los antimicrobianos, caracterización genética y filogenética de *E. coli* en aves silvestres, donde recolectaron 19 muestras de aves silvestres y veinticuatro muestras de hisopos rectales de pollos de engorde. En el estudio realizaron la susceptibilidad con 20 antibióticos: ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (A+IB), ertapenem (ETP), ceftiofur (CFF), ceftriaxona (TRC), estreptomina (STM); neomicina (NEO, ceftazidima + clavulanico (CAC), oranfenicol (CMP), florfenicol (FLO), tetraciclina (TTC), espectomicina (SPE); sulfadiazina + trimetoprim (COT), ácido nalidíxico (NAL); ciprofloxacina (CIP). En los análisis de susceptibilidad a antibióticos, identificó que la mitad de las cepas son resistentes a tres o más antibióticos que fueron probados. El antibiótico con más resistencia fue la ampicilina y la tetraciclina, e identificaron 17 genes de resistencia a los antibióticos; *dfrA*, *dfrB*, *aadA*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tetA*, *tetB*, *oqxA*, *oqxB*, *qepA*, *qnrS*, *qnrA* y *qnrB*.

(Stępień-Pyśniak et al., 2019) analizó la resistencia a antibióticos y genética en 27 cepas de *Enterococcus* (*Enterococcus hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus* y *E. faecium*). Los antibióticos utilizados fueron vancomicina, penicilina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, doxiciclina, lincomicina y todos los amino glucósidos para el *Enterococcus*. La susceptibilidad a vancomicina (0.125–64 mg/L), penicilina (0.25–128 mg/L), ampicilina (0.125–64 mg/L), gentamicina (2–1,024 mg/L), estreptomina (4–2,048 mg/L), kanamicina (4–2,048 mg/L), tetraciclina (0.25–128 mg/L), doxiciclina (0.125–64 mg/L), eritromicina (0.125–64 mg/L), lincomicina (0.5–256 mg/L), ciprofloxacina (0.125–64 mg/L) y cloranfenicol (0.25–128 mg/L). De las 27 cepas de *Enterococcus* 25 fueron resistentes por lo menos a un antibiótico aislados en especies de aves silvestres. Como resultados, la lincomicina fue el antibiótico con mayor resistencia, seguido de la eritromicina, la ciprofloxacina y las tetraciclinas. *E. faecium* encontraron que todos los

betalactámicos resistentes tienen el gen *pbp5*, en cuanto a la gentamicina no se encontraron genes de resistencia: *aa(6')*, el gen *ant(6)* fue identificado en dos de nueve aislados con alta resistencia a estreptomicina, dos aislados fueron encontrados con el gen *aph(3')*. La mayoría de las cepas eran resistentes a las tetraciclinas y contenían los genes *tet(M)* y *tet(L)*.

(Osman et al., 2020) habló sobre la intoxicación de alimentos por *Staphylococcus* debido a que es una de las enfermedades más comunes, la leche es rica en nutrientes y tiene un pH neutro por ende favorece al crecimiento de bacterias, en este estudio se realizó la recolección de 42 *Staphylococcus* aislados del cual 12 son *Staphylococcus* coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius*) y 30 coagulasa negativa (*Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus saccharolyticus* y *Staphylococcus auricularis*), utilizaron discos de antibiótico como: ampicilina sulbactam (20 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10IU), tetraciclina (30µg), vancomicina (30 µg) y meticilina (5 µg). Los resultados adquiridos identifican que 24 de los 42 aislados de *Staphylococcus* son altamente resistentes a la penicilina, seguido de oxacilina, tetraciclina, eritromicina, meticilina y cloranfenicol. En cuanto a la vancomicina se observó una baja resistencia del 9,5%. Se detectaron los principales genes en tetraciclinas: *tet(k)* y *tet(M)*, en macrólidos: *erm(B)* y *erm(C)*, meticilina: *mecA* y betalactámicos: *blaZ*. El gen de los betalactámicos fue encontrado en un 64,2% (27/42) de estafilococos.

(Zhang et al., 2020) realizó un estudio de *Staphylococcus aureus* en donde se recolectaron un total de 401 hisopos (300 de cerdos y 101de personas). Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizaron el método de dilución en caldo utilizando placas personalizadas a 21 antibióticos: penicilina, ceftarolina, ceftobiprol, clindamicina, gentamicina, daptomicina, oxacilina, teicoplanina, vancomicina, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, moxifloxacina, trimetoprima/sulfametoxazol, ácido fusídico,

eritromicina, rifampicina, mupirocina, norfloxacin, linezolid. En los resultados obtenidos, el mayor porcentaje es a la penicilina, tetraciclinas, trimetoprima, macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, linezolid y mupirocina. Para la detección de genes de enterotoxinas utilizaron: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sei*, *sej*, y *mecA*, *spaA*, *scn*. Veinte siete de los 29 aislados de *S. aureus*, tanto en personas como cerdos, portaban los genes *scn*.

(Siriken et al., 2020), llevó a cabo una investigación en donde recolectaron 100 muestras que consistían en la primera mitad en carne de res molida y albóndigas de carne e identificaron las cepas de *Salmonella* spp. En las pruebas de susceptibilidad aplicaron 10 antibióticos: cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg), cloranfenicol (30µg), ampicilina (10µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), estreptomicina (10µg), tetraciclina (30µg) y trimetoprima/sulfametoxazol, utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Todos los aislados fueron susceptibles a dos antibióticos, ceftriaxona, cefotaxima y al ácido nalidíxico; encontraron resistencia a estreptomicina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol.

(Srednik & Yannick, 2018) habló del *Staphylococcus* coagulasa negativa, una de las causas más comunes de infecciones intramamarias bovinas. De este modo analizó 90 aislados de *Staphylococcus* de vacas con mastitis clínica y subclínica en Argentina. Los genes de resistencia encontrados son de betalactámicos, de los cuales 21 aislados tenían el gen *blaZ*, cuatro el gen *mecA* y uno tenía el *mecC*. Un aislado pertenecía a *S. chromogenes* y presentaba ambos genes: *blaZ* y *mecA*.

(Toomey et al., 2014) analizó la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias del ácido láctico que fueron aisladas en camales de carne porcina y vacuno. 37 cepas fueron aisladas (12 *Enterococcus*, 10 *Lactobacillus* s, 8 *Streptococcus*, 3 *Lactococcus*, 2 *Leuconostoc* y 2 *Pediococcus*). Para la susceptibilidad utilizaron 6 antibióticos:

ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina y vancomicina. La eritromicina fue la más resistente en once cepas, incluyendo cinco de diez *Enterococcus faecium*, dos de los ocho *Streptococcus* spp, uno *Lactobacillus paracasei*, dos de cinco *Lactobacillus reuteri* y uno *Lactobacillus curvatus*. Los 11 aislados del BAL resistentes a eritromicina fueron positivos a los genes *erm(B)*. Salieron positivos los genes de resistencia a tetraciclina *tet(M)* y *tet(S)* en *L. plantarum* y *L. mesenteroides*.

La investigación de **(Y. S. Lin, 2020)** analizó el genoma de *L. garvieae* en Singapur, de la cual se tomaron muestras de cinco pacientes y seis muestras de pescado, las muestras de pescado se adquirieron en supermercados o restaurantes de sushi seleccionados al azar y las muestras se cultivaron en placas de agar sangre y se incubaron a 35C durante 18-24 h sin dióxido de carbono. En la identificación de genes de resistencia encontraron que el 72,7% contenían genes de resistencia, en comparación con los del extranjero 41,18% y en el estudio solo tres aislamientos (peces=1, humano=2) poseían múltiples genes de resistencia. Los aislados poseían mayor diversidad de genes de resistencia (*inuA*, *tetL*, *tetS* y *mdt(A)*).

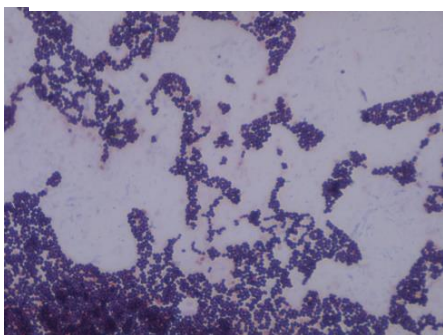
(Y. Lin et al., 2023) realizó una investigación en donde obtuvo treinta y nueve muestras de *L. garvieae* a partir de 2899 muestras de leche con mastitis clínica en bovinos en seis provincias de China. Se determinaron cinco complejos clonales a partir de treinta y dos tipos de secuencia multilocus (MLST) de *L. garvieae*; tipo de secuencia 46 (ST46) fue el tipo de secuencia predominante y se identificaron 13 MLST novedosos. Todas las muestras fueron resistentes al cloranfenicol y la clindamicina, pero sensibles a la penicilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftiofur, enrofloxacin y marbofloxacin. La mayoría de las cepas poseían genes de resistencia a los antimicrobianos (AMR) *IsaD* y *mdtA*. Según los resultados de COG (base de datos de Clusters of Orthologous Genes).

(Gibello & Sánchez, 2016) demostró que el *L. garvieae* es un patógeno relevante a nivel mundial que afecta a diversos peces marinos y de agua dulce silvestres, también se ha aislado en otros animales como los rumiantes con mastitis subclínica y cerdo con neumonía. Desde los años 90, el *Lactococcus garvieae* se ha asociado con diferentes infecciones humanas, principalmente endocarditis y las infecciones humanas por el consumo o la manipulación de productos contaminados como pescado, marisco crudo, carne, la leche cruda y los productos lácteos. *L. garvieae* es resistente a la clindamicina y esta característica se ha utilizado para distinguirla de *L. lactis*. Los antibióticos utilizados en la acuicultura para peces son limitados debido al problema asociado de desarrollo de resistencias. *L. garvieae* aislados de peces analizados son susceptibles a la eritromicina, sin embargo, en otro estudio han reportado altas frecuencias de resistencia a la eritromicina, así como a la estreptomicina, tetraciclina, oxitetraciclina, florfenicol y algunas quinolonas. Se ha demostrado el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos de bacterias acuáticas a patógenos humanos y animales.

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 *Lactococcus garvieae*

Figura 1 *Lactococcus garvieae*



Fuente: Propia

1.2.1.1 Historia

L.garvieae fue identificado por primera vez en 1983 en un estudio donde se encontró la bacteria como responsable de la mastitis bovina. Algunos investigadores autores han descrito con el nombre de *Streptococcus garvieae*, familia *Streptococcaceae* y del género *Streptococcus* por su morfología y características bioquímicas. Sin embargo, en 1985 se definió que el género *Lactococcus* y *Enterococcus* fueran géneros separados de *Streptococcus* y *Lactobacillus*, y pasó a llamarse *L. garvieae*. Posteriormente Kusuda identificó una nueva especie llamada *Enterococcus seriolicida*, que incluye a un conjunto de bacterias Gram positivas responsables de importantes pérdidas económicas en la acuicultura japonesa. No obstante, debido a la estrecha similitud molecular y fenotípica encontrada entre esta especie y las primeras cepas aisladas de *L. garvieae* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Europa, se llegó a la conclusión de que debería ser reclasificada como *L. garvieae*. En 1991 se registró por primera vez la infección de *L. garvieae* en humanos, y desde entonces ha provocado diferentes tipos de enfermedades (Pilar, 2018).

1.2.1.2 Características generales de *L. garvieae*

L. garvieae es una bacteria Gram positiva de la familia *Streptococcaceae*. En el género de *Lactococcus* se reconocen actualmente siete especies: *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis*, *L. plantarum*, *L. fujiensis* y *L. lactis* con sus subespecies: *lactis*, *cremoris* y *hordniae*. Su hábitat más común es en los vegetales, piel y productos lácteos. Algunas especies son utilizadas en la industria alimentaria para preservar productos cárnicos, lácteos y sus derivados, mejorando su sabor. Sin embargo, en la actualidad algunas de estas especies se consideran patógenos oportunistas debido al aumento de casos clínicos relacionados con infecciones bacterianas en humanos (Pilar, 2018).

Tabla 1 Categoría taxonómica de *L. garvieae*

Superreino	Bacteria
Filo	Bacillota (bajo G+C Gram-positiva bacteria)
Clase	Bacili
Orden	Lactobacillales
Familia	Streptococcaceae
Género	<i>Lactococcus</i>
Especies	<i>L. garvieae</i>

Fuente: (NCBI,2024)

El *L. garvieae* es una bacteria mesófila con una morfología cocoide con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , no móviles, no son formadoras de esporas, suelen estar en parejas o formando cadenas cortas, su metabolismo es homofermentativo, produce solo la forma L(+) del ácido láctico, sus requerimientos nutricionales son complejos, es auxótrofo en diversas vitaminas y aminoácidos. Crecen a un pH de 9,6 en cloruro de sodio al 6,5% entre 10 a 42 °C, pero su temperatura óptima es de 30°C. *L. garvieae* no produce sulfuro de hidrógeno ni indol, en la prueba de catalasa da negativo, es α -hemolítica, pero algunos autores la catalogan como β -hemolítica. En cuanto al contenido de Guaninas más Citosinas (G+C) del ADN es del 38% (Y. S. Lin, 2020).

1.2.1.3 *L. garvieae* como agente zoonótico y patógeno

L. garvieae representa un riesgo significativo en la acuicultura de agua dulce debido a las pérdidas entre el 50 y 80 % total de la producción. Inicialmente esta bacteria era conocida como agente etiológico de la mastitis bovina; también se identifica como una de las bacterias de la microbiota intestinal de las personas, pero de igual forma hay varios datos escritos de infecciones a personas por esta bacteria. Se consideraba a la bacteria como un

patógeno oportunista de baja virulencia en mamíferos que era capaz de infectar solo a hospedadores inmunosuprimidos; posteriormente hay nuevos casos clínicos que indican la capacidad de la bacteria para propagarse a hospedadores sanos como inmunosuprimidos. Estudios han aislado a la bacteria en diferentes muestras biológicas como queso, verduras, carnes, productos cárnicos procesados, leche cruda, productos derivados del pescado, peces, amígdalas de caninos y felinos. Algunos estudios resaltan que la bacteria tiene el potencial de ser un agente zoonótico, aunque aún no se ha demostrado su incidencia (**Rösch et al., 2019**).

1.2.2 Sensibilidad a los antibióticos

Al momento de que una bacteria es expuesta a un antimicrobiano (ATM) se generan dos posibilidades; si existen células bacterianas resistentes a ese antimicrobiano, se eliminarán las bacterias sensibles y solo quedan las resistentes que al crecer y multiplicarse produzcan que todas las bacterias del cultivo sean resistentes, y si una bacteria es resistente a dicho antimicrobiano, todas sus células hijas serán resistentes a no ser que se genere una mutación (**Gurmessa et al., 2020**).

1.2.3 Mecanismo de resistencia en bacterias

La resistencia antimicrobiana (RAM) es la capacidad natural, adquirida o transitoria que realiza una cepa a efectos bacteriostáticos o bactericidas de un antimicrobiano. La resistencia natural intrínseca es una característica particular de ciertos géneros o especies frente a un antimicrobiano específico. Es independiente de una exposición anterior al antibiótico y a la adquisición de mutaciones o genes externos, como son la resistencia a cefalosporinas del género *Enterococcus*, a ampicilina por la *Klebsiella* spp, como también a los betalactámicos por *Mycoplasma*. Existen diversos mecanismos de resistencia que poseen las bacterias: Producción de enzimas que inactivan antibióticos, modificación del propio punto diana o sobreexpresión de la bomba de eflujo que ayuda a la incorporación

y a la expulsión del fármaco; modificaciones a nivel de la proteína de la membrana que impide la llegada del fármaco al punto diana (**Gurmessa et al., 2020**).

1.2.4 Resistencia adquirida por bacterias

Ocurre cuando hay cambios en el genoma de los microorganismos, pérdida o inserciones de material genético y mutaciones puntuales. Se origina una mutación cuando hay los ciclos de replicación bacteriana y favorece a la generación de factores genéticos que ayudan a la resistencia antimicrobiana. Los genes que adquieren resistencia pueden ser por medio de elementos genéticos móviles como integrones, transposones, plásmidos y mobilomas (**Espinosa & Arias, 2019**).

1.2.5 Genes de resistencia

Existen varias formas en que la bacteria adquiere genes de resistencia. Puede ser por transferencia vertical de genes, es decir, la transmisión de información genética modificada que está localizada en el cromosoma bacteriano a generaciones posteriores de células hijas, y la transferencia horizontal de genes que está mediada por los elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones y bacteriófagos. Dependiendo del tipo de antibiótico, se pueden generar cuatro tipos de mecanismos de resistencia microbiana que incluyen: eliminación activa de antibióticos de las células bacterianas mediante una bomba de eflujo; crear una vía metabólica alternativa que realice una función similar o la misma que la vía inactivada por el fármaco o limitar la necesidad de la célula de metabolitos producidos en la vía inhibida; modificación del objetivo del antibiótico; inactivación enzimática del medicamento (**Sánchez et al., 2016**).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la sensibilidad a los antibióticos y presencia de genes de resistencia en *Lactococcus garvieae* aislado en carnes de pollo que se expende en Ambato.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la sensibilidad a los antibióticos de *Lactococcus garvieae* por método de difusión en agar.
- Demostrar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en *Lactococcus garvieae* por PCR en carne de pollo que se expende en Ambato.
- Identificar mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos en *Lactococcus garvieae*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del estudio

El presente estudio se lo realizó en los laboratorios de Microbiología y biología molecular 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
Temperatura °C	Ecuatorial Meso Térmico Seco
Clima	13 a 16
Humedad relativa, %	60 – 75
Velocidad del viento, m/s	2.1 – 8.9
Precipitación, mm	200 – 500

Fuente:(GAD Cevallos,2023)

2.3 Equipos y materiales

2.3.1 Equipos

Tabla 3 Equipos

Equipos	
• Balanza Analítica FC 2000 (2000 g; 0,01 g) • Autoclave • Incubadora • Refrigerador • Baño maría	• Transiluminador • Agitador magnético con plancha de calentamiento • Termociclador • Espectrofotómetro • Cámara de electroforesis

2.3.2 Reactivos

Tabla 4 Reactivos

Reactivos	
• Agar tripticasa de soya • Agar Müller Hilton • Infusión cerebro- corazón	• Alcohol • Discos de antibiograma

2.3.3 Materiales de laboratorio

Tabla 5 Materiales de laboratorio

Materiales de laboratorio	
• Gradilla • Caja Petri • Tubos de ensayo • Varilla de agitación • Cuchara de medición • Vaso de precipitación • Micro pipeta • Papel aluminio • Guantes de látex • Cuvets • Tubos Eppendorf	• Portaobjetos • Asa de siembra • Cofia • Bata quirúrgica • Papel Kraft • Mechero bunsen • Zapatones • Cinta • Matraz Erlenmeyer • Bolsa ziploc

2.3.4 Fármacos

Tabla 6 Fármacos

Fármacos	
• Linezolid • Ceftriaxona • Amoxicilina+ ácido clavulánico	• Lincomicina • Oxitetraciclina • Blanco

2.4 Factores de estudio

2.4.1 Factor 1

Tabla 7 Fármacos y su descripción

Fármaco	Simbología	Descripción	Genes de resistencia
Linezolid	LZD 10µg	Antibiótico perteneciente a la familia de las oxazolidinonas que ejerce su acción por inhibición de la fase de iniciación de la síntesis proteica	optrA
Ceftriaxona	CRO 30µg	Antibiótico perteneciente al grupo de las cefalosporinas. Impiden que las bacterias puedan sintetizar la pared que les rodea.	ampC blaTEM blaCTX-M
Amoxicilina más ácido clavulánico	AUG 3µg	Betalactámico en combinación con un inhibidor de betalactamasas, actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y previenen la acción de las enzimas bacterianas resistentes.	ampC blaTEM blaCTX-M
Lincomicina	MY 10µg	Antibiótico pertenece al grupo de las lincosamidas, cuya actividad principal es bacteriostática.	isa(D) erm(B)
Oxitetraciclina	OT 30µg	Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales derivados de diferentes especies de <i>Streptomyces</i> spp.	tet(D) erm(B)

Fuente: (Elaboración propia)

2.4.2 Factor 2

Tabla 8 Primers y secuencia de genes

Fármaco	Primers	Secuencia 5´a 3´	Gen objetivo	Amplicón	Referencia
Oxitetracilina	TetD-f	AAACCATTACGGCATTCTGC	tetD	787	Mawardi et al.,2023
	TetD-r	GACCGGATACACCATCCATC			
	TetA-f	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	tetA	210	
	TetA-r	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG			

Fuente: (Elaboración propia)

2.5 Manejo del experimento

La Investigación se realizó en 3 fases

Fase 1: Se determinó la sensibilidad de la cepa *L. garvieae* en los diferentes discos de antibióticos. Se considera la variable en respuesta de la Sensibilidad (S) o Resistencia ante los antibióticos evaluados.

Fase 2: Se realizó la extracción del ADN del *L. garvieae*, el disco de antibiótico que tuvo mayor resistencia de la fase 1, e identificó los genes de resistencia para después realizar el método de PCR y electroforesis.

Fase 3: los resultados obtenidos fueron presentados y analizados mediante el estudio bibliográfico de mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos en *Lactococcus garvieae*.

2.6 Tamaño de la muestra

Se trabajó con la cepa *Lactococcus garvieae* JRC-LG1 con el código de acceso LC376029.1 asilada de la carne de pollo expendido en Ambato, las mismas que se encuentran criopreservadas en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca.

2.7 Variable Respuesta

2.7.1 Cuantitativa

Está basado de acuerdo a los criterios establecidos por Clinical Laboratory Standard Institut (CLSI), después de las 24 horas de incubación, encontramos los diámetros de la zona de inhibición alrededor de los discos se medirá el milímetro más cercano.

- Se utiliza una regla o calibrador por encima de la caja Petri y medir el diámetro de la zona tomando en cuenta los 6 mm del disco
- Hay indicios de que no existe inhibición si el diámetro es de 6mm

2.7.2 Cualitativa

Se determinará la medición del halo que forma alrededor del disco y determinamos si las bacterias son sensibles, intermedias o resistentes al antibiótico. Se medirá a sensibilidad a antibióticos.

- S= sensible
- I = intermedio
- R= resistente

Tabla 9 Sensibilidad, intermedio, resistente y Fármacos

Discos	Sensible	Intermedio	Resistente
Linezolid	≥ 23	21-22	≤ 20
Ceftriaxona	≥ 23	20-22	≤ 19
Amoxicilina + Ácido clavulánico	≥ 18	14-17	≤ 13
Lincomicina	≥ 21	15-20	≤ 14
Oxitetraciclina	≥ 28	25-27	≤ 24

Fuente: (CLSI, 2023)

2.8 Metodología

La cepa de *L. garvieae*, que fueron identificadas en anteriores estudios, se encuentran conservadas en eppendorfs, etiquetadas y guardadas en gradillas cubiertas con papel aluminio a una temperatura de -20°C en el laboratorio de Microbiología ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato para su posterior procesamiento.

2.8.1 Fase 1. Refrescar la cepa de *L. garvieae* en tripticasa de soya (TS)

El medio de cultivo la peptona y la tripteína aportan nutrientes ricos en aminoácidos libres, péptidos bases púricas, minerales, pirimídicas y vitaminas. Garantiza el crecimiento de la mayoría de microorganismos tanto grampositivos como gramnegativos, levaduras y hongos, se puede adicionar suplementos como la sangre de un ovino al 5% para observar reacciones hemolíticas en los microorganismos (Media, 2019).

Preparación

1. Suspender 40gr del medio de cultivo en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar con agitación suave hasta la completa disolución de la muestra y hervir 1 minuto.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 45 minutos.
4. Dejar enfriar a una temperatura entre los 45-50°C y vaciar en las placas estériles (**Media, 2019**).

2.8.1.1 Siembra de la cepa *L. garviae* en TS

Primero se buscaron los eppendorfs que tengan la cepa de *L. garviae* que vamos a trabajar; se les dejó a temperatura ambiente por unos 10 minutos. En el área de siembra, se realizó una esterilización de los materiales y se rotularon las cajas Petri con el nombre de la cepa. Posteriormente se utilizó un palillo estéril para la obtención de una gota de la cepa, después esa gota se coloca en la caja Petri dejando reposar por 1 hora o hasta que se seque para, se realiza la técnica de estría con un asa estéril, todo este proceso se realizó al lado de un mechero de bunsen y al final colocamos las placas con la cepa en la incubadora durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

2.8.2 Siembra de las colonias en la Infusión Cerebro-Corazón

Medio liquido nutritivo que esta proporcionado por la infusión de cerebro de una ternera y la infusión de corazón de un vacuno y la peptona corresponde a la fuente de carbono, aminoácido, nitrógeno, péptidos y vitaminas que permite el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. La infusión es apropiada para hemocultivos debido a que pueden desarrollar todas las especies de estreptococos excepto los tiol y piridoxa (**Media, 2022**).

Preparación

1. Suspender 37gr de la muestra en 1000 ml de agua destilada.

2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 45 minutos.
3. Dejar enfriar a una temperatura entre los 45-50°C.
4. Distribuir la infusión en tubos de ensayos previamente esterilizados siempre a lado del mechero de bunsen (**Media, 2022**).

2.8.2.1 Siembra de las colonias de *L. garvieae* en la infusión Cerebro-Corazón

Al momento que la infusión ya está distribuida en los tubos de ensayos, cuales ya estaban esterilizados, con el asa estéril seleccionamos de 6-7 colonias aisladas previamente sembradas en Agar TS, añadimos las cepas recolectadas en los tubos de ensayos, realizamos un vórtex de los tubos y observamos que presenta turbidez. Para finaliza, enviamos a la incubadora por 3 horas.

2.8.3 Método de sensibilidad a los antibióticos en *L. garvieae*

2.8.3.1 Siembra de *L. garvieae* en Agar Müller Hilton

Medio de cultivo altamente recomendado para pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos, existe un procedimiento estándar basado en el uso de Agar Müller Hinton que fue creado por Kirby-Bauer, este medio fue desarrollado para el cultivo de gonococos (**Media, 2023**).

Preparación

1. Disolver 38 g en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar la mezcla y dejar hervir para lograr la dilución total.
3. Esterilizar en autoclave durante 45 minutos a 121°C.
4. Dejar enfriar la mezcla a 45°-50°C y distribuir sobre las placas de Petri estériles, se debe utilizar un volumen apropiado para que el espesor de la mezcla sea de 4

mm, es importante mantenerla sobre una superficie horizontal (suspender de 25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

5. Distribución equitativamente en placas de Petri y dejar almacenado hasta que se realice la siembra (**Media, 2023**).

2.9.3.3 Colocación de los discos de antibióticos en las placas

Primeramente, verificamos que las placas se encuentren completamente secas; comenzamos con la colocación del disco blanco en el centro de la placa como control con la ayuda de una pinza esterilizada, después ordenamos los discos de antibiótico de la siguiente manera: AMC, CRO, LNZ, OT, L2. Los colocamos alrededor del disco blanco a una distancia razonable, y se deja a incubar la placa por un día a 37°C posterior para su lectura.

2.8.4 Fase 2 Extracción del ADN de la cepa *L. garvieae*

2.8.4.1 Protocolo de extracción de ADN

Posterior a la siembra del cultivo para localizar colonias aisladas, se extrajo el ADN por (**Aljanabi & Martinez, 1997**) el método de extracción ADN modificada de la cepa. Primero Centrifugamos el cultivo que se encuentra en los tubos de ensayo a 3000 rpm por 15 minutos, posteriormente desechamos lo sobrenadante y dejamos el sedimento, lo re suspendemos en 500µl de la infusión cerebro corazón y pasamos a un tubo eppendorf, agregamos 40µl de SDS al 20%, añadimos 8µl de la Proteinasa K al 20mg/ml y realizamos un vórtex. Ponemos a incubar a 65°C durante dos horas, después de la hora añadiremos 300µl de solución de NaCl 6M, centrifugaremos por 30 segundos a la velocidad máxima que tenga la centrifugadora, posteriormente centrifugamos de nuevo, pero por 30 minutos a 10000rpm, al acabar la centrifugadora trasferimos el sobrenadante a nuevos eppendorf y el restante lo desechamos. En los nuevos tubos añadimos el volumen igual de isopropanol, realizamos un vórtex y mandamos a incubar a -20°C por una hora, después

de la hora centrifugamos a 10000 rpm por 20 minutos, desecharmos el sobrenadante y lavamos con etanol al 70% hasta que seque el eppendorf, al final re suspendemos en 300μ de agua libre de endonucleasas.

2.8.4.2 Evaluación de la calidad de las secuencias genómicas

Se evaluó con ayuda del Nanodrop 2000, aplicando una gota 1μl con una micro pipeta, en donde dio lectura de la concentración (ng/μl), la pureza que mide las proteínas en una proporción (260/280) y los contaminantes (260/230).

2.8.5 Protocolo de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en el termociclador y cada ciclo se lleva a cabo 3 etapas:

- **Desnaturalización:** El ADN es calentado y es separado de su doble hélice a una temperatura de 95°C durante 20 a 30 segundos con el motivo, o el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir si el ADN presenta alta cantidad de G-C se requerirá más tiempo para romper estas uniones, y al final tendremos cadenas separadas para sintetizar nuevas cadenas.
- **Hibridación:** En esta etapa los cebadores o Primers se unen al extremo 3' del ADN previamente separado y comienzan a hibridar con su secuencia complementaria, para que se una la hélice previamente separado del ADN con el primers se requiere una temperatura de hibridación optima que oscila entre 50 a 60 °C.
- **Extensión:** Aquí actúa la Taq polimerasa sobre la unión de la hélice con el primers y realiza su función catalítica, se agregan los dNTPs para crear cadenas complementarias, la extensión de las cadenas es de 5' a 3' a una temperatura de 72 °C para que se de la unión (Canene, 2013).

Se realizó dos programas de PCR en el termociclador de acuerdo al ADN y Primers.

Se amplificó fragmentos de 1 gen (tetD) mediante PCR. En primer lugar, se realizó un mix en tubos de PCR de 25µl, que contenía 12,5µl Dreamtaq, 1µl del Primers Forward, 1µl del Primers reverse, 1 µl del ADN y 9,5µ de agua libre de endonucleasas. Como control negativo no se utilizó ADN y posteriormente se introdujeron en el termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 10 Condiciones de PCR para el gen (tetD)

Etapas	Temperatura	Tiempo	Referencia
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	(Ture et al., 2018)
Desnaturalización	94°C	30sg	
Anillamiento	54°C	30seg	
Extensión	72°C	45sg	
Extensión final	72°C	10 min	

El segundo programa de PCR en el termociclador de igual manera se realizó un mix en tubos PCR de 25µl, que contenía 12,5µl Dreamtaq, 1µl del Primers Forward, 1µl del Primers reverse, 2 µl del ADN y 8,5µ de agua libre de endonucleasas. Como control negativo no se utilizó ADN y posteriormente se introdujeron en el termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 11 Condiciones de PCR para el gen (tetD)

Etapas	Temperatura	Tiempo	Referencia
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	30sg	
Anillamiento	63°C	30seg	40x ciclos (Mawardi et al., 2023)
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	5 min	

El tercer programa de PCR en el termociclador de igual manera se realizó un mix en tubos PCR de 25µl, que contenía 12,5µl Dreamtaq, 1µl del Primers Forward, 1µl del Primers reverse, 2 µl del ADN y 8,5µ de agua libre de endonucleasas. Como control negativo no se utilizó ADN y posteriormente se introdujeron en el termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 12 Condiciones de PCR para el gen (tetA)

Etapas	Temperatura	Tiempo	Referencia
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	30sg	
Anillamiento	60°C	30seg	40x ciclos (Mawardi et al., 2023)
Extensión	72°C	2 min	

Extensión final	72°C	5 min
------------------------	------	-------

2.8.6 Protocolo de Electroforesis

Se realizó mediante el preparado de gel de agarosa al 1,5 gr por 100 ml de TAE al 100x, pero nuestras máquinas son de 30 y 60ml, donde realizamos una relación en donde la cámara de 30ml se administró 0.45g de gel de agarosa, lo calentamos en el microondas hasta que desaparezca la turbidez y quede transparente, posterior agregamos el Sybr Safe Green unos 3µl dependiendo la cantidad de TAE puesto, distribuimos la muestra en la cámara con los peines, dejamos unos 10 minutos hasta que solidifique, la cámara colocamos en la electroforesis, retiramos los peines y comenzamos a aplicar los 5µl de la muestra de ADN que recolectamos del PCR y en el último pocillo colocamos el Marcador de Peso Molecular, tapados y dejamos correr la electroforesis a 80V por unos 30 minutos. Al acabar visualizamos las muestras en cámara UV.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo detallaremos los resultados que se obtuvieron en las diferentes etapas del estudio realizado. En la primera etapa detallaremos sobre los halos de inhibición de los diferentes antibióticos, categorizando la cepa como Sensible, Intermedio y Resistente por el método de Kirby Bauer, detallando la media de 3 réplicas de la cepa. En la segunda etapa detallaremos si presenta genes de resistencia, basándonos por el método de electroforesis en donde con la cámara UV medimos el tamaño de banda de acuerdo al gen seleccionado.

3.1 Prueba de sensibilidad a los antibióticos

Figura 2 Placas de sensibilidad *invitro* en *L. garvieae*



AMC: amoxicilina+ácido clavulánico; CRO: ceftriaxona; LNZ linezolid; OT: oxitetracilina; L2: lincomicina

En la **figura 2**, observamos la sensibilidad del *L. garvieae* con el método Kirby Bauer difusión en agar. Obtuvimos halos de inhibición en los discos de amoxicilina más ácido clavulánico y en el linezolid, sin embargo, el linezolid presentó el halo de inhibición de 19 mm significando la resistencia del fármaco a *L. garvieae* según los parámetros del

CLSI, en cambio la amoxicilina más ácido clavulánico presentó un halo de inhibición de 25mm demostrando que es sensible a la bacteria. Se organizó una tabla, tomando en cuenta el antibiótico más resistente hasta el sensible, la cepa *L. garvieae*, donde se realizó una escala donde el antibiótico con mayor resistencia tiene una escala de 1 y las más sensibles muestran un valor al 3.

Tabla 13 Sensibilidad in vitro de la cepa *L. garvieae* aislada en carne de pollo frente a cinco antibióticos (amoxicilina+ ácido clavulánico, ceftriaxona, linezolid, oxitetraciclina y lincomicina).

<i>Antibiótico</i>	<i>Repetición</i>	<i>Sensibilidad escala (1-3)</i>
<i>AMC30</i>	1	3
<i>AMC30</i>	2	3
<i>AMC30</i>	3	3
<i>CRO30</i>	1	1
<i>CRO30</i>	2	1
<i>CRO30</i>	3	1
<i>LNZ30</i>	1	1
<i>LNZ30</i>	2	1
<i>LNZ30</i>	3	1
<i>OT30</i>	1	1
<i>OT30</i>	2	1
<i>OT30</i>	3	1
<i>L2</i>	1	1
<i>L2</i>	2	1
<i>L2</i>	3	1

En la **Tabla 13**, nos presenta que la cepa *L. garvieae* tiene una alta multiresistencia a los cuatro antibióticos aplicados (CRO, LNZ, OT y L2), mientras la amoxicilina más ácido clavulánico fue la de mayor sensibilidad tenía la cepa *L. garvieae*. Esto nos indica que la

cepa se encuentra en la categoría (2) donde este presenta una alta resistencia a nivel de macrólidos, lincomicinas y tetraciclinas, y que la resistencia a estos antibióticos se encuentra localizados en plásmidos de resistencia (R) o en transposones, por ende, esta caracterización de plásmidos (R) revela la presencia de genes de resistencia *ermB* y *tet(S)*. El gen *ermB* contribuye a la resistencia a la eritromicina mediante la modificación de la diana mediada por la producción de una 23S rRNA metilasa, mientras que el gen *tet(S)* es una proteína de protección ribosomal que confiere resistencia a la tetraciclina (Meyburgh, 2017).

Según (Y. Lin et al., 2023), los resultados que obtuvimos en este trabajo investigativo son sustentados, debido a que en su estudio identificó cepas de *L. garvieae* aisladas en leche con mastitis clínica, los aislados presentaban una multiresistencia a diferentes antimicrobianos en donde la lincomicina y rifaximina estaban presente en todas las cepas, la oxitetraciclina con un 73,47%, y la cefalexina un 12,24%, debido a que la rifaximina ha sido utilizada con bastante frecuencia como antibióticos intramamarios, estos resultados coinciden con otros estudios en que el *L. garvieae* de fuentes derivadas de pescado y de leche de vaca son resistentes a tetraciclinas y a su vez detectaron genes *tet(S)* en todos los aislados.

La investigación de (Shahin et al., 2022) identificó cepas de *L. garvieae* y *Escherichia coli* en tres diferentes instalaciones de acuiculturas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en California. Donde 44 cepas aisladas de *L. garvieae* fueron identificadas donde midieron la susceptibilidad y verificaron que la cepa presenta una resistencia a las tetraciclinas, intermedia en resistencia norfloxacin, amoxicilina y trimetoprima/sulfametoxazol. Este desarrollo de resistencia se puede atribuirse a que en California realizan el uso excesivo o indebido a los agentes antimicrobianos en especial las tetraciclinas para el tratamiento de peces con patologías.

De todos los antibióticos resistentes el linezolid es el que mayor preocupa debido a que según **(Jiachang et al., 2021)**, el linezolid es un agente antimicrobiano para el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos Gram positivos multirresistentes. La aparición de resistencia al linezolid supone una grave amenaza para la sanidad pública, aparte de las modificaciones en el sitio diana del linezolid, se han identificado genes transferibles de resistencia al linezolid, cfr, optrA y poxtA, en varias especies de todo el mundo.

(Roberts & Schwarz, 2016) comenta que las tetraciclinas en los últimos 70 años se ha generalizado el uso de las tetraciclinas tanto en animales como en humanos, esto ha provocado un aumento en la resistencia, se unen al ribosoma de elongación e inhiben la entrega del complejo ternario factor de elongación termoestable (EF-Tu), el guanósín trifosfato (GTP) y Aminoacil ARNt al sitio A. el sitio de unión primario se encuentra en la hélice 34 del ARNr 16S en la subunidad 30S, que se solapa con el bucle del tallo anticodón del ARNt del sitio A.

La resistencia a las tetraciclinas se debe a la generación de nuevos genes de resistencia que codifican el sistema efflux dependientes de energía en las que hay 30 genes diferentes: tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y), tet(Z), tet(30), tet(31), tet(33), tet(47), etc. También proteínas que protegen los ribosomas bacterianos de la acción de las tetraciclinas que encontramos 12 genes diferentes: tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(32), tet(Q), tet(T), tet(36), otr(A), tetB(P), tet, tet(44). Las que inactivan enzimáticamente que son 3 genes: tet(X), tet(34), tet(37), y un gen que aún se desconoce su mecanismo de acción: tet(U) **(Roberts & Schwarz, 2016)**.

Del mismo modo **(Hameed & Salman, 2023)** realizó una prueba de susceptibilidad en 11 bacterias probióticas (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus garvieae*), donde la mayoría de estas

bacterias presentaban resistencia a cefotaxima, gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol. Esta resistencia se debe a una falta de permeabilidad o en una alteración de la pared celular, según estos hallazgos las dos cepas de *L. garvieae* solo fueron resistentes a la cefotaxima que es una cefalosporina de tercera generación, esto concuerda con nuestros resultados solo en la resistencia a la cefalosporina.

Figura 3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos para bacterias probióticas. R: Resistente. S: Sensible. I: intermedio

Antibiotic Bacterialisolates	Meropenem	Vancomycin	Imipenem	Cefoxitin	Gentamicin	Cefotaxime	Ciprofloxacin	Tetracycline	Ampicillin	Trimethoprim /Sulfamethoxazole
<i>L.gasseri</i> (Lb1)	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
<i>L. acidophilus</i> (Lb2)	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R
<i>L. acidophilus</i> (Lb3)	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R
<i>L. acidophilus</i> (Lb4)	I	S	I	I	R	R	I	S	I	R
<i>L. plantarum</i> (Lb5)	S	S	S	S	R	R	I	S	S	R
<i>L. plantarum</i> (Lb6)	I	S	S	I	R	S	I	S	I	R
<i>L. plantarum</i> (Lb7)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
<i>L. fermentum</i> (Lb8)	S	I	S	R	R	I	I	I	R	R
<i>L. fermentum</i> (Lb9)	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R
<i>L. garvieae</i> (Lc1)	I	S	S	I	I	R	I	S	S	R
<i>L. garvieae</i> (Lc2)	I	S	I	R	S	S	I	S	S	S

Nota. Ilustración tomada de *Hameed & Salman,2023*

(Rahmeh et al., 2019) recolectó leche cruda de camello donde encontró bacterias de ácido láctico (LAB) donde desempeñan un papel fundamental en la fermentación y conservación, se identificaron 58 colonias bacterianas que fueron identificadas molecularmente y realizaron una prueba de susceptibilidad y encontraron resistencia a penicilina G (10µg), ampicilina (10µg), eritromicina (15µg), clindamicina (10µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg).

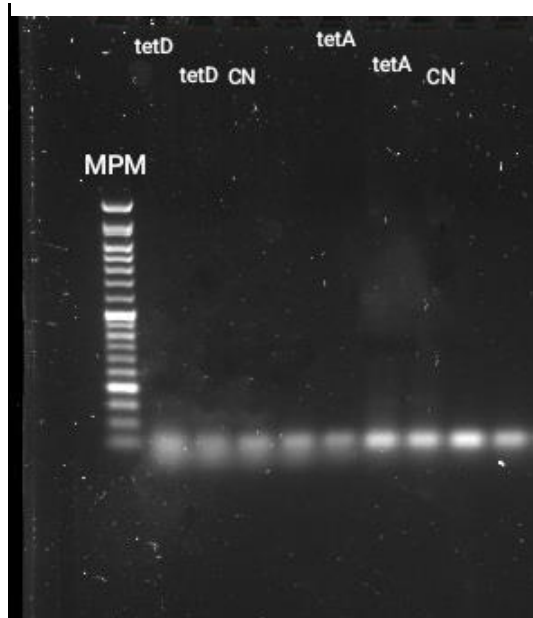
3.2 Identificación de genes de resistencia por PCR

Tabla 14 Calidad del ADN, medido en concentración (ng/μl), la pureza (260/280) contaminantes (260/230).

Concentración	1404,8 ng/μl
A260(10 mm path)	28,096
A280(10 mm path)	13,588
260/280	2,07
260/230	1,84

En la tabla 14 se observa la concentración del ADN con 1404,8 ng/μl, lo cual significa que es una calidad excelente con una pureza y contaminantes adecuados para continuar con el trabajo investigativo. La cepa de *L. garvieae* que fue aislada en carne de pollo en Ambato, en donde no se demostró la presencia del gen de resistencia a tetraciclinas. En la Figura 4. Se detallan los resultados obtenidos donde no se amplificó los genes *tetD* con 786 bp, *tetA* con 210bp.

Figura 4 Técnica de PCR con primers



MPR: marcador de peso molecular; tetD: gen de resistencia; CN: control negativo; tetA: gen de resistencia; CN: control negativo.

Tabla 15 Patrón genotípico de genes de resistencia

<i>Muestra</i>	Genes de resistencia	
	<i>tetD</i>	<i>tetA</i>
<i>L. garvieae</i>	-	-

L.garvieae fue negativo a presencia de genes de resistencia al antibiótico, los genes de resistencia *tetD* y *tetA*, son genes que reducen la concentración intracelular del fármaco debido a la exportación por genes, los relacionamos por que comparten el 80% de la secuencia de aminoácidos y se encuentran en el plásmido de la bacteria. Estos resultados que obtuvimos son sustentados con (Mawardi et al., 2023) donde realizó un estudio administrando probióticos libre de genes de resistencia a antibióticos para el crecimiento y la resistencia a *Streptococcus agalactiae*, los genes utilizados fueron: *tetA*, *tetB*, *tetD*, *tetE*, *tetQ*, *tetO*, *ermB* y *qnrS*,

Figura 5 Aislados bacterianos que muestran patrones anti-*Streptococcus agalactiae*, y detección de genes de resistencia a los antibióticos.

Isolate/ parameter	<i>L. garvieae</i>	<i>P. megaterium</i>	<i>Bacterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
Zone diameter of (mm) anti- <i>Streptococcus</i>	*	6.00 ± 0.00	22.50 ± 4.17	6.00 ± 0.00	18.50 ± 0.02	19.34 ± 0.36
Hemolytic pattern	γ	γ	γ	γ	β	γ
Antibiotic gene targets:						
<i>tetA</i>	-	-	-	-	+	+
<i>tetB</i>	-	-	-	+	-	-
<i>tetE</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetD</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetO</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetQ</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-
<i>qnrS</i>	-	-	-	-	-	-

Nota Ilustración tomada de *Mawardi et al., 2023*

Identificaron que la bacteria *L. garvieae*, *Priestia megaterium* y *Bacterium* spp, cumplieron los requisitos, no tenían potencial de transformarse en patógeno y no contienen genes de resistencia.

Otro estudio (**Yano et al., 2021**) identificó 180 aislados que fueron obtenidos en las muestras de camarón donde identificaron a 30 cepas de *L. garvieae*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas veronii* y *Shewanella* spp. Midieron el perfil de resistencia y determinaron los genes de resistencia. Como resultado la oxitetraciclina dio como resistentes y en cuanto los genes de resistencia utilizaron: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetM* y *tetS*. Esto confirma que la bacteria *L. garvieae* resistente a la oxitetraciclina en diferentes regiones, esto puede incluir posibles patógenos que se transmitirán por el alimento y puede estar en altas densidades.

Figura 6 Aislados bacterianos que muestran patrones anti-*Streptococcus agalactiae*, y detección de genes de resistencia a los antibióticos.

Bacterial group	No. of strains	Tet genes						
		Sole gene						
		A	B	C	D	E	M	S
<i>Aeromonas-p</i>	15	3	–	–	1	–	–	–
<i>Aeromonas-v</i>	27	6	–	–	–	5	–	–
<i>Aeromonas-s</i>	6	6	–	–	–	–	–	–
<i>Shewanella spp.</i>	2	–	–	1	–	–	–	–
<i>Lactococcus-g</i>	25	–	–	–	–	–	–	3

Nota Ilustración tomada de Yano *et al.*, 2021

Pero (Ture *et al.*, 2018) identificó la resistencia a los antimicrobianos y a los metales pesados en *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus garvieae*, donde se tomaron muestras en peces y en sedimentos de fondo de jaulas marinas, hallaron 183 cepas realizaron pruebas de susceptibilidad con los antibióticos: tetraciclina, amoxicilina/ácido clavulánico, enrofloxacin, eritromicina, penicilina y trimetoprima/sulfametoxazol, identificaron de genes como: *tetA*, *tetB*, *tetD*, *ereA*, *ereB*, *sulI*, *sulII*, *dhfrA1*, *blaTEM*, *blaCTX*, *ampC* y *floR*. Los resultados obtenidos el *L. garvieae* presentaba los genes *tetA* tuvo una prevalencia del (16,9%) seguido del *tetB* (10,7%) y al último el gen *tetD* (4.4%). De manera que los resultados que obtuvieron no coinciden los resultados de esta investigación por el motivo de que los genes de resistencia a la oxitetraciclina se dan debido a que es el antibiótico más utilizado en piscifactorías de tal modo estos genes son identificados en muchas bacterias grampositivos y gramnegativos se encuentran principalmente en bacterias multirresistentes, estos genes se pueden dar por la ubicación de nuevos elementos genéticos móviles.

De igual forma (**Lazăr et al., 2021**) realizó un estudio donde recolectó 44 cepas de *Enterococcus* aisladas de cuatro lagos pesqueros, donde se analizó la sensibilidad a los antibióticos de todas las cepas por el método de difusión en disco y son: penicilina (P 10), ampicilina (AMP 10), vancomicina (VA 30), tetraciclina (TE 30), eritromicina (E 15), doxiciclina (DXT 30), levofloxacin (LEV 15) y linezolid (LZD 30), realizaron pruebas para la identificación de genes de resistencia: *QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *Aac3Ia*, *Sul1*, *Sul2*, *TetA*, *TetB*, *TetC*, *TetD*, *TetM*, *ermA*, *ermB*, *ermC*). En los resultados obtenidos presenciaron resistencia a macrólidos (75%), vancomicina (35%), tetracilinas (15), doxiciclina y linezolid (5%), el gen de resistencia *tetA* tuvo una prevalencia del 25% y el gen *tetD* no se amplificó, se sugiere que estos medios presentan una alta resistencia a antibióticos con presencia de genes y tienen una gran probabilidad de ser transmitidos horizontalmente a otras especies asociadas desde la microbiota de sedimentos acuáticos, elevando el riesgo zoonótico.

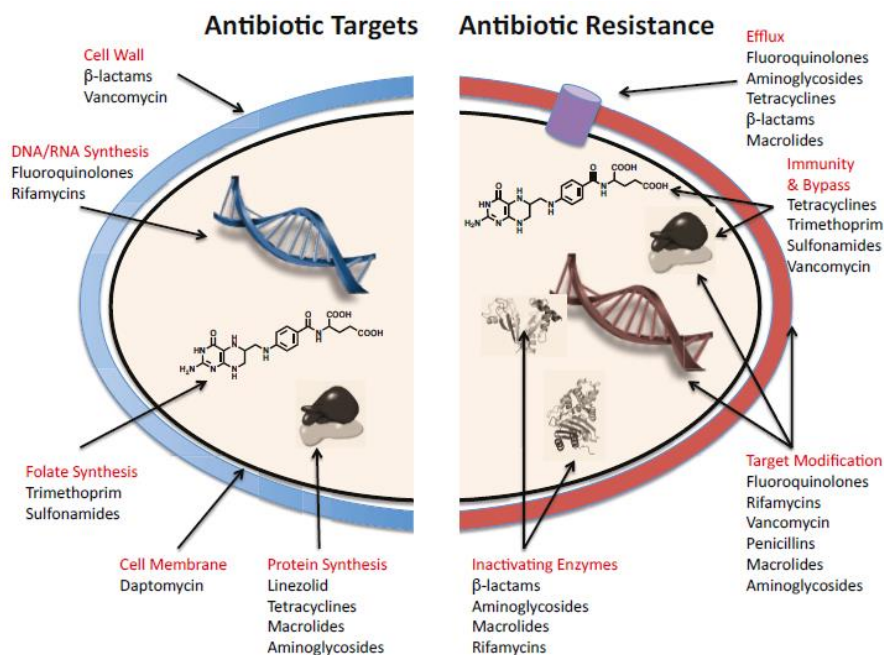
(**Márquez et al., 2017**) recolecto 120 cepas de diferentes granjas de producción de leche y elaboración queso de cabra e identifico 19 aislados por secuenciación del ADNr 16S como *Lactococcus* sp. (6) *Enterococcus* sp. (1), *Lactobacillus* sp. (4), *Bacillus* sp. (1) *Escherichia* sp. (5), *Enterobacter* sp. (1) y *Helicobacter* sp. (1), donde realizo pruebas de sensibilidad con los discos: ampicilina (AMP 30), ceftazidima (CFZ, 30), cefotaxima (CTX 30), imipenem (IPM 10), estreptomicina (SM 10), netilmicina (NET 30), tetraciclina (TET 30), ciprofloxacino (CIP 5), ácido nalidíxico (NA 30), sulfametoxazol/trimetoprima (TMP/STX 25/75), también realizaron identificación de genes de resistencia. Los resultados encontraron que la mayoría de las cepas eran resistentes a ampicilina, seis cepas eran resistente a cefotaxima, ceftazidima, tetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprima, el *Lactococcus* fue resistente a oxitetraciclina, ácido nalidíxico y sulfametoxazol/trimetoprima, los genes de resistencia encontrados fueron: *qacA/B*, *tet(D)*.

En comparación con otros autores, la cepa *L. garvieae* no se demostró la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas específicamente con los genes tetD y tetA, pero no se puede afirmar que no presente genes de resistencia a tetraciclinas debido a la investigación bibliográfica hay otros genes de resistencia a tetraciclinas que afectan proteínas que protegen los ribosomas bacterianos.

3.3 Mecanismos moleculares de resistencia de *L. garvieae* a OT, CRO, LNZ, L2

La tasa de resistencia de *L. garvieae* a infecciones y las cepas resistentes a múltiples fármacos han aumentado, provocando que los casos clínicos tengan un tratamiento más difícil, existen diferentes mecanismos de resistencia endógena que incluye tres aspectos diferentes.

Figura 7 Objetivos de los antibióticos y mecanismos de resistencia



Nota. Ilustración tomada de Wright, 2010

3.3.1 Mecanismos moleculares de resistencia de *L. garvieae* a tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo al que pertenecen tanto los antibióticos naturales como: tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina. y los semisintéticos como: doxiciclina, demeclociclina. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la biosíntesis de proteínas bacterianas uniéndose a la subunidad ribosómica 30S e impidiendo la asociación de Aminoacil ARNt Actualmente, sólo se utilizan ocasionalmente en medicina humana, pero han encontrado una aplicación generalizada en el tratamiento de la ganadería y la acuicultura **(Butaye et al., 2013)**.

La eliminación de las tetraciclinas de la célula bacteriana suele estar mediada por proteínas asociadas a la membrana (Tet) que intercambian un protón por un complejo tetraciclina-catión. Todas las proteínas de eflujo Tet pertenecen a la familia de los "facilitadores principales". Actualmente se conocen al menos 18 tipos diferentes de proteínas eflujo de tetraciclina, que se han subdividido en seis grupos en función de sus identidades de aminoácidos **(Butaye et al., 2013)**.

El primer grupo incluye las proteínas Tet de las clases A, E, G, H, I, J y Z, así como Tet (30). Estas proteínas de eflujo de aproximadamente 46 kDa constan de 12 dominios transmembrana, los genes estructurales tet respectivos van acompañados de un gen represor tet específico. La expresión de estos genes tet es inducible por cantidades nanomolares de tetraciclina y se basa en la unión de un complejo Mg²⁺ de tetraciclina a la proteína represora tet que, en ausencia de la tetraciclina, bloquea la transcripción del gen estructural tet. Los genes tet de las clases A, B, D y H, están asociados a transposones no conjugativos o a elementos similares a transposones y están ampliamente distribuidos entre diferentes bacterias, los de las clases C, E y G se encuentran a menudo en plásmidos **(Hraoui et al., 2011)**.

En el segundo grupo de proteínas Tet(K) y Tet(L) que se encuentran principalmente en *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y otras bacterias Gram-positivas y constan de 14 regiones transmembrana, suelen ser portadores de plásmidos, estos pequeños plásmidos portadores de tet(K) de B/5 kb están estructuralmente muy relacionados y no albergan genes de resistencia adicionales y en raras ocasiones han detectado pequeños plásmidos portadores de tet(K) como integrados mediados por IS257 no sólo en el cromosoma de *Staphylococcus*, sino también en grandes plásmidos de resistencia a la mupirocina o la gentamicina presentes en los estafilococos. A diferencia de los genes tet del grupo 1, en la inducción no interviene una proteína represora, sino que se produce a través de un mecanismo conocido como "atenuación traslacional" (Hraoui et al., 2011).

3.3.2 Mecanismos moleculares de resistencia de *L. garvieae* al Linezolid

El linezolid pertenece a la familia de las oxazolidonas, son moléculas heterocíclicas con oxígeno y nitrógeno en un anillo de cinco miembros unido por un grupo carbonilo, son agentes antimicrobianos sintéticos. las oxazolidonas inhiben la biosíntesis de proteínas bacterianas. Sin embargo, no inhiben la reacción de elongación ni la unión de ninguno de los dos N-formil metionil-ARNt o ARNm a la subunidad ribosómica 30S, se unen a la porción 23S de la subunidad 50S y evitan que forme un complejo con la subunidad ribosomal 30S (Pang et al., 2020).

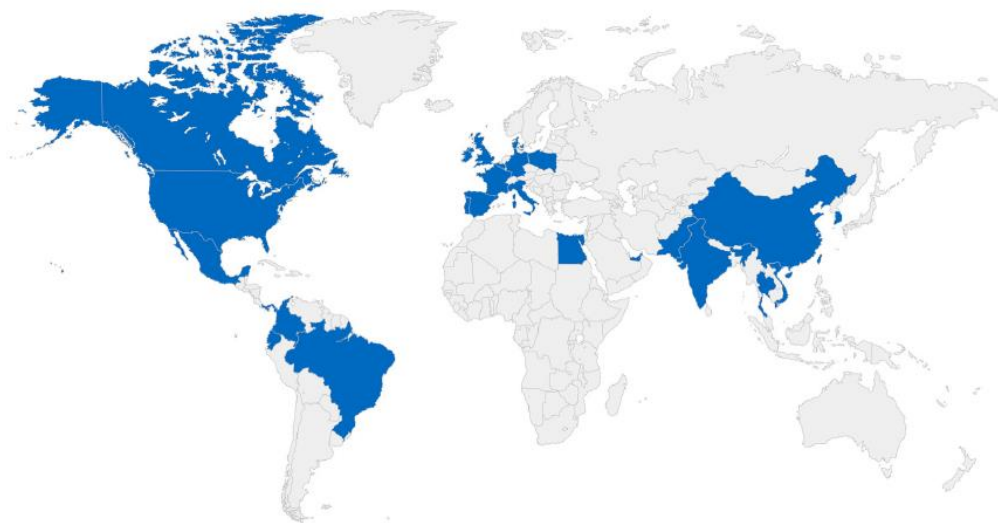
En un estudio seleccionaron 10 *Enterococcus* y produjeron mutantes resistentes del linezolid que presentaban mutaciones puntuales en varias posiciones del bucle central del dominio V del ARNr 23S, como C2610G, G2576U, G2513U, G2512U y G2505A, demostrando que el locus es la zona preferente para las mutaciones mediadoras de resistencia a la oxazolidinona, se encontró resistencia al linezolid en *Staphylococcus aureus*, presentando una mutación G2576U en el ARNr 23S. Las mutaciones en el ARNr 23S y la resistencia al linezolid puede deberse a modificaciones en los genes que codifican las proteínas del ribosoma L3 (*rplC*) y L4 (*rplD*), estas modificaciones incluyen

mutaciones puntuales que dan lugar a intercambios de uno o varios aminoácidos **(Pang et al., 2020)**.

El gen *cfr* es el primer gen transferible de resistencia a las oxazolidinonas, este gen es transportado por plásmidos y fue descrito como un nuevo gen de resistencia al cloranfenicol y florfenicol, la proteína *cfr* representa un ARN metiltransferasa de la superfamilia radical s adenosilmetionina (SAM). En el 2005 se identificó un gen de resistencia a oxazolidinona, *optrA* en un plásmido de un aislado de *E. faecalis* y el gen codifica una proteína ABC-F que confiere resistencia mediante protección ribosómica **(Schwarz et al., 2021)**.

Se identificó que el gen *cfr* estaba presente en 25 países de los cinco continentes mostrando la presencia de genes de resistencia a las oxazolidinonas y las bacterias hospedadoras en las que se ha identificado el gen *cfr* incluyen los géneros grampositivos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Jeotgalicoccus*, *Macrooccus* y *Mammaliicoccus*, así como los géneros gramnegativos **(Schwarz et al., 2021)**.

Figura 8 Distribución geográfica de bacterias portadoras de *cfr*, los países en azul son aquellos en los que la ocurrencia de Se han informado bacterias portadoras de *cfr*



Nota. ilustración tomada de Schwarz et al., 2021

En el estudio de (Schwarz et al., 2021) identificó el gen *optrA* en *L. garvieae* donde se encontraban ubicado en plásmidos de diferentes tamaños (41979 pb a 85819 pb), el gen era diferentes de los de los *Enterococcus*, excepto por la región similar que codifica una topoisomerasa, una helicasa, una proteína de unión al ADN SpoVG, una oxidoreductasa dependiente de FAD, un regulador transcripcional AraC y el *OptrA* compartido por el plásmido pLG728-*optrA* y un fragmento cromosómico de *E. aecalis*.

3.3.3 Mecanismos moleculares de resistencia de *L. garvieae* a β -lactámicos

La base estructural de los antibióticos betalactámicos consiste en un anillo betalactámico, es un anillo de cuatro miembros que contiene nitrógeno, la secuencia peptídica D-Ala-D-Ala, que sirve como sustrato para las transpeptidasas de la pared celular, tiene una

conformación estructural similar a la de un anillo y existen cuatro categorías principales de compuestos betalactámicos, **(Hakenbeck et al., 2012)**.

Los antibióticos betalactámicos interfieren con la biosíntesis de la pared celular bacteriana mediante la inactivación de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), el uso excesivo de los fármacos resulta en una alteración genética que modifica las secuencias de aminoácidos de las proteínas de unión a penicilina PBP2x, PBP2b y PBP1a, y la presencia de fragmentos incluso menores y diversos que surgen de mutaciones puede afectar a la modificación de los genes *pbp*, lo que lleva al desarrollo de resistencia a b-lactámicos en *Streptococcus* **(Zahari et al., 2023)**.

Los mecanismos bacterianos de resistencia a los betalactámicos incluyen la alteración de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana al fármaco mediante la disminución del número de canales de porinas y la modificación de la diana (PBP), el mecanismo de degradación de los antibióticos mediante la rotura del anillo betalactámico está representado por los genes: *amp*, *bla*, *oxa*, algunos genes de resistencia se encuentran en diferentes elementos genéticos, en el cromosoma *ampC* y en el plásmido *ampR*, *blaTEM*, *blaCIT*, *blaFOX*, *blaCTX-M*, *oxa-2* y *blaSHV* **(Zhu et al., 2022)**.

(Hayes et al., 2020) describe que existen tres mecanismos principales de resistencia a los antibióticos betalactámicos: la reducción del acceso a las PBP, la reducción de la afinidad de unión de las PBP o la destrucción del antibiótico mediante enzimas betalactamasas y la resistencia a los antibióticos betalactámicos en organismos Gram positivos se debe principalmente a la modificación de la diana, donde se producen cambios estructurales en las PBPs, existe informes de susceptibilidad reducida a las penicilinas en *Streptococcus* y se produce debido a las sustituciones de aminoácidos dentro de las proteínas fijadoras de penicilinas lo que afecta en la capacidad de unión de antibióticos de penicilina su aparición es significativa y preocupante, ya que las mutaciones de PBP se consideran el

primer paso en una eventual resistencia completa a la penicilina, como se observó anteriormente en otros *Streptococcus*.

- **Enzimas betalactamasas:** Es uno de los principales mecanismos de resistencia principalmente en bacterias Gram negativas, pero también pueden ser producidas por bacterias Gram positivas, estas betalactamasas hidrolizan en el anillo betalactámico, por ende, inactiva el antibiótico antes de su unión con las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), es mediada por plásmidos o estar cromosómicamente codificada o pueden ser transferibles y son inactivadas por los inhibidores de betalactamasa.
- **Reducción del acceso de PBP:** las proteínas fijadoras de penicilinas son numerosas seis son las más conocidas y cuatro de ellas: 1a, 1b, 2 y 3. Los PBP interviene en la síntesis y la estructuración de la pared celular, los cambios de la estructura de las estructuras de las proteínas fijadoras de penicilinas dan como efecto en una sensibilidad reducida a los antibióticos betalactámicos.
- **Alteración en la permeabilidad y bombas de expulsión:** frente a la barrera que constituye a una membrana celular como el caso de las bacterias Gram negativas, las sustancias con poca afinidad lipofílicas como betalactámicos requieren proteínas que les ayuden en la entrada del espacio periplásmico para poder unirse a las proteínas fijadoras de penicilinas y este es uno de los motivos por el cual las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas (**Suárez & Gudiol, 2009**).

3.3.4 Mecanismos moleculares de resistencia de *L. garvieae* a lincosamidas

Las lincosamidas presentan el mismo mecanismo de acción de las mayorías de macrólidos y estreptogramidas, el sitio diana para ellos es un fragmento de ARNr de cuatro nucleótidos (en la región de la peptidiltransferasa) dentro del dominio V del ARNr 23S, en la subunidad 50S del ribosoma. Existen varios mecanismos de resistencia de a los antibióticos lincosamidas, macrólidos y estreptogramidas. El más común implica en la modificación del sitio diana del antibiótico y se lleva a cabo en las enzimas adenil-N metiltransferasa *erm* (metilación del ribosoma de la eritromicina), dimetilando la adenina 2058, lo que conduce a la resistencia a las lincosamidas, macrólidos y estreptogramidas (Mlynarczyk-bonikowska et al., 2022).

En bacterias Gram positivas como *Streptococcus* y *Enterococcus*, la resistencia a lincosamidas y macrólidos suele tener su origen en la presencia de genes *erm*(B), el gen *ermB* se encuentra en Tn551 descrito a menudo en el cromosoma hMRSA y VRSA y en pI258, estos genes codifican para metilasas resistentes a la eritromicina (enzimas *Erm*), que alteran el sitio diana de los antibióticos macrólidos en la bacteria y por tanto transmiten resistencia cruzada a los compuestos macrólidos y lincosamidas (Kimpe et al., 2014).

Según (Yin-ze & Terutoyo, 2020) el mecanismo de resistencia a lincosamidas en *L. garvieae* suele deberse a la modificación de dianas ribosómicas mediada por *erm*(B) y reveló que un plásmido R transferible que contiene *erm*(B) en *L. garvieae* serotipo II estaba ampliamente distribuido, y reveló la presencia de un nuevo gen homólogo *Isa*(D) de ABC-F en cepas salvajes resistentes a lincomisinas y también realizó un análisis comparativo y reveló que el alelo de *Isa*(D) con mutación puntual única en la posición 233 aa (TGG/TAG; triptófano/codón de terminación prematura PTC) en cepas sensibles a lincomisinas, estreptomisinas.

Con la investigación realizada en literatura actualiza se ha podido comprobar que la resistencia a los antibióticos (CRO, LNZ, OT y L2) no se debe solo a un mecanismo, si no a varios mecanismos dependiendo del antibiótico, por lo que es importante continuar realizando investigaciones.

3.4 Comprobación de la hipótesis

A partir de los resultados obtenidos y analizados por medio del trabajo investigativo, no se encontró genes de resistencia a oxitetracilina, se acepta la hipótesis nula afirmando que no presenta genes de resistencia la cepa *L. garvieae* a oxitetracilina.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La cepa *Lactococcus garvieae* que fue aislada presentó una multiresistencia a los diferentes antibióticos aplicados (CRO, LNZ, OT y L2) generando así mayor preocupación en cuanto a que antibiótico podemos aplicar, afectando a la industria ganadera como a la acuicultura y considerando como agente zoonótico emergente, generando así la necesidad de investigar alternativas para la prevención y control.
- No se detectó mediante la técnica de PCR convencional la presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina *tetD* y *tetA* identificando que la resistencia no se da en la codificación del sistema efflux dependientes de energía, si no que tendríamos que buscar en proteínas que protegen el ribosoma bacteriano en acción de las tetracilinas.
- Se concuerda con los autores, en donde las bacterias desarrollan diferentes mecanismos moleculares de resistencia evitando así la destrucción de la mismas frente a diferentes antibióticos, ya sea modificando el sitio de objetivo, la permeabilidad de la membrana o por el sistema efflux que tiene la bacteria.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar antibióticos sensibles a *L. garvieae* cuando sea necesario evitando que la bacteria genere más resistencia frente a diferentes antibióticos evitando así más resistencia, igual forma concientizar a los productores del manejo excesivo de antibiótico frente a las patologías.
- Se recomienda ampliar las investigaciones de genes de resistencia presente a esta bacteria, no solo en los genes de oxitetraciclina, si no en los demás antibióticos que presenta resistencia.
- Realizar charlas o concientizar al uso prudentes de los antibióticos así evitando que genere multiresistencia a diferentes antibióticos, deteniendo el impacto negativo que genera esto en los últimos años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S., & Martinez, I. (1997). Study on DeNOx performance of Ce-Mg-Al mixed oxides. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 2.
- Butaye, P., Cloeckaert, A., & Schwarz, S. (2013). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3), 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00202-4)
- Canene, K. (2013). General PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 291–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>
- Espinosa, I., & Arias, M. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio Antimicrobial resistance in bacteria from animals, challenges for their contention from laboratory. *Revista de Salud Animal*, 41(3), 1–19. <http://opn.to/a/6fQBe>
- Gibello, A., & Sánchez, F. (2016). The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*, 109, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.010>
- Gurmessa, B., Pedretti, E. F., Cocco, S., Cardelli, V., & Corti, G. (2020). Manure anaerobic digestion effects and the role of pre- and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency. *Science of the Total Environment*, 721, 137532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137532>
- Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapate, D., & Maurer, P. (2012). Molecular mechanisms of β -lactam resistance in. *Future Microbiology*, 7(3), 395–410.
- Hameed, S., & Salman, J. (2023). Co-Aggregative Effect of Probiotics Bacteria against Diarrheal Causative Bacteria. *Archives of Razi Institute*, 78(3), 831–841.

<https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359870.2494>

- Handrova, L., & Kmet, V. (2019). Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* from eagles and goshawks. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(7), 605–614. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1608103>
- Hayes, K., O'Halloran, F., & Cotter, L. (2020). A review of antibiotic resistance in Group B *Streptococcus*: the story so far. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(3), 253–269. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1758626>
- Hraoui, M., Boubaker, I. B. Ben, Doloy, A., Redjeb, S. Ben, & Bouvet, A. (2011). Molecular mechanisms of tetracycline and macrolide resistance and emm characterization of *streptococcus pyogenes* isolates in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 17(3), 377–382. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0160>
- Jiachang, C., Chen, J., Schwarz, S., Wang, Y., & Zhang, R. (2021). Detection of the plasmid-borne oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Lactococcus garvieae* isolated from faecal samples. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(9), 1358–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.04.027>
- Kimpe, A., Decostere, A., Baele, M., & Devriese, L. A. (2014). Presence and mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Enterococcus columbae* strains belonging to the intestinal flora of pigeons. *Avian Pathology*, 33. <https://doi.org/10.1080/0307945042000220705>
- Lazăr, V., Gheorghe, I., Curutiu, C., Savin, I., Marinescu, F., Cristea, V. C., Dobre, D., Popa, G. L., Chifiriuc, M. C., & Popa, M. I. (2021). Antibiotic resistance profiles in cultivable microbiota isolated from some romanian natural fishery lakes included in Natura 2000 network. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02770-8>
- Lees, P., Pelligand, L., Giraud, E., & Toutain, P. L. (2021). A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(2), 137–171. <https://doi.org/10.1111/jvp.12895>

- Lin, Y., Han, J., Barkema, H. W., Wang, Y., Gao, J., Kastelic, J. P., Han, B., Qin, S., & Deng, Z. (2023). Comparative Genomic Analyses of *Lactococcus garvieae* Isolated from Bovine Mastitis in China. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02995-22>
- Lin, Y. S. (2020). Genomic analysis of *Lactococcus garvieae* isolates. *Pathology*, 52(6), 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.06.009>
- Márquez, M. L., Burgos, M. J., Aguayo, M. C., Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology*, 62, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.008>
- Mawardi, M., Indrawati, A., Lusiastuti, A. M., & Wibawan, I. W. T. (2023). Antibiotic resistance gene-free probiont administration to tilapia for growth performance and *Streptococcus agalactiae* resistance. *Veterinary World*, 16(12), 2504–2514. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.2504-2514>
- Media, T. (2019). *Tm 2381 – tryptic soya agar*.
- Media, T. (2022). *TM 361 – BRAIN HEART INFUSION AGAR*.
- Media, T. (2023). *Tm 339 -Mueller Hinton Agar*.
- Meyburgh, C. M. (2017). *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 123(1), 67–79. <https://doi.org/10.3354/dao03083>
- Mlynarczyk-bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1).
- Odonkor, S. T., Simpson, S. V., Morales Medina, W. R., & Fahrenfeld, N. L. (2022). Antibiotic-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Isolates from Ghanaian Drinking Water Sources. *Journal of Environmental and Public Health*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2850165>
- Osman, K. M., Pires, Á. D. S., Franco, O. L., Orabi, A., Hanafy, M. H., Marzouk, E.,

- Hussien, H., Alzaben, F. A., Almuzaini, A. M., & Elbehiry, A. (2020). Enterotoxigenicity and Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Raw Buffalo and Cow Milk. *Microbial Drug Resistance*, 26(5), 520–530. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0114>
- Osorio, L. (2023). Determinación de *Campylobacter spp.* en muestras de carne de pollo que se expenden en el cantón Ambato.
- Pang, S., Boan, P., Lee, T., Gangatharan, S., Tan, S. J., Daley, D., Lee, Y. T., & Coombs, G. W. (2020). Linezolid-resistant ST872 Enterococcus faecium harbouring optrA and cfr (D) oxazolidinone resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.012>
- Pilar, D. (2018). Variabilidad intraespecífica y características del genoma del patógeno *Lactococcus garvieae*.
- Rahmeh, R., Akbar, A., Kishk, M., Al-Onaizi, T., Al-Azmi, A., Al-Shatti, A., Shajan, A., Al-Mutairi, S., & Akbar, B. (2019). Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes and New Infections*, 30, 100560. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100560>
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2016). Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 576–592. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.04.0207>
- Rösch, R. M., Buschmann, K., Brendel, L., Schwanz, T., & Vahl, C. F. (2019). Lactococcus garvieae Endocarditis in a Prosthetic Aortic Valve: A Case Report and Literature Review. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 7. <https://doi.org/10.1177/2324709619832052>
- Sánchez, P., Muñoz, R., & Gutiérrez, N. (2016). Bacterial Resistance to Antibiotics: Mechanisms of Transfer. *Revista Spei Domus*, 8(17), 31–37.
- Schwarz, S., Zhang, W., Du, X. D., Krüger, H., Feßler, A. T., Ma, S., Zhu, Y., Wu, C., Shen, J., & Wang, Y. (2021). Mobile oxazolidinone resistance genes in gram-positive

- and gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), 1–63. <https://doi.org/10.1128/CMR.00188-20>
- Shahin, K., Veek, T., Heckman, T. I., Littman, E., Mukkatira, K., Adkison, M., Welch, T. J., Imai, D. M., Pastenkos, G., Camus, A., & Soto, E. (2022). Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, from California, USA. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4), 2326–2343. <https://doi.org/10.1111/tbed.14250>
- Siriken, B., Al, G., & Erol, I. (2020). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in Ground Beef and Meatball Samples in Samsun, Turkey. *Microbial Drug Resistance*, 26(2), 136–144. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0481>
- Srednik, E. M., & Yannick, D. N. (2018). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *Microbiology, Fems*, 1–20.
- Stępień-Pyśniak, D., Hauschild, T., Dec, M., Marek, A., & Urban-Chmiel, R. (2019). Clonal structure and antibiotic resistance of enterococcus spp. from wild birds in Poland. *Microbial Drug Resistance*, 25(8), 1227–1237. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0461>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Toomey, N., Bolton, D., & Fanning, S. (2014). Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*, 161(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.010>
- Ture, M., Altinok, I., & Alp, H. (2018). Effects of cage farming on antimicrobial and heavy metal resistance of *Escherichia coli*, *enterococcus faecium*, and *lactococcus garvieae*. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1422–1430. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0040>

- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., & Aue-Umneoy, D. (2021). Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04926.x>
- Yin-ze, S., & Terutoyo, Y. (2020). Characterization of lsa (D), a Novel Gene Responsible for Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins in Fish Pathogenic *Lactococcus garvieae* Serotype II. *Microbial Drug Resistance*, 00(00), 1–10. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0218>
- Zahari, N. I. N., Engku Abd Rahman, E. N. S., Irekeola, A. A., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Alotaibi, J., Alqahtani, S. A., Halawi, M. Y., Alamri, I. A., Almogbel, M. S., Alfaraj, A. H., Ibrahim, F. Al, Almaghaslah, M., Alissa, M., & Yean, C. Y. (2023). A Review of the Resistance Mechanisms for β -Lactams, Macrolides and Fluoroquinolones among *Streptococcus pneumoniae*. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 59, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/medicina59111927>
- Zhang, X., Wang, G., & Yin, C. (2020). Antibiotic resistance and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Hunan, China. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(4), 563–570. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.135802>
- Zhu, L., Eraso, J. M., Mangham, R. E., Saavedra, M. O., Olsen, R. J., Beres, S. B., & Musser, J. M. (2022). Genome-Wide Transposon Mutagenesis Screens Identify Group A *Streptococcus* Genes Affecting Susceptibility to β -Lactam Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 204(12), 1–11. <https://doi.org/10.1128/jb.00287-22>

ANEXOS

Anexo 1. Medición del agar



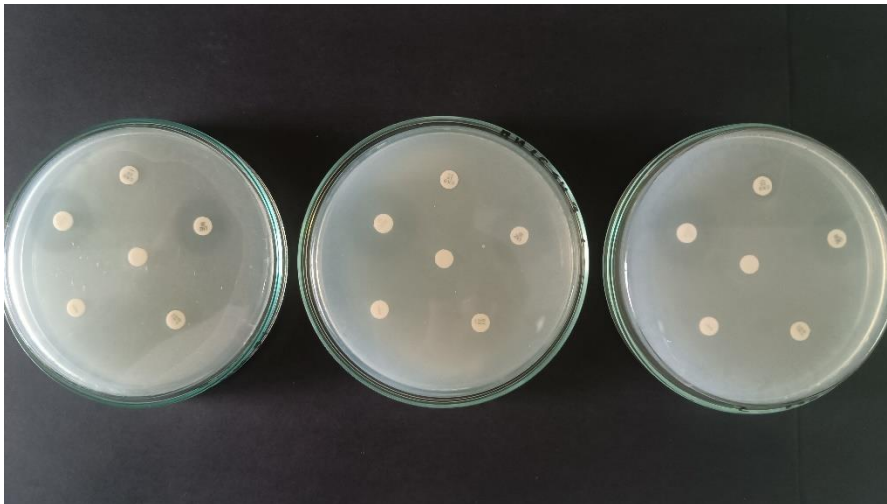
Anexo 2. Extracción de la cepa *Lactococcus garvieae*



Anexo 3. Aislamiento y cultivo de la bacteria



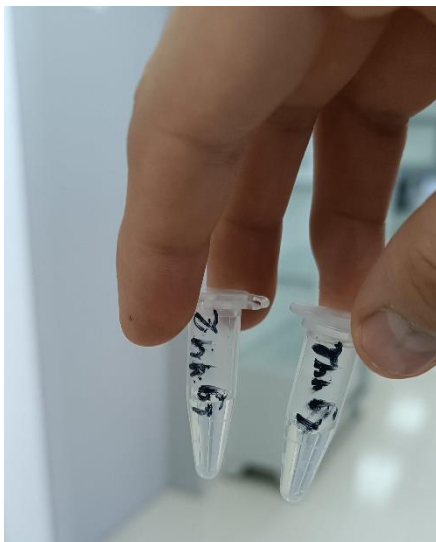
Anexo 4. Placas de antibiograma



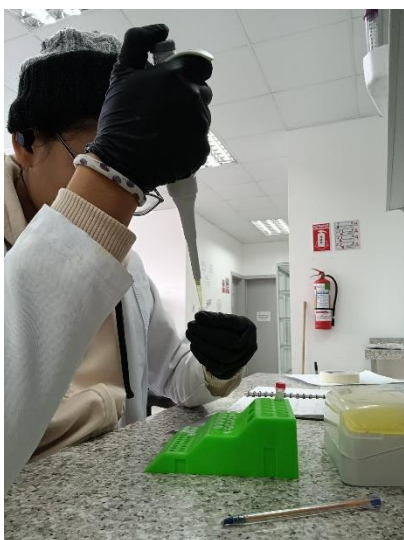
Anexo 5. Protocolo de extracción de ADN



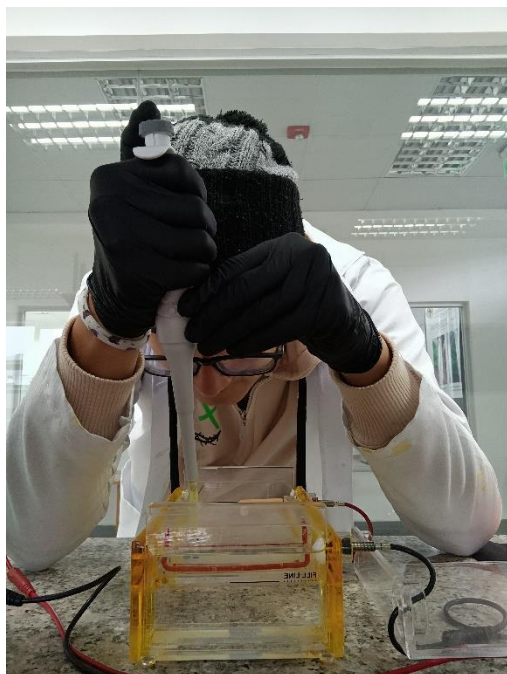
Anexo 6. ADN extraído



Anexo 7. Protocolo para el PCR



Anexo 8. Aplicación de la muestra en la cámara de electroforesis



Anexo 9. Visualización de la cámara

