



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella*
***spp.* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA”.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médica Veterinaria

Autora:

Paredes Mayorga Daniela Nicole

Tutora:

Herrera Yunga Vanessa del Rosario

LATACUNGA – ECUADOR

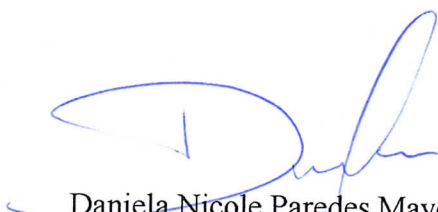
Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Paredes Mayorga Daniela Nicole, con cédula de ciudadanía N° 1805438452; declaro ser autora del presente proyecto de investigación: **“PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella spp.* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA”**, siendo la Doctora Mtr. Vanessa Del Rosario Herrera Yunga, Tutora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 20 de febrero del 2024



Daniela Nicole Paredes Mayorga
CC: 1805438452
Estudiante

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **PAREDES MAYORGA DANIELA NICOLE**, identificada con cédula de ciudadanía N° 1805438452, de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora. Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema, en calidad de Rectora y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “*PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE Salmonella spp. EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA*” la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico:

Fecha de inicio de la carrera: Abril 2019 – Agosto 2019

Fecha de finalización: Octubre 2023-Febrero 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de mayo del 2023

Tutora: MVZ. Vanessa Del Rosario Herrera Yunga

Tema: “**PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella spp.* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA**”

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

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

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

. La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.

a. La publicación del trabajo de grado.

b. La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

c. La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

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

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

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

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


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

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

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

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

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga a los 20 días del mes de febrero del 2024.



Paredes Mayorga Daniela Nicole

LA CEDENTE

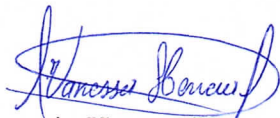
Dra. Idalia Eleonora Pacheco
Tigsalema.PhD
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella spp.* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATANCUNGA”, de Paredes Mayorga Daniela Nicole, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre-defensa.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



MVZ. Vanessa del Rosario Herrera Yunga, Mtr.

C.C: 1103758999

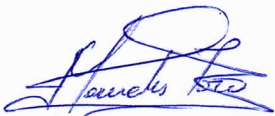
DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Paredes Mayorga Daniela Nicole, con el título de Proyecto de Investigación :“**PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella spp.* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA**”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

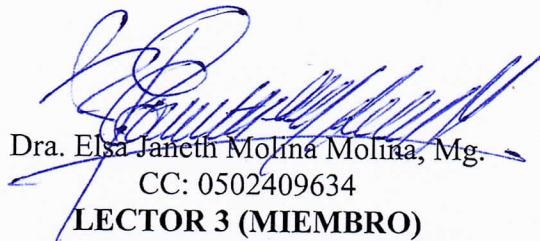
Latacunga, 20 de febrero del 2024



Dra. Blanca Mercedes Toro Molina, Mg.
CC: 0501720999
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Dra. Nancy Margoth Cueva Salazar, Mg.
CC: 0501616353
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Dra. Elsa Janeth Molina Molina, Mg.
CC: 0502409634
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en este largo camino, para poder culminar con éxito mi carrera.. A mi madre Olga por su dedicación y apoyo incondicional durante toda mi vida y a mi padre William que está en el cielo por haberme apoyado en todo momento y por ser un pilar importante en mi formación como persona, de quien aprendí a perseverar.

A mi hermano, mi abuelita, mis tíos y primos por siempre darme palabras de aliento y fuerza para seguir adelante.

A mi tutora Vanessa del Rosario Herrera Yunga, mil gracias por toda su amistad, su paciencia y apoyo brindado durante todo este tiempo.

A mis amigas por haberme brindado una gran amistad, y apoyo incondicional durante toda la carrera, en especial a Ruth mi mejor amiga por acompañarme en todo este proceso.

A todas las personas de buen corazón que se han cruzado en mi camino y me han ofrecido su apoyo y también su ayuda.

Daniela Nicole Paredes Mayorga

DEDICATORIA

A todas las mujeres de ciencia, este trabajo está dedicado a ustedes, mujeres valientes e inteligentes que día a día abren camino en el mundo. Su pasión por la ciencia y su tenacidad para superar obstáculos son una inspiración para mí y para muchas otras personas. Son un ejemplo de que la fuerza y la determinación no tienen género.

A los estudiantes apasionados por el conocimiento, los animo a perseguir sus sueños con valentía y determinación. No importa cuán difícil parezca el camino, siempre hay una luz al final. Sientan orgullo por sus logros y continúen luchando por alcanzar aún más.

Daniela Nicole Paredes Mayorga

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella*
spp. EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA

Autor:

Paredes Mayorga Daniela Nicole

RESUMEN

La salmonelosis es una enfermedad bacteriana que ataca a cuyes, esta puede tener un curso epidémico inicial, seguido de un comportamiento endémico, esto significa que la enfermedad puede presentarse en brotes repentinos, pero luego se convierte en una enfermedad persistente dentro de la población convirtiéndola en una amenaza silenciosa.

El objetivo de este proyecto fue determinar los genes de resistencia de *Salmonella* spp. a partir de 24 muestras (hisopados rectales, hígado, abscesos y pulmón). Estas fueron identificadas como *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas, posteriormente fueron conservadas en glicerol al 50% para su análisis molecular posterior. La identificación de los genes de resistencia fue realizada mediante PCR convencional utilizando los genes *sul2*, *qnrB* y *blaCTX-M-9* pertenecientes a sulfonamidas, quinolonas y betalactamasas, como control positivo se utilizó la cepa ATCC 14028 de *Salmonella* Typhimurium y control negativo *E. coli*. El resultado mostró que el 83% de las muestras fueron resistentes al gen *sul2* con un tamaño de banda de 673 pb (20/24). Sin embargo, no se encontró resistencia al gen *qnrB* (Quinolonas) o *blaCTX-M-9* (betalactamasas) (0/24). Los resultados de este estudio resaltan la importancia de la vigilancia continua de la resistencia a los antibióticos en *Salmonella* en las granjas cavícolas ya que el uso de sulfonamidas en este estudio muestra que existe resistencia, por tanto, las quinolonas y fluoroquinolonas serían opción.

Palabras clave: *Salmonella*, Genes de Resistencia, Cuyes, PCR.

COTOPAXI TECHNICAL UNIVERSITY

AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES FACULTY

TOPIC: “ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS FROM *Salmonella* spp. IN GUINEA PIGS FROM LATACUNGA CITY”.

Author:

Paredes Mayorga Daniela Nicole

ABSTRACT

Salmonellosis is a bacterial disease, what attacks guinea pigs, this can have an initial epidemic course, followed by endemic behavior, this means that the disease can occur in sudden outbreaks, but then, it becomes a persistent disease within the population, making it an a silent threat. The aim this project was to determine the resistance genes from *Salmonella* spp., starting 24 samples (rectal swabs, liver, abscesses and lung). These were identified as *Salmonella* spp., through biochemical tests, subsequently, they were preserved in 50% glycerol for subsequent molecular analysis. The resistance genes identification was made by conventional PCR using the *sul2*, *qnrB* and *blaCTX-M-9* genes belonging to sulfonamides, quinolones and beta-lactamases, as a positive control was used the ATCC 14028 strain from *Salmonella* Typhimurium and a negative control was *E. coli*. The result showed, what 83% the samples were resistant to the *sul2* gene with a band size 673 bp (20/24). However, it was not found no resistance to the *qnrB* (Quinolones) or *blaCTX-M-9* (betal-lactamases) gene (0/24). The results this study highlight the importance from antibiotic resistance continuous surveillance in *Salmonella* in cattle farms, since the sulfonamides use this study shows, which exists resistance, therefore, quinolones and fluoroquinolones would be an option.

Keywords: *Salmonella*, guinea pigs, antimicrobial resistance, *sul2*, *qnrB*, *blaCTX-M-9*, public health.

INDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	i
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iv
AVAL DEL LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	x
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.	2
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
5. OBJETIVOS	4
5.1 Objetivo General.	4
5.2 Objetivos Específicos	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	5
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	5
7.1 El cuy	5
7.2 Epidemiología de la <i>Salmonella</i>	6
7.3 Generalidades de la <i>Salmonella</i>	7
7.4 Características Microbiológicas de la salmonella	8
7.5 Pruebas de identificación de sensibilidad antibiótica	10

7.6 Agentes Microbianos usados en veterinaria para el tratamiento de salmonella	11
7.7 Mecanismos de resistencia.	12
7.8 Genes de resistencia	13
7.9 Prueba para detectar los genes de resistencia	14
7.10 Crio conservación	18
7.11 Extracción de ADN	18
7.12 Cuantificación del ADN.	19
7.13 Electroforesis	19
8. VALIDACIÓN DE LAS HIPÓTESIS	19
9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	20
9.1 Ubicación del experimento	20
9.2 Diseño experimental y tipo de investigación	20
9.3 Muestra	20
9.4 Fase de laboratorio	20
9.4.2 Pruebas bioquímicas	22
Resultados de las pruebas microbiológicas	22
9.5 Extracción de DNA	24
9.6 PCR	24
9.6.1 Condiciones de la PCR	25
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
14. BIBLIOGRAFIA	31
15. ANEXOS	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de salmonella spp	18
Tabla 2Perfiles de genes de resistencia usados para diferentes antibióticos.	24
Tabla 3Perfiles de genes de resistencia para betalactamasas.	25
Tabla 4Condiciones PCR para genes sul2 y qnrB	26
Tabla 5Condiciones PCR para genes blaCTX-M-9	27

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella spp* EN CUYES DE LA CIUDAD DE LATACUNGA

Fecha de inicio: Octubre 2023

Fecha de finalización: Febrero 2024

Lugar de ejecución

Provincia Cotopaxi, ciudad de Latacunga

Facultad que auspicia

Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia

Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Prevención de enfermedades infecciosas y parasitarias en animales domésticos de la provincia de Cotopaxi del Ecuador.

Equipo de Trabajo

Mvz. Vanessa Herrera Yunga. Mtr.

Daniela Nicole Paredes Mayorga

Área de Conocimiento

62 Agricultura, Silvicultura y Pesca

SUB ÁREA

64 Veterinaria

Línea de investigación

Salud Animal

Sub líneas de investigación de la Carrera

Microbiología, Parasitología, Inmunología y Sanidad Animal.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

Las infecciones por *Salmonella* multirresistente están poniendo en jaque la producción de cuyes en Ecuador, en los últimos años, se ha observado un aumento alarmante de la resistencia a los antibióticos en *Salmonella spp.*, el patógeno responsable de la salmonelosis, una enfermedad que afecta a miles de cuyes cada año.

Esta situación representa una grave amenaza para la salud de los animales, la economía de los productores y la salud pública, las opciones de tratamiento tradicionales para la salmonelosis son cada vez menos efectivas. Las fluoroquinolonas, sulfamidas y betalactámicos, pueden llegar a ser ineficaces contra muchas cepas de *Salmonella* debido a la aparición de genes de resistencia bacteriana.

Esta investigación tiene como objetivo identificar los genes de resistencia a antibióticos presentes en cepas de *Salmonella* aisladas de cuyes en Latacunga, para ello se utilizaron técnicas microbiológicas clásicas y pruebas moleculares.

Los resultados de este estudio proporcionarán información crucial a los productores de cuyes para que puedan seleccionar antibióticos más eficaces y reducir las pérdidas económicas por gastos económicos al comprar antibióticos que ya no muestran eficiencia. Además, la investigación contribuirá en la batalla contra la resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública de gran importancia a nivel mundial.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.

Directos: Granjas dedicadas a la crianza de cuyes de la ciudad de Latacunga.

Indirectos: Productores de cuyes de los diferentes lugares de la provincia de Cotopaxi.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La resistencia antimicrobiana es un desafío persistente y en constante crecimiento. Esta problemática se vuelve aún más alarmante cuando un microorganismo exhibe múltiples

mecanismos de resistencia y tiene la capacidad de transmitirlos tanto a su descendencia como a otras bacterias, independientemente de si son de la misma especie o de especies diferentes (1).

En Cotopaxi, la producción anual es de 60.000 animales entre vivos y faenados, mientras que la demanda es de 664.250. Los animales para producción representan el 40% del valor del sector agropecuario y son fuente de ingresos para una de cada cinco personas, pero pueden verse afectados por problemas de sanidad y bienestar (2).

Los cobayos, al igual que otras especies, pueden padecer diversas enfermedades infecciosas, y la falta de conocimiento sobre alternativas en salud animal es la principal causa de la mortalidad en la cría de estos animales. La salmonelosis es una de las enfermedades más perjudiciales para los cobayos, ya que dificulta el progreso de la crianza y su tratamiento no ofrece resultados satisfactorios con medicamentos específicos, lo que representa una pérdida considerable para los criadores (3).

Los brotes epidémicos de salmonelosis en países en vías de desarrollo pueden asociarse con tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, sobre todo cuando son provocados por cepas resistentes a los antibióticos (4). La FAO considera que la salmonella es la enfermedad más grave que afecta a los cuyes, contribuyendo hasta en un 95% de las muertes relacionadas con diversas causas. La susceptibilidad a la salmonelosis varía según la edad de los cuyes: los lactantes muestran una mayor tasa de morbilidad, alcanzando hasta un 52.70%, seguidos por los adultos con un 30.65% y los de recría con un 19.83% (5).

En Ecuador, según el "Diagnóstico del Sistema de Producción de Cuyes en Pequeños y Medianos Productores de la Sierra del Ecuador", elaborado por el Ing. José Gabriel Camacho MBA y la Dra. Rocío Patiño Mg, la salmonelosis es uno de los principales problemas en los criaderos de cuyes, con una presencia del 56% en esta enfermedad en estos animales (6).

Por muchos años, los antibióticos han sido extensamente empleados en la medicina humana y veterinaria, no solo para combatir enfermedades, sino también como medidas preventivas y para promover el crecimiento. Además, se ha reportado en varios países su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades (7). Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos en diversos microorganismos patógenos, incluyendo *Salmonella* spp., ha aumentado la preocupación a nivel mundial en términos de salud pública, ya que el desarrollo de resistencias puede comprometer la efectividad del tratamiento de infecciones en humanos (8).

En cuyes, los antibióticos más utilizados para combatir la salmonelosis son las fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfas y quinolonas. La efectividad de los tratamientos se ve afectada por la falta de un diagnóstico correcto y la generación de resistencia de la bacteria a los antibacterianos, por lo que la elección del agente terapéutico debe estar basada en pruebas de susceptibilidad (9).

El aumento de aislados de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Estas cepas resistentes no sólo amenazan la salud animal, sino que también pueden transmitirse a los humanos a través de la cadena alimentaria, lo que las convierte en un verdadero problema de salud pública (10). Los genes de resistencia a estos antimicrobianos se asocian a elementos genéticos móviles como plásmidos e integrones. Estos últimos son elementos de expresión génica que incorporan genes sin promotor, convirtiéndolos en genes funcionales (11).

Según diversos estudios, se han logrado demostrar genes ya resistentes, dentro de esto podemos mencionar los genes *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac (62)-Ib*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *cat1*, *cat2*, *cmlA*, *cmlB*, *sul1* y *sul2* asociados a tetraciclinas, fenicoles y sulfamidas. El uso inadecuado de agentes antimicrobianos en cobayos para controlar patógenos entéricos afecta la sustentabilidad alimenticia de la población rural. Por ello, es importante identificar el patógeno y su resistencia para un adecuado control (12).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Identificar los genes *qnrB*, *sul2* y *blaCTX-M-9* de resistencia a *Salmonella spp.* en colonias aisladas de órganos en cuyes de la ciudad de Latacunga, para poder establecer nuevos protocolos terapéuticos.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar los genes *qnrB* y *sul2* de resistencia bacteriana en aislados de *Salmonella spp.* mediante la aplicación de PCR y electroforesis.
- Identificar los genes *blaCTX-M-9* de resistencia bacteriana en aislados de *Salmonella spp.* mediante la aplicación de PCR y electroforesis.

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

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADO	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Aislamiento, crio conservación al 50% y extracción de ADN de Salmonella spp. a partir de muestras con sospecha de la bacteria.	Reactivación de las colonias en un medio de cultivo. Confirmación de la presencia de Salmonella spp. mediante pruebas bioquímicas. Preservación de las muestras a largo plazo por crio conservación al 50% en glicerol. Extracción de ADN para análisis moleculares.	El 100% de las muestras dieron un resultado positivo a Salmonella tras su aislamiento e identificación, mientras que el 72,73% de las muestras fueron viables al ser conservadas en un porcentaje de 50% de glicerol. La extracción de ADN fue exitosa al tener una cantidad de 3,14 ng/ul.	Informe de validación de los resultados obtenidos a partir de las muestras.
Identificar los genes sul2, qnrB y blaCTX-M-9 que codifican a la resistencia bacteriana aislados de Salmonella spp. mediante la aplicación de la PCR-m.	Utilización de cebadores para amplificar secuencias específicas de ADN que están presentes en genes que codifican para la resistencia a los antibióticos.	El 91.67% fueron positivas para el gen sul2, lo que indica una alta prevalencia de resistencia a las sulfonamidas mientras que no se detectó resistencia al gen qnrB en ninguna de las 24 muestras (0%).	Informe de validación de los resultados de prueba PCR.

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 El cuy

El cuy, también conocido científicamente como 'Cavia porcellus', es un roedor que se reconoce internacionalmente como mascota y a menudo se utiliza para probar nuevos medicamentos y alimentos. En Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia, el cuy ha adquirido un estatus particular como un alimento altamente nutritivo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) (13).

órgano más comúnmente afectado, presentando lesiones en el 87.7% de los casos, seguido por el intestino, pulmón y bazo. Se registraron lesiones adaptativas solo en el bazo, donde se identificó hiperplasia folicular linfoide en seis animales ($7.4 \pm 0.06\%$), aumento de tamaño (megalia) en el bazo en 25 cobayos ($30.9 \pm 0.07\%$), en el ganglio mesentérico en 11 cobayos ($13.6 \pm 0.08\%$), y en un caso en el riñón (1/81). Además, el hígado fue el órgano con mayor frecuencia de aislamiento de *Salmonella* ($24.1 \pm 0.05\%$, 68/282), seguido por el bazo, intestino, útero, pulmón y vesícula biliar (18).

7.3 Generalidades de la *Salmonella*

7.3.1 Descubrimiento y nomenclatura:

La bacteria *Salmonella*, que fue descubierta en 1855 por Theobald Smith y nombrada en honor al Dr. Daniel Salmon, es un género de bacilos gramnegativos que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se han identificado más de 2,500 serotipos de *Salmonella*, y se destaca que *S. enterica* subsp. *enterica* es responsable de más del 50% de las infecciones causadas por este género bacteriano (19).

7.3.2 Clasificación taxonómica

Tabla 1 Clasificación taxonómica de salmonella spp

Dominio	Bacteria
Filo	<i>Proteo bacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Entero bacteria</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Salmonella</i>

Fuente: Galván Z, 2017.

7.3.3 Especies y subespecies

El género *Salmonella* se compone de dos únicas especies:

- **S. entérica:** Esta especie representa la gran mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales. Se subdivide en seis subespecies:

- *S. enterica* subsp. entérica: La subespecie más común, responsable de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos.
- *S. enterica* subsp. salamae: Asociada principalmente a reptiles y cerdos.
- *S. enterica* subsp. arizonae: Afecta principalmente a aves y reptiles, aunque puede causar infecciones en humanos.
- *S. enterica* subsp. diarizonae: Similar a *S. enterica* subsp. arizonae, pero con un rango de hospedadores más amplio.
- *S. enterica* subsp. houtenae: Poco común, se ha asociado a infecciones en humanos y animales.
- *S. enterica* subsp. indica: Afecta principalmente a cerdos y bovinos.
- **S. bongori**: Esta especie es menos común que *S. entérica* y se asocia principalmente a infecciones en reptiles (20).

7.3.4 Genoma de la *Salmonella*

Serotipos: Kauffman y White desarrollaron un sistema para clasificar aún más *Salmonella* por serotipo, basándose en tres antígenos: somático (O), capsular (K) y flagelar (H).

- Antígeno O: Es un componente de la membrana bacteriana externa. Un serotipo puede expresar más de un antígeno O.
- Antígeno H: Se encuentra en los flagelos y participa en la respuesta inmunitaria del huésped. La mayoría de *Salmonella* spp. son difásicas, lo que significa que pueden expresar dos proteínas flagelares diferentes.
- Antígeno K: Son polisacáridos capsulares. Los antígenos Vi son un subtipo especial de antígeno K que se encuentra solo en tres serotipos patógenos: Paratyphi C, Dublín y Typhi (21).

7.4 Características Microbiológicas de la salmonella

7.4.1 Colonias

Una colonia se forma a partir de la proliferación de un microorganismo en la superficie de un medio sólido, formando una masa compuesta por millones de organismos que son visibles a simple vista. La observación minuciosa de las características de la colonia es fundamental para identificar el microorganismo. La morfología de la colonia está relacionada con las propiedades

de la célula de origen y la masa celular. Entre las características que se examinan de cada colonia se encuentran: a) Tamaño, el cual es característico y uniforme para cada especie o tipo, variando desde dimensiones muy pequeñas o apenas perceptibles hasta unos centímetros de diámetro. b) Consistencia, que puede ser blanda, seca o viscosa. c) Forma, que está determinada por el borde y el espesor. El borde puede ser liso, ondulado, aserrado, entre otros, mientras que el espesor varía según la elevación, pudiendo ser plana, elevada, convexa, cónica, crateriforme, etc (22).

7.4.2 Medios de cultivo

Son herramientas fundamentales para el crecimiento y la identificación de microorganismos. Estos proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento, la diferenciación y la identificación de bacterias, hongos y virus, lo que los convierte en una pieza fundamental para la microbiología. (23)

Enriquecimiento.

- Caldo Tetracionato: Se emplea para el cultivo selectivo de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces, alimentos y otros materiales relevantes para la salud pública. Está compuesto por peptona, carbonato de calcio, sales biliares y tetracionato. *Salmonella* spp. cuenta con la enzima tetracionato reductasa, lo que le permite crecer en este medio a pesar de la toxicidad del tetracionato (24).

Aislamiento.

- Agar Sangre: Medio general para el crecimiento de bacterias. Permite observar la hemólisis (destrucción de glóbulos rojos) producida por algunas bacterias. (25)
- Agar MacConkey: Medio poco selectivo que permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram negativas fermentan la lactosa y forman colonias de color rojo, mientras que las Gram positivas no fermentan la lactosa y son incoloras (26).
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB): Similar al Agar MacConkey, pero permite una mejor diferenciación entre coliformes (colonias azul-verdosas) y otros Gram negativos (colonias incoloras) (27).

- Agar Hektoen: Medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp. Contiene sales biliares, verde brillante y tiosulfato de sodio. *Salmonella* spp. produce H₂S, dando colonias de color verde claro con precipitado negro (28).
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD): Este medio es moderadamente selectivo y diferencial, diseñado para aislar y distinguir patógenos entéricos Gram negativos, como *Salmonella* spp. Contiene extracto de levadura, desoxicolato de sodio, xilosa, lisina, lactosa y sacarosa. Facilita la distinción entre *Salmonella* spp. y otros entéricos como *Shigella* y coliformes (29).

Pruebas.

- Prueba de Indol: Se utiliza para determinar si la bacteria es capaz de desdoblar el indol. Se utiliza el reactivo de Kovacs, que forma un complejo rojo con el indol. *Salmonella* spp. no produce indol (30).
- Tinción de Gram: Permite clasificar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Se realiza una tinción primaria, decoloración y tinción de contraste (31).

7.5 Pruebas de identificación de sensibilidad antibiótica

7.5.1 Técnica en disco en agar

La prueba de difusión en agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias de comunes de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales (32).

7.5.2 E-TEST

Se incorpora una serie de diluciones dobles de un antibiótico en una tira portadora de plástico desde la cual el antibiótico se difunde libremente en el agar, creando un gradiente de difusión a lo largo de la tira. agar HTM o agar chocolate suplementado (33). En este método determina únicamente la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se encuentra en la interfaz de una elipse, es importante realizar una lectura cuidadosa, incluso con la ayuda de una lupa, especialmente si la interfaz cae entre dos puntos. Además, se debe observar la presencia de pequeñas colonias en las áreas de bajo crecimiento, ya que esto puede indicar resistencia o niveles bajos de la misma (34).

7.5.3 La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) representa la concentración más baja de un antibiótico, medida en $\mu\text{g/ml}$, que detiene el crecimiento de una cepa bacteriana particular. En IDEXX, se emplea un sistema comercial automatizado para calcular las CMI, utilizando un método de prueba de sensibilidad cuantitativo. Este enfoque ayuda a determinar qué clase de antibiótico es más eficaz al proporcionar información sobre la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (35).

La CMI se presenta primero seguida de una interpretación que puede ser S (Sensible), I (Intermedia) o R (Resistente), y luego la CMI en $\mu\text{g/ml}$.

- **Sensible (S):** Indica que el microorganismo es inhibido por la concentración sérica habitual del fármaco.
- **Intermedia (I):** Indica que el microorganismo solo es inhibido por la dosis máxima recomendada del fármaco.
- **Resistente (R):** Indica que el microorganismo es resistente a los niveles habituales del fármaco en el suero (36).

7.6 Agentes Microbianos usados en veterinaria para el tratamiento de salmonella

En Medicina Veterinaria, se pueden utilizar varios antibióticos para tratar infecciones por *Salmonella* en animales, dependiendo de la especie afectada, la gravedad de la infección y la sensibilidad de la bacteria a los diferentes antibióticos. Es importante destacar que la elección del antibiótico debe basarse en pruebas de sensibilidad bacteriana y debe ser determinada por un veterinario capacitado (37).

- **Fluoroquinolonas:** Ejemplos de fluoroquinolonas utilizadas en animales incluyen enrofloxacina y marbofloxacina. Estos antibióticos tienen un amplio espectro de acción y pueden ser efectivos contra *Salmonella* en muchas especies (38).
- **Tetraciclinas:** Las tetraciclinas, como la doxiciclina y oxitetraciclina, también se utilizan para tratar infecciones por *Salmonella* en animales. Tienen una buena actividad contra bacterias Gram negativas, incluyendo *Salmonella* (39).
- **Quinolonas:** Las quinolonas, como la ciprofloxacina, ofloxacina y levofloxacina, constituyen un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro que se dirigen a la síntesis del ADN. Estos medicamentos inhiben directamente la replicación del ADN al interactuar con dos enzimas específicas: el ADN girasa y la topoisomerasa IV. Han

sido ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones tanto intra como extrahospitalarias, así como en la agricultura y en la industria alimentaria. Sin embargo, este uso extendido ha llevado a un aumento en la resistencia a las quinolonas, un problema cada vez más común debido a la constante exposición de diversos microorganismos a estos medicamentos (40).

- **Sulfonamidas:** Estos antibióticos como trimetoprima-sulfametoxazol y sulfadiazina se utilizan a menudo en combinación, para tratar infecciones por Salmonella en animales. Tienen un amplio espectro de acción y pueden ser eficaces en el tratamiento de ciertas cepas de Salmonella (41).
- **Betalactámicos:** Los betalactámicos, tales como la penicilina, amoxicilina, ampicilina, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam, son agentes bactericidas que ejercen su acción mediante dos mecanismos principales: la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y la inducción de la autólisis bacteriana (42).

7.7 Mecanismos de resistencia.

Cuando se menciona la resistencia antimicrobiana, se hace referencia a la capacidad de un microorganismo para resistir y sobrevivir a los efectos de un antibiótico, o a cómo una bacteria puede reducir o neutralizar la acción de los agentes antimicrobianos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos mediante mutaciones genéticas o el intercambio de material genético con otras bacterias o virus. Estos mecanismos incluyen la transformación, la transducción, la transposición y la conjugación (43).

La resistencia natural o intrínseca es inherente a las bacterias y estaba presente antes del uso de antibióticos, en contraste, la resistencia adquirida implica un cambio genético en la bacteria y constituye un desafío clínico. En resumen, si una bacteria desarrolla resistencia a un antibiótico, dicho antibiótico ya no será eficaz contra esa bacteria. La resistencia adquirida puede ser temporal o permanente y puede ser causada por mutaciones genéticas o por la incorporación de material genético externo (44).

Los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias involucran la utilización de bombas de eflujo, la modificación o desactivación del antibiótico a través de enzimas hidrolíticas, la obstrucción de la penetración del antibacteriano, la alteración de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, la formación de biofilms y el aumento en la expresión del sitio objetivo (45).

Los principales mecanismos de resistencia incluyen:

- Producción de enzimas: Las bacterias pueden producir enzimas específicas que modifican o inactivan el antibiótico, como las betalactamasas que degradan los antibióticos betalactámicos.
- Modificación del blanco: Las bacterias pueden modificar la diana celular del antibiótico, ya sea por mutación o por la producción de una diana alternativa, lo que reduce la eficacia del antibiótico.
- Bombas de eflujo: Las bacterias pueden expulsar el antibiótico al exterior celular mediante bombas de expulsión activa, impidiendo que alcance su objetivo dentro de la célula.
- Permeabilidad de la membrana: Las bacterias pueden alterar la permeabilidad de su membrana celular, dificultando el acceso del antibiótico a su diana (46).

7.8 Genes de resistencia

Quinolonas: Los genes *qnr* han sido identificados en enterobacterias como *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Providencia stuartii* y *Salmonella spp.* Las secuencias que codifican las proteínas Qnr se hallan ampliamente distribuidas en los genomas de las enterobacterias (47).

- *qnrB*, *qnrD*, *qnrR*: Actúa uniéndose y protegiendo a la girasa y a la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas.
- *aac*: Codifica una variante aminoglucósido acetiltransferasa, capaz de inactivar ciprofloxacina a través de la acetilación de su sustituyente piperazinil (48).

Tetraciclinas: Son capaces de expresar proteínas con afinidad diferencial a diferentes tipos de tetraciclinas. Se ha reportado que las bombas Tet(A), Tet(B) y Tet(K) son capaces de expulsar tetraciclina, minociclina y doxiciclina a diferentes grados. TetA (A) en dos aislados veterinarios de *Salmonella* mostraron una especificidad de sustrato alterada con una susceptibilidad reducida a la minociclina y las glicilciclinas (49).

Fenicoles: Los genes que codifican para los distintos tipos de CAT, se encuentran ampliamente distribuidos en cepas de enterobacterias, codificados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano, asociados a la presencia de transposones e integrones (50)

- *cat1*

- cat2
- cmlA
- cmlB

Sulfamidas: Codifican la resistencia a las sulfonamidas en Salmonella

- sul1: Se encuentra en el segmento conservado 3' (3'CS) de los integrones de clase 1 y es el más común.
- sul2: Se asocia con plásmidos multicopia pequeños o grandes plásmidos transmisibles de multirresistencia (51).

Betalactámicos: Son un grupo de enzimas que confieren resistencia bacteriana a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos codificados en plásmidos, como ejemplo blaTEM, blaSHV, blaCTX y Amp-C (52).

7.9 Prueba para detectar los genes de resistencia

7.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR ha ganado importancia en el diagnóstico debido a su precisión para identificar el agente infeccioso, y también por ser el estándar para caracterizar sus genotipos de resistencia y virulencia. El procedimiento de PCR convencional toma alrededor de 12 horas y se divide en tres etapas (53).

En la primera etapa, se extrae el material genético. La segunda etapa, realizada en un termociclador, implica la amplificación del ADN. Este equipo permite alcanzar las temperaturas necesarias para cada paso del ciclo de amplificación: desnaturalización del ADN, hibridación de cebadores y extensión catalizada por el ADN polimerasa. La amplificación se repite un número determinado de veces, duplicando el número de moléculas de producto. Así se produce una cantidad elevada de amplicones, detectando incluso pequeñas cantidades iniciales de ADN. En la tercera etapa, los amplicones se detectan mediante electroforesis en gel de agarosa. Para agilizar el diagnóstico, se ha desarrollado la PCR en tiempo real, que permite obtener resultados en pocas horas al combinar la amplificación con la detección de los amplicones en paralelo (54).

7.9.2 Perfil de genes de resistencia

Un estudio en Lima, Perú, realizado por Meylin Huamán encontró que 35 cepas de *Salmonella Typhimurium* de cuyes de crianza intensiva tenían genes de resistencia a diversos antimicrobianos, los genes usados en este estudio fueron los siguientes (55).

Tabla 2 Perfiles de genes de resistencia usados para diferentes antibióticos.

Genes	Nombre del primer	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)
QnrB	QnrB-F:	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG	469
	QnrB-R:	ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC	
QnrD	QnrD-F:	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AATA	582
	QnrD-R:	AAC AAG CTG AAG CGC CTG	
QnrS	QnrS-F:	ACG ACAT TCG TCA ACT GCAA	417
	QnrS-R:	TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC	
aac(6)-LB	aac(6)-LB-F:	TAA ATT GGT AAA TCG AT	482
	aac(6)-LB-R:	CCC GCT TTC TCG TAG CA	
tetA	tetA-F:	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	210
	tetA-R:	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	
tetB	tetB-F:	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	659
	tetB-R:	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	
tetC	tetC-F:	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	418
	tetC-R:	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	
tetD	tetD-F:	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	787
	tetD-R:	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC	
Cat1	Cat1-F:	CTT GTC GCC TTG CGT ATA AT	508
	Cat1-R:	ATC CCA ATG ATG AAC CTG AA	
Cat2	Cat2-F:	AAC GGC ATG ATG AAC CTG AA	547
	Cat2-R:	ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG	
Cm1A	Cm1A-F:	CGC CAC GGT GTT GTT GTT AT	531
	Cm1A-R:	GCG ACC TGC GTA AAT GTC AC	
Cm1B	Cm1B-F:	ACT CGG CAT GGA CAT GTA CT	394
	Cm1B-T:	ACG GAC TGC GGA ATC CAT AG	
Sul1	Sul1-F:	TCA CCG AGG ACT CCT TCT TC	840
	Sul1-R:	CAG TCC GCC TCA GCA ATA TC	
Sul2	Sul2-F:	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA	673

Sul2-R:

GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT

 Fuente. Huamán M, Pérez C, Rodríguez J, Killerby M, Lovón S, Chauca L. 2020

Gen qnrB

El gen qnrB es una variante del gen qnr que se encuentra en bacterias patógenas, especialmente en enterobacterias como *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Providencia stuartii* y *Salmonella spp.* Este gen codifica para una proteína denominada QnrB, que confiere resistencia a las quinolonas. La proteína QnrB actúa uniéndose y protegiendo a la girasa y a la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas, lo que permite a las bacterias resistir a estos antibióticos (56).

Gen sul2

El gen sul2 es una dihidropteroato sintasa resistente a las sulfonamidas, comúnmente hallada en pequeños plásmidos de bacterias Gram-negativas. Se ha evaluado su prevalencia entre 413 patógenos importantes, analizando genomas secuenciados, plásmidos y ensamblajes de genomas completos disponibles en NCBI o IslandViewer. Los resultados muestran una variabilidad en la prevalencia de sul2 entre las especies, destacando una alta presencia en *Achromobacter xylosoxidans* (21.74% en cromosomas, 1.53% en genomas completos, etc.) y *Acinetobacter indicus* (42.86% en cromosomas, 16.88% en plásmidos, etc.) (57).

De igual manera un Ecuador, realizado por Diego Martín Cushicóndor Collaguazo, encontró que 5 cepas de *Salmonella Infantis* de pollos de engorde tenían genes de resistencia a β -lactámicos, los genes usados en este estudio fueron los siguiente (58).

Tabla 3 Perfiles de genes de resistencia para betalactamasas.

Genes	Nombre del primer	del	Secuencia 5' a 3'	Tamaño de amplicón (pb)
blaTEM-1	TEM	front	GCGGAACCCCTATTTG	964
	P1			
blaSHV	TEM C-R-ny		ACCAATGCTTAATCAGTGAG	854
	SHV OS5		TTATCTCCCTGTTAGCCACC	
blaCTX-M-UI	SHV OS6		GATTTGCTGATTCGCTCGG	593
	CTX-M-UI1		ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	
blaCTX-M-1	CTX-M-UI2		TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG	1100
	CTX1-SEQ-F		CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	
	CTX1-SEQ-R		CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	

blaCTX-M-2	CTX-M-2F	ATGATGACTCAGAGCATTCG	900
	CTX-M-2R	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	
blaCTX-M-8	CTX-Mgp8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	800
	CTX-Mgp8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT	
blaCTX-M-9	CTX G-9 F	AAAAGGATCCTTGATGGTTGCTCTGTGG	1100
	CTX-G-9R	AAAAGGATCCCGATTTATTCAACAAAACC AG	
blaCMY-2	Qeprev cmy2 startF cmy-group2-R	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG	1138
blaKPC	KPCF KPCR	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	879

Fuente. Cushicondor D. 2017

BlaCTX-M-9

El gen blaCTX-M-9 pertenece a la familia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que puede inactivar una amplia variedad de estos antibióticos.

La presencia de este gen en bacterias patógenas puede complicar el tratamiento de las infecciones causadas por dichas bacterias, ya que pueden volverse resistentes a múltiples antibióticos (59).

6.9.3 Condiciones de la PCR

Tabla 4 Condiciones PCR para genes sul2 y qnrB

Gen Sul2 & qnrB		
Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	4 min
Ciclos (30)		
Desnaturalización	94	1 min
Hibridación	51	1 min
Elongación	68	1 min

Fuente. Huamán M, Pérez C, Rodríguez J, Killerby M, Lovón S, Chauca L. 2020

Tabla 5 Condiciones PCR para genes blaCTX-M-9

Gen blaCTX-M-9		
Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95.0	10'
Desnaturalización	95.0	1'
Hibridación	55.0	1' (35 ciclos)
Elongación	72.0	1'
Extensión final	72.0	10'

Fuente. Cushicondor D. 2017

7.10 Crio conservación

La crio conservación tiene como objetivo crucial la preservación de microorganismos. Esta tarea busca asegurar que la viabilidad y pureza de estos microorganismos se mantengan durante décadas, la técnica de crio preservación se utiliza para lograr este objetivo. Consiste en congelar células o tejidos a temperaturas muy bajas, generalmente entre -80 °C (ultra congelación) y -190 °C (nitrógeno líquido). Esto reduce el metabolismo celular a un punto casi nulo, permitiendo la supervivencia del microorganismo por largos periodos (60).

El procesamiento primario de la muestra consiste en realizar un subcultivo del microorganismo en un medio de cultivo adecuado. Este proceso se realiza en condiciones de esterilidad dentro de un gabinete de bioseguridad, la solución criogénica, que es una mezcla de agua y glicerol, se prepara en diferentes porcentajes (30%, 40% y 50%) para la crio preservación. El cálculo de las cantidades se realiza en base al volumen total necesario (61). (Anexo 8)

7.11 Extracción de ADN

La etapa de extracción implica aislar y purificar las moléculas de ADN, aprovechando sus propiedades fisicoquímicas. Los kits comerciales han simplificado este proceso a solo unas pocas horas, al reducir la cantidad de pasos necesarios. Además, cuando se usan según las recomendaciones del proveedor, aseguran una extracción de alta pureza, ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son altamente eficientes (62).

7.11.1 Kit comercial para la extracción de ADN

Thermo Scientific™ Kit de purificación de ADN

Este kit ofrece una forma rápida y sencilla de obtener ADN genómico de alta calidad a partir de diversas fuentes como sangre completa, suero, líneas celulares, células bacterianas, tejidos

de plantas y mamíferos, se basa en la precipitación selectiva de ADN mediante detergente procedente de un lisado crudo. El tiempo aproximado de aplicación es de 25 minutos con un rendimiento típico de 2 a 10 μg de ADN genómico (63).

7.12 Cuantificación del ADN.

El Fluorómetro Qubit esta diseñado para medir con precisión la cantidad de ADN, ARN y proteínas y también la integridad y calidad del ARN, utilizando los ensayos Qubit altamente sensibles (64). (Anexo 9)

7.13 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de laboratorio que se emplea para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas según su tamaño y carga eléctrica. Se realiza mediante la aplicación de una corriente eléctrica que mueve las moléculas a través de un gel o matriz, actuando los poros del gel como un tamiz que permite el movimiento más rápido de las moléculas más pequeñas (65). En particular, la electroforesis en gel de agarosa es una forma común de esta técnica, donde se fabrica un gel de agarosa y se insertan las muestras en pozos del gel, permitiendo la migración de las moléculas en función de su carga y tamaño. La velocidad de migración depende de diversos factores como la concentración de agarosa, voltaje y composición del buffer en el gel. Mediante la comparación con estándares de tamaños conocidos, es posible determinar el tamaño de las moléculas de interés en la muestra (66).

8. VALIDACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

H1: En los aislados de *Salmonella sp.* a partir de lesiones en cuyes se identifican los genes de resistencia a sulfamidas, quinolonas y betalactámicos.

H0: En los aislados de *Salmonella sp.* a partir de lesiones en cuyes no se identifican los genes de resistencia.

La hipótesis alternativa se cumple parcialmente, debido a que en 20 muestras de un total de 24 se encontró una alta prevalencia de resistencia al gen *sul2*, mientras que no se encontró resistencia a los genes *qnrB* y *blaCTX-M-9* por lo tanto el 83% de las muestras obtenidas de cuyes, presentan resistencia a uno de los genes estudiados *sul2*.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 Ubicación del experimento

El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la Clínica Veterinaria en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi con su localización en Latacunga, provincia de Cotopaxi, localizada en el centro norte del callejón interandino de la República del Ecuador. La segunda fase de la investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Católica de Cuenca, Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) en Ricaurte, campus Miraflores, ubicada en Cuenca en la provincia de Azuay en la zona sur del Ecuador.

Con las cajas de *salmonella spp* ya conservadas en dichas instalaciones por la Sra. Anita ex egresada de la Universidad. (7)

9.2 Diseño experimental y tipo de investigación

Este estudio empleó el enfoque deductivo y se clasifica como una investigación de naturaleza exploratoria y descriptiva.

9.3 Muestra

Se realizó la reactivación de 40 aislados que se obtuvieron a partir de hisopados rectales y lesiones en órganos compatibles con salmonelosis que fueron bioquímicamente identificados como *Salmonella sp.* conforme al siguiente protocolo.

Enriquecimiento en el caldo tetrationato siguiendo las instrucciones del fabricante, en un tubo que contiene 9 ml del caldo se colocaron dos colonias, se dejó incubar por 24 h a 37 °C.

Posteriormente, se colocó en el medio selectivo bismuto sulfito agar en estriado y se dejó en la incubadora por 24 h a 37 °C.

Finalmente se almacenará a 4 °C hasta su posterior análisis.

9.4 Fase de laboratorio

Todos los procedimientos realizados a continuación fueron tanto para las muestras de tipificación como para las de resistencia.

9.4.1 Procedimiento de reactivación de muestras

Tetrathionate

Se preparó el medio de Caldo Tetrionato conforme a las instrucciones del fabricante. Para 40 muestras, se prepararon 297 ml de agua destilada, a la cual se añadieron 1,37 g del medio en un frasco Boeco. Luego se llevó a ebullición sin autoclavar y se enfrió. Posteriormente, se distribuyeron 9 ml del medio en los tubos correspondientes utilizando jeringas estériles de 10 ml. Se procedió a refrescar las muestras en la cámara de flujo laminar utilizando un asa de siembra completamente estéril, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron los tubos con algodón, papel parafilm y papel aluminio, y se rotularon para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

Bismuto

Se preparó el medio de agar bismuto sulfito conforme a las indicaciones del fabricante. Para 33 muestras, se prepararon 660 ml de agua destilada, a la cual se añadieron 34.52 g del medio en un frasco Boeco. Luego se llevó a ebullición sin autoclavar y se enfrió a una temperatura de 45°C. Se distribuyeron 20 ml del medio en las placas de Petri utilizando una jeringa de 20 ml y se esperó a que se solidificara. Posteriormente, se sembraron las muestras utilizando la técnica de estría en la cámara de flujo laminar, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron las placas con papel parafilm y se rotularon para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

XLD

(Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, se realiza el medio siguiendo las instrucciones de fabricante para 33 muestras se preparó 660 ml de agua destilada añadiendo 37,62 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar, y enfriar a una temperatura de 45°C y colocar 20 ml en las cajas petri con la ayuda de una jeringa de 20 ml esperamos hasta que se solidifique con la ayuda del asa de siembra fueron sembradas mediante técnica de estría en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del papel parafilm y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlas a 37°C por 24h.

Se analizaron un total de 40 muestras obtenidas de cuyes infectados con linfadenitis, hisopados rectales, hisopados de suelo, y tejidos (hígado, bazo, ganglios abscesos y otros órganos con

lesiones). De las cuales el 82.5% (33/40) resultaron con un crecimiento de colonias sospechosas a *Salmonella* spp. Siendo.

9.4.2 Pruebas bioquímicas

Resultados de las pruebas microbiológicas

Agar Triple Azúcar Hierro

El TSI es un medio de cultivo que tiene habilidad para fermentar azúcares y generar ciertos productos metabólicos.

El procedimiento consiste en preparar el medio de conformidad con las instrucciones del fabricante, seguido de esterilizar el agua en autoclave a 121 °C durante 15 minutos para esterilizarla . Se distribuyeron 9 ml del medio en tubos esterilizados. Luego, las muestras se apilaron en una cámara de flujo laminar , se sellaron adecuadamente y se rotularon para facilitar la identificación. Finalmente se incubaron incubadodurante 24 a 37° C.

La interpretación de los resultados se basa en cambios en el color y la consistencia del medio.

Medio de azufre indol para movilidad

La prueba SIM, se llevó a cabo la preparación del medio siguiendo las indicaciones del fabricante. Para 32 muestras, se prepararon 297 ml de agua destilada, a los cuales se les añadieron 8,91 g del medio en un recipiente de precipitación. Después de llevarlo a ebullición, se procedió a esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Tras el enfriamiento, se vertieron 9 ml del medio en los respectivos tubos utilizando jeringas estériles de 10 ml. Posteriormente, se sembraron las muestras en la cámara de flujo laminar utilizando un punzón completamente estéril, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron los tubos con algodón, papel parafilm y papel aluminio, y se rotularon adecuadamente para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados:

Tras la realización de las pruebas bioquímicas el 100% dieron un resultado positivo en motilidad y SH₂, y un efecto negativo en INDOL debido a que Salmonella no produce indol (Anexo 8).

9.4.3 Crioconservación

Enriquecimiento de las muestras

Tetrathionate

Se realizó el medio de Caldo Tetratiónato, siguiendo las instrucciones de fabricante, para 33 muestras se preparó 297 ml de agua destilada añadiendo 1,37 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin auto clavar, y enfriar, para su colocación de 9 ml en los respectivos tubos con la ayuda de jeringa estériles de 10 ml, luego con la ayuda del asa de siembra completamente estéril se procedió a refrescar la muestra en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del algodón, papel parafilm y papel aluminio y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlo a 37°C por 24h .

Preparación de solución criogénica

Se preparó la solución criogénica, que constituye de una mezcla de agua y glicerol, para el cálculo de las cantidades se dividió en tres porcentajes, de 30%, 40% y 50%, partiendo de un cálculo en general para la cantidad de ul en cada tubo.

Calculo total de Agua

33 muestras * 3 = 99 tubos en total

33x500ul x 3 = 49 500

49 500 / 1000 = 49.5 ml

49,5 / 3 = 16.5 ml

Calculo de porcentajes

40%: $40\% * 16.5\text{ml} = 6.6$ (Glicerol)

$60\% * 16.5 = 9.9$ ml (Agua)

50%: $50\% * 16.5 \text{ ml} = 8.25$ (Glicerol)

$50\% * 16.5 \text{ ml} = 8.25$ (Agua)

30%: $30\% * 16.5 \text{ ml} = 4.95$ (Glicerol)

$70\% * 16.5 \text{ ml} = 11.55$ (Agua)

9.4.4 Procedimiento de crio conservación.

Para la crioconservación, se tomaron 0.5 ml de las muestras de los tubos de Tetracionato. Se colocaron en tubos eppendorf y se agregaron 0.5 ml de solución criogénica. Se prepararon así 99 tubos, que se distribuyeron en tres porcentajes: 30%, 40% y 50%. El caldo de Luria Bertani se colocó en la solución al 50%, finalmente se colocaron las muestras en gradillas para tubos eppendorf y se conservaron a -20° . Este proceso fue estandarizado tanto para las muestras para detección de resistencia como para las muestras que serán destinadas para tipificación.

9.5 Extracción de DNA

9.5.1 Procedimiento para la extracción de DNA

Siguiendo la instrucción del kit THERMO SCIENTIFIC PARA 100 REACCIONES, las muestras se colocaron en duplicados, alicuotando en dos eppendorf de 1.5 ml y fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis, este proceso fue compartido junto con las muestras para tipificación..

9.6 PCR

Se realizó una reacción en cadena de polimerasa utilizando los genes específicos de Quinolonas, Sulfamidas y Betalactamasas con una solución de stock o trabajo a base de la solución madre,

estas soluciones fueron estandarizadas en conjunto con el equipo de trabajo en el laboratorio de biotecnología de la universidad católica de cuenca.

Solución madre

- $25 \text{ nMol} \times 10 = 250 \text{ ul}$ de agua ultra pura
- $50 \text{ nMol} \times 10 = 500 \text{ ul}$ de agua ultra pura

Conforme al peso de los genes se multiplica y se agrega el agua ultra pura.

Solución de trabajo

$90\text{ul} + 10\text{ul} = 100 \text{ ul}$ solución de stock

- 90ul de agua ultra pura
- 10ul de solución madre

Los cálculos para los genes de la PCR se realizaron en base a las instrucciones del fabricante (Dream Taq Green PCR Master Mix 2X) donde se estandarizó un nuevo protocolo, llegando a un volumen final de 20 μ l para cada muestra. Estos calculos se estandarizaron tanto para las muestras de resistencia como para las de tipificación.

Cálculo estandarizado para los genes

- Dreams taq Green PCR Master Mix : 10 ul
- Forward primer : 2 ul
- Reverse primer: 2 ul
- Template DNA: 1.5 ul
- Agua: 4.5 ul

Volumen total: 20 ul

9.6.1 Condiciones de la PCR

Las reacciones de PCR se llevarán a cabo en un termociclador (Thermo científico).

Gen Sul2 & qnrB		
Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	4 min
Ciclos (30)		
Desnaturalización	94	1 min
Hibridación	51	1 min
Elongación	68	1 min

Fuente: Fuente: Huamán M, Pérez C, Rodríguez J, Killerby M, Lovón S, Chauca L. 2020

9.7 Electroforesis y visualización de las bandas

Los productos obtenidos por PCR punto final fueron separados mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 2% que se realizó en 60ml de TAE buffer 1X agregando 1.2g de agarosa ultrapura, con buffer TAE 1X a 100 V por 1 hora en la cámara de electroforesis horizontal. Para visualizar las bandas de ADN, se utilizó 2.1µl de sybrsafe como revelador, en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas fue determinadas mediante marcador de peso molecular de 100 pb.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Resultados

Resultados detección de genes de resistencia.

Se analizaron 24 muestras para determinar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos sul2 y qnrB. Se encontró que 22 de las 24 muestras (91.67%) fueron positivas para el gen sul2, lo que indica una alta prevalencia de resistencia a las sulfonamidas en las bacterias analizadas.

No se detectó resistencia al gen qnrB en ninguna de las 24 muestras (0%).

- **sul2**

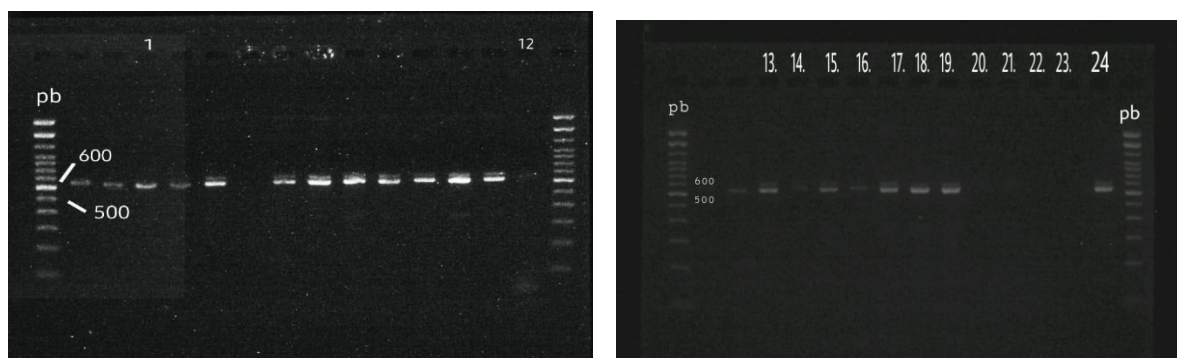


Figura 1. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante PCR múltiple para la detección del gen *sul2*, los productos amplificados para 673 pb, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1, Control Negativo *tiphy*; Línea 2, Control *S.Typhimurium* ATCC 14028; marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder.

Discusión:

En el presente estudio, se observó que las tasas de resistencia a las sulfas fueron inferiores a las reportadas en investigaciones anteriores, como la llevada a cabo por Huamán et al. en 2023, que encontró una resistencia del 68.6% en *Salmonella* Typhimurium de cuyes en Perú. Esta disparidad podría explicarse por diversas razones, como variaciones en las poblaciones de *Salmonella* estudiadas, diferencias en los métodos de investigación empleados o incluso las políticas de uso de antibióticos en Ecuador y Perú. Es importante destacar que en este estudio se evidenció resistencia a las sulfas en *Salmonella* spp., mientras que no se encontraron indicios de resistencia a quinolonas y betalactamasas. Estos hallazgos subrayan la complejidad de la resistencia antimicrobiana y la necesidad de una vigilancia continua y una gestión prudente de los antibióticos para abordar eficazmente esta preocupación tanto en la salud animal como en la humana.

- **qnrB**

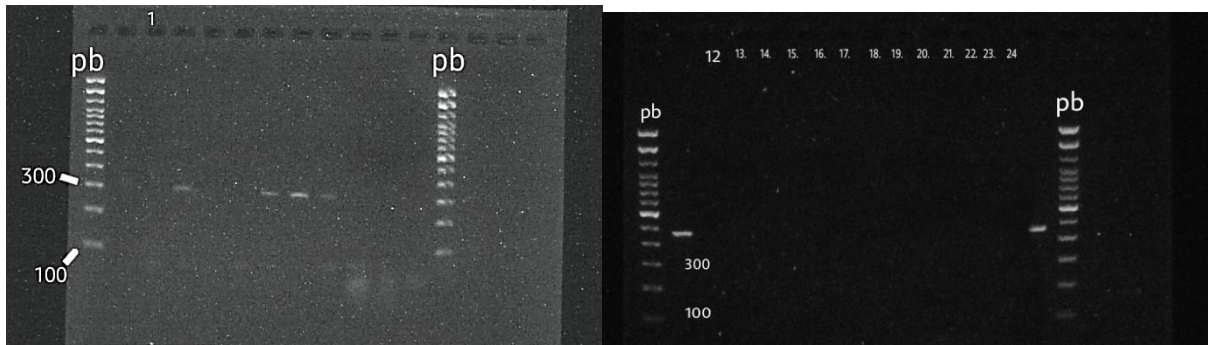


Figura 2. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante PCR múltiple para la detección del gen *qnrB*, utilizando un cebador, los productos amplificados para 469 pb, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1 Control *S.Typhimurium* ATCC 14028; marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder.

- *BlaCTX-M-9*

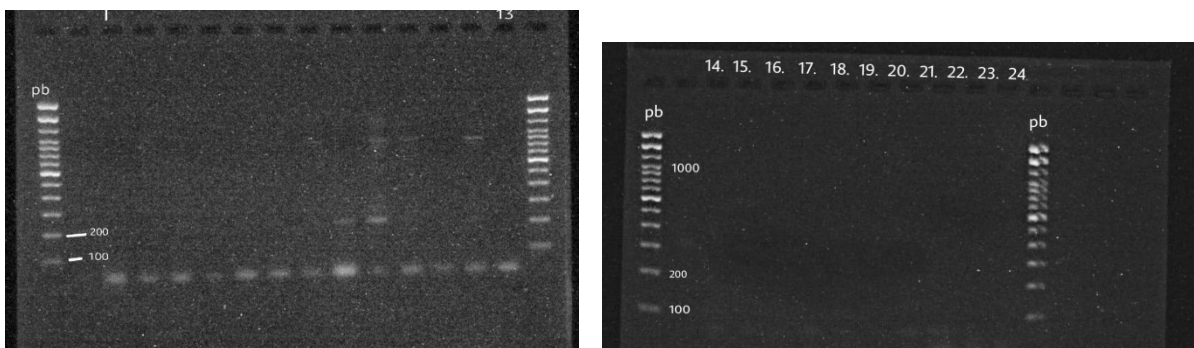


Figura 3. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante PCR múltiple para la detección del gen *blaCTX-M-9*, utilizando un cebador, los productos amplificados para 1100 pb, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1, Control Negativo *E.coli*; Línea 2, Control *S.Typhimurium* ATCC 14028; marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder.

Discusión:

Todos los resultados de este estudio no fueron resistentes a betalactamasas y quinolonas. La resistencia a las betalactamasas se debe principalmente a la producción de betalactamasas de tipo CTX-M, como la *blaCTX-M.9*, que se detectó en todas las muestras de nuestro estudio.

Estos resultados son comparables a los de Cushicondor (2023), quien realizó un estudio en pollos, donde encontró que el 80% de Salmonella de pollos en Galápagos era resistente a betalactamasas y el 60% de Salmonella de pollos en Galápagos era resistente a quinolonas.

Estos resultados son comparables a los de Cushicondor (2023), quien realizó un estudio en pollos, donde encontró que el 80% de Salmonella de pollos en Galápagos era resistente a betalactamasas y el 60% de Salmonella de pollos en Galápagos era resistente a quinolonas.

Los resultados de los estudios realizados por Salvatierra et al. (2018) en cuyes en Lima, Perú, y por Vega-Sánchez et al. (2020) en canales de cerdo en Jalisco, México, revelan importantes similitudes y diferencias en la resistencia antimicrobiana y la caracterización genotípica de cepas de Salmonella en distintos contextos de producción animal.

En ambos estudios, se evidenció la presencia de cepas de Salmonella resistentes a múltiples antimicrobianos, lo que destaca la preocupación global por la resistencia antimicrobiana en este patógeno y su impacto en la salud pública. En particular, la resistencia a la ciprofloxacina fue una característica destacada en ambas investigaciones, lo que refuerza la importancia de vigilar y controlar el uso de este antimicrobiano en la producción animal.

Sin embargo, existen diferencias significativas entre los hallazgos de los dos estudios. Por ejemplo, mientras que el estudio en cuyes mostró una alta homogeneidad genética y una prevalencia de resistencia relativamente baja, el estudio en cerdos reveló una mayor diversidad genética y una prevalencia más alta de resistencia a múltiples clases de antimicrobianos. Estas diferencias pueden atribuirse a las variaciones en las prácticas de producción animal, los sistemas de manejo y las condiciones ambientales entre los dos contextos estudiados.

11. IMPACTO TÉCNICO.

El impacto técnico del estudio es significativo, ya que proporciona información crucial para implementar medidas preventivas que ayuden a contener la transmisión de Salmonella a otros animales. La comprensión de la resistencia a los antibióticos es fundamental para los productores, ya que les permite seleccionar y administrar de manera más eficaz los antibióticos apropiados para el tratamiento de las infecciones. Esto es especialmente importante en la prevención de la propagación de Salmonella resistente a los antibióticos dentro del hato. Al identificar qué antibióticos son más eficaces contra las cepas de Salmonella presentes en la población animal, se pueden evitar tratamientos ineficaces que podrían aumentar la resistencia bacteriana y favorecer la propagación de cepas resistentes. Por lo tanto, el estudio no solo tiene

un impacto técnico al proporcionar orientación práctica a los productores, sino que también contribuye a la salud y el bienestar general de los animales y a la seguridad alimentaria.

12.CONCLUSIONES

En cuanto a los resultados de la PCR la mayoría de las muestras analizadas en el estudio (20/24) presentaron resistencia al gen *sul2* evidenciando una alta prevalencia de resistencia (83%), mientras que no se encontró resistencia a los genes *qnrB* y *blaCTX-M-9*.

El gen *sul2* codifica una enzima que confiere resistencia a las sulfamidas, un tipo de antibiótico que se utiliza para tratar las infecciones por *Salmonella* spp. La resistencia al gen *sul2* en *Salmonella* spp. de cuyes significa que las infecciones por esta bacteria pueden ser más difíciles de tratar, lo que puede tener graves consecuencias para la salud tanto de los animales como de las personas.

13.RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de cuyes, donde se ha identificado la presencia de resistencia a sulfamidas, se recomienda revisar y ajustar los protocolos de tratamiento antibiótico en la producción de estos animales. Es esencial diversificar las opciones terapéuticas y considerar el uso de otros tipos de antibióticos para combatir eficazmente las infecciones bacterianas. Se debe aplicar antibiogramas previamente a la elección de un tratamiento, asegurando así la selección adecuada de antibióticos para *Salmonella* en cuyes infectados.

En este contexto, se destaca la eficacia demostrada de las quinolonas y betalactámicos, los cuales han mostrado ser una alternativa efectiva y sin evidencia de resistencia en las muestras analizadas en este estudio. Por lo tanto, se recomienda considerar el uso de quinolonas como parte de las estrategias de tratamiento antibiótico en la cría de cuyes, con el objetivo de garantizar una gestión adecuada de las enfermedades bacterianas y minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia antibiótica en esta especie.

Se recomienda realizar estudios para comprender mejor la resistencia de Salmonella a sul2, qnrB y blaCTX-M9. Estos estudios ayudarían a desarrollar nuevas estrategias para prevenir y controlar la salmonelosis resistente a los antibióticos. Adicionalmente, se deben implementar medidas de control en la producción de cuyes, como mejorar la higiene, la vacunación contra Salmonella y el uso responsable de antibióticos. Estas medidas son esenciales para reducir la incidencia de Salmonella spp. y la resistencia a los antibióticos en la producción de cuyes. Alternar los antibióticos utilizados también es una estrategia recomendada para prevenir la aparición de resistencia.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Cortés V, Sevilla-Navarro S, García C, Bravo E, Orenza M, Marín C, et al. Estudio de resistencias antimicrobianas en cepas de Salmonella spp. aisladas en ponedoras, pollos y pavos durante 2017 [Internet]. Wpsa-aeca.es. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/18775_estudio%20de%20resistencias%20antimicrobianas%20en%20cepas%20de_salmonella%20spp.%20aisladas%20en%20ponedoras,_pollos%20y%20pavos%20durante%202017.pdf
2. Sandoval-Lema JA, Sosa-Zúñiga MF, Soria-Álvarez CE. Neumonía Causada por Salmonella en Niño Inmunocompetente: Reporte de Caso. Polo del Conocimiento [Internet]. 2020 [citado el 2 de mayo de 2023];5(3):105–19. Disponible en: <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/1325/html>
3. Rojas GC, General M. REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII (621) 757 -763, 2016 [Internet]. Binasss.sa.cr. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>

4. Fernández Riverón Fernando, López Hernández Jorge, Ponce Martínez Laida María, Machado Betarte Caridad. Resistencia bacteriana. Rev. Cub Med Mil [Internet]. 2003 Mar [citado 2023 mayo 02]; 32(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es.
5. OIE. GBADs - El impacto global de las enfermedades animales [Internet]. Woah.org. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://gbads.woah.org/index-es.html>.
6. José Gabriel Camacho DRPM. DIAGNÓSTICO DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CUYES EN PEQUEÑOS Y MEDIANOS PRODUCTORES DE LA SIERRA DEL ECUADOR [Internet]. 2018 [consultado el 21 de febrero del 2024]. Disponible en: <http://file:///D:/HP/Downloads/LINEA%20DE%20PRODUCCI%C3%93N%20DE%20CUYES%20-%20completo.pdf>
7. Sandoval-Lema JA, Sosa-Zúñiga MF, Soria-Álvarez CE. Neumonía Causada por Salmonella en Niño Inmunocompetente: Reporte de Caso. Polo del Conocimiento [Internet]. 2020 [citado el 2 de mayo de 2023];5(3):105–19. Disponible en: <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/1325/html>
8. Ulises Garza-Ramos. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. [Internet]. 2009. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009#:~:text=Los%20genes%20de%20resistencia%20a,se%20convierten%20en%20genes%20funcionales
9. Eng S-K, Pusparajah P, Ab Mutalib N-S, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Front Life Sci [Internet]. 2015;8(3):284–93. [citado el 2 de mayo de 2023] Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21553769.2015.1051243>
10. Galanis E, Wong DMALF, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, et al. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution, 2000–2002. Emerg Infect Dis

[Internet]. 2006;12(3):381–8. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/3/05-0854_article

11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Salmonelosis [Internet]. Woah.org. 2018 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf

12. El Cuy en Ecuador [Internet]. GoRaymi. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.goraymi.com/es-ec/ecuador/gastronomias/cuy-ecuador-ajuqflufk>

13. González CGD. Evaluación de factores de virulencia de cepas de *Salmonella* spp. aislados de cuyes (*Cavia porcellus*) enfermos y sanos [Internet]. Edu.pe. 2019 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10779/Duran_gc.pdf?sequence=1&isAllowed=y

14. Américo Layme M.1, RosaPerales C.1,2, Alfonso Chavera C.1, CésarGavidia C.3, Sonia Calle E. Vista de LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS EN CUYES (*Cavia porcellus*) CON DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE *Salmonella* sp [Internet]. Edu.pe. 2011 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/14513/12808>

15. Mamani AL. Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en cobayos con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria7 [Internet]. Edu.pe. 2010 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/748/Layme_ma.pdf?sequence=1&isAllowed=y

16. Alegría Lovera C. EFECTO DE LA NORFLOXACINA EN EL TRATAMIENTO DE *Salmonella* ssp. EN CUYES [Internet]. Edu.pe. 2008 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en:

<https://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14292/889/ZT416.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

17. Inda Marcela Figueroa Ochoa *. Antonio Verdugo Rodríguez*. Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp [Internet]. Medigraphic.com. 2005 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf

18. El Cuy en Ecuador [Internet]. GoRaymi. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.goraymi.com/es-ec/ecuador/gastronomias/cuy-ecuador-ajuqflufk>

19. Salmonella [Internet]. ELIKA Seguridad Alimentaria. 2018 [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/salmonella/>

20. MV Ms JDR, Suárez MV MS M, Esp. CUMV. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de Salmonella spp. en granjas de [Internet]. Org.co. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n3/v19n3a06.pdf>

21. TRABAJO PRÁCTICO N o 3 [Internet]. Edu.ar. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/183670/mod_resource/content/1/2019%20TP3%20FARMACIA.pdf

22. Solmegas. Medios de Cultivo [Internet]. Solmeglas.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://solmeglas.com/medios-de-cultivo-que-son-funcionalidades-calidad/>

23. Edu.ec. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/5599/1/11928.pdf>

24. Britanialab.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070906bed89d.pdf

25. Previsto U. BD CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate) [Internet]. Www.bd.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?idx=31333>

26. Laboratorio M. Agar Eosina y Azul de Metileno [Internet]. Com.mx. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=2266
27. Condalab. Agar Entérico Hektoen ISO Cat. 1030 [Internet]. Mdmcientifica.com. 2019 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/09/1030_es_1.pdf
28. Valtek SA. Agar Xilosa - Lisina - Desoxicolato (Agar XLD) [Internet]. Valtek.cl. 2021 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Agar-XLD-Valtek-Version-3.pdf>
29. Seimc.org. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
30. López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología [Internet]. Medigraphic.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
31. . Herrera Marco Luis. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. Rev. med. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) [Internet]. 1999 Jan [cited 2023 May 02]; 34(Suppl): 33-41. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en.
32. Microbiología (Tercera edición) E. Etest [Internet]. Sciencedirect.com. [consultado el 18 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/etest>
33. Pdf HUE. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf> [Internet]. Unirioja.es. 2013 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf>

34. Kapital. Antibiogramas, pruebas de sensibilidad microorganismos [Internet]. 2023. [citado el 12 de enero de 2023]; Disponible en: <https://www.kapitalinteligente.es/antibiogramas-pruebas-de-sensibilidadmicroorganismos/>
33. IDEXX. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) [Internet]. Idexx.es. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
35. Malbrán CG, Curso I, Dra AA, Latinoamericano De Actualización En Antimicrobianos C. METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION [Internet]. Com.ar. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf
36. Pdf HUE. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf> [Internet]. Unirioja.es. 2013 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf>
37. IDEXX. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) [Internet]. Idexx.es. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
38. Salvatierra R. G, Rimac B. R, Chero O. A, Reyna W. I, Rosadio A. R, Maturrano HL Resistencia antimicrobiana y genotipificación de cepas de Salmonella Typhimurium aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*) provenientes de granjas de producción intensiva de la ciudad de Lima, Perú. Rev Investigag Vet Perú [Internet]. 2018 [consultado el 18 de febrero del 2024];29(1):319–39. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172018000100031&script=sci_arttext
40. March-Rosselló GA. Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2017 [citado el 2 de mayo de 2023];35(3):182–8. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades->

infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-rapidos-deteccion-resistencia-bacteriana-S0213005X16303986

41. Yaguapaz Cortez AG. Aislamiento y evaluación de la resistencia a los antimicrobianos en salmonella spp, a partir de hisopados rectales y tejidos de cuyes (cavia porcellus) en criaderos de los cantones Pujilí y Latacunga de la provincia de Cotopaxi [Internet]. Edu.ec. febrero de 2023 [consultado el 8 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/10612>.

42. Difco™ y BBL™ . _ Base de caldo de tetracionato, manual, segunda edición [Internet]. Cloudfront.net. [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/32/c3/f5c64d84fd1c3f37215a99db29d9.pdf>

43. Casart et al. Tipificación molecular de Salmonella aislada de cuyes. Ocho de marzo del 2016. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/19-Texto%20del%20art%C3%ADculo-83-2-10-20191010.pdf>

44. Otto.M. Radostis. Tratado de las enfermedades del ganado bovino. 2008 [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://file:///D:/HP/Downloads/Radostis%202.pdf>

45. Castro RF. EPIZOOTIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS EN BOVINOS, PORCINOS Y AVES [Internet]. Unam.mx. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c05.pdf>

46. García J, Martínez D, Caña L, González D, Rodríguez L, Rodolfo H, et al. Genes qnr en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2018 [consultado el 8 de febrero del 2024];35(2):147–54. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000200147

47. Alarcón F, Lissette C. Caracterización molecular de la resistencia a fenicoles en bacilos Gram negativos aislados de pisciculturas de las VIII y X regiones de Chile. 2006 [citado el 21 de julio de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.udec.cl/xmlui/handle/11594/6349>

48. Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ. Las mutaciones en la región del bucle interdominio del gen de resistencia a la tetraciclina tetA (A) aumentan la salida de minociclina y glicilciclinas. Resistencia a los microbios [Internet]. 2000 [consultado el 8 de febrero de 2024];6(4):277–82. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11272255/>
49. Pérez-Trallero E, Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2003 [citado el 21 de julio de 2023];21(9):520–9. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-13052338>
50. Casart et al. Tipificación molecular de Salmonella aislada de cuyes. Ocho de marzo del 2016. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/19-Texto%20del%20art%C3%ADculo-83-2-10-20191010.pdf>
51. Velandia DPL, Torres Caycedo MI, Castañeda Orduz LM, Prada Quiroga CF. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. Rev investiga salud Univ Boyacá [Internet]. 2016 [consultado el 14 de febrero del 2024];3(2):107–26. Disponible en: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/182>
52. Gonzales C. Evaluación de factores de virulencia de cepas de Salmonella spp. aisladas de cuyes (Cavia porcellus) enfermos y sanos. Lima-Perú 2019. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10779/Duran_gc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
53. Artedínamico. ETAPAS DE UN PROCESO PCR. [citado el 2 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/etapas-de-un-proceso-pcr>
54. Huamán M, Pérez C, Rodríguez J, Killerby M, Lovón S, Chauca L. Caracterización genética y patrones de resistencia antimicrobiana en cepas de Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium en cuyes de crianza intensiva. Rev Investigag Vet Perú [Internet]. 2020

[consultado el 14 de febrero del 2024];31(1):e17542. Disponible en:
<https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/8307?locale-attribute=en>

55. José GA, Dianny MR, Luisa Caña G, Diorelis GV, Lucy RC, Hectorina RC, et al. Genes qnr en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 21];35(2). Available from:
<https://revinf.cl/index.php/revinf/article/view/73>

56. McArthur AG, Wright GD. The comprehensive antibiotic resistance database [Internet]. McMaster.ca. [cited 2024 Feb 21]. Available from: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36551>

57. Diego Martín Cushicóndor Collaguazo MVZ. Análisis de similitud genética y resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos del género Salmonella procedentes de granjas de pollos de engorde en Galápagos, Ecuador. 2017. [consultado el 14 de febrero del 2024];31(1):e17542. Disponible en:
[file:///D:/HP/Downloads/CUSHIC%C3%93NDOR_DIEGO_TESIS_MAESTR%C3%8DA_EN_PRODUCCI%C3%93N_Y_SANIDAD_AV%C3%8DCOLA_APROBADA%20\(4\).pdf](file:///D:/HP/Downloads/CUSHIC%C3%93NDOR_DIEGO_TESIS_MAESTR%C3%8DA_EN_PRODUCCI%C3%93N_Y_SANIDAD_AV%C3%8DCOLA_APROBADA%20(4).pdf)

58. Ogutu JO, Zhang Q, Huang Y, Yan H, Su L, Gao B, et al. Development of a multiplex PCR system and its application in detection of blaSHV, blaTEM, blaCTX-M-1, blaCTX-M-9 and blaOXA-1 group genes in clinical Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 2015 [cited 2024 Feb 21];68(12):725–33. Available from:
<https://www.nature.com/articles/ja201568>

59. Yocelyn Ocares P. Técnico agrícola, INIA Quilamapu Jean Franco Castro F. Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu. Preservación de microorganismos por congelación [Internet]. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA / MINISTERIO DE AGRICULTURA. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://file:///D:/HP/Downloads/NR42413.pdf>

60. Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Gob.pe. 2014. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible

en:[https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

61. Thermo Scientific TM Kit de purificación de ADN genómico - Extracción y purificación de ADN Productos bioquímicos y reactivos [Internet]. Fishersci.es. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-genomic-dna-purification-kit/10571031>

62. Artedimico. QUBIT 4.0 FLUORÓMETRO PARA CUANTIFICACIÓN SELECTIVA DE ADN, ARN Y PROTEÍNAS POR FLUORESCENCIA - INVITROGEN - Q33226. [consultado el 14 de febrero de 2024]; Disponible en: <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/productos/qubit-40-fluorometro-para-cuantificacion-selectiva-de-adn-arn-y-proteinas-por-fluorescencia-invitrogen-q33226>

63. Vega-Sánchez V, Barba-León J, González-Aguilar DG, Cabrera-Díaz E, Pacheco-Gallardo C, Orozco-García AG. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aisladas de canales de cerdo obtenidas de dos tipos de rastros en Jalisco, México. Rev Mex Cienc Pecu [Internet]. 2020 [consultado el 18 de febrero del 2024];11(4):1004–15. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242020000401004

64. Mansilla Q. M, Morales-Cauti S, Dellepiane-Gil H, Chuquizuta Ramos C. Resistencia antibiótica de cepas de Salmonella enterica aisladas de canales de cuyes en un mercado de Lima, 2021. Rev Investig Vet Peru [Internet]. 2023 [consultado el 18 de febrero del 2024];34(1):e24595. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172023000100026

65. Rojas AC. Método: Gel de electroforesis Agarosa [Internet]. Conogasi. 2017 [cited 2024 Feb 21]. Available from: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>

64. Electroforesis [Internet]. Genome.gov. [cited 2024 Feb 21]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesi>