



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**“Evaluación de la presencia de los genes de resistencia a antibióticos
betalactámicos y glucopéptidos en *Mammaliicoccus sciuri* aislado de la
carne de pollo que se expende en Ambato”**

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

AUTOR:

Jessica Fernanda Barreno Mayorga

TUTOR:

Dra. Sandra Cruz

CEVALLOS, 2024

**“Evaluación de la presencia de los genes de resistencia a
antibióticos betalactámicos y glucopéptidos en *Mammaliicoccus
sciuri* aislado de la carne de pollo que se expende en Ambato”**

REVISADO Y APROBADO POR:



Dra. Sandra Cruz. PhD.

TUTORA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

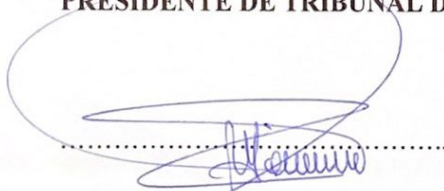
Fecha



Ing. Núñez Torres Oscar Patricio PhD

8/8/2024

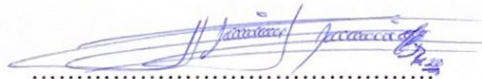
PRESIDENTE DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Ing. Núñez Torres Oscar Patricio PhD

8/8/2024

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



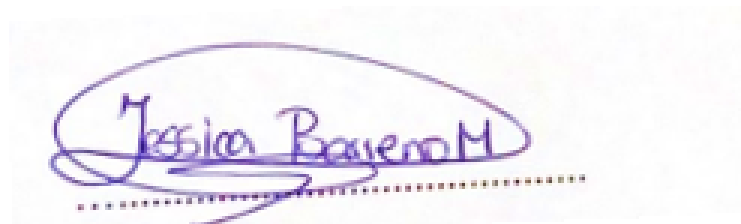
Ing. Mg. Guerrero López Jorge Ricardo

8/8/2024

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **JESSICA FERNANDA BARRENO MAYORGA**, portador de cédula de ciudadanía número: **1804624409**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“Evaluación de la presencia de los genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y glucopéptidos en *Mammaliicoccus sciuri* aislado de la 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.



JESSICA FERNANDA BARRENO MAYORGA

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**Evaluación de la presencia de los genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y glucopéptidos en *Mammaliicoccus sciuri* aislado de la carne de pollo que se expende en Ambato**” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, 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.

A handwritten signature in purple ink, reading "Jessica Barreno M.", enclosed within a large, loopy oval. Below the signature, there is a horizontal line of small, repeating rectangular marks.

JESSICA FERNANDA BARRENO MAYORGA

DEDICATORIA

Dedico este documento que representa el esfuerzo de muchos años a Dios y a San Juan Bendito quienes han guiado mis pasos y me han dado la fuerza para superar cada adversidad a lo largo de mi vida.

A mis padres Carmen y Ángel por sostener mi mano día a día siendo mi apoyo, mi refugio y mis cómplices a lo largo de mi vida, gracias por nunca decirme que no a nada.

A mi hermano Martin, mi compañero de vida, quien con cada ocurrencia, enojo y abrazos ha animado cada momento difícil y alegre que la vida nos ha puesto.

A mi abuelita mamita Miche, quien me a brindado su apoyo y cariño incondicional.

A mi ahijada Arelis, por ser mi refugio y apoyo en cada momento importante, espero ser un ejemplo para ti. A mis primas y primos, de forma especial a Fer, John, Mary, Pame, por hacer mi vida más bonita, escucharme y darme fuerzas para seguir adelante.

A mis ángeles en el cielo, mis hermanos Ángel, Álvaro, también a mis abuelitos papa Rosendo, mama Dori, papa Ángel, a mis primos Fabian, Karina, Salito y Fabiancito, por cuidarme desde el lugar donde se encuentren, por visitarme en mis sueños, y darme la fuerza para terminar cada proyecto que me he propuesto.

Y por último me la dedico a mí, a la niña que soñaba con ser doctora y reinita estamos a poco de cumplir nuestros sueños.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios y a San Juan por darme la fortaleza y perseverancia necesarias para completar este proyecto.

A mis padres Carmen y Ángel por quererme y apoyarme siempre, gracias por su esfuerzo, amor y paciencia.

A la Dra. Sandra Cruz por su invaluable guía, asesoramiento y apoyo constante. Su experiencia y conocimiento han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A mi mejor amiga Emily gracias por estar en los momentos más difíciles y alegres de mi vida, espero tenerte siempre, a mis amigos de la carrera y de vida Erika, Fernanda, Rosita, Katy, Shanty, David, gracias por su amistad, cariño y sobre todo por nunca dejarme sola.

A mi familia gracias por estar pendiente de mí y mis estudios, gracias por cada palabra de aliento y muestra de amor.

A mis pacientes estrellas, Toby, Pelusa, Leo, Mortadela, Campanita, Blanquita, Kiara, Quimbolito, Azabache, gracias por acompañarme en las madrugadas y ser mi motivación para terminar la carrera.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	iii
DERECHO DE AUTOR	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I.....	13
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>13</i>
<i>MARCO TEÓRICO</i>	<i>16</i>
1.1. Antecedentes investigativos	16
1.2. Categorías fundamentales	20
1.3. Objetivos	24
CAPÍTULO II	26
<i>METODOLOGÍA.....</i>	<i>26</i>
2.1. Ubicación del estudio.....	26
2.3. Factores de estudio.....	28

2.4. Manejo del experimento	29
2.5. Identificación de la muestra.....	29
CAPÍTULO III.....	40
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>40</i>
Comprobación de la hipótesis.....	48
CAPÍTULO IV	49
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	<i>49</i>
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	.
TABLA 2. FÁRMACOS A UTILIZAR Y DESCRIPCIÓN	
TABLA 3. PRIMERS GENES DE RESISTENCIA.....	34
TABLA 4. MASTER MX PARA EL GEN MECA.....	34
TABLA 5. MASTER MX PARA EL GEN VANCA	35
TABLA 6. CONDICIONES DE PCR PARA EL GEN MECA	36
TABLA 7. CONDICIONES DE PCR PARA EL GEN VANCA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA1. MORFOLOGÍA DE MAMMALIICOCCUS SCIURI	23
FIGURA 2. CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN	38
FIGURA 3. RESULTADO DEL PRIMER EXPERIMENTO.	
FIGURA 4. RESULTADOS DEL SEGUNDA PCR.	
FIGURA 5. RESULTADO PCR.	40
FIGURA 6. RESULTADO PCR PARA EL GEN MECA	..
FIGURA 7. RESULTADO DEL PRIMERA PCR PARA EL GEL VANCA.....	
FIGURA 8. RESULTADO DEL SEGUNDA PCR PARA EL GEN VANCA.	
FIGURA 9. PCR MÚLTIPLE GEN VANCA.	.
FIGURA 10. RESULTADO DE LA TERCERA PCR.....	.

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos representa un problema significativo para la salud pública debido a la capacidad de las bacterias de causar infecciones difíciles de tratar. El objetivo de esta investigación es detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico) y glucopéptidos (vancomicina) en la bacteria *Mammaliicoccus sciuri* aislada de la carne de pollo vendida en Ambato. La investigación se realizó mediante la recolección de muestras *Mamamlicocus* aisladas de carne de pollo y su análisis en laboratorio para determinar la presencia de los genes de resistencia mencionados, mediante PCR, extracción de ADN y electroforesis. Obteniendo como resultados la presencia de genes de resistencia en betalactámicos con una amplificación de la banda de 162 pb mas no se encontró una amplificación de glucopéptidos lo que quiere decir que existen diferentes formas para la existencia de una resistencia. La identificación y monitoreo de estos genes son cruciales para evaluar la seguridad alimentaria y evitar la propagación de bacterias resistentes en la cadena alimentaria final.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, *Mammaliicoccus sciuri*, carne de pollo, seguridad alimentaria.

ABSTRACT

Antibiotic resistance represents a significant public health problem due to the ability of bacteria to cause difficult-to-treat infections. The objective of this research is to detect the presence of resistance genes to beta-lactam antibiotics (amoxicillin + clavulanic acid) and glycopeptides (vancomycin) in the bacteria *Mammaliicoccus sciuri* isolated from chicken meat sold in Ambato. The research was carried out by collecting Mamamlicocus samples isolated from chicken meat and analyzing them in the laboratory to determine the presence of the aforementioned resistance genes, using PCR, DNA extraction and electrophoresis. Obtaining as results the presence of resistance genes in beta-lactams with an amplification of the band of 162 bp but no amplification of glycopeptides was found, which means that there are different ways for the existence of resistance. The identification and monitoring of these genes are crucial to evaluate food safety and prevent the spread of resistant bacteria in the final food chain.

Keywords: antibiotic resistance, *Mammaliicoccus sciuri*, chicken meat, food safety.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos en bacterias es un problema a nivel mundial, esto sucede porque las bacterias tienen la capacidad de provocar diferentes infecciones que son muy difíciles de tratar, en cuanto a los genes de resistencia en los antibióticos betalactámicos, forman un vínculo genético que va a otorgar una resistencia a diferentes antibióticos como lo es la penicilina (metecilina) al igual que a las cefalosporinas. Es importante mencionar que la resistencia a los antibióticos se considera un problema muy significativo en la salud pública, en donde la monitorización al igual que la identificación es importante para asegurar la salud alimentaria, para poder prevenir la propagación de las bacterias en la cadena alimentaria, y de igual forma para cuidar la salud humana **(Van der Veken et al., 2022)**.

En cuanto a los antibióticos glucopéptidos, en donde se encuentran la vancomicina, teicoplanina, los cuales son empleados para tratar diferentes infecciones graves las mismas que son provocadas por bacterias grampositivas, en cuanto a la resistencia a la vancomicina esta presenta un fenómeno que es muy significativo al igual que alarmante en los campos de la seguridad alimentaria y microbiología médica. Para poder confirmar la presencia de los genes de resistencia, se necesita diferentes pruebas de laboratorio, estas técnicas van a implicar técnicas como PCR, las mismas que son dirigidas a genes específicos, estos genes son vanA, vanB, vanC entre otros **(Angeli et al., 2022)**.

En el estudio de **Boonchuay et al., (2023)** en su investigación titulada "*Vagococcus sp.* un patógeno porcino: caracterización molecular y fenotípica de cepas aisladas de cerdos enfermos en Brasil", el principal objetivo fue identificar *Vagococcus sp.* en cerdos y caracterizar las cepas aisladas. En los años 2012 y 2017, se analizaron 11 cepas con características morfológicas similares a *Streptococcus* en cerdos con diversas enfermedades. La identificación bacteriana se realizó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) y se confirmó con la secuenciación de ARNr 16S y perfiles bioquímicos. Además, se genotipificaron las cepas utilizando la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado con una sola enzima (SE-AFLP). Para determinar la concentración mínima inhibidora de antibióticos veterinarios, se utilizó el método de microdilución en caldo.

Mammaliicoccus sciuri, previamente conocido como *Staphylococcus sciuri*, es una bacteria Grampositiva, esta bacteria muestra una oxidasa positiva y es negativo para coagulasa. *Mammaliicoccus sciuri* perteneciente al género *Mammaliicoccus*, los mismos que son caracterizados por ser un racimo de cocos, la principal característica de esta bacteria es que es el portador significativo de genes de virulencia y presenta resistencia a diferentes antibióticos (**Dhaouadi et al., 2022**).

Este estudio permitirá identificar la bacteria *Mammaliicoccus sciuri* y su resistencia a diversos antibióticos, lo que es esencial para evaluar la seguridad alimentaria y evitar la diseminación de bacterias resistentes en la cadena alimentaria. Estas bacterias son un riesgo para la salud de los consumidores debido a la dificultad de su tratamiento. Para detectar genes de resistencia en bacterias aisladas de alimentos, se llevarán a cabo pruebas de laboratorio, como extracción de

ADN y las pruebas de PCR, con el fin de identificar genes específicos de resistencia a glucopéptidos y betalactámicos.

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

Boonchuay et al., (2023), en su estudio utilizó 11 aislamientos de *Mammaliicoccus sciuri* resistente a la meticilina los cuales fueron obtenidos de seis muestras de caballos, 4 muestras de vacas y una muestra fue obtenida de pollos, para este estudio se evaluó en función de la concentración mínima, con ayuda del sistema VITEK 2, en donde se evaluaron tres genes de resistencia a antimicrobianos estos genes fueron mecA, mecC, blaZ, con ayuda de la PCR se obtuvieron genes de mecA y también de blaZ, pero no se encontraron genes de mecC.

Garcia-Aroca et al., (2022) el autor menciona que la resistencia a la meticilina en *M. sciuri*, en la cepa 2254 tanto A como M, fueron sensibles, de la misma forma se tomó muestras de la cepa 6942 de los animales que se encontraban enfermos, en donde se cultivó en agar de soja a una temperatura de 37° C, se realizó en un tiempo de 24 a 48 horas. Y para identificar las diferentes especies se realizó una espectrometría de masas.

En el estudio de **(Van der Veken et al., 2022)** se demostró que *M. sciuri* es susceptible a diferentes antibióticos, como es el caso de la ampicilina, cloranfenicol, vancomicina, los mismos que se usaron con macrodiluciones en caldo de Mueller- Hinton, se usó para la determinación de estos genes se realizaron tres repeticiones, en este estudio se utilizó *Staphylococcus aureus* como cepa de control de calidad, mismos que se incubaron por 20 horas a una temperatura de 37° C.

En el estudio de **Castellano et al., (2018)** menciona que la vancomicina es un antibiótico que se usa para bacterias Gram positivas como es el caso de *Mammaliicoccus sciuri* el mismo que también tiene una resistencia en la meticilina, en distintos casos para complementar el manejo de las diferentes infecciones que son causadas por las bacterias Gram positivas, de la misma forma menciona los diferentes tratamientos en para las bacterias los mismos que son usados en los tratamientos como medidas de apoyo para controlar a las bacterias Gram positivas.

Matas et al., (2008) en su estudio menciona que las bacterias que se hacen resistentes a los antimicrobianos son consideradas una amenaza creciente, esto pasa por el mal uso de los medicamentos lo que va a causar una resistencia. En este estudio se analizó muestras de cerdos, los mismos que fueron tratados con enrofloxacin, el objetivo de este estudio fue identificar las bacterias que son resistentes, para su comprobación se usó medios de agar criogénico para el aislamiento de las cepas de resistencia a vancomicina, se usó 12 muestras de cerdos durante siete días, en estas muestras se encontraron resistencia a vancomicina.

De Moura et al., (2023) menciona en su estudio el descubrimiento y también seguimiento de los genes de resistencia a los antimicrobianos, menciona que son esenciales para comprender la evolución de la resistencia de la bacteria para así frenar su dispersión. En este estudio se descubrió que las cepas de *M. sciuri* que fueron aisladas con ayuda de hisopos en la piel del pezón y de muestras de la leche recolectados de una oveja, se pudo identificar *M. sciuri* gracias a la identificación de los nucleolos, los mismos que fueron calculados en un panel de genomas estafilocócicos, en ambas cepas se presentaron un fenotipo que es multirresistente, estas son a bencilpenicilina con un MIC > 0,5 µg/ml de igual manera al ácido fusídico CMI = 4 y 8 µg/ml y de la misma forma a tetraciclina con MIC ≥ 16 µg/ml.

El autor **Belhout et al., (2023)** menciona en su estudio que se describió la composición de la flora nasal de *Staphylococcaceae* en dromedarios, identificando cinco especies previamente no registradas en estos animales. Aproximadamente la mitad de las especies identificadas pertenecían a CPS, siendo *S. aureus* la más común. La prevalencia de MRS/MRM a nivel de finca fue del 57%, con *M. lentus* y *S. epidermidis* como las especies más prevalentes. También se detectó la presencia de CA-MRSA, cuya fuente probable es humana, sugiriendo contaminación cruzada entre humanos y dromedarios. En cuanto a los MRSE, la mayoría eran del tipo ST61, típicamente asociado con infecciones humanas. Se identificó una nueva variante del elemento estafilocócico SCC Mec tipo VIII en MRSH. Casi todas las cepas de *M. lentus* presentaban el inusual elemento híbrido SCC mec-mecC, indicando una epidemiología específica en *Staphylococcaceae* de camello argelino. Este elemento se detectó por primera vez en *M. lentus*. Estos resultados señalan una epidemiología particular en Argelia, donde el mecC parece estar más vinculado a la resistencia a la meticilina que en otras regiones del mundo. Dada la escasa cantidad de investigaciones en esa área, se requiere una investigación exhaustiva que abarque todos los compartimentos para comprender la prevalencia y los tipos de MRS y MRM, con el objetivo de esclarecer la epidemiología y la propagación de la resistencia a la meticilina, que tiene importantes implicaciones para la salud.

Kos et al., (2023) menciona en su estudio que ofrece información sobre la presencia y las características genómicas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y otros *Staphylococcus* resistentes a la meticilina, en explotaciones lecheras en Serbia, destacando la utilidad de la secuenciación completa del genoma para analizar estos patógenos zoonóticos oportunistas. Un 24,0% de las explotaciones mostraron positividad para MRS y/o MRM, identificándose 70 aislamientos de MRS/MRM en total. Se observó una notable diversidad genética dentro de las especies. Frecuentemente, se encontraron aislamientos de MRS/MRM

distintos de *S. aureus* que portaban genes de resistencia a múltiples fármacos, sugiriendo su posible papel como reservorios de genes de resistencia antimicrobiana. La presencia de genes de virulencia fue escasa en los MRS/MRM analizados. La mayoría de los aislamientos de SARM pertenecían al linaje SARM-LA, específicamente al ST398-t034, y un aislamiento del genotipo ST152-t355 albergaba genes PVL. Aunque la prevalencia de SARM fue baja, la detección de genes asociados con la resistencia antimicrobiana, enterotoxinas estafilocócicas y genes de virulencia en las cepas de SARM de la leche de tanque de almacenamiento (BTM) plantea riesgos para la salud animal y humana. Dada la potencial transmisión zoonótica del SARM, se destaca la importancia de la vigilancia continua en entornos agrícolas.

Boonchuay et al., (2023) en su investigación titulada "Asociación de tipos de secuenciación multilocus y perfiles de resistencia antimicrobiana de *Mammaliicoccus sciuri* resistente a meticilina en animales en el sur de Tailandia", el principal objetivo fue investigar un nuevo tipo de secuenciación multilocus (MLST) relacionado con el patrón de resistencia a los antibióticos de *M. sciuri* en animales del sur de Tailandia. Para ello, se utilizaron 11 aislados de *M. sciuri* resistentes a la meticilina (MRMS) provenientes de seis caballos, cuatro vacas y un pollo de un estudio anterior. Se reevaluó la resistencia a los antimicrobianos (AMR) basándose en las concentraciones mínimas inhibitorias mediante un sistema automatizado VITEK® 2 y se analizaron tres genes AMR: *mecA*, *mecC* y *blaZ*. Se encontró que los genes *mecA* y *blaZ* estaban presentes en todos los aislados, mientras que el gen *mecC* no fue detectado. El estudio demostró la diversidad del MRMS en el sur de Tailandia.

1.2.Categorías fundamentales

1.2.1. Genes de resistencia

Los genes que otorgan resistencia a diversos antimicrobianos están asociados con elementos genéticos móviles, como los plásmidos, transposones e integrones. Estos últimos actúan como elementos de expresión genética que pueden incorporar genes sin promotores, convirtiéndolos en genes funcionales. Así, los integrones funcionan como casetes de expresión para los genes insertados, y frecuentemente incorporan múltiples genes. Los integrones de clase 1 son los más investigados y se encuentran principalmente en aislamientos clínicos. La integrasa facilita la movilización de estos casetes, lo que ha resultado en numerosas reconfiguraciones y combinaciones de casetes, seleccionadas por diferentes antibióticos. Esto permite una multiresistencia que se propaga mediante transposones o plásmidos **(Garza-Ramos et al., 2009)**.

1.2.2. Fármacos

Los antibióticos betalactámicos, son una clase de antimicrobianos, los cuales comparten una estructura química de un anillo b- lactámico, cuenta también con un mecanismo de acción común, en este grupo se incluye las penicilinas, cefalosporinas, las mismas que actúan sobre la pared celular bacteriana, son activos en la mayoría de las bacterias **(Hincapié et al., 2021)**.

Los glucopéptidos se producen mediante la síntesis de péptidos, son una clase de antibióticos desarrollados para curar ciertas formas de bacterias, son usados comúnmente para curar inflamaciones del intestino, combaten a las bacterias gran positivas, siendo la vancomicina una de las primeras moléculas (Morejón, 2015)

Tabla 1.

Fármacos a utilizar y descripción

Fármaco	Descripción
Amoxicilina + ácido clavulánico	Antibiótico betalactámico, del grupo de las penicilinas, actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, actúa mediante la unión e inhibición de la enzima transpeptidasa.
Vancomicina	Glucopéptido que tiene estructura compleja, ejerce su efecto inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, su modo de acción se basa en la alteración de la transglucosidasa por un impedimento estérico.

Fuente: (Nelli et al., 2022).

1.2.3. *Mammaliicoccus sciuri*, taxonomía, clasificación y morfología

Mammaliicoccus sciuri pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, esta bacteria ha sido aislada primariamente en roedores al igual que en otros mamíferos y ocasionalmente aislada en seres humanos, *M. sciuri* es Gram positiva, en cuanto a su nombre científico completo es *Mammaliicoccus sciuri*, y está dentro del género de los *Mammaliicoccus*. La bacteria *M. sciuri* se va a presentar en forma esférica, lo que es una característica muy común del género al que pertenece, es similar a los racimos de uvas lo que también es típico de los estafilococos (Van der Veken et al., 2022).

Tabla 2.

Taxonomía de M. sciuri

Superfilo	Bacteria
Filo	Bacillota
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Genero	Mammaliicoccus
Especie	Mammaliicoccus sciuri

Fuente: (Ncbi, 2022)

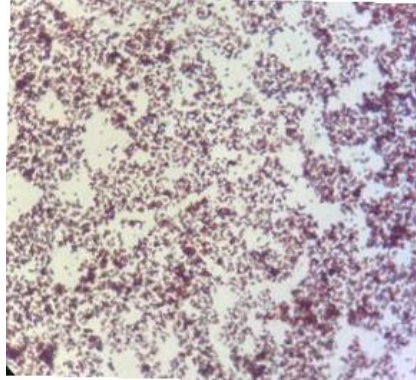


Figura 1. *Mammaliicoccus sciuri*

1.2.4. Hábitat natural y significado clínico

La bacteria coloniza áreas como piel, mucosas y cavidades nasales en los huéspedes mamíferos. Aunque *Mammaliicoccus sciuri* se considera un microorganismo oportunista e inofensivo, en raras ocasiones va a causar infecciones en humanos, esto se va a dar en personas que se encuentran con un sistema inmunológico comprometido o también en pacientes que se encuentran con dispositivos médicos implantados (**Van der Veken et al., 2022**).

1.2.5. Carne de pollo

La carne de pollo es una de las más consumidas en nuestro país y en los países circundantes. Su bajo costo, su adecuada composición nutricional en proteínas y sus características

organolépticas aceptables para personas de todas las edades favorecen su consumo. No obstante, esto no la exime de riesgos, especialmente químicos y microbiológicos, que se deben al sistema de producción intensiva utilizado. Sin embargo, estos riesgos son controlables con relativa facilidad. Para el consumidor, la carne de pollo se define principalmente por dos características esenciales que influyen en su decisión de compra: su bajo precio y una percepción de alta seguridad **(Burgos, 2017)**.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la presencia de los genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y glucopéptidos en *Mammaliicoccus sciuri* aislado de la carne de pollo que se expende en Ambato.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de genes de resistencia a betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico) en *Mammaliicoccus sciuri*.
- Determinar la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos (vancomicina) en *Mammaliicoccus sciuri*.

- Describir los mecanismos moleculares de resistencia a betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico) y glucopeptidos (vancomicina) de *Mammaliicoccus sciuri*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. Está ubicado en el km 2,5 vía Cevallos - Quero, sector Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, con una extensión de 19.000 km², latitud 2 882 msnm. 1°22'08.7" y longitud 78° 36'23.8" (GAD Cevallos, 2022).

2.2. Caracterización del lugar.

Tabla 2.

Caracterización del lugar

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

Fuente: (GAD Cevallos, 2022).

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipos

- Balanza Analítica FC 2000 (cap.2000 g; 0,01 g)
- Autoclave
- Incubadora
- Escala McFarland
- Agitador magnético con plancha de calentamiento
- Nevera
- Baño María
- Espectrofotómetro

2.3.2. Materiales

- Mandil
- Filipino
- Mascarillas
- Alcohol
- Agarosa
- Primers

- Gotaq
- Marcador de peso molecular
- Sybr safe green
- Tubos de PCR (2 cm)
- Puntas azules, amarillas y blancas
- Ependort (15 ml)

2.3.3. Material de oficinas

- Computadora
- Esferos
- Cinta adhesiva
- Impresora
- Cámara fotográfica
- Cuaderno de apuntes
- Rotulador

2.3. Factores de estudio

Genes de resistencia de Amoxicilina + ácido clavulánico, Vancomicina y sus mecanismos moleculares en *Mammaliicoccus sciuri*, de la carne de pollo que se expende en la ciudad de Ambato.

2.4. Manejo del experimento

2.5. Identificación de la muestra

La bacteria *Mammaliicoccus sciuri*, previamente identificada molecularmente como NCTC12103 con código de acceso LS483305.1; la misma que se encuentra en conservación en el laboratorio de Biología Molecular de la FCAGP.

2.5.1. Refrescamiento de la cepa *Mammaliicoccus sciuri* en TS

➤ Preparación de Agar Tripticasa de soya

El agar tripticasa de soya es un medio no selectivo, este medio promueve el desarrollo y aislamiento de diferentes microorganismos que sean aerobios, anaerobios estrictos o facultativos, su composición cuenta con sangre esto hace que ayude al crecimiento de diferentes microorganismos existentes, el principal componente de este agar es el compuesto de la peptona de soya el mismo que es un estimulante ante el crecimiento, de la misma manera tiene cloruro de sodio el mismo que hace que exista un balance osmótico (**Safety & Sheet, 2012**).

1. Para empezar, utilizamos los materiales que se encuentran en el laboratorio, los mismos que los pasamos por el autoclave a una temperatura de 120 ° C.

2. Pesar 48 gr del producto en la balanza analítica.
3. Los gramos que ya pesamos los vamos a colocar en 1000 ml de agua, la misma que esta destilada.
4. Homogenizar la mezcla utilizando un microondas durante 10 minutos.
5. Subir la temperatura hasta que llegue al punto de ebullición.
6. Trasladar el agar TS a l autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120 ° C.
7. Terminado el proceso de la autoclave, colocamos el contenido en diferentes placas Petri, las mismas que ya estaban esterilizadas.
8. Se deja que solidifique el agar durante 24 horas, para posterior a esto sembrar nuestra bacteria.

➤ **Siembra de cepa de *Mammaliicoccus sciuri***

1. Iniciar sacando de los eppendorfs congelados a - 20 ° con el fin de ambientar a las bacterias cerca de un mechero y en un cuarto estéril
2. Se utiliza un palillo para siembra y realizamos una colecta de la bacteria dentro del eppendorf, esto cerca del mechero con el fin de evitar la contaminación.
3. Posterior a esto colocamos la bacteria dentro de las placas Petri con agar TS, estas placas estaban previamente rotuladas con el nombre y el numero de la bacteria.
4. Se debe esperar que la gota se seque durante unas 3 a 4 horas para proceder a estriar con ayuda de un asa.
5. Se incuba 24 horas a 37 ° C.

➤ **Preparación de Caldo cerebro- corazón**

El caldo cerebro corazón es ricamente nutritivo, al igual que es un medio líquido, el mismo que estimula el crecimiento de los microorganismos, su principal componente es la infusión del cerebro de terneras, de la misma forma corazón de bovinos, cuenta también con peptona el mismo que aporta el carbono, cuenta también con nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y péptidos los mismos que ayudan al desarrollo de los microorganismos (**Safety & Sheet, 2012**).

1. Esterilización de los materiales de laboratorio en autoclave a 120 ° C.
2. En la balanza analítica pesar 3.7 g del producto
3. Colocar agua destilada previamente esterilizada en un vaso de precipitación con los gramos ya pesados
4. Homogenizar la muestra
5. Con ayuda del microondas se lo calienta hasta el punto de ebullición
6. Se lo mete a la autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C.
7. Se trasvasa el contenido a unos tubos de ensayo, los mismos que ya estaban previamente esterilizados, al igual que etiquetados y con su tapón correspondiente.

➤ **Siembra de colonias de *M. sciuri* en el caldo cerebro corazón**

1. Transcurrido las 24 horas de incubación de las cepas de *M. sciuri* previamente sembradas en agar TS, con la ayuda de a asa de siembra recolectamos de 5-6 colonias que están aisladas directo de la placa Petri, esto se realiza cerca del mechero.

2. Se coloca las cepas recolectadas dentro de los tubos de ensayo con el caldo cerebro corazón
3. Incubar por 24 horas a 37 ° C.

(Máster et al., 2019)

Extracción de ADN y PCR

➤ Extracción de ADN

1. Se inicia centrifugando el cultivo a 3000 rpm durante 15 minutos.
2. Posterior re suspendemos en 500 µl en caldo de cerebro corazón para pasar a un eppendorf.
3. Agregar también 4° µl de SDS que está al 20%.
4. Añadir 8 µl de solución de proteinasa K esta está al 20 mg/ ml.
5. Mezclar bien en vórtex.
6. Incubar durante 2 hora 65 ° C.
7. Añadir 300 µl de NaCl 6 M.
8. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
9. Centrifugar durante 30 minutos a 10000 g
10. Colocar el sobrenadante en nuevos tubos
11. Agregar volumen igual de isopropanol, mezclar bien, incubar los tubos a -20 ° C esto durante toda la noche.
12. Centrifugar durante 20 minutos a 10000 g
13. Lavar con etanol al 70 % y debemos dejar secar

14. Re suspender en 300 µl en agua libre de endonucleasas

(Albanabi y martinez 1997) modificado

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta es una técnica de laboratorio la misma que se utiliza para amplificar una secuencia específica del ADN, esta técnica se basa en la síntesis de ADN que es dirigida por cebadores de oligonucleótidos y también por un ADN polimerasa. Es importante mencionar que los cebadores son fragmentos del ADN, los mismos que se unen a la secuencia de ADN objetivo, esta unión se hace en los extremos, para realizar una PCR se debe realizar una serie de ciclos con diferentes temperaturas esto se hace con el fin de separar el ADN para que luego se unan con los cebadores **(Roger Alberto Rabelo Florez, 2023)**.

1. Se debe iniciar reconstruyendo el primer, se añadió 640 µl de agua libre de endonucleasas
2. Diluir el primer, para ello se tomó 45 µl de agua libre de endonucleasa y 5 µl del primer
3. Preparar el máster Mx

Tabla 3.*Primers Genes de resistencia*

Gen	Secuencia	Amplificación
MecA	F: TCCAGATTACAACCTTCACCAGG R: CCACTTCATATCTTGTAAC	162 bp
VancA	F: GGCAAGTCAGGTGAAGATG R: ATCAAGCGGTCAATCAGTTC	713 bp

Fuente : (Vallejo Pazmiño et al., 2022)
Tabla 4.*Máster Mx para el gen mecA*

Reactivos	ADN	Go Taq	Primer Forward	Primer Reverse	H2O	Volumen final
Volumen	2 µl	12,5 µl	1 µl	1 µl	8, 5 µl	25 µl

Fuente: (Máster et al., 2019)

Tabla 5.

Máster Mx para el gen VancA

Reactivos	ADN	Go Taq	Primer Forward	Primer Reverse	H2O	Volumen final
Volumen	2 µl	15 µl	1 µl	1 µl	8, 5 µl	25 µl

Fuente: (Máster et al., 2019)

- Colocar en los tubos de PCR 23 µl del máster Mx, posterior 2 µl de DNA como volumen final tenemos 25 µl.
- En dos tubos se administró una muestra de ADN y un negativo que en este caso se administró agua libre de endonucleasas.
- Se dio vòrtex hasta que toda la muestra este homogenizada
- Centrifugar la muestra
- Utilizar el termociclador con la temperatura y el tiempo adecuado con las condiciones del ADN y del primer utilizado.

Tabla 6.

Condiciones de PCR para el gen MecA

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 ° C	15 minutos	30
Desnaturalización final	94 ° C	1 minuto	
Alineamiento	54 ° C	1 minuto	
Elongación inicial	72 ° C	1 minuto	
Elongación final	72 ° C	1 minuto	

Fuente: (Pérez, 2020)

Tabla 7.

Condiciones de PCR para el gen VancA

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 ° C	5 minutos	40

Desnaturalización final	94 ° C	1 minuto
Alineamiento	59 ° C	1 minuto
Elongación inicial	72 ° C	2 minuto
Elongación final	72 ° C	5 minuto

Fuente: (Vallejo Pazmiño et al., 2022)

➤ Electroforesis en el gel de agarosa

1. Determinar la cantidad que se va a utilizar, esto depende de la cantidad de cubetas (30, 60, 100). Se utilizo una cubeta de 30, se pesó 0, 6g de agarosa.
2. Para la cubeta de TAE que se utilizó se añadió 30 ml de TAE 1 X y se lo mezcló con la agarosa 0,6 %, esto se mezcló en un vaso de precipitación.
3. Con la ayuda del microondas se disolvió el gel esto en un tiempo de 30 a 45 segundos
4. Diluida la agarosa se debe añadir 10 µl de safe green
5. Se añadió en la cubeta, junto con los peines y se dejó que se solidifique a temperatura ambiente
6. Cuando el gel se solidificó, se desprende los peines y se introduce el gel en las cámaras de electroforesis, dichas cámaras deben estar cubiertas de solución TAE 1X.
7. Con una pipeta, se debe colocar 5µl de muestra, y el marcador de peso molecular, hay que mencionar que en el primer pocillo se debe colocar el marcador de peso molecular
8. Se coloca la tapa de la cámara, hay que programar la fuente de energía de acuerdo con el parámetro, en este caso se utilizó 80 volt los mismos que se corrieron por 30 minutos.

9. Terminado el tiempo se pasó el gel al transiluminador, en donde se observó la banda de ADN con su tamaño correspondiente.

En la figura 2 se puede observar la medición en el nanodrop de la concentración del ADN, en donde se obtiene 1341, 4 ng/ μ L, lo que significa que es de buena calidad para nuestro poder realizar nuestra PCR.

Según el estudio de **Polo, (2011)** donde indica que para la extracción del ADN para que sea de buena calidad se necesita un mínimo de 400 ng/ μ L, se utiliza un nanodrop automático, se muestra una investigación donde se realiza mediante el mismo método, para de esta forma podemos realizar una PCR.

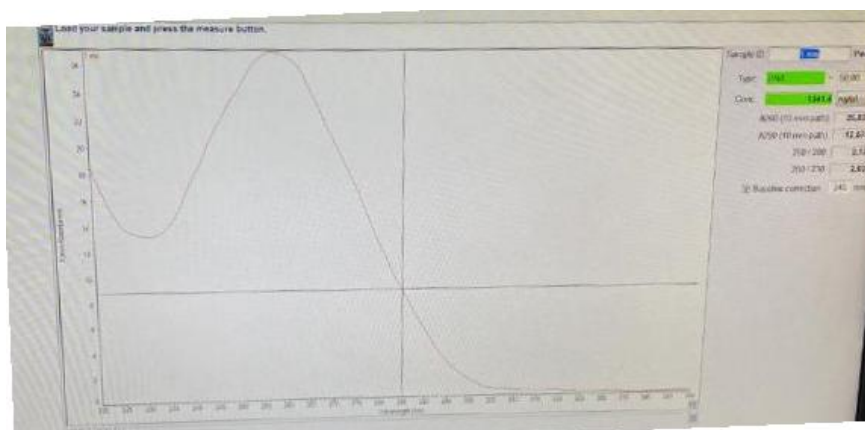


FIGURA 1. Calidad y concentración del ADN

2.7. Variables respuestas

Cuantitativas. –

Para esto se evaluó la amplificación de la banda dependiendo el gen, para el gen MecA se debe obtener una banda de 162 pb y para VancA la amplificación de la banda debe ser de 713 bp (Pérez, 2020).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

Identificación de la presencia de genes de resistencia a betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico) en *Mammaliicoccus sciuri*.

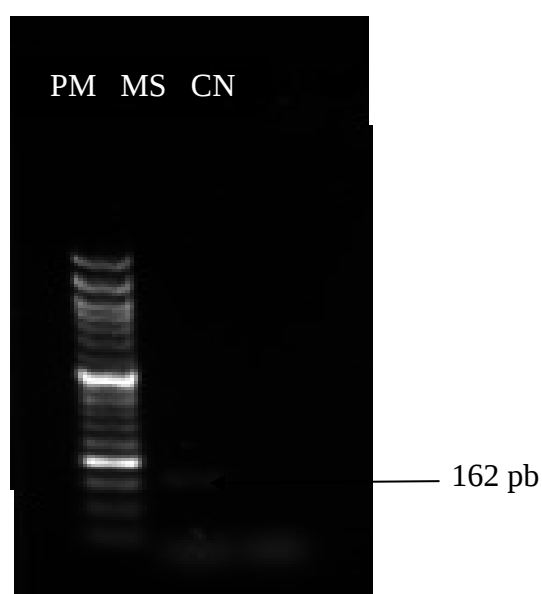


FIGURA 5. Resultados del gel final. En el pocillo 1 se puede observar el marcador de peso molecular, en el siguiente pocillo se observa el gen *mecA* con la amplificación de 162 pb, el pocillo 3 es el blanco

En la figura 5 se evidencia el resultado final obteniendo los pares de bases que se requería el cual es de 162. Para esto se realizó de la siguiente manera, la máster Mx, contenía, primers 2 μ l, se utilizó agua libre de endonucleasas 17 μ l, de ADN se utilizó 2 μ l. se realiza PCR en el

termociclador con el siguiente protocolo iniciando con una desnaturalización de 95 ° C con un tiempo de 15 minutos, seguido de 94 ° C por 1 minuto, se utilizó 30 ciclos, para el anillamiento se usó 54 ° C por 1 minuto, terminando con una extensión de 72 ° C durante 1 minuto.

Tabla 4.

Genes de resistencia a betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico)

Autor	Tamaño del amplicon (pb)	Nombre del primer
(Vallejo Pazmiño et al., 2022)	138 pb	Midicell® Primo™, Modelo
(Pérez, 2020)	174 pb	Touch-stick®
Iyer, (2013)	967 pb	Biolasa BIOTAQ™ PCR Kit
Nelli et al., (2022)	162 pb	DNeasy® UltraClean® Microbial Kit

Nuestro estudio concuerda con lo descrito por **Nelli et al., (2022)**, quien menciona que se encontraron genes de resistencia al utilizar *Staphylococcus aerus*, utilizando el gen *mecA*, en dicho estudio se amplifica a 138 pb, similar al nuestro teniendo como resultado 162 pb, manifestando que este gen codifica una proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a), que permite a las bacterias continuar la síntesis de su pared celular incluso en presencia de antibióticos β -lactámicos, haciéndolos más resistentes.

Según **Iyer, (2013)** , quien utilizó una PCR multiple, donde existió una amplificación de 967 pb, la caracterización del casete cromosómico SCCmec mediante PCR múltiple ha permitido una clasificación detallada de estas cepas, revelando la prevalencia de tipos específicos de SCCmec en diversas poblaciones. El mecanismo principal de resistencia mediado por el gen *mecA* consiste en la modificación del objetivo de los antibióticos β -lactámicos, manifestando que existe una mayor resistencia, lo que concuerda con nuestra investigación, ya que obtuvimos una amplificación de 162 pb

A pesar de que **Pérez, (2020)**, utiliza otro protocolo de PCR diferente al nuestro este autor tuvo similares resultados, en donde se observó que el 50% de las cepas de *S. aureus* aisladas poseían el gen *mecA*, indicando una prevalencia significativa de resistencia a la meticilina. Esta resistencia se asocia con la producción elevada de PBP2a, que inhibe la acción de los antibióticos β -lactámicos, incluyendo la meticilina y la oxacilina. Lo que concuerda con nuestros estudios pues se obtuvo una amplificación de 162 pb, a pesar de usar otro protocolo distinto al autor mencionado.

Determinación la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos (vancomicina) en *Mammaliicoccus sciuri*.

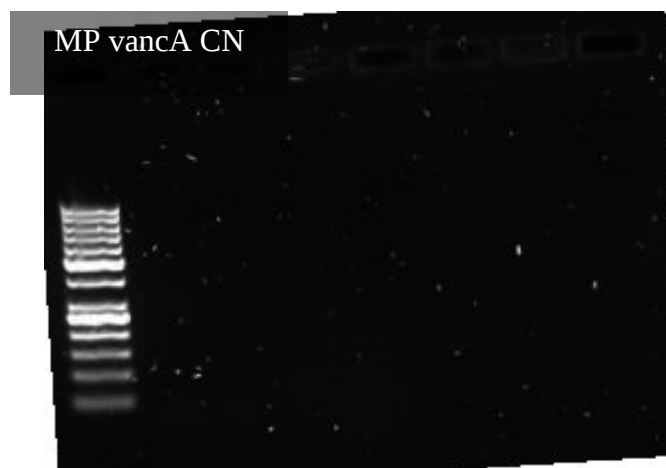


FIGURA 8. *Resultado del gel, gen VancA.*

La figura muestra la realización del gen VancA, mismo que se realizó de la siguiente manera: los primers se diluyeron 10 en 1, se utilizó 24,5 de la máster Mx los cuales contenían 12,5 de Taq, 0,5 de cada primers, y 11 μ L de agua, finalmente 0,5 de ADN. Se utilizó el termociclador con las siguientes indicaciones, iniciando desnaturalización, 94 ° C durante 2 minutos, de la misma manera la desnaturalización 1 fue de 94 ° C por 1 min, para la elongación final e inicial se realizó de 72 ° C durante 2 minutos y 72 ° C durante 5 minutos respectivamente, para el anillamiento se usó 59 ° C por 1 minuto se usó 35 ciclos, para la electroforesis se usó un gel de agarosa al 2 % con una 80 V durante 30 minutos. Terminado el proceso se llevó a la cámara de UV y se puso a visualizar de la siguiente manera.

Tabla 5.

Genes de resistencia a glucopéptidos (vancomicina)

Autor	Tamaño del amplicon (pb)	Nombre del primer
(Liliana et al., 2020)	174 pb	WHONET®
(Cotaquispe et al., 2021)	597 pb	Thermo Scientific
(Patente, 2021)	732 pb	Multizoom Nikon AZ100
(Vallejo Pazmiño et al., 2022)	713 pb	DNeasy® UltraClean® Microbial Kit

Según **Cotaquispe et al.,(2021)** menciona en su estudio que se identificaron 24 cepas resistentes a la vancomicina a través del gen *vancA*, lo que difiere de nuestro estudio, pues a pesar de la existencia de resistencia, no podría deberse a los genes utilizados, sino a otros mecanismos, como puede ser la pared celular.

Liliana1 et al., (2020) difieren con nuestra investigación, ya que en este estudio se menciona que existe una leve sensibilidad al antibiótico, más no una resistencia, teniendo una amplificación de 174 pb; sin embargo, en nuestro estudio no se presentó una amplificación ante este antibiótico.

Patente, (2021) resalta la efectividad de la vancomicina, junto con antibióticos como la rifampicina y el linezolid, contra todos los aislamientos analizados, obteniendo un tamaño del amplicon de 732 pb, lo que difiere con nuestros resultados; ya que no existió una amplificación de la banda.

➤ **Resistencia a betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico):**

Encontramos en el estudio de **Calvo et al., (2011)** que la producción de la betalactamasa la misma que se encuentra en espectro reducido; estas enzimas descomponen la amoxicilina, desactivándola. Aunque el ácido clavulánico puede inhibir estas enzimas, su eficacia puede ser limitada si la bacteria produce grandes cantidades de betalactamasas. Existe la modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) PBP2a y PBP2': *M. sciuri* puede poseer PBPs alteradas con menor afinidad por los betalactámicos, permitiendo la síntesis de la pared celular a pesar de la presencia de amoxicilina. Lo que concuerda con el estudio de **Castellano González & Perozo-Mena, (2010)** menciona que la resistencia a meticilina se considera intrínseca porque no implica la destrucción del antibiótico por enzimas β -lactamasas. Esta resistencia se debe a una proteína de unión a penicilina adicional llamada PBP2' o PBP2a, que no está presente en las cepas sensibles a la meticilina. Las PBPs son enzimas que participan en la síntesis de la pared celular al catalizar las reacciones de transpeptidación del peptidoglucano. Esta proteína permite que la síntesis de la pared celular continúe incluso en presencia de meticilina, al bloquear la unión de los antibióticos β -lactámicos a su sitio activo, pero permitiendo la transpeptidación

Aragão & Trajano, (2021) menciona que la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* se debe a la incorporación del elemento SSCmec, que incluye el complejo mec, en el cromosoma de la bacteria. El complejo mec alberga el gen mecA junto con sus genes reguladores mecR1 y mecI. Aunque su origen no está claro, se cree que está vinculado a estafilococos coagulasa negativos, ya que se han identificado mecA y un gen homólogo. Por el contrario **Cervantes et al., (2014)** en su estudio comparte que la resistencia a la meticilina en niveles extremadamente bajos puede deberse a la fuerte represión del gen mecA, controlado por el elemento regulador negativo mecI-mecR1 asociado con mecA.

Según **Giono-Cerezo et al., (2020)** en su estudio reporta que la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* y en estafilococos coagulasa negativos se debe a la presencia de una proteína adicional de unión a la penicilina, conocida como PBP2 β o PBP2a. Esta proteína es adquirida mediante un ADN externo llamado SCCmec, que se integra en el genoma estafilocócico. PBP2a pertenece a la subclase B1 de proteínas de unión a la penicilina de alto peso molecular, caracterizada por su baja afinidad hacia los antibióticos lactámicos, lo que concuerda con el estudio de **Sopena & Sabrià, (2020)** que mencionan que la PBP2a tiene una afinidad muy baja por estos antibióticos y se cree que contribuye al ensamblaje de la pared celular cuando las PBPs normales son inactivadas. El gen mecA se encuentra en un gran complejo genético móvil conocido como el cassette cromosómico mec del estafilococo. Se han identificado al menos ocho tipos de SCCmec, aunque algunos son más comunes que otros.

➤ **Resistencia a glucopéptidos (vancomicina):**

Andaluz, (1994) menciona que se encuentra la modificación de precursores de la pared celular: la resistencia a la vancomicina puede deberse a cambios en los precursores de la pared celular, donde los terminales D-Ala-D-Ala son reemplazados por D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser, lo que reduce la afinidad de la vancomicina por sus blancos. es importante mencionar la regulación génica, genes de resistencia como *vancA*, *vancB* y *vancC* pueden estar presentes en *M. sciuri* y ser activados en respuesta a la exposición a la vancomicina, lo que concuerda con **Palomo, (2020)** en su estudio se puede deducir que el principal gen responsable de la resistencia es *vancA*, que codifica una proteína que funciona como ligasa de D-alanina-D-lactato. Este metabolito, con baja afinidad por los glucopéptidos, reemplaza a la D-alanina-D-alanina en el peptidoglucano.

Según **Capinera, (2021)** la disminución en la sensibilidad a la vancomicina se debe a un engrosamiento de la pared celular bacteriana debido al aumento en la síntesis del peptidoglucano, lo que provoca que el antibiótico quede atrapado en las capas superficiales de la pared celular.

Oliveira, (2015) menciona en su estudio que la producción de glucopéptidos, que descomponen el anillo, es uno de los mecanismos de resistencia. Otro mecanismo está asociado con el gen *vancA*, que codifica una proteína con baja afinidad por la penicilina.

En el estudio de **Botelho, (2015)** la vancomicina se fija a los dos residuos terminales de D-alanina en la fracción pentapéptida del peptidoglicano, bloqueando las reacciones de

transglicosilación y transpeptidación, lo que interrumpe la síntesis de la pared celular. La resistencia ocurre a través de la modificación del terminal D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Ser, ocurre una resistencia de bajo nivel, produciendo una unión 7 veces menor o a D-Ala-D-Lac hace que ocurra una resistencia de alto nivel, reduciendo la unión 1,000 veces. Lo que concuerda con **Michael Page, (2022)** que manifiesta que los mecanismos de resistencia a glucopéptidos requieren la ayuda específica de enzimas para modificar los peptidoglicanos, un mecanismo es la resistencia basada en D-Ala-D-Lac, que reduce la unión de la vancomicina a los peptidoglicanos en 1,000 veces al eliminar un enlace de hidrógeno, provocando altos niveles de resistencia y dando lugar al gen VancA.

➤ **Comprobación de la hipótesis**

Mediante los resultados obtenidos en la presente investigación, esta cumple con la hipótesis donde existe la presencia de los genes de resistencia a betalactámicos más no se encontró genes de resistencia para glucopéptidos en *Mammaliicoccus sciuri* aislado de la carne de pollo que se expende en Ambato; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa (Ha).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- *M. sciuri* tiene genes de resistencia a betalactámicos, para lo cual se pudo observar la amplificación de la banda de 162 pb que se requería, es importante mencionar que la betalactamasa produce y modifica las proteínas de unión a penicilina (PBPs) para desactivar estos antibióticos.
- Aunque se identificaron genes de resistencia no se amplificó el gen *vancA*, sin embargo, existen diferentes mecanismos para que exista una resistencia en esta bacteria, por lo tanto, no se descarta la resistencia a glucopéptidos en *M. sciuri*: lo que hace posible, que existan otros genes o factores de resistencia, no identificados en este análisis.
- La bacteria *M. sciuri* emplea betalactamasas, modifica las PBPs, y utiliza bombas de reflujo para resistir a betalactámicos. Frente a la vancomicina, altera precursores y engrosa su pared celular. Además, puede adquirir genes de resistencia de otras bacterias

4.2. RECOMENDACIONES

- Implementar un sistema de monitoreo continuo en los puntos de venta de carne de pollo en Ambato para evaluar la prevalencia de diferentes bacterias y sus genes de resistencia a antibióticos. La vigilancia epidemiológica es crucial para detectar y controlar la propagación de bacterias resistentes.
- Promover políticas y regulaciones estrictas sobre el uso de antibióticos en la cría de pollos. Esto incluye la supervisión y control del uso de antibióticos para reducir la selección y propagación de bacterias resistentes en las explotaciones avícolas.
- Utilizar técnicas avanzadas de biología molecular y genómica, como la secuenciación de próxima generación, para una identificación más precisa y rápida de los genes de resistencia a antibióticos en *M. sciuri* y otras bacterias presentes en la carne de pollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andaluz. (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Publica de Mexico*, 36(4), 428–438.
- Angeli, A., Urbański, L. J., Capasso, C., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2022). Activation studies with amino acids and amines of a β -carbonic anhydrase from *Mammaliicoccus* (Staphylococcus) sciuri previously annotated as Staphylococcus aureus (SauBCA) carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 2786–2792. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2131780>
- Aragão, B. B., & Trajano, S. C. do. (2021). Staphylococcus Aureus, Um Perigo Oculto Em Queijo Coalho Caprino: Uma Revisão. *Avanços Em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 5*, 399–414. <https://doi.org/10.37885/211106681>
- Belhout, C., Boyen, F., Vereecke, N., Theuns, S., Taibi, N., Stegger, M., de la Fé-Rodríguez, P. Y., Bouayad, L., Elgroud, R., & Butaye, P. (2023). Prevalence and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococci (MRS) and Mammaliicocci (MRM) in Dromedary Camels from Algeria: First Detection of SCCmec-mecC Hybrid in Methicillin-Resistant Mammaliicoccus lentus. *Antibiotics*, 12(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040674>
- Boonchuay, K., Sontigun, N., Wongtawan, T., & Fungwithaya, P. (2023). Association of multilocus sequencing types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant Mammaliicoccus sciuri in animals in Southern Thailand. *Veterinary World*, 16(2), 291–295. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.291-295>
- Botelho, M. S. L. (2015). *Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia*

Burgos, C. V. (2017). *Artículo científico. 1*, 11–24.

Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC. In *Seimc*.

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>

Capinera, John L. (2021). EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Hypericum brasiliense* EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus schleiferi*. *Block Caving – A Viable Alternative?*, 21(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.02.027><https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/>

Castellano González, M. J., & Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismos de resistencia a glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 36–44.

Castellano, M., Perozo Mena, A., Leal A, J., & Maldonado M, C. (2018). Frecuencia y resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus*. *Kasmera*, 46(1), 26–39.

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(4), 196–204.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt144a.pdf>

Cotaquispe, R., Sarmiento, R., Lovón, S., & Rodríguez, J. (2021). Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus* spp con resistencia a meticilina en pollos comerciales.

Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú, 32(3), e20395.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v32i3.20395>

de Moura, G. S., de Carvalho, E., Ramos Sanchez, E. M., Sellera, F. P., Marques, M. F. S., Heinemann, M. B., De Vlieghe, S., Souza, F. N., & Mota, R. A. (2023). Emergence of livestock-associated *Mammaliicoccus sciuri* ST71 co-harboring *mecA* and *mecC* genes in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 283, 109792.

<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2023.109792>

Dhaouadi, S., Bouchami, O., Soufi, L., Dhaouadi, F., Chaari, S., Bouglita, W., Cherif, A., de Lencastre, H., Elandoulsi, R. B., & Miragaia, M. (2022). Frequent dissemination and carriage of an SCCmec-mecC hybrid in methicillin-resistant *Mammaliicoccus sciuri* in farm animals from Tunisia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, 228–235.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.09.007>

Garcia-Aroca, T., Souza, S. S. R., Ikimiukor, O. O., Marcovici, M. M., Smith, J. T., Amador, S., McGonagle, C. J., Nye, G. J., Needle, D. B., Gibson, R., & Andam, C. P. (2022). Genome Sequencing of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Mammaliicoccus sciuri* from Diseased Animals . *Microbiology Resource*

Announcements, 11(10), 16–18. <https://doi.org/10.1128/mra.00714-22>

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica de Mexico*, 51(SUPPL.3), 439–446. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900009>

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), 172–180.

<https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>

Hincapié, M. A. P., García, B. L. J., Gómez, M. D., Mejía, L. L., Holguín, T. A., Uribe, C. A.

- P., Valencia, O. L. N., & Berrouet, M. C. M. (2021). Reacciones adversas a betalactámicos : una revisión de tema. *Medicina UPB*, 40(1), 11.
<https://doi.org/10.18566/medupb.v40n1.a08>
- Iyer, K. M. (2013). Infection. *General Principles of Orthopedics and Trauma*, 17(2), 27–46.
https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4444-1_4
- Kos, A., Papić, B., Golob, M., Avberšek, J., Kušar, D., Ledina, T., Đorđević, J., & Bulajić, S. (2023). Genomic Insights into Methicillin-Resistant Staphylococci and Mammaliicocci from Bulk Tank Milk of Dairy Farms in Serbia. *Antibiotics*, 12(10), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12101529>
- Liliana1, G.-G., * N.-C. D., Perozo-Mena Armindo3, B.-G. J. y, & Milagros2, M. (2020). *Universidad del Zulia Facultad de Medicina Escuela de Medicina Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales Maracaibo , Venezuela Indizada en la Base de Datos LILACS*. 1–4.
- Máster, T. F. De, A, A. N. D. E. S., & Pollo, C. D. E. (2019). *Nálisis de sensibilidad a antimicrobianos de cepas bacterianas aisladas en carne de pollo*.
- Matas, L., Méndez, M., Rodrigo, C., & Ausina, V. (2008). Diagnóstico de las faringitis estreptocócicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(SUPPL. 13), 14–18. <https://doi.org/10.1157/13128775>
- Michael Page, I. (2022). *DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM Staphylococcus spp. ISOLADOS DE CÃES E ANIMAIS SILVESTRES*.
- Morejón, M. (2015). Glicopéptidos, origen y desarrollo actual. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 1–3. <http://scielo.sld.cu>
- Ncbi, S. A. L. (2022). *Explorador de taxonomía*.

- Nelli, A., Voidarou, C. C., Venardou, B., Fotou, K., Tsinas, A., Bonos, E., Fthenakis, G. C., Skoufos, I., & Tzora, A. (2022). *Staphylococci Isolates from the Mammary Secretion of Dairy Goats*.
- Oliveira. (2015). PADRÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE INFEÇÕES DA PELE E TECIDOS MOLES EM ANIMAIS DE COMPANHIA, PORTUGAL. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 1(April).
- Palomo, A. (2020). Resistencia a los glucopéptidos en enterococos. *Control Calidad SEIMC*, 1–9. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Vre.pdf>
- Patente, S. D. E. (2021). 2 389 364.
- Pérez, G. (2020). *Kasmera*. 5222(46).
- Polo, A. (2011). *EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO KIT DE PROMEGA M O D Andrés Felipe POLO-ÁLVAREZ 1 1*. 1–5.
- Roger Alberto Rabelo Florez. (2023). *Rarabelof*. 1–104.
<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/58315/rarabelof.pdf?sequence=1>
- Safety, M., & Sheet, D. (2012). *Nutrient Agar , Prepared*. 11–13.
- Sopena, N., & Sabrià, M. (2020). Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. *Medicina Clínica*, 118(17), 671–676. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(02\)72490-1](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(02)72490-1)
- Vallejo Pazmiño, G. I., Andrade Tacuri, C. F., Orellana Bravo, P. P., & Gerardo Ortiz, J. (2022). Resistencia de cepas de Staphylococcus aureus aislados en ambientes nosocomiales. *Revista Vive*, 5(13), 22–34.
<https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i13.127>

Van der Veken, D., Hollanders, C., Verce, M., Michiels, C., Ballet, S., Weckx, S., & Leroy, F. (2022). Genome-Based Characterization of a Plasmid-Associated Micrococcin P1 Biosynthetic Gene Cluster and Virulence Factors in *Mammaliicoccus sciuri* IMDO-S72. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(4), 1–23.
<https://doi.org/10.1128/aem.02088-21>

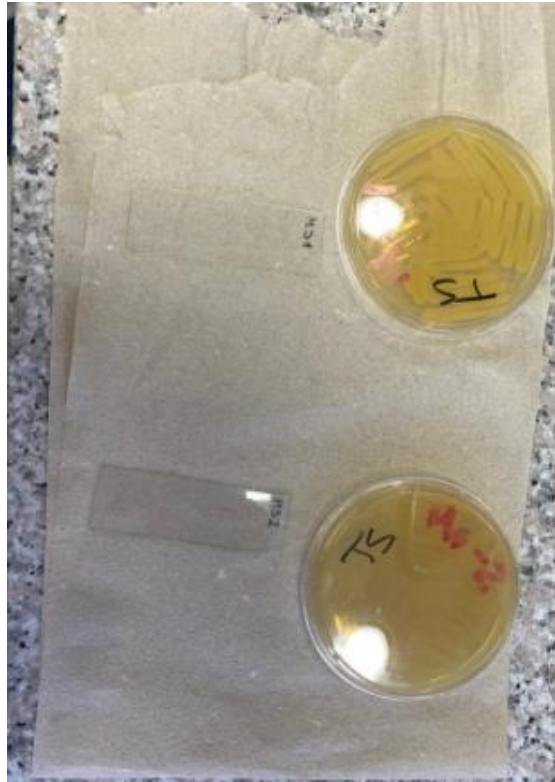
ANEXOS



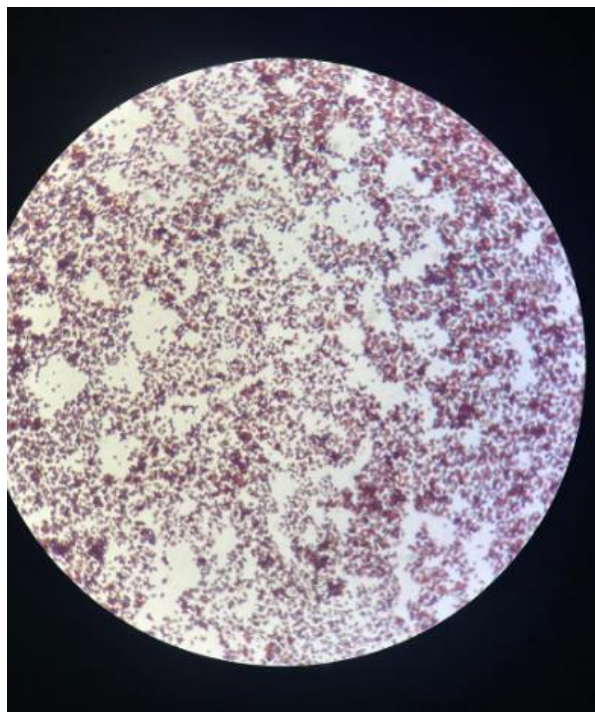
Agar para ir al autoclave



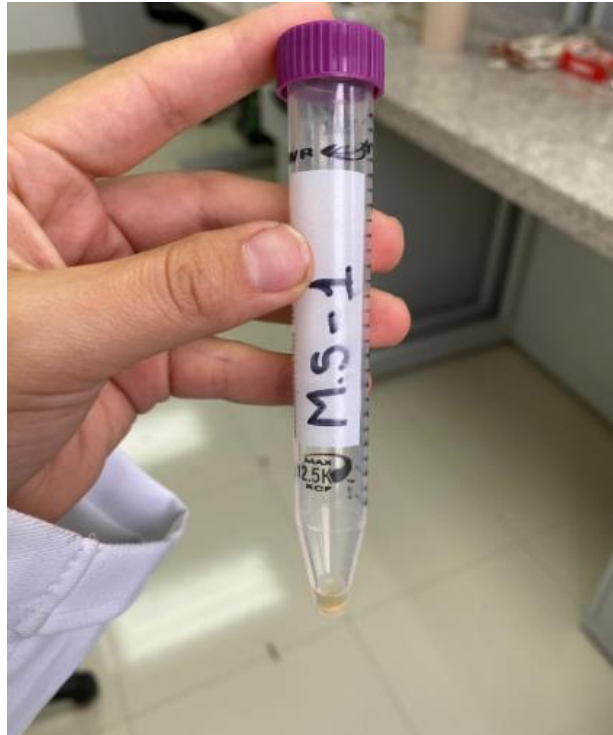
Asa de siembra con las bacterias



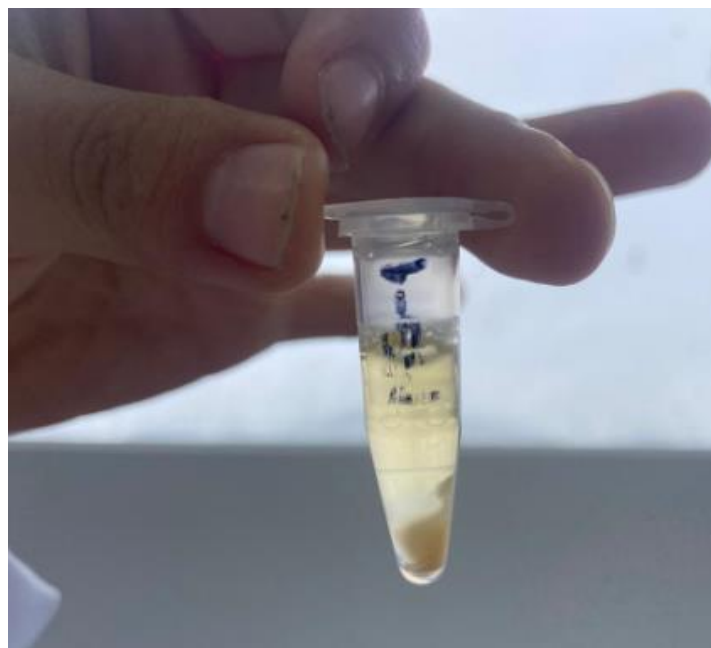
Muestras en agar tripticasa



Bacteria vista desde el microscopio



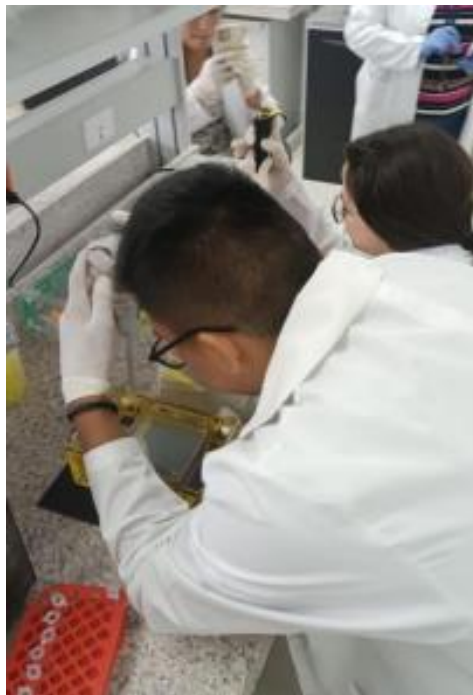
Extracción del ADN



PCR



PCR



Electroforesis en el gel de agarosa



Muestras listas para cargar



Geles en la cámara de electroforesis