



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* QUE COLONIZAN LA MUCOSA
NASAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS EN LA
PROVINCIA DE CAÑAR (ECUADOR, 2021).**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUIMICO FARMACEUTA**

AUTORA: ANDREA MARIBEL PONCE MOROCHO

DIRECTOR: DR. LUIS ANDRES YARZÁBAL RODRÍGUEZ, PHD.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* QUE COLONIZAN LA MUCOSA
NASAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS EN LA
PROVINCIA DE CAÑAR (ECUADOR, 2021).**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUIMICO FARMACEUTA**

AUTORA: ANDREA MARIBEL PONCE MOROCHO

DIRECTOR: DR. LUIS ANDRES YARZABAL RODRIGUEZ, PhD.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Yo **Ponce Morocho Andrea Maribel**, portador(a) de la cédula de ciudadanía N.º **010680045-1**. Declaro ser el autor de la obra: **“Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*) criados en la provincia de Cañar (Ecuador, 2021).”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **11 de abril de 2024**

F: 

Ponce Morocho Andrea Maribel

C.I. **010680045-**

Certificación del Tutor

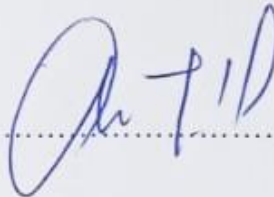
Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD.
DOCENTE DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR.
CARRERA DE BIOFARMACIA

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado “**Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*) criados en la provincia de Cañar (Ecuador, 2021)**”, realizado por **PONCE MOROCHO ANDREA MARIBEL**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, abril 2024

Firma:



Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD.

C.I.: 0151710431

DEDICATORIA

Con cariño y admiración a mis queridos padres Nancy y José, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me apoyaron incondicionalmente y me han permitido alcanzar uno de mis más grandes sueños, gracias por ser un ejemplo de superación, sacrificio y por enseñarme que a pesar de las circunstancias se puede lograr un objetivo.

A ustedes les debo lo que ahora soy ;

A mi adorado hijo Francis, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios, quiero que siempre tengas la fortaleza para luchar por tus propias convicciones.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo y culminación de este aporte académico no hubiese sido posible sin la participación de docentes y colaboradores de la institución, quienes permitieron que este trabajo llegue a feliz término, por ello, expreso mis agradecimientos.

Agradezco de manera especial y sincera a mi tutor, Dr. Andrés Yarzábal, por permitirme realizar la tesis bajo su dirección, por su orientación y compromiso. Su apoyo y su confianza en mi ha sido un aporte invaluable, no solamente para el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

Gracias por ser un mentor excepcional ;

En fin, a todas las autoridades universitarias, profesores, investigadores y personal, quienes, con su colaboración a la resolución de los problemas planteados, me ayudaron a cumplir con mi objetivo.

Gracias a todos ;

Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*) criados en la provincia de Cañar (Ecuador, 2021).

Andrea Maribel Ponce Morocho

Palabras clave: *Cuyes (Cavia porcellus)*; *Staphylococcus aureus*; Resistencia antimicrobiana; Biomarcadores (*nucA*, *femB*).

RESUMEN

Introducción: El cuy o *Cavia porcellus*, también conocido como cobayo, cuyo, conejillo de indias, etc., se adapta fácilmente a cualquier entorno, sirve de huésped para agentes infecciosos causantes de enfermedades que son transmitidas a otras especies, como el ser humano (zoonosis). *S. aureus* es una bacteria Gram+, productora de coagulasa, coloniza la piel y mucosas de animales y del ser humano, posee genes de virulencia y resistencia antimicrobiana.

Objetivo: Caracterizar fenotípicamente cepas de *S. aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*C. porcellus*) criados en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador).

Metodología: Para el desarrollo de esta tesis se emplea un diseño de investigación no experimental, transversal, de tipo descriptivo, según Roberto Hernández Sampieri de la metodología de investigación de la 6ta edición y de acuerdo a los parámetros establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021).

Resultados: De las 3 granjas muestreadas en la provincia del Cañar, se obtuvieron 112 muestras y 35 aislados iniciales, el 90% de estos dieron resultados positivos para las pruebas bioquímicas realizadas y todas fueron Gram-positivas; 30 cepas contenían el gen *nucA* y 27 el gen *femB*. En el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana se identificaron 19 cepas con resistencia a la Ciprofloxacina (61,29%) y 17 a la Oxacilina (54,83%).

Conclusión: Se identificaron 31 cepas con características morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondiente a la especie *Staphylococcus aureus*.

Phenotypic Characterization of *Staphylococcus Aureus* Strains Colonizing the Nasal Mucosa of Guinea Pigs (*Cavia Porcellus*) Raised in Cañar (Ecuador, 2021).

Andrea Maribel Ponce Morocho

Keywords: *Guinea pigs (Cavia porcellus)*; *Staphylococcus aureus*; *Antimicrobial resistance*; *Biomarkers (nucA, femB)*.

ABSTRACT

Introduction: The guinea pig or *Cavia porcellus*, also known as cavy, *cuy*, or guinea pig, among others, easily adapts to any environment; it can host infectious agents causing diseases transmitted to other species, including humans (zoonoses). *S. aureus* is a Gram-positive bacterium and coagulase producer that colonizes animals' and humans' skin and mucous membranes, harboring virulence and antimicrobial resistance genes.

Objective: To phenotypically characterize *S. aureus* strains colonizing the nasal mucosa of guinea pigs (*C. porcellus*) raised on farms in the Province of Cañar (Ecuador).

Methodology: For the development of this thesis, a non-experimental, cross-sectional, descriptive research design was employed according to Roberto Hernández Sampieri's 6th edition research methodology and following the parameters established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021).

Results: Out of the three farms sampled in the province of Cañar, 112 samples and 35 initial isolates were obtained; 90% presented positive results for the biochemical tests performed, all of which were Gram-positive; 30 strains contained the *nucA* gene, and 27 contained the *femB* gene. In the antimicrobial susceptibility test, 19 strains were identified with resistance to Ciprofloxacin (61.29%) and 17 to Oxacillin (54.83%).

Conclusion: Thrity-one strains were identified with morphological, biochemical, and molecular characteristics corresponding to *the Staphylococcus aureus* species.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	- 1 -
AGRADECIMIENTOS	- 2 -
RESUMEN	- 3 -
ABSTRACT	- 5 -
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	- 7 -
ABREVIATURAS	- 9 -
INTRODUCCIÓN	- 11 -
CAPÍTULO I.....	- 13 -
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	- 14 -
I.2.- JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	- 17 -
I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:.....	- 20 -
I.3.- OBJETIVOS	- 21 -
I.4.- ANTECEDENTES.....	- 22 -
EL CUY (<i>Cavia porcellus</i>).....	- 22 -
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	- 26 -
CAPÍTULO II.....	- 34 -
II.1.- METODOLOGÍA.....	- 35 -
II.2.- MUESTRAS.....	- 35 -
II.3.- DEFINICION Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES	- 36 -
II.4.- PROCEDIMIENTOS PARA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS ..	- 38 -
II.5.- PROCEDIMIENTOS ÉTICOS	- 47 -
CAPÍTULO III.....	- 48 -
III.1.- RESULTADOS	- 49 -

III.2.- ANALISIS FENOTIPICO	- 49 -
III.3.- ANALISIS MORFOLÓGICO.....	- 55 -
III.4.- ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIBIÓTICOS.....	- 56 -
III.5.- ANALISIS MOLECULAR	- 60 -
III.- DISCUSIÓN.....	- 63 -
Capítulo IV	- 67 -
IV.1.- CONCLUSIONES.....	- 68 -
IV.2.- RECOMENDACIONES	- 69 -
BIBLIOGRAFIA.....	- 70 -
ANEXOS.....	- 79 -
Autorización de publicación en el repositorio institucional	- 82 -

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AM: Ampicilina

ATCC: American Type Culture Collection.

AX: Amoxicilina

AZM: Azitromicina

blaZ: Gen que codifica para la β -lactamasa Z

C: Cloranfenicol

CIITT-UCACUE: Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología de la Universidad Católica de Cuenca

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: Instituto de estándares para el laboratorio clínico

CN: Gentamicina

COVID-19: Novel Coronavirus Infectious Disease 2019

DA: Clindamicina

DNA: Desoxyribonucleic acid

E: Eritromicina

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

femAB: Operón involucrado en la formación de la cadena lateral de pentaglicina presente en el peptidoglicano estafilocócico

femB: Parte del operón femAB de la síntesis del inter péptido de pentaglicina

FOX: Cefoxitina

I: Resistencia antimicrobiana intermedia

LNZ: Linezolid

mecA: Gen responsable de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*

nucA: Gen que codifica para la termonucleasa de *S. aureus*

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OX: Oxacilina

P: Penicilina

PBP2: Proteína de fijación a la penicilina 2

PBP2a: Proteína de fijación a la penicilina 2a

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PH: Potencial de Hidrogeno

R: Resistencia antimicrobiana

RA: Rifampicina

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

S: Sensibilidad antimicrobiana

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SXT: Trimetoprima / Sulfametoxazol

SYBR: Colorante de unión de ADN bicatenario

TAE: Tris, acetato y EDTA

TE: Tetraciclina

TEC: Teicoplanina

UV: Radiación Ultravioleta

VA: Vancomicina

INTRODUCCIÓN

El cuy es un mamífero roedor comercializado y consumido tradicionalmente por los pobladores de la Sierra Ecuatoriana, y en la mayoría de los casos representa la base de su economía doméstica.

Su nombre científico es *Cavia porcellus* y en otros países es conocido como cobayo, cuyo, conejillo de indias, etc. Su importancia radica principalmente en la tradición culinaria inmemorable que representa, sobre todo en la capital azuaya, es presentado como el tradicional cuy asado, que es un plato típico y su mayor consumo está en la ciudad de Cuenca, principalmente en épocas festivas. De acuerdo con algunos registros históricos, se ha observado que el cuy fue domesticado durante la época incaica y era parte de rituales de sacrificio como ofrenda a los dioses de la naturaleza (1,2).

Su reproducción es activa y prolífica, además de que esta especie se adapta fácilmente a cualquier entorno en el que se encuentre (3). Sin embargo, los índices de reproducción de cuyes de granjas familiares o comerciales se ven reducidos a causa de la aparición de enfermedades infecciosas que afectan su crecimiento, engorde y desarrollo (4). Estas enfermedades son ocasionadas por un amplio rango de microorganismos patógenos que influyen en la morbimortalidad de los cuyes y, a la vez, son capaces de propagarse e infectar a otros animales, incluso al ser humano (zoonosis) ocasionando variados signos clínicos (5,6).

Las enfermedades infecciosas representan uno de los problemas más relevantes en la salud pública a nivel mundial, generando un gran impacto socioeconómico, por lo que resulta fundamental estudiar su origen, vías de transmisión y propagación de microorganismos causantes de estas enfermedades. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo ampliamente diseminado en el medio ambiente (6). Se trata de una bacteria Gram positiva, productora de coagulasa, que coloniza la piel y las mucosas, tanto de animales como del ser

humano, lo que permite su transmisión directa o indirecta entre especies, aumentando el riesgo de zoonosis (7).

Además, *S. aureus* es un patógeno de gran importancia clínica porque posee características de virulencia y resistencia a los antimicrobianos de uso común, haciendo que su propagación represente una gran amenaza para la salud pública (6,8). La capacidad de resistencia antibiótica de esta especie está íntimamente relacionada con el uso indebido y desproporcionado de compuestos antimicrobianos para tratar diversas patologías, dando origen a cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina (SARM) (9).

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

En los últimos años, y en lo que va de la pandemia del COVID-19, se ha observado un incremento en el uso de antibióticos, siendo una de las principales razones de la incertidumbre que existe respecto al arsenal terapéutico contra la COVID-19, provocando la discontinuidad de los programas de control de antibióticos (10).

Ante esta problemática se ha demostrado la facilidad con la que las infecciones se pueden propagar, amenazando el estado de salud de la población en general, afectando la economía, el estilo de vida y la subsistencia de las personas (11). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la actualidad mueren al menos 700.000 personas cada año a nivel mundial a causa de enfermedades fármaco resistentes (12), debido a la prescripción inadecuada de antibióticos, lo que facilita el desarrollo de bacterias resistentes y reduce la eficacia de los tratamientos actualmente disponibles (13). Con la finalidad de enfrentar esta problemática, la OMS presentó en el año 2001, una iniciativa denominada “Estrategia Global para la contención de la Resistencia a los Antimicrobianos”, con el fin de promover el correcto uso de los antibióticos por parte de los profesionales de la salud y la población en general (12).

Entre las bacterias patógenas de mayor relevancia epidemiológica, sobresale *S. aureus*, especie Gram positiva, causante de infecciones comunitarias e intrahospitalarias, cuyas tasas de morbilidad y mortalidad son muy elevadas a nivel mundial (14,15).

SARM es la abreviatura de *S. aureus* resistente a la meticilina. Las cepas SARM se distinguen de otros tipos de estafilococos por su resistencia a la mayoría de los antibióticos que utilizan los médicos para tratar infecciones ocasionadas por estafilococos comunes (16). El mecanismo de resistencia a la meticilina desarrollado por *S. aureus* se da por la ausencia del gen *mecA*, que codifica la proteína fijadora de penicilina, la cual posee poca afinidad por la meticilina y otros

β -lactámicos; además, en este fenómeno de resistencia participan otros mecanismos de inactivación enzimática, debido a que la bacteria genera enzimas (betalactamasas), que alteran o hidrolizan la estructura química de la molécula antibiótica, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana (17).

La resistencia a la metilina implica resistencia a todos los β -lactámicos, incluyendo las penicilinas, combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas (18). A su vez la evolución y origen de las cepas SARM ocurre en ambientes intrahospitalarios, allí donde existe una mayor presión selectiva debido al uso concomitante de antibióticos y desinfectantes (19,20). Sin embargo, de acuerdo a estudios reportados en diferentes países, se sabe que estas cepas también colonizan o infectan animales de granja como vacas, cerdos, conejos, aves de corral, cabras, cuyes e incluso animales domésticos como perros y gatos (21).

Es a partir de estos reservorios animales que dichas cepas pueden ser transmitidas a los seres humanos. Es por esto que algunas cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos betalactámicos de última generación, constituyen también un verdadero problema emergente en medicina veterinaria (22).

Entre los animales de granja comercializados con fines de alimentación, está el cuy (*C. porcellus*) que constituye un producto alimenticio nativo, de alto valor nutritivo y bajo costo de producción y a la vez contribuye a la seguridad alimentaria de la población de escasos recursos en las regiones andinas (23).

El cuy es un roedor doméstico endémico de los Andes, el cual es criado principalmente en países como Ecuador, Perú, Colombia y Bolivia. El cuy representa una importante tradición culinaria dentro de las culturas andinas desde tiempos ancestrales hasta la actualidad. Al día de hoy, existen un sinnúmero de granjas cuyeras que se dedican a la crianza y comercialización de estos animales. Sin embargo, la mayoría de los criaderos son informales, lo que repercute negativamente en la calidad de producción de cuyes (24).

Entre los principales problemas de las granjas cuyeras figura el riesgo de insalubridad y descomposición causados, no solo por los deficientes procedimientos de sacrificio, almacenado y comercialización de la carne cruda de cuy, sino también por la falta de tecnificación adecuada y carentes medidas sanitarias para su crianza y reproducción, ocasionando un déficit en la calidad de los animales (25).

Por eso es importante identificar los principales agentes microbianos que infectan a los cuyes en sus diferentes etapas reproductivas, reconocer las posibles vías de transmisión al ser humano, fuentes de contaminación, los factores predisponentes y las estrategias adecuadas para el control y tratamiento de las infecciones en cuyes (26).

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos como hongos, virus, bacterias o parásitos, que naturalmente habitan dentro o fuera del organismo de animales o del ser humano, pero bajo ciertas condiciones ambientales estos son capaces de desencadenar una serie de enfermedades que se transmiten de un organismo a otro (27).

La interacción directa entre los animales de granja y el ser humano propician la diseminación y transmisión de enfermedades zoonóticas, las cuales son causadas por la propagación de microorganismos patógenos capaces de infectar al ser humano por medio de vías de transmisión directas o indirectas (28,29).

Se ha descrito que las principales bacterias causantes de enfermedades respiratorias en cuyes incluyen a *Streptococcus zooepidemicus*, *S. pneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica*, seguidas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*. En el caso de las enfermedades entéricas, las bacterias involucradas son *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacillus piliformis*, *Salmonella sp*, *Clostridium sp* y *Campylobacter sp* (30).

En casos de mortalidad y enfermedad en cuyes, los productores generalmente desconocen la causa, por lo que no brindan un tratamiento óptimo para tratar a

sus animales (31). Acto que predispone a la aparición y diseminación incontrolada de cepas resistentes (32). De acuerdo con esto, se trata de un problema de salud pública cuyo estudio es fundamental para contribuir con la formulación de estrategias que eviten su amplificación y a su vez orientar en la toma de decisiones de las autoridades sanitarias.

I.2.- JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Significado o importancia de la solución del problema

El alto impacto que generan las enfermedades zoonóticas en la salud pública es importante. Considerando que en el Ecuador y América latina las investigaciones realizadas en este campo de estudio son escasas, es evidente la importancia de identificar a los principales agentes infecciosos que causan estas enfermedades, que además de afectar el desarrollo y crecimiento normal de los animales, reducen su rentabilidad.

Aporte: teórico, metodológico, práctico; novedad

En este contexto de la investigación, se procede a la elaboración de un marco de referencia teórico en donde se fundamenta la posibilidad de que la manipulación de cuyes de granja favorece la diseminación de enfermedades zoonóticas.

Es así que este estudio aporta resultados que contribuyen a la actualización de conocimientos, la formulación de recomendaciones para el cuidado y manejo de cuyes de granja y colabora con estrategias fármaco-terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas/zoonóticas mediante el uso adecuado de antibióticos.

El proyecto reviste interés científico, puesto que los resultados obtenidos serán susceptibles de ser publicados en revistas de impacto a nivel internacional, aportando a la producción científica de la Universidad Católica de Cuenca.

Beneficios: humanos, económicos, educativos y de formación profesional

Los beneficiarios directos de este trabajo de tesis son:

En primera instancia están los estudiantes, tesistas de grado y colaboradores en las labores de investigación, quienes también se verán beneficiados; en su formación académica.

De igual manera también serán beneficiados los docentes/investigadores de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad Académica de Salud y Bienestar; Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT), quienes participarán de manera directa en las distintas actividades.

Instituciones como la Universidad Católica de Cuenca se beneficiará con la difusión de los resultados en publicaciones indexadas que se sumarán a otros productos necesarios para la acreditación de las respectivas Carreras y la permanencia en la categoría.

Por otra parte, también se pueden beneficiar de esta investigación los dueños de establecimientos agropecuarios, quienes obtendrán la información necesaria sobre las cepas bacterianas que afectan la salud de sus animales y su posible transmisión al ser humano. Esta información puede servir para, posteriormente, poner énfasis en la correcta manipulación, producción y comercialización de los cuyes, aumentando su productividad y rentabilidad en aquellas áreas donde se dedican a la crianza de estos animales.

Cabe mencionar que también las empresas o proveedores de reactivos y equipos de laboratorio serán beneficiarios directos de este proyecto de investigación.

Entre los beneficiarios indirectos están:

Población de Cañar: los pobladores de la zona del Cañar y el público en general también serán beneficiarios de esta iniciativa que les permita conocer las características de uno de los microorganismos potencialmente patógeno, catalogado como agente causal de zoonosis.

Estudiantes: de las Carreras implicadas en el proyecto antes mencionadas, quienes recibirán información sobre las características de la cepa de *S. aureus* que infectan a los animales de granja, en sus clases teóricas y en sus prácticas.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:

Los cuyes criados para consumo humano en la región de Cañar, ¿están colonizados, en sus fosas nasales, por cepas de *Staphylococcus aureus* que expresan factores de virulencia?

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.- Objetivo General:

Caracterizar fenotípicamente cepas de *S. aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*C. porcellus*) criados en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador).

I.3.2.- Objetivos Específicos:

- Aislar cepas de *S. aureus* a partir de las fosas nasales de cuyes en granjas localizadas en la Provincia de Cañar.
- Determinar la susceptibilidad/resistencia de las cepas aisladas de *S. aureus* frente a distintos antibióticos.
- Identificar factores de virulencia de estas cepas mediante técnicas fenotípicas y moleculares.

I.4.- ANTECEDENTES

EL CUY (*Cavia porcellus*)

Cavia porcellus es un mamífero roedor conocido como cuy, cuyo, cobaya, cobayo o conejillo de indias. Se trata de una especie doméstica, endémica de las cordilleras andinas de América del Sur. Pertenece a la familia *Caviidae* y ha sido producto del cruce entre varias especies del género *Cavia*, tal como se observa en la **Tabla 1** (33).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cuy (3).	
Categoría	Taxón
· Reino	Animal
· <i>Phylum</i>	<i>Vertebrata</i>
· <i>Subphylum</i>	<i>Gnathosmata</i>
· Clase	<i>Mammalia</i> (mamífero, sangre caliente, piel cubierta de pelos)
· Subclase	<i>Theira</i> (mamífero vivíparo)
· Orden	<i>Rodentia</i>
· Suborden	<i>Hystricomorpha</i>
· Familia	<i>Caviidae</i> (roedor con 2 mamas, 4 dedos ant. y 3 post.)
· Género	<i>Cavia</i>
· Especie	<i>Cavia porcellus</i>

Según registros arqueológicos encontrados, estos animales tienen su origen en la etapa Guangala en 100 a.c y 800 d.c en Salango, al sur de la provincia de Manabí, cuando en aquel entonces la zona costera funcionaba como una antigua red comercial del pueblo preincaico (34). Sin embargo, han sido domesticados hace más de 3,000 años por civilizaciones andinas preincaicas de Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia; para su uso como animales de compañía, alimento y en algunos casos para fines terapéuticos de la medicina popular y ancestral. En el Ecuador, la crianza de cuyes es exclusiva de las regiones andinas, especialmente de las áreas rurales (33).

Crianza y alimentación.

Los cuyes son sensibles al frío, por lo que no pueden estar expuestos a temperaturas extremas, así que son criados en jaulas o corrales (“cuyeros”) cercanos a las viviendas, para proveer de un entorno y temperatura adecuados y su alimentación se basa principalmente en alfalfa, forraje, maleza, desperdicios de cocina y desechos de las cosechas (3).

Muchos habitantes rurales en Ecuador se dedican a la crianza de cuyes para su venta y comercialización, es una actividad significativa que garantiza una fuente de alimentación proteínica a bajo costo y a la vez genera un ingreso económico importante. Cabe destacar que la carne de cuy es bastante apreciada por su importante fuente de proteínas, bajo contenido en grasa y tiene un sabor agradable (35).

Reproducción.

Los cuyes pueden reproducirse a una edad temprana y tienen ciclos reproductivos frecuentes, por lo que, las prácticas reproductivas de cuyes varían según las necesidades del criador y de las condiciones locales (36).

Venta y comercialización.

En Ecuador, el consumo de cuyes es parte de la tradición culinaria, especialmente en las regiones andinas; existe una demanda continua de cuyes tanto para el consumo doméstico, como para eventos especiales, incluso se ha visto oportunidades de exportación en el extranjero a mercados internacionales que buscan comercializar productos exóticos.

Es así que la crianza de cuyes en territorio ecuatoriano es una actividad que data de hace cientos de años de antigüedad y constituye un aporte económico rentable para sus criadores porque no hay normativas que impidan su comercialización y su producción, se ofertan como animales vivos destinados al consumo o para la cría y su costo en el mercado varía de acuerdo al tamaño y peso del animal (36,37).

Manejo Sanitario.

Desde el punto de vista epidemiológico, se señala que el cuy es uno de los pocos animales domésticos que convive con el ser humano en el interior de sus viviendas y esto puede dar lugar a infecciones cruzadas (zoonosis) (37).

Si los cuyes son criados en un entorno insalubre, estos se exponen a contraer diversas enfermedades de origen bacteriano, viral o parasitario. Las causas que predisponen estas enfermedades son los cambios bruscos en su habitat, cambios de temperatura, exposición de los animales a la humedad, corrientes de aire, sobrepoblación de cuyes, déficit alimentario, estrés, malas prácticas de cuidado, presencia de roedores o aves y el ingreso indiscriminado del personal a los galpones, entre otros factores (26,38).

Enfermedades infecciosas (zoonosis).

Los procesos infecciosos aparecen por la invasión y multiplicación de microorganismos como bacterias, virus, hongos o parásitos potencialmente patógenos, en las cavidades de un huésped (39). Un proceso infeccioso puede representar la estrecha interacción de un microorganismo con el ser humano bajo ciertas condiciones ambientales, lo que puede dar origen a enfermedades zoonóticas y la gravedad de la infección depende de factores como las características del microbio invasor, la cantidad de inóculo y la respuesta inmunológica del hospedador (40).

Los microorganismos pueden transmitirse de persona a persona, de animal a animal, o de animales a personas (estas se conocen como enfermedades zoonóticas) (41), sin embargo, estos gérmenes que normalmente habitan dentro y fuera del organismo humano pueden causar diversas enfermedades de diferentes grados clínicos, si se someten a algún cambio en su entorno y su transmisión puede darse por vectores como insectos, elementos como el agua y la ingesta de alimentos contaminados (42).

Etiología.

Los principales agentes que han sido identificados como responsables de enfermedades infecciosas en cuyes son *Streptococcus pyogenes* grupo C, *Streptobacillus* y *S. aureus**/ (43).

Identificación fisiológica y metabólica.

Las características fisiológicas y metabólicas de las bacterias son identificadas generalmente con la finalidad de conocer el modo de vida y el hábitat de las diferentes especies (44). En este contexto, los humanos y animales sirven como nichos ecológicos porque ofrecen óptimas condiciones físicas, químicas, temperatura, pH, concentración de O₂, presión osmótica, etc. facilitando su multiplicación y diseminación (45).

Estas características han permitido formular medios de cultivo ideales para el aislamiento e identificación de los organismos objeto de estudio. Desde un enfoque terapéutico, permite comprender la actividad antibiótica, mediante el bloqueo de las vías metabólicas o como interfiere en la síntesis de macromoléculas esenciales para la bacteria (45).

Para la valoración de los caracteres fisiológicos y metabólicos de *S. aureus* se observa la capacidad de fermentación del manitol al desarrollarse en un rango de temperaturas que van desde los 30°C hasta los 37°C (45).

Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias es mediante el cultivo bacteriológico en el laboratorio. Sin embargo, la efectividad de los tratamientos farmacológicos contra este tipo de enfermedades se ve afectada por la falta de un diagnóstico correcto y la aparición de cepas resistentes a los antibióticos; por lo tanto, la elección del agente terapéutico debe basarse en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (43).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Los estafilococos, en general, son cocos Gram positivos cuyas células se agrupan en racimos. *S. aureus* es una bacteria que produce pigmentos de color amarillo intenso, similares al color del oro, mientras que *Staphylococcus albus* (*S. epidermidis*) no produce este tipo de pigmentos (46). La mayoría de las cepas de *S. aureus* producen β -hemólisis alrededor de las colonias al ser cultivadas en agar sangre y se diferencian de otras especies estafilocócicas porque producen enzimas (catalasa y coagulasa), fermentan carbohidratos, producen ácido láctico y no producen gas. Además, son resistentes al calor y la desecación (47).

Entre las características que predominan en *S. aureus* está la producción de hemolisinas, catalasas y coagulinas, las cuales facilitan su identificación.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>S. aureus</i> (47).	
Categoría	Taxon
· Reino	<i>Bacteria</i>
· Filo	<i>Firmicutes</i>
· Clase	<i>Bacilli</i>
· Orden	<i>Bacillales</i>
· Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
· Género	<i>Staphylococcus</i>

Los estafilococos forman parte del microbiota normal de la piel y mucosas de seres humanos y animales sanos, no obstante, bajo ciertas condiciones pueden convertirse en patógenos oportunistas ocasionando infecciones cutáneas, respiratorias y sistémicas (48).

La presencia de diferentes especies del género *Staphylococcus* ha sido asociada con diversas enfermedades en distintos animales de granja. Estas enfermedades incluyen mastitis, linfadenitis, metritis, dermatitis, infecciones urinarias, artritis, entre otras (49). En cuyes adultos, se ha asociado la presencia de *Staphylococcus spp.* con un tipo de linfadenitis estafilocócica (24).

Vías de transmisión y contagio.

- **Contacto directo.** La transmisión directa de *S. aureus* ocurre a través del contacto físico entre cuyes infectados y cuyes sanos, mediante lamidos o roces.
- **Contacto con superficies contaminadas.** El microorganismo puede persistir en superficies y objetos, así que, si el animal entra en contacto con jaulas, comederos o bebederos contaminados existe la posibilidad de infectarse.
- **Transmisión vertical.** Sucede cuando la madre infecta a sus crías durante el parto o lactancia.
- **Vectores.** Los insectos y otros vectores pueden transportar la bacteria de un lugar a otro, incluyendo los corrales donde habitan los cuyes.
- **Contaminación ambiental.** La presencia de heces y basura favorece la proliferación de microorganismos; si hay animales cerca, estos pueden contraer infecciones.
- **Humanos.** Se da por el contacto con fluidos y gotículas contaminadas, expulsados por una persona contagiada.
- **Alimentos.** También pueden transmitirse por los alimentos (ETA) (50).

Estructura celular de *S. aureus*.

Biofilm (biopelícula). Algunas de las cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida o *biofilm* que tiene la función de permitir que la bacteria se adhiera a superficies para colonizar otros organismos, además de brindarle protección frente a la fagocitosis y la acción de ciertos antibióticos (7,51).

Cápsula y capa de polisacárido. También facilita la adherencia y tiene capacidad anti fagocitaria. La producción de la cápsula ocurre por la gran acumulación de polisacáridos y es lo que les da una apariencia mucóide a las colonias en los medios de cultivo (52).

Peptidoglucanos y enzimas asociadas.

El peptidoglucano es uno de los componentes principales de la pared celular de los organismos Gram positivos y Gram negativos. Este se compone por cadenas

de ácidos y subunidades de disacáridos. Su función es conferir resistencia y tolerancia osmótica a la bacteria, además de estimular la quimiotaxis y la agregación leucocitaria (53).

Algunas de las enzimas sintetizadas por *S. aureus* producen proteínas (hemolisinas y leucocidinas) y toxinas involucradas en la producción de enfermedades; estas enzimas se pueden unir a la capa exterior del peptidoglucano mediante enlaces covalentes que favorecen la adhesión de la bacteria a otros organismos (54).

La coagulasa. Está presente como factor de agregación (*clumping factor*) que es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, produciendo la coagulación del plasma y es usada como marcador de virulencia, ya que permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo (55).

La catalasa. Es otra enzima que degrada el $H_2 O_2$, otorgando protección al microorganismo contra la fagocitosis (56).

Toxinas. La mayoría de las cepas de *S. aureus* pueden ser codificadas por hemolisinas: *alfa*, *beta*, *gamma* y *delta*, estas actúan frente a las células sanguíneas como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos (57).

Metabolismo de *S. aureus*

No es exigente con sus requerimientos nutricionales y se desarrolla rápidamente en la mayoría de medios, fermentan carbohidratos como el manitol (7.5–10% NaCl), no produce gas, es anaerobio facultativo, produce pigmentos blancos y amarillos y crece favorablemente a temperaturas de 30-37°C (58).

Caracteres genéticos de *S. aureus*

Entre las características de *S. aureus*, destaca la presencia de elementos móviles como plásmidos, secuencias de inserción y transposones, los cuales contienen genes relacionados con la expresión de factores de virulencia y le otorgan resistencia antimicrobiana (59).

En la actualidad, las cepas de *S. aureus* pueden ser identificadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, mediante la cual se

puede amplificar genes como *nucA* y *femB*, entre muchos otros; el gen *nucA* codifica para una enzima term nucleasa, producida por la mayoría de cepas de *S. aureus*. El gen *femB* también es considerado como un marcador molecular de resistencia antibiótica, forma parte del operón *femAB* y participa en la síntesis de la pentaglicina (60).

Pruebas bioquímicas para identificación de *S. aureus*

Fermentación en medio Manitol Salado. Este medio de cultivo es ideal para la identificación de *S. aureus* y su elevado contenido de sal inhibe el crecimiento de organismos Gram negativos (51). Este medio permite la diferenciación de *S. aureus* frente a otras bacterias porque produce un halo de pigmentación amarillo característico, a causa de la fermentación del manitol, lo que genera un cambio en el color del medio (52).

Después de incubarse durante 24H, se observa el crecimiento de colonias de 0.5 a 1.5 mm de diámetro. Estas colonias son lisas, elevadas, brillantes, con bordes enteros, de consistencia cremosa, con pigmentación amarilla debido a la producción de carotenoides. Además, son resistentes al calor y la desecación (49).

Pruebas enzimáticas:

Prueba de catalasa. Sirve para confirmar la presencia de la catalasa, puesto que se encuentra en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo oxidasa y las bacterias que sintetizan esta enzima descomponen el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, generando la liberación de burbujas de gas, por lo que es utilizada para confirmar y diferenciar a *S. aureus* (catalasa positiva) de otras especies (61).

Prueba de coagulasa. Es una prueba que se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima coagulasa, la misma que actúa transformando el fibrinógeno en fibrina y produce la coagulación del plasma. Esta prueba se realiza en tubo y sirve para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positiva) de otros *Staphylococcus* (61).

Prueba de DNAsa. Se realiza para determinar la actividad de la desoxirribonucleasa para hidrolizar el ADN y producir oligonucleótidos, polinucleótidos y fosfato. Sirve para diferenciar especies de *Staphylococcus* que producen enormes cantidades de DNAsa extracelular (61). El ADN hidrolizado es transparente y el ADN polimerizado precipita, produciendo un cambio en la visibilidad del medio, de azul a verde malaquita (61).

Es importante mencionar que algunas cepas de *S. aureus* son positivas y las cepas SARM pueden dar resultados negativos para esta prueba (61). Según Jeffries et al. en 1957 quienes fueron los primeros en realizar esta prueba indicaron que el ácido desoxirribonucleico polimerizado sirve como sustrato para la enzima desoxirribonucleasa, el NaCl se encarga de mantener el equilibrio osmótico y el agar funciona como solidificante (62).

Prueba de hemólisis. Se refiere a la detección de la actividad hemolítica del microorganismo, es decir, al tipo de hemolisinas producidas por ciertos microorganismos, las cuales, tienen la capacidad de destruir o lizar los eritrocitos y liberar hemoglobina en un medio de cultivo que contenga sangre (60).

Esta prueba sirve para detectar la capacidad hemolítica del microorganismo y clasificarlo como una bacteria potencialmente virulenta (61). Según el tipo de hemólisis que producen, se clasifican en:

Hemólisis alfa: lisis parcial de glóbulos rojos, formando un halo verdoso alrededor de la colonia, debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por el desprendimiento de H_2O_2 (63).

Hemólisis beta: lisis total de glóbulos rojos, produce un halo claro y brillante alrededor de las colonias, otorga selectividad a *S. aureus* (63,64).

Hemólisis gamma: es la ausencia total de lisis de glóbulos rojos al observar el medio, las colonias no presentan modificaciones en su color y aspecto (65).

Tinción de Gram

Este procedimiento consiste en aplicar cristal de violeta, el cual tiene afinidad por el peptidoglucano de la pared bacteriana; a continuación, el Lugol (mediante la formación del complejo cristal violeta-yodo) actúa para impedir la salida del cristal violeta. La mezcla de alcohol-acetona sirve para deshidratar y obstruir los poros de la pared celular de los Gram positivos y a la vez destruir la membrana externa de los Gram negativos (66).

Al contener grandes cantidades de peptidoglucano, las bacterias Gram positivas retienen el complejo cristal violeta-yodo. La safranina funciona como un colorante secundario, para teñir las bacterias (Gram negativas) que no lograron retener el complejo cristal violeta-yodo (67,68).

Pruebas moleculares.

Tomando en cuenta que las pruebas para identificación fenotípica de *S. aureus* no siempre permiten distinguir claramente las distintas cepas (69). Se recurre a técnicas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RT-PCR (PCR en tiempo real), con el fin de detectar la presencia de genes específicos del genoma de la especie *S. aureus* (70).

La resistencia antimicrobiana se origina a partir de genes que codifican este mecanismo de defensa contra los antibióticos (71). Estos genes de resistencia suelen ser transferidos entre bacterias mediante transmisión vertical (fisión binaria) u horizontal (contacto directo con bacterias de la misma o de diferente especie) (72).

Resistencia de *S. aureus* a compuestos β -lactámicos

Los β -lactámicos son compuestos bactericidas capaces de inducir la lisis bacteriana al bloquear la síntesis del peptidoglucano de la pared celular, afectando la producción de puentes interpeptídicos (73). Entre este grupo de antibióticos se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (74).

El compuesto β -lactámico de mayor importancia es la penicilina, antibiótico natural de uso clínico utilizado para tratar infecciones estafilocócicas, por lo que es fundamental para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Desafortunadamente, en la actualidad más del 90% de las cepas clínicas de *S. aureus* muestran resistencia a la penicilina (75).

S. aureus resistente a meticilina (SARM) es el término empleado para denominar un grupo de cepas capaces de resistir a casi todos los β -lactámicos, por lo que representan un gran problema de salud a nivel mundial (76). Desde que fueron identificadas, en el 2005, su diseminación ha ido aumentando mediante diferentes vías de transmisión. La resistencia a la meticilina está asociada a la presencia de los genes *mecA* y *mecC* en el genoma de *S. aureus*, siendo este último un gen homólogo de la *mecA*. Ambos genes se localizan en el casete cromosómico *SSCmec* de *S. aureus*, un elemento genético móvil de transferencia horizontal (78).

Resistencia a antibióticos no β -lactámicos

El uso de los β -lactámicos en general, se ve limitado por el constante aumento de las enfermedades infecciosas causadas por organismos multirresistentes. En efecto, se ha observado la resistencia combinada a la penicilina, tetraciclina, estreptomicina, gentamicina y eritromicina (79).

Frente a esta situación, se recomienda el uso de la vancomicina para tratar infecciones causadas por cepas SARM. Sin embargo, también han surgido cepas altamente resistentes a este antibiótico y a otros, tales como linezolid, tigeciclina, daptomicina, tetraciclinas, clindamicina, rifampicina, etc (77,78).

Marcadores moleculares de resistencia antimicrobiana

Los marcadores de resistencia antimicrobiana son secuencias nucleotídicas que sirven para valorar la capacidad de resistencia de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano. La detección de estos marcadores contribuye a la identificación temprana de bacterias multirresistentes, vinculadas con enfermedades infecciosas (80).

Gen *nucA*. *S. aureus* codifica para una termonucleasa extracelular o TNasa en proporciones similares a las cepas que producen coagulasa. El gen *nucA* es el responsable de codificar esta termonucleasa y está presente en prácticamente todas las cepas de *S. aureus*, por lo que es utilizado como un indicador diagnóstico de esta especie (81, 82).

Gen *femB*. Los genes *fem* están involucrados en el mecanismo de resistencia a la meticilina. El gen *femB* forma parte del operón *femAB* que sintetiza la pentaglicina de la pared celular de *Staphylococcus spp* y también sirve como indicador diagnóstico de especies de este género (83, 84).

Gen *blaZ*. Gen que codifica la β -lactamasa y esta enzima es responsable de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos β -lactámicos que incluyen penicilinas y cefalosporinas (85). El mecanismo de acción de la β -lactamasa se basa en hidrolizar el anillo β -lactámico del antibiótico e inactivar sus propiedades antibacterianas, limitando la eficacia del antibiótico en el tratamiento de infecciones. Este gen se asocia a las bacterias del género *Staphylococcus* y su presencia le confiere resistencia a la penicilina (86, 87).

Gen *mecA*. Otorga a *S. aureus* resistencia a la meticilina; el gen forma parte de un elemento genético móvil integrado al cromosoma bacteriano, conocido como "*Staphylococcal cassette chromosome mec (SSCmec)*", no endógeno. Su presencia puede ser detectada a través de PCR (88). Este gen codifica para una proteína de 78kDa, con baja afinidad por la penicilina y por otros antibióticos beta-lactámicos (PBP2' o PBP2a) (89). Es por ello que representa un marcador genético ideal para estudios de caracterización o identificación de resistencia a β -lactámicos (90).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1.- METODOLOGÍA

II.1.2.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque: El enfoque de esta investigación es cuantitativa

Diseño de Investigación: Descriptivo

Nivel de Investigación: Básico-orientado

Tipo de Investigación:

Por el ámbito: Mixta: De campo y de laboratorio

Por la técnica: Observacional

Por la temporalidad: Transversal actual

II.2.- MUESTRAS

Muestreo y muestra:

Para iniciar esta investigación se recolectaron muestras en tres diferentes granjas cuyeras ubicadas en la provincia del Cañar, mediante la técnica de hisopado nasofaríngeo de las mucosas nasales de cuyes de diferentes edades, pesos y sexo. Las muestras fueron llevadas al laboratorio en Medio Stuart para continuar con los procedimientos de cultivo e incubación.

Universo de estudio o la población:

NOTA: Por no tratarse de un estudio de corte epidemiológico, no aplican este tipo de consideraciones. La unidad de estudio está constituida por las cepas bacterianas (aislados puros) cuyas características fenotípicas y diversidad nos interesa conocer. La estrategia de muestreo para el aislamiento de dichas cepas tomó en cuenta la recolección de muestras representativas de varias granjas dedicadas a la crianza de cuyes, ubicados en la provincia del Cañar.

Sin embargo, con el fin de brindar mayor cantidad y calidad de información, se da a conocer que, a partir de 35 cepas aisladas anteriormente de 112 muestras

aleatorias de 112 cuyes procedentes de 3 granjas (FINCA P: Pedrito; FINCA Q: Veterinaria; FINCA R: Instalaciones del CIITT) de la provincia del Cañar, mediante la técnica de hisopado nasofaríngeo (**Tabla 9, Figura 2**).

Criterios de selección: en este contexto se consideraron los siguientes criterios de selección:

- ➔ Criterios de inclusión: Colonias bacterianas que presenten las características típicas de la especie *S. aureus* en cultivo en medio Agar Manitol Salado, pruebas de coagulasa y catalasa positivos, tinción Gram positivos y actividad Beta-hemolítica.
- ➔ Criterios de exclusión: Colonias bacterianas que no presentaron las características típicas de la especie *S. aureus* en cultivo en medio Agar Manitol Salado.

II.3.- DEFINICION Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

Tomando en cuenta de que se trata de un estudio de tipo observacional y descriptivo, consideraremos las siguientes variables:

VARIABLES CUANTITATIVAS: cantidad de morfotipos de colonias cultivadas a partir de muestras de la superficie de las mucosas nasales de cuyes; frecuencia de cepas que presentan los marcadores moleculares *nucA* y *femB* en su genoma.

VARIABLES CUALITATIVAS: morfología celular; color del pigmento sintetizado; tipo de pared celular (reacción frente a la tinción de Gram); clasificación taxonómica bacteriana; ubicación filogenética de las cepas identificadas; presencia de factores de toxicidad y patogenicidad; tipo de respuesta de sensibilidad frente a antimicrobianos; producción de factores de virulencia.

II.3.1.- OPERACIÓN Y ANALISIS DE VARIABLES

- **VARIABLES INDEPENDIENTES:** cepa o aislado de *Staphylococcus aureus*
- **VARIABLES DEPENDIENTES:** ver Tabla 3

Tabla 3. Clasificación y definición de las variables de operacionalización.

Variables	Definición	Clasificación	Indicador	Escala
Cantidad de morfotipos de colonias bacterianas	Cantidad de colonias bacterianas con diferentes morfologías, que se desarrollan en medio de cultivo agarizado en cajas de Petri.	Cuantitativa continua	Numero de morfotipos diferentes/muestra nasofaríngea de cuyes	De razón
Color del pigmento sintetizado	Coloración producida por las bacterias.	Cualitativa nominal	Color (amarillo, blanca, crema, etc)	Nominal
Morfología celular	Fisonomía de las células a través del microscopio óptico con aumento de 100X.	Cualitativa nominal	Bacilos Cocos Espirilos Coco-bacilos	Nominal
Tipo de pared celular	Respuesta celular bacteriana frente a la tinción de Gram.	Cualitativa nominal	Gram positivas Gram negativas	Nominal
Clasificación taxonómica	Género y especie según la clasificación taxonómica.	Cualitativa nominal	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus sp.</i> ; otros géneros o especies	Nominal
Respuesta frente a factores de patogenicidad y toxicidad	Mecanismos de patogenicidad y toxicidad que facilitan la diseminación nosocomial de las cepas.	Cualitativa nominal	Catalasa Coagulasa DNAsa Hemólisis	Nominal
Susceptibilidad frente a antimicrobianos	Inhibición de la multiplicación de las bacterias en presencia de concentraciones estandarizadas de antibióticos.	Cualitativa nominal	Sensible Intermedio Resistente	Nominal
Presencia de genes específicos de <i>S. aureus</i>	Detección, mediante PCR, de marcadores específicos de <i>S. aureus</i> .	Cualitativa nominal	<i>NucA</i> <i>femB</i>	Nominal
Presencia de genes asociados a factores de resistencia antimicrobiana	Detección, mediante PCR, de genes que codifican la capacidad antibiótica de las distintas cepas aisladas.	Cualitativa nominal	<i>MecA</i> <i>blaZ</i>	Nominal

Métodos e Instrumentos para la recolección de datos.

La información obtenida a lo largo de las diferentes etapas del estudio se introdujo en una base de datos, elaborada en Microsoft Excel 2019. Para su análisis se utilizó la estadística descriptiva.

Procesamientos, análisis, resumen y presentación de la información.

El análisis de los resultados estará basado en la descripción y en la estadística descriptiva; y el procesamiento de los datos se realizará empleando cálculos básicos. Los resultados serán presentados en forma de fotografías, figuras, tablas y gráficos de frecuencias y porcentajes.

II.4.- PROCEDIMIENTOS PARA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

Tabla 4. Insumos requeridos en el laboratorio del CIITT-UCACUE para el proceso de investigación.

Materiales	Reactivos	Medios de cultivo	Equipos
- Hisopos estériles	- Solución salina	- Agar Manitol Salado	- Estufa
- Mecheros Bunsen	- Alcohol	- Agar Sangre	- Refrigeradora
- Palillos estériles	- Agua destilada	- Agar DNAsa	- Microscopio
- Porta objetos	- Kit de tinción Gram	- Medio de Stuart (medio de transporte)	- Autoclave
- Frascos de vidrio con tapa de diferentes tamaños.	- H ₂ O ₂ al 3%	- Agar base	- Cabina de flujo laminar.
- Aceite de inmersión	- Plasma citratado de conejo.	- Agar Müller Hilton	- Vortex
- Toallas de papel	- Plasma humano		- Cámara de electroforesis horizontal
- Equipo de protección personal.	- Kit PCR		- PCR en termociclador
- Placas Petri	- Cepa <i>S. aureus</i> ATCC 11632		- Computadora
- Asas de siembra	- Agarosa grado Biología Molecular		- Balanza analítica
- Rotuladores permanentes.	- kit Invitrogen™ PCR Master Mix Starter Pack.		
- Guantes de nitrilo	- Solución de lisis		
- Sistema de soporte	- Agua libre de nucleasas.		
- Erlenmeyer	- Aceite de inmersión		
- Tubos de ensayo	- Discos para test de susceptibilidad antimicrobiana. Bioanalyse® Susceptibility Test Discs		
- Tubos para PCR			
- Microtubos			
- Pipetas Pasteur			
- Algodón			
- Tubos Eppendorf			
- Tubos para PCR nuevos o esterilizados			
- Micropipetas automáticas			
- Puntas azules y amarillas			

II.4.1.- Procedimientos para obtención de muestras:

Después del proceso de selección de las granjas participantes (**Figura 2**) en el estudio, se procedió a la toma de muestras mediante el uso de hisopos estériles. Para ello, se insertó el hisopo en las fosas nasales de cada cuy, girando suavemente el mismo hasta obtener la muestra necesaria. A continuación, el hisopo con la muestra obtenida fue transportada en medio Stuart y conservada a temperatura ambiente hasta llegar al laboratorio de microbiología (CIITT).

II.4.2.- Procedimientos para cultivo y aislamiento de microorganismos

Cultivo y aislamiento primario

Una vez obtenidas las 112 muestras, se realizó el cultivo inicial de los inóculos en medio de Agar Manitol Sal y se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se observan las características morfológicas de las colonias.

La capacidad de las cepas para fermentar el manitol permitió identificar de manera preliminar aislados del género *Staphylococcus*.

Reactivación y purificación de cepas

Previo al aislamiento primario y conservación de las cepas bacterianas a temperatura ambiente, las colonias se reactivaron mediante el cultivo de las mismas, en agar de manitol salado, en el interior de una cabina de flujo laminar (**Figura 10**).

Las placas inoculadas se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 horas, al observar el crecimiento de nuevas cepas, se purificaron mediante sub-cultivos o repiques sucesivos en el mismo medio hasta obtener cepas con rasgos fenotípicos únicos (cultivos axénicos o puros).

Las cepas obtenidas fueron empleadas en procedimientos posteriores, durante el proceso de la investigación y para la generación de una colección bacteriana.

Caracterización morfológica colonial

La morfología de las colonias se determinó mediante la observación directa de sus características al ser cultivadas en medio de manitol salado. Los caracteres considerados fueron tamaño, elevación, consistencia, color, borde, textura (44):

- Elevación: plana, planoconvexa, convexa, acuminada, umbilicada, papilada.
- Bordes: liso, ondulado, lobulado, espiculado, filamentoso, rizoide.
- Forma: Regular, Irregular, Circular, Filamentosa, Rizoide.
- Consistencia: Butirosa (brillante, húmeda y translúcida), mucoide, vítrea (opaca seca), seca (dura).
- Tamaño: Puntiforme, Pequeña, Mediana, Grande.
- Color: amarillo, rojo, naranja, blanco, crema, etc.
- Textura: brillante u opaca (44).

Prueba de Catalasa. Esta prueba da resultados presuntivos para el género *Staphylococcus* al observar la producción y liberación de burbujas después de colocar H₂O₂ sobre la muestra (colonias aisladas) (**Figura 4A**).

Prueba de la coagulasa. Para la realización de esta prueba se agregó 500ug de plasma en un tubo esterilizado y se inoculó la colonia del aislamiento inicial. Después de 4 y 24 horas de incubación a 37°C, se observó la coagulación del inóculo, siendo un resultado positivo (**Figura 4B**).

Agar DNAsa. Se produjo hidrólisis del ADN, por lo que manifestaron actividad desoxirribonucleica (indicador de patogenicidad), presentaron halos transparentes alrededor del área de crecimiento, siendo consideradas como positivas para esta prueba (**Figura 4C**).

Prueba de actividad hemolítica. Las cepas con características compatibles para *Staphylococcus spp.* fueron inoculadas en Agar Sangre para observar si el microorganismo es capaz de multiplicarse y producir hemólisis, mediante la visualización de los halos alrededor de las colonias y el cambio producido en el aspecto del medio (**Figura 5**). La especie *S. aureus* presenta actividad β

hemolítica y se observa un halo claro y brillante alrededor de las colonias por la lisis total de los glóbulos rojos del medio (63, 65).

II.4.3.- Tinción de Gram.

Esta técnica diferencial fue realizada de acuerdo a lo expuesto por González Elizalde et.al (91). Esta tinción permite discriminar a las bacterias en dos grandes grupos en base a la estructura de su pared celular: Gram positivos (color violeta-azulado) y Gram negativos (color rojo-rosa) (92).

Haciendo uso del asa bacteriológica, se obtuvo un inóculo procedente del medio manitol salado, se realizó un frotis en el portaobjetos y se aplicó la técnica de tinción de Gram.

Criterios de selección de cepas para análisis posteriores

La producción de catalasa, coagulasa y la fermentación de manitol son las características mínimas requeridas para diferenciar *S. aureus* de otros *Staphylococcus* (93). Por lo tanto, los criterios para seleccionar las cepas que serán sometidas a análisis posteriores tendrán que cumplir los requerimientos adjuntos a continuación:

Tabla 5. Características diferenciales de *S. aureus*.

Manitol	Positivo
Catalasa	Positivo
Coagulasa	Positivo
Hemolisis	β hemólisis
Tinción de Gram	Positivo
NucA	Positivo
FemB	Positivo

Por lo tanto, las cepas que presentaron resultados diferentes, fueron descartadas de estudios posteriores.

II.4.4.- Ensayos de susceptibilidad frente a antibióticos

La susceptibilidad a los antibióticos se determinó mediante el método de difusión de discos o técnica de Kirby-Bauer. Para ello, las cepas puras fueron suspendidas en solución salina y ajustadas a una turbidez de 0.5 en el estándar de McFarland y finalmente fueron inoculadas (por hisopado) en la superficie del agar Müeller-Hinton, en donde se colocaron los 17 discos de susceptibilidad antimicrobiana de la marca comercial Bioanalyse - Susceptibility Test Discs (Antimikrobiyal Duyarlilik Test Diski) (94), con los siguientes antibióticos:

Tabla 6. Discos Bioanalyse para análisis de sensibilidad antimicrobiana.

ANTIBIOTICOS	Contenido del disco	Símbolo
Amoxicilina	25mcg	AX
Ampicilina	10mcg	AM
Azitromicina	15mcg	AZM
Cefoxitina	30 µg	FOX
Ciprofloxacina	5 µg	CIP
Clindamicina	2mcg	DA
Cloranfenicol	30 µg	C
Eritromicina	15 µg	E
Gentamicina	10mcg	CN
Linezolid	30mcg	LNZ
Oxaciclina	1mcg	OX
Penicilina	10 µg	P
Rifampicina	5mcg	RA
Teicoplanina	30 µg	TEC
Tetraciclina	30mcg	TE
Trimetoprima/ Sulfametoxazol	1.25/23.75mcg	SXT
Vancomicina	30mcg	VA

Los antibióticos se eligieron en base a su eficacia, disponibilidad en el mercado, y toxicidad. Las placas se incubaron a 37 °C por 24h (**Tabla 14-Anexos**). El diámetro del halo de inhibición se interpretó como cepas sensibles, intermedias o resistentes, en base a los criterios establecidos por el CLSI (93).

II.4.5.- Detección por PCR de marcadores moleculares específicos de la especie *S. aureus*.

Para esto empleamos el método de lisis alcalina. Con un asa bacteriológica se introdujeron colonias de *S. aureus* provenientes de cultivo en medio manitol salado en tubos cónicos con 1ml de agua destilada esterilizada. La suspensión se homogenizó por agitación fuerte en vórtex, se centrifugó por 3 minutos a 8000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 50 µl de solución de lisis (SDS al 1% en NaOH 0,25 N). Se homogenizó otra vez, y se calentó a 96°C durante 10 minutos. Se añadieron 450 µl de agua libre de nucleasas, se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm y el ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado para amplificación por PCR (95, 96). Para esto, se utilizó una ADN-polimerasa termoestable, resistente a altas temperaturas (96).

A partir de este extracto celular, se amplificaron los genes *nucA* y *femB*. Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación, se modificaron los siguientes parámetros:

- Factor de dilución del ADN genómico
- Temperaturas de hibridación
- Concentración de los cebadores o primers (97).

Condiciones de amplificación

Mezcla de reacción. El kit comercial utilizado fue Invitrogen™ PCR Master Mix Starter Pack, de la marca Invitrogen™. La solución master Mix Thermo Scientific DreamTaq Green PCR contienen una ADN Taq polimerasa mejorada para todas las aplicaciones de PCR estándar (98, 99).

La solución master Mix fue preparada en frío de la siguiente manera

Tabla 7. Volúmenes y concentraciones para un volumen de reacción de 400µl de solución Master Mix (94).

Componente	Volumen	Concentración final
Master Mix 10x	330µl	1x
Primer Forward	49.5µl	1.2µl
Primer Reverse	49.5µl	1.2µl
Molde de ADN	60µl	1.5µl
Agua libre de nucleasas	220µl	5.5µl
Mezcla final en cada microtubo	18.5µl	

Detección de los genes *nucA*, *femB*, *mecA* y *blaZ*.

Para el proceso de amplificación molecular se utilizó una cepa control de *S. aureus* ATCC 11632 y se siguió el protocolo según Kobayashi y Col 1994 y Schnellmann y Col 2006, planteado en la **Tabla 8**. (96, 97).

Tabla 8. Proceso de amplificación de genes *nucA*, *femB*, *mecA* y *blaZ*.

Gen	Secuencia del iniciador 5' – 3'	Perfil térmico	Longitud amplicón (pb)
<i>nucA</i>	F: 5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3' R: 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC 3'	94°C x 5 min 34 ciclos: 94°C x 1 min; 54°C x 1 min; 72°C x 1 min 10 ciclos: 94°C x 40 seg; 68°C x 40 seg; 72°C x 1 min Extensión final: 72°C x 5 min	280 pb
<i>femB</i>	F: 5' TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC 3' R: 5' ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT 3'	94°C x 5 min 10 ciclos: 94°C x 45 seg; 50°C x 45 seg; 72°C x 1 min 35 ciclos: 94°C x 1 min; 50°C x 45 seg; 72°C x 1 min Extensión final: 72°C x 5 min	650 pb
<i>mecA</i>	F: 5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATG A 3' R: CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	94 °C x 5 min 34 ciclos: 94°C x 1 min; 54°C x 1 min; 72°C x 1 min Extensión final: 72°C x 10 min	300 pb
<i>blaZ</i>	F: 5' GTT GCG AAC TCT TGA ATA GG 3' R: 5' GGA GAA TAA GCA ACT ATA TCA TC 3'	94°C x 5 min 34 ciclos: 94°C x 1 min; 54°C x 1 min; 72°C x 1 min Extensión final: 72°C x 10 min	650 pb

La amplificación fue confirmada sometiendo los amplicones a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE, a 100 V constantes, durante 45 minutos. Los geles, teñidos con SYBR Safe fueron fotografiados bajo iluminación UV en un transiluminador, para verificar la longitud de los fragmentos amplificados (100).

CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad de cada una de las pruebas realizadas se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 11632 y para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 respectivamente.

II.5.- PROCEDIMIENTOS ÉTICOS

El proyecto planteado no presenta ningún tipo de conflicto bioético; desde el punto de vista social, se verán beneficiados los dueños de establecimientos agropecuarios y las comunidades aledañas, quienes se dedican a la crianza de cuyes, puesto que el objetivo principal es conocer las características de los microorganismos potencialmente patógenos y causantes de enfermedades zoonóticas que infectan a sus animales, las mismas que generan un impacto económico en la población rural.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

III.1.- RESULTADOS

III.2.- ANALISIS FENOTIPICO

Muestreo y aislamiento inicial de cepas a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos de cuyes.

Del total de 112 cuyes que fueron muestreados en las 3 granjas ubicadas en la provincia del Cañar (**Figura 1 y 2**), 33 muestras resultaron positivas para aislados con características de *S. aureus*. A partir de estas 33 muestras se lograron finalmente aislar 32 aislados que luego se purificaron con la finalidad de crear una colección (**Tabla 9 y 10**).

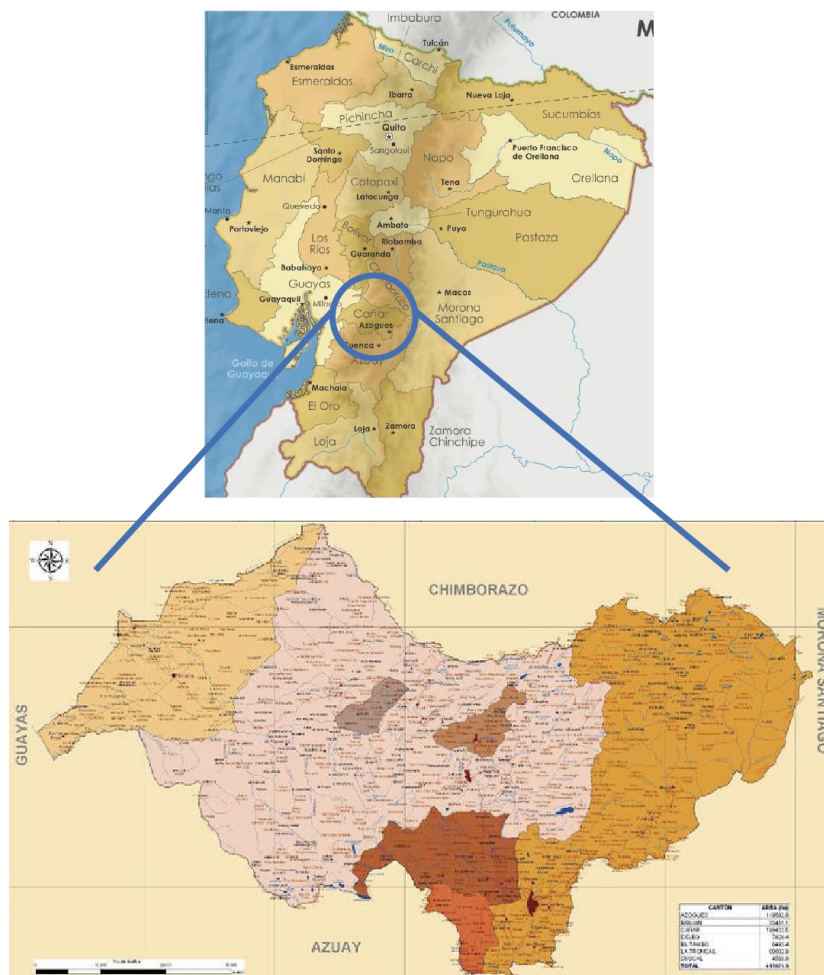


Figura 2. Ubicación de la provincia del Cañar en el territorio del Ecuador (101)

Tabla 9. Cateo de granjas de los cuyes muestreados.

Granja y código designado	Identificación de aislados	N ° de cuyes	N ° de muestras	N ° aislados	Información adicional
GRANJA P (Pedrito)	P4.1; P4.2; P5.1; P6.1; P7.1; P8.1; P9.1; P10.1; P11.1; P12.1;P13.1; P14.1; P15.1;P16.1; P17.1; P19.1;P21.1; P22.2; P23.1;P24.1; P25.1; P26.1;P28.1; P29.1; P31.1.	34	24	24	<ul style="list-style-type: none"> - Cuyes de distintas edades. - Cuyes entre machos y hembras. - Alimentación mixta: alimento vegetal (forraje) y alimento concentrado. - Animales aparentemente sanos.
GRANJA Q (Veterinaria)	Q15.1; Q15.2; Q17.1; Q18.1; Q22.1; Q29.1	32	5	5	<ul style="list-style-type: none"> - Cuyes de distintas edades. - Cuyes entre machos y hembras. - Alimentación mixta: alimento vegetal (forraje) y alimento concentrado. - Animales aparentemente sanos y muy pocos presentaban parásitos externos en pelo y piel.
GRANJA R (instalaciones del CIITT)	R16.1; R17.1; R24.1; R39.1.	46	4	2	<ul style="list-style-type: none"> - Cuyes de distintas edades. - Todos los cuyes fueron machos. - Alimentación mixta: alimento vegetal (forraje) y alimento concentrado. - Animales aparentemente sanos (no se observó signos de enfermedad o presencia de parásitos externos).
TOTAL		112	33	32	

A



B



C



Figura 2. Muestreo de los cuyes pertenecientes a las 3 Granjas:

A: Granja P (Pedrito)

B: Granja Q (Veterinaria)

C: Granja R (instalaciones del CIITT).

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los aislados obtenidos a partir del cultivo inicial.

De los 35 aislados obtenidos del aislamiento inicial, 34 fermentaron el medio de Manitol Salado, 33 fueron coagulasa-positivos, 26 aislados fueron DNAsa-positivos y 30 produjeron β -hemólisis en el medio. Y a su vez, el 100% de los aislados fueron cocos Gram positivos y catalasa-positivos, respectivamente, como se observa en la **Tabla 10** y en las figuras a continuación.

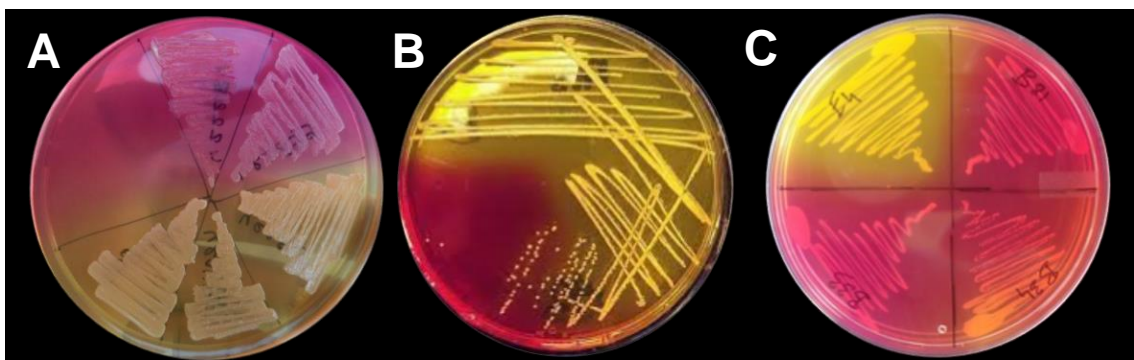


Figura 3. - A, B, C: características morfológicas de las colonias aisladas en agar de Manitol Salado.

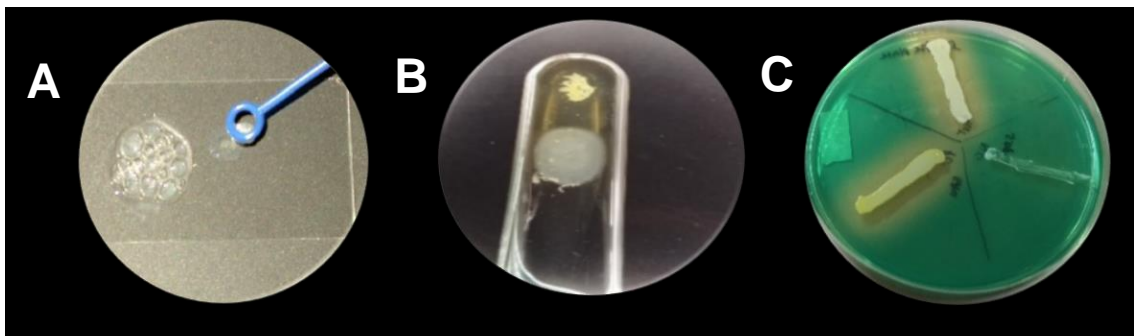


Figura 4. - Pruebas bioquímicas. (A) Catalasa; (B) Coagulasa; (C) DNAsa

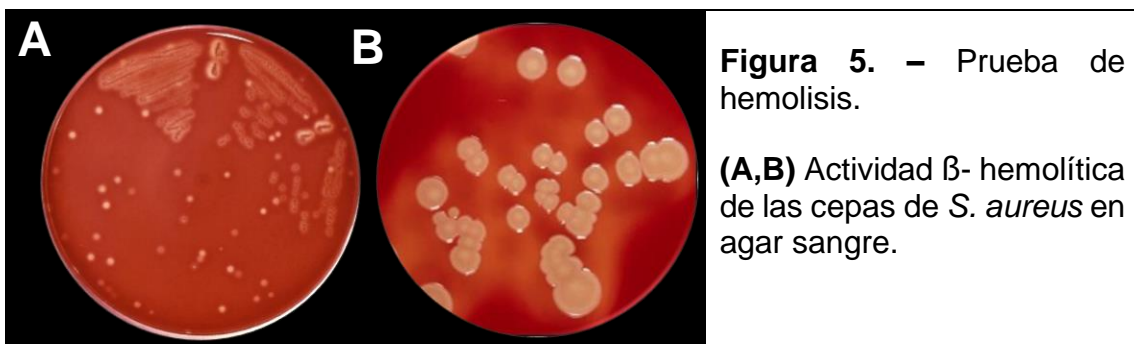


Figura 5. - Prueba de hemólisis.

(A,B) Actividad β - hemolítica de las cepas de *S. aureus* en agar sangre.

Tabla 10. Resultados del aislamiento primario, identificación y coloración colonial, fermentación del manitol, tinción de Gram, pruebas bioquímicas, actividad hemolítica y pruebas moleculares para determinación de los genes *NucA* y *FemB* y genes de resistencia *BlaZ* y *MecA*.

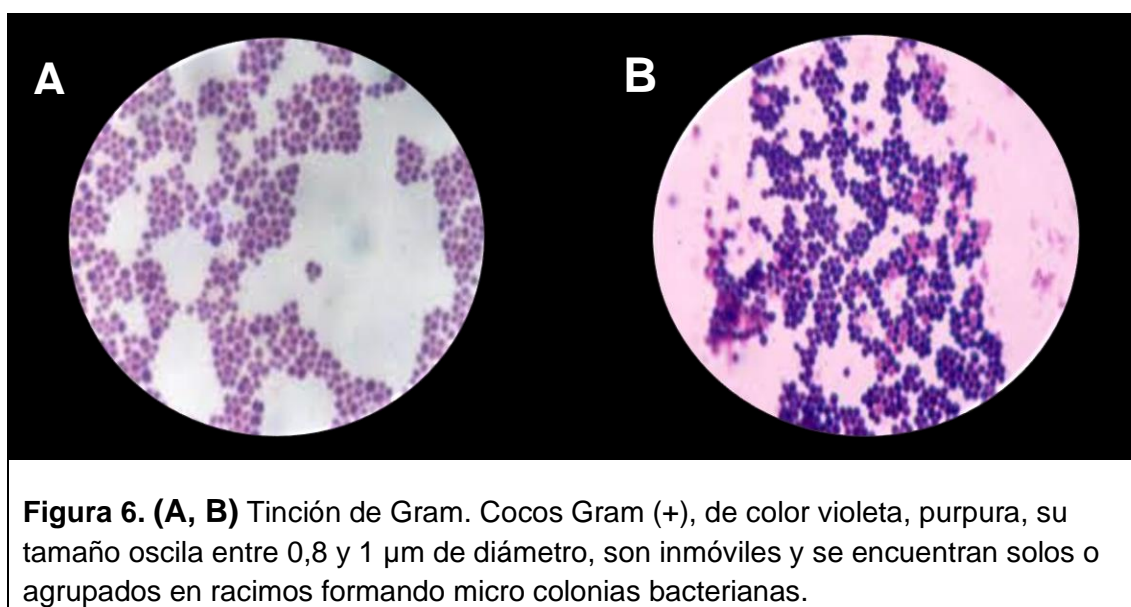
ID MUESTRA	COLONIA	MANITOL	GRAM	Catalasa	Coagulasa	DNAsa	Hemólisis	<i>nucA</i>	<i>femB</i>	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	
0c	ATCC	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
1c	P4.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
2c	P4.2	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
3c	P5.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	-	-	-
4c	P6.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	-	+	+	-	-
5c	P7.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	+	+	-	-
6c	P8.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
7c	P9.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
8c	P10.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
9c	P11.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
10c	P12.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
11c	P13.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	+	+	-	-
12c	P14.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	+	-	-	-
13c	P15.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
14c	P16.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	+	+	+	-
15c	P17.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	-	-	-
16c	P19.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
17c	P21.1	Amarilla	+	cocos Gram (+)	+	+	-	-	-	-	-	-
18c	P22.2	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
19c	P23.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	-	-	-
20c	P24.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
21c	P25.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-

22c	P26.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	-	+	+	-	-
23c	P28.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
24c	P29.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
25c	P31.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
26c	Q15.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
27c	Q15.2	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
28c	Q17.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	-	+	-	-
29c	Q18.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
30c	Q22.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
31c	Q29.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	-	-	-	-	-	-	-
32c	R16.1	Blanca	-	cocos Gram (+)	+	+	-	β hemólisis	-	-	-	-
33c	R17.1	Blanca	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-
34c	R24.1	Crema	-	cocos Gram (+)	+	-	-	-	-	-	-	-
35c	R39.1	Crema	+	cocos Gram (+)	+	+	+	β hemólisis	+	+	-	-

Morfología colonial (color amarillo, rojo, naranja, blanco, crema, etc.); fermentación del manitol (+/-); tinción Gram (Gram +/Gram -); prueba de catalasa (+/-); prueba de coagulasa (+/-); prueba DNAsa (+/-); actividad hemolítica (alfa, beta, gamma); detección génica (*nucA* y *femB*); detección de resistencia antimicrobiana (*blaZ* y *mecA*).

III.3.- ANALISIS MORFOLÓGICO

De las 112 muestras de hisopados, se obtuvieron 35 aislados que fueron identificados como cocos Gram (+) (**Tabla 10**). En la observación microscópica se identificaron características celulares como: la coloración violeta o purpura y la forma de los microorganismos, eran múltiples cocos agrupados conformando racimos, compatibles con el género *Staphylococcus spp.* (**Figura 6**).



Criterios para la selección de cepas de *S. aureus*.

Como se observa en la **Tabla 10**, algunos de los aislados presentan todas las características determinantes del género *Staphylococcus*; sin embargo, otras cepas resultaron positivas para unas pruebas y negativas para otras. Por ejemplo, el aislado 31c resultó negativo frente a las pruebas de coagulasa y DNAsa; de la misma forma, cuando fue sometida a pruebas moleculares para detectar los genes *nucA* y *femB*, ambos resultaron negativos. Otra cepa identificada con el código 34c dió resultados negativos para la fermentación del manitol, pruebas de coagulasa, DNAsa, hemólisis y por supuesto, las pruebas moleculares también fueron negativas.

Por lo tanto, estas cepas y otras más que presentaron un fenotipo extraño o atípico fueron descartadas de los análisis posteriores tal y como se muestra a continuación, en donde, se seleccionaron 31 cepas y los 4 restantes fueron se descartadas.

TABLA 11. Selección y descarte de cepas para ensayos de susceptibilidad.

CEPAS SELECCIONADAS	CEPAS DESCARTADAS
1C (P4.1), 2C (P4.2), 3C (P5.1), 4C (P6.1), 5C (P7.1), 6C (P8.1), 7C (P9.1), 8C (P10.1), 9C (P11.1), 10C (P12.1), 11C (P13.1), 12C (P14.1), 13C (P15.1), 14C (P16.1), 15C (P17.1), 16C (P19.1), 18C (P22.2), 19C (P23.1), 20C (P24.1), 21C (P25.1), 22C (P26.1), 23C (P28.1), 24C (P29.1), 25C (P31.1), 26C (Q15.1), 27C (Q15.2), 28C (Q17.1), 29C (Q18.1), 30C (Q22.1), 33C (R17.1), 35C (39.1).	17C (P21.1), 31C (Q29.1), 32C (R16.1), 34C (R24.1).

III.4.- ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIBIÓTICOS

En total, 31 cepas de *S. aureus* cumplieron con los criterios de selección establecidos, 24 de las cuales procedían de muestras de la granja P, 5 de la granja Q y 2 cepas de la granja R. Todas ellas se evaluaron en ensayos de susceptibilidad frente a 17 antibióticos seleccionados.

Se consideraron como cepas resistentes a la Oxacilina a aquellas que desarrollaron halos de inhibición iguales o menores a 19mm, de acuerdo a las normas establecidas en el CLSI, 2021 (94). Para el control de calidad de todo el proceso se utilizó una cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 25923.

De las 31 cepas de *S. aureus* seleccionadas se determinó que 17 fueron resistentes a la Oxacilina (54,83%), 19 a la Ciprofloxacina (61,29%) y 1 a la Penicilina (3,22%). Por otra parte, todas las cepas fueron sensibles a la Eritromicina, Teicoplanina, Rifampicina, Linezolid, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Tetraciclina, Cefoxitina, Ampicilina y Clindamicina (**Figura 7, Tabla 12**).

Además, 25 cepas presentaron sensibilidad intermedia a la ciprofloxacina, vancomicina, amoxicilina, azitromicina, gentamicina, y cloranfenicol. Los aislados de rango intermedio se pueden interpretar de acuerdo al agente antimicrobiano y a las pautas clínicas específicas que presenten los cuyes (Figura 7, Tabla 12).

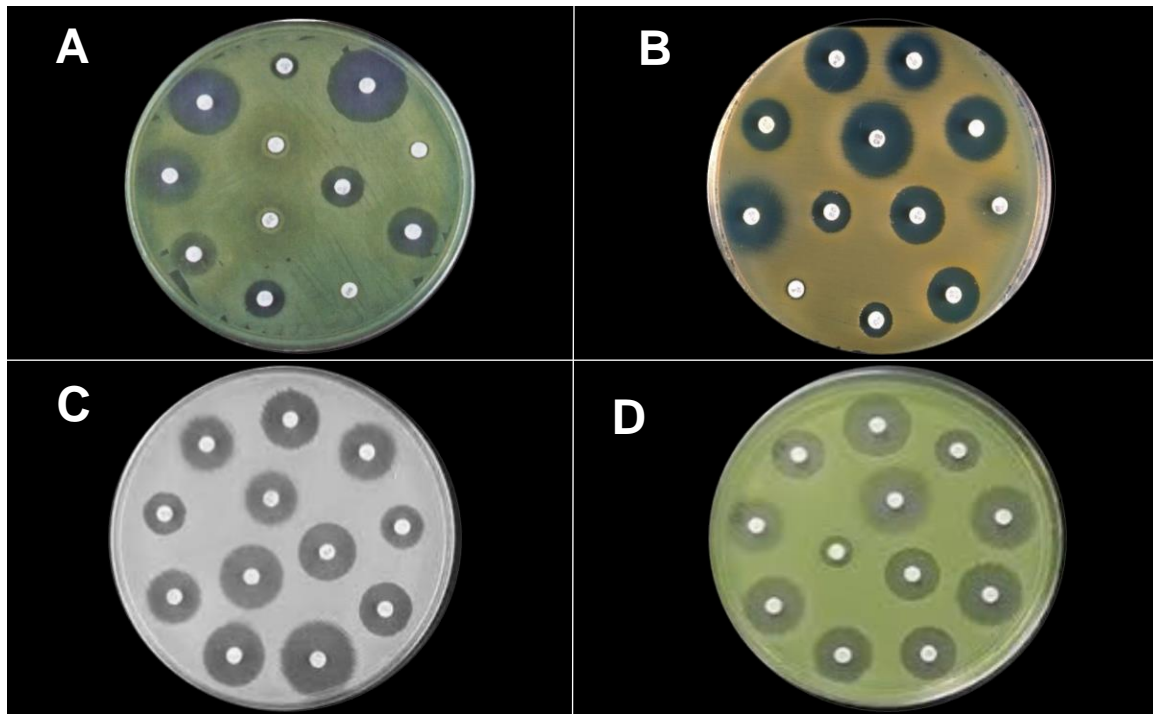


Figura 7. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos de *S. aureus* frente a 17 antibióticos en medio Müller Hinton. (A, B, C, D) El diámetro de los halos de inhibición es indicador de la sensibilidad o resistencia de *S. aureus* frente a los antimicrobianos.

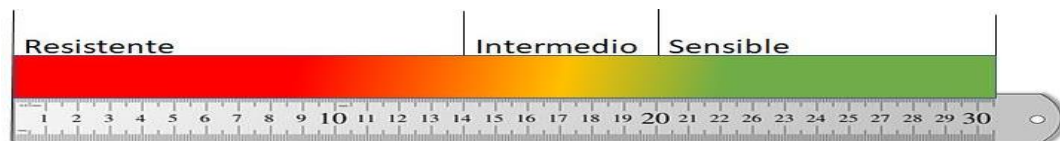


Tabla 12. Medición e interpretación de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (*S. aureus*) frente a antimicrobianos.

ID Colonias		ANTIBIOTICOS																
		OX	CIP	VA	AX	AZM	CN	C	E	P	TEC	RA	LNZ	SXT	TE	FOX	AM	DA
		Oxacilina	Ciprofloxacina	Vancomicina	Amoxicilina	Azitromicina	Gentamicina	Cloranfenicol	Eritromicina	Penicilina	Teicoplanina	Rifampicina	Linezolid	Trimetoprim/ Sulfa.	Tetraciclina	Cefoxitina	Ampicilina	Clindamicina
P26.1	22c	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P10.1	8c	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P7.1	5c	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P4.1	7c	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P8.1	6c	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P6.1	4c	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P13.1	11c	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P28.1	23c	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P22.2	18c	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P25.1	21c	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P24.1	20c	R	R	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P17.1	15c	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P19.1	16c	R	R	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

P15.1	13c	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R39.1	35c	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Q22.1	30c	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P11.1	9c	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P5.1	3c	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P12.1	10c	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P31.1	25c	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Q15.2	27c	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P23.1	19c	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R17.1	33c	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P16.1	14c	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P29.1	24c	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Q17.1	28c	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Q18.1	29c	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P4.2	2c	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P9.1	7c	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Q15.1	26c	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P16.1	14c	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC	29213	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

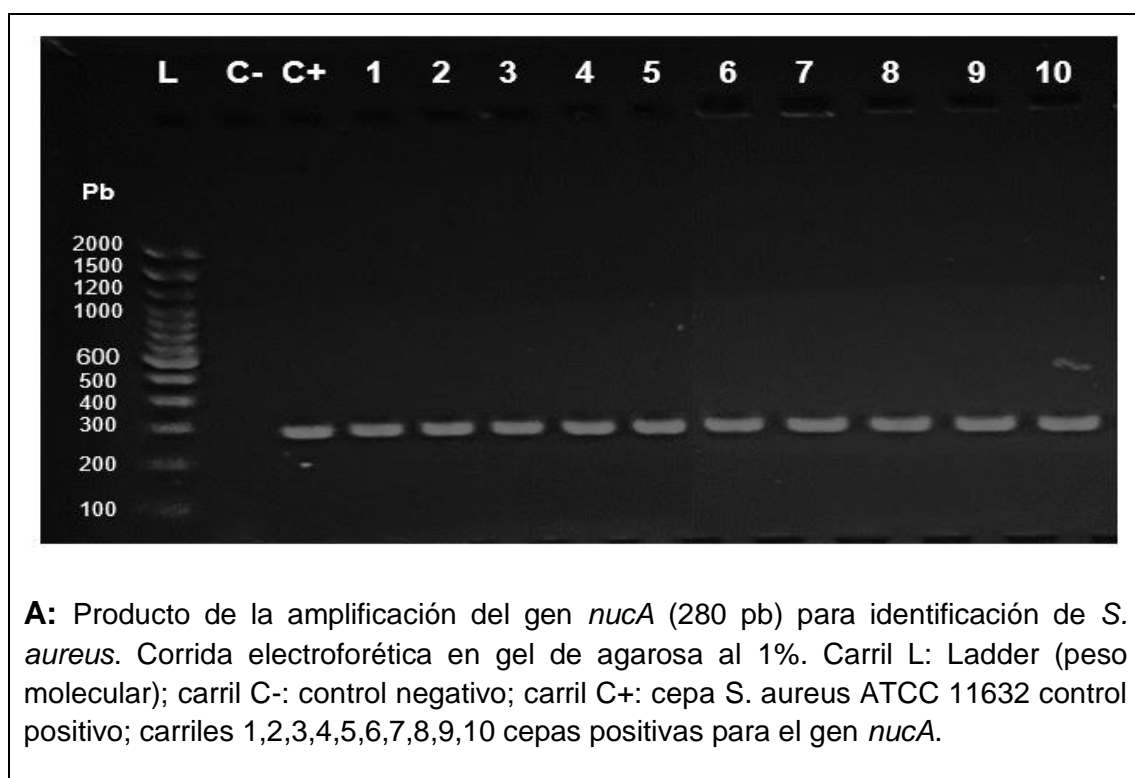
III.5.- ANALISIS MOLECULAR

Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*

De las 112 muestras recolectadas en total, se obtuvieron 35 aislados que fueron identificados presuntivamente como *S. aureus*, de los cuales 2 resultaron ser coagulasa-negativos (**Tabla 10**). En ambos ensayos (*nucA* y *femB*) se aprecia la amplificación a partir del ADN genómico de las cepas control ATCC 11632.

La presencia del gen *nucA* se demostró en casi todas las cepas coagulasa-positivas. El amplicón resultante del gen *nucA* tiene una longitud de 280 pb (**Figura 8A**). En total 30 cepas resultaron positivas para este gen.

De igual manera, la mayoría de cepas coagulasa-positivas que presentaron el gen *nucA* también presentaron el gen *femB*. Se obtuvo un amplicón de 650 pb en 27 cepas de *S. aureus* aisladas de las mucosas nasales de cuyes (**Figura 8B**).





B: Producto de la amplificación del gen *femB* (650 pb) para identificación de *S. aureus*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Carril L: Ladder (peso molecular); carril C-: control negativo; carril C+: cepa *S. aureus* ATCC 11632 control positivo; carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: cepas positivas para el gen *femB*.

Figura 8. – Amplificación génica para la identificación de *S. aureus* extraído de las fosas nasales de cuyes. **(A, B)** Corrida electroforética para identificación de los genes *nucA* y *femB*.

Sin embargo, la PCR para la identificación del gen *blaZ* dio resultados negativos (**Figura 9A**), lo cual sugiere que las cepas serían sensibles a los antibióticos β -lactámicos como la penicilina. De igual manera, los resultados del gen *mecA* fueron negativos (**Figura 9B**), puesto que no se obtuvo amplificación alguna en ninguna de las cepas; lo que indica que las cepas analizadas no tienen capacidad intrínseca de resistir a la meticilina y a otros antibióticos de la misma familia.

Estos resultados fueron validados con el antibiograma en medio Müller Hinton (**Tabla 12**).



A: Producto de la amplificación del gen *blaZ* (negativo) para la identificación de resistencia a la penicilina en *S. aureus*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Carril L: Ladder (peso molecular); carril C-: control negativo; carril C+: control positivo de cepa *S. aureus* ATCC 11632; carriles 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15: cepas negativas para el gen *blaZ*.



B: Producto de la amplificación del gen *mecA* (negativo) para identificación de *S. aureus* resistente a la meticilina. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Carril L: Ladder (peso molecular); carril C-: control negativo; carril C+: control positivo de cepa *S. aureus* ATCC 11632; carriles 1,2 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15: cepas negativas para el gen *mec A*.

Figura 9. – PCR de los genes *blaZ* y *mecA* para identificación de genes asociados a la resistencia antimicrobiana. **(A, B)** Corrida electroforética para identificación de genes *blaZ* y *mecA*.

III.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación nos planteamos como objetivo principal la identificación y caracterización fenotípica de *S. aureus* que colonizan las mucosas nasales de cuyes (*C. porcellus*) criados en granjas de la Provincia del Cañar. Los resultados obtenidos indican que dependiendo de la granja de donde provienen los cuyes muestreados, estos pueden estar más o menos infectados con cepas de *S. aureus*, que además pueden presentar algunos genes de virulencia.

El análisis de resultados señala que, la incidencia de *S. aureus* en cuyes varía entre cada una de las granjas muestreadas, puesto que, de las 112 muestras obtenidas en total, se identificaron 31 cepas de *S. aureus* (27,67 %), de las cuales 24 (21,42 %) fueron identificadas en la granja P (Pedrito), 5 (4,09 %) en la granja Q (veterinaria) y 2 (1,78 %) en la granja R (CIITT). Es decir, el mayor número de cepas identificadas se encuentran en la granja P y la menor cantidad de cepas están en la granja de las instalaciones del CIITT. Esto es extraño, porque se trata de un recinto en donde los cuyes son monitoreados constantemente.

Conforme lo estipulado, se considera que entre los factores que contribuyen al origen y prevalencia de infecciones/colonizaciones por bacterias en las granjas muestreadas los más importantes son los siguientes: a) malas prácticas de higiene de los cuyeros, b) mal manejo y crianza de los cuyes, c) condiciones de hacinamiento, d) falta de ventilación adecuada, e) salud general de los mamíferos, f) animales que provienen de lugares con altas tasas de infección, g) mala gestión de desechos y residuos, h) la falta de implementación de medidas adecuadas para el control y prevención de enfermedades (como la vacunación y la aplicación de prácticas de bioseguridad). Además, se estima que el tipo de alimentación de los cuyes, la contaminación, el manejo y la calidad nutricional de los alimentos también se asocian a la presencia de infecciones bacterianas. Inclusive, según reporta Vargas et. al (102), también hay influencia de la época del año, es decir, que época lluviosa hay mayor riesgo de contagio con *S. aureus*

debido a la humedad del ambiente, lo que favorece su diseminación entre los animales.

Conforme a un estudio realizado por Morales et.al. (103), la escasa desinfección y aplicación de protocolos de bioseguridad en la crianza de cuyes son la causa de la propagación y diseminación de patógenos como *S. aureus* en los corrales donde habitan. Además, mediante la prueba exacta de Fisher se determinó la asociación entre los agentes infecciosos aislados y el tipo de crianza practicada en los animales. Según Huamán (26), la mayor frecuencia de aislamientos bacterianos en animales adultos podría estar acompañada de factores de estrés producto de peleas, dieta a base de forraje fibroso o mal picado y manejo sanitario, entre otros.

En cuanto al análisis de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. aureus*, se demostró que las cepas de las 3 granjas muestreadas presentaron un mayor número de cepas resistentes a la ciprofloxacina, seguida de la oxacilina. Además, alrededor del 40% de las cepas presentaron sensibilidad intermedia a la vancomicina y a la amoxicilina; además, también se observó un índice de multiresistencia significativa de *S. aureus* de las tres granjas frente a ciprofloxacina, amoxicilina y vancomicina.

El surgimiento de cepas de *S. aureus* multirresistentes evidencia una respuesta a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana (104). Y entre los factores que favorecen el desarrollo de cepas resistentes y multirresistentes están el uso inapropiado y frecuente de antibióticos para promover el crecimiento y prevenir enfermedades, lo que ejerce una presión selectiva sobre los microorganismos, permitiéndoles proliferar en presencia de estos medicamentos (105). También se debe a la transmisión de genes de resistencia a través de diversos mecanismos, incluida la transferencia horizontal (106) y a la capacidad de *S. aureus* para adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales en las que se encuentre (107).

De acuerdo con Morales et.al (103), el cuy muestra susceptibilidad a un amplio número de patógenos, entre ellos del género *Staphylococcus spp.*, cuyas cepas

pueden transmitirse por múltiples vías, siendo la transmisión oral/fecal la más frecuente y reportada (108; 109; 110; 111).

Por otra parte, el uso de antibióticos en cada granja puede influir en la resistencia y prevalencia bacteriana. De hecho, y como ya hemos dicho, el uso inapropiado o excesivo de antibióticos contribuye al desarrollo de cepas resistentes. De acuerdo con un estudio realizado por Estupiñán et.al (25), en el año 2018 en la provincia de Imbabura (Ecuador), los resultados del análisis histopatológico y bacteriológico en muestras de ganglios linfáticos de cuyes adultos, confirmaron la presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* susceptibles a los antibióticos de uso veterinario frecuente. De igual manera en otra investigación realizada por Mescco et al. (112), *S. aureus* resultó ser susceptible a la mayoría de antibióticos evaluados, incluyendo la gentamicina.

Entre las limitaciones que hemos identificado en el presente estudio, se pueden considerar las siguientes: el número limitado de muestras y granjas que se incluyeron en el estudio, la discriminación entre sexo y edad de los cuyes, la inclusión de animales de procedencia desconocida, las condiciones ambientales o estacionales podrían afectar la prevalencia de la bacteria, la falta de información clínica detallada sobre los cuyes (historias médicas, exposición a antibióticos, etc), factores como el estado inmunológico de los animales y la presencia de otras enfermedades. Sin embargo, pese a estas limitaciones, los resultados obtenidos constituyen un avance significativo en relación con estudios previos en este tema. En efecto, hasta donde hemos podido consultar la literatura especializada, se trata del primer trabajo en su tipo a efectuarse en el contexto ecuatoriano.

En resumen, los principales resultados obtenidos señalan, que de acuerdo a la granja de donde proceden los cuyes, estos son más propensos a adquirir infecciones por cepas de *S. aureus* potencialmente virulentas.

La información que se ha recopilado es de gran importancia puesto que podría permitir la creación o implementación de sistemas/programas destinados al control de enfermedades transmitidas entre los cuyes: De igual manera, podría

permitir la formulación de estrategias destinadas a brindar una mayor atención a la salud animal en las explotaciones cunícolas de la región.

Capítulo IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

- El 27,67% (31/112) de las muestras de hisopados nasales de cuyes analizadas en este estudio, resultaron positivas para *Staphylococcus aureus*.
- Los resultados obtenidos fueron verificados mediante la aplicación de pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.
- De las 35 cepas de *S. aureus* aisladas inicialmente, 30 cepas coagulasa positivas portan en su genoma el gen nucA y 27 el gen femB.
- El 61,29% de las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a la Ciprofloxacina y el 54,83% a la Oxacilina.
- Todas las cepas de *S. aureus* evaluadas en este estudio fueron susceptibles a la Eritromicina, Teicoplanina, Rifampicina, Linezolid, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Tetraciclina, Cefoxitina, Ampicilina y Clindamicina.
- La gran mayoría (90%) de los animales infectados por *S. aureus* provenían de una sola granja, la granja P (Pedrito). En las demás granjas, la cantidad de animales positivos resultó ser mínima.
- A partir de los resultados obtenidos se pueden formular estrategias para el cuidado, manejo y prevención de enfermedades infecciosas en cuyes de granjas familiares-comerciales.

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Es importante realizar otros estudios de este tipo para determinar el tipo de microorganismos que afectan la salud de los animales de granja y estos a su vez, transmitir enfermedades al ser humano (zoonosis).
- Formular estrategias para el cuidado y manejo adecuados de cuyes, teniendo en cuenta los factores que amenazan contra la salud y seguridad de los animales.
- Dar a conocer los resultados de esta investigación en la comunidad científica internacional relacionada con la identificación de *S. aureus* en animales de granja, causante de enfermedades infecciosas y zoonosis.
- Ampliar este estudio a otros animales de granja como cerdos, vacas, cabras, ovejas, aves, etc.
- Continuar con investigaciones de este campo de estudio en otras granjas dedicadas a la crianza de cuyes de otras localidades andinas del Ecuador.
- Realizar una investigación detallada, tomando en cuenta factores como la edad, raza y sexo de los cuyes, el estado de salud, condiciones específicas de hacinamiento, temperatura y humedad del hábitat y tipo de medicamentos administrados para la erradicación o prevención de enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

1. Usca JE; Flores LG; Tello LA; Navarro MN. Manejo General en la cría del cuy. ESPOCH. 2022; 4 (5): 28-30.
2. Dávila AP; Mora CF; Cordova CA. Caracterización etológica del cuy (*Cavia Porcellus*) en sistemas de producción tradicional y tecnificado. Revista Investigación Pecuaria. Colombia. 2018. Volumen 5(1): 5-15. DOI: <https://doi.org/10.22267/revip.1851.1>
3. Vivas JA. Especies Alternativas: Manual de Crianza de Cobayos (*Cavia porcellus*). Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua, 2009 6(2): 6-8.
4. Rico-Numbela E; Rivas Valencia C. Manual sobre el Manejo de Cuyes, Benson Agriculture and Food Institute, 2003 (6): 8-10.
5. Nami TS; Le Dell KH; Sabeti K; Borchardt SM; Boxrud DJ; Elianne J. Comparison of community and health care associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA. 2003; 290: 2976- 2984.
6. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Infect. 2003; 111: 1265-1273.
7. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998; 339: 520-532
8. Mandell GL, Bennett JE, Olin R. *Staphylococcus*. Principles and practice of infectious diseases. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2005.
9. Hiramatsu K; Cui L; Kuorda M; Ito T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2001; 9: 486-493
10. Chiara-Chilet C; Saavedra-Velasco M. Control de antibióticos en tiempos de COVID-19. Rev. Fac. Med. Hum. 2020; 20(4): 761-762.
11. ONU. La resistencia a los antibióticos supone un riesgo cada vez mayor para las personas, los animales y el medio ambiente. Noticias ONU. Noticias ORG. 2021; 56(8):1-6.
12. WHO. No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. OMS. 2019; 88(21) 1-5.
13. OMS. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO. 2021;54 1-2.
14. AEMPS. Resistencia bacteriana y COVID-19: recomendaciones del PRAN para el uso prudente de los antibióticos durante la pandemia. Notas informativas de la AEMPS. 2020; 28 1-3
15. Díaz-Medina LM; Medina-García M. Susceptibilidad antimicrobiana en muestras clínicas de pacientes con infecciones asociadas a la atención de salud. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2017;16(3): 14-21.
16. Monté-Cerero L; Martínez-Casanueva R. Microorganismos aislados en pacientes ingresados. Hospital Salvador Allende, La Habana. Febrero a junio de 2015. Revista Habanera de Ciencias Médicas; 2017; 16(4): 11-16.
17. Gregory-Thompson E; Husney A; Torres E. Russo. *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM). CIGNA. 2022.
18. Hartman BJ; Tomasz A. Low-affinity penicillin binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1984; 158:513-6.

19. Song MD; Wachi M; Doi M; Ishino F; Matsubishi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 1987; 221:167-71.
20. Katayama Y; Ito T; Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassettechromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1549-55.
21. Marko-Andree J. Portal Arbieto. Actividad antimicrobiana mediante tratamiento combinado de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico para la bioconservación de carne de cuy (*Cavia porcellus*). Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. 2019; 6(14) 25-35.
22. Weese JS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *ILAR Journal*; 2010; 51(3):233-44
23. Gad SC. *Animal Models in Toxicology*. 3° Edición. Boca Ratón, Florida, USA: CRC Press. 2015.
24. Obregón R; Serrano-Martínez E; Chauca L. Causas de mortalidad neonatal en cobayos (*Cavia porcellus*) durante la estación fría en el Instituto Nacional de Innovación Agraria, Lima – Perú. *Salud tecnológica veterinaria*, 2018; 2, 93-99.
25. Estupiñán P; Burgos A; Chacha S. Linfadenitis en un plantel productor de cuyes. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 2018; 5(3). Pág. 2-3. DOI: <https://doi.org/10.36331/revista.v5i1.33>
26. Huamán M; Killerby M; Chauca, L. *Manual de Bioseguridad y Sanidad en cuyes*. Lima: Instituto Nacional de Innovación Agraria/Proyecto. 2019; 046_PI. 86
27. Ausina V; Ruiz S; Moreno- Guillen E. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica, Médica Panamericana, Madrid (2005)*, pp. 1-18
28. OPS/OMS. Zoonosis. Disponible en: Zoonosis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud (paho.org). 2018.
29. MSP. Subsistema de vigilancia SIVE- Alerta de Enfermedades Zoonóticas, Ecuador, SE 1-4, 2019.
30. Urrego E. *Producción de cuyes (Cavia porcellus)*. 1° Edición. Lima, Perú: Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). 2009.
31. García-Aguado J. Estudio del paciente con adenopatías periféricas. En: Séptimo Curso de Actualización Pediatría. Madrid, España; Exlibris Ediciones. 2010; p. 31 – 42.
32. Grundmann H; Aires-de-Sousa M; Boyce J; Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public health threat. *Lancet.* 2006; 368:874-85.
33. Zaldívar AM; Chauca L. *Producción de cuyes (Cavia porcellus) en los países andinos. Tercer informe técnico, Fase I. Proyecto Sistemas de Producción de Cuyes. Convenio INIAA-CIID. 1989; Pág. 86, La Molina, Perú. FAO.*
34. Stahl P; Norton P. Animales domésticos y las implicaciones del intercambio precolombino desde Salamago, Ecuador. *Misilánea Antropológica Ecuatoriana*. 1984; 4:83-92.

35. Gutiérrez A. Dioses, símbolos y alimentación en los Andes: Interrelación hombre-fauna en el Ecuador prehispánico. 2002; 1: 266.
36. Avilés DF; Landí V; Delgado JV; Martínez A.M. Ecuadorian people and their relationship with the guinea pig. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. Universidad de Córdoba, España. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. AICA. 2014; 4, 38-40.
37. Tirira DG. Mamíferos del Ecuador. Guía de campo. Ediciones Murciélago Blanco. Publicación Especial de los Mamíferos del Ecuador, Quito. 2007. 6.
38. Chauca L. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Lima, Perú: FAO. 1997.
39. Kok M; Pechere JC. Nature and pathogenicity of micro-organisms. In: Cohen J., Powderly W.G., editors. Infectious diseases. 2 da ed. Mosby; Edinbrough: 2004. pp. 3–29.
40. Ausina V; Prets G. Principales grupos de seres vivos con capacidad patógena para el hombre. In: Ausina Ruiz V., Moreno Guillen S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Médica Panamericana; Madrid: 2005. pp. 1–18.
41. Finch RG; Irving WL; Moss P; Anderson J. Infectious diseases, tropical medicine and sexually transmitted infection. In: Kumar P., Clark M. Kumars and Clark's Clinical Medicine. 7.^a ed. Elsevier; Amsterdam: 2009. pp. 79–206.
42. Becker KL; Snider R; Nylén ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36(3):941–952.
43. FAO. Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. 2012.
44. Estrella-Cervantes G; Rafael-García G. Paz-Salazar S. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev. Latinoam de Patol Clin Med Lab*. 2014; Vol. 61; Núm. 1: 28-40.
45. Zendejas G; Avalos H; Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed* 2014;25(3):129-143.
46. Orenstein A. The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*. 1959.
47. Zendejas-Manzo GS; Avalos-Flores H; Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed*. 2014; Vol. 25; No. 3: 129-143. DOI: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i3.42>
48. Caycedo-Lozano L; Ramírez-Corrales L; Suárez-Trujillo DM. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. Nueva [Internet]. Junio de 2021; 19(36): 49-94. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702021000100049&lng=en.
49. Ramírez I. Estudio bacteriológico y epidemiología de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). (Tesis de Bachiller). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú 1972.
50. Barriga O. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS, 2003. Tercera edición Volumen III. No. 580, pág. 55
51. Hernández-Betancourt O; Ulloa-Cuesta Y; Del Río-Méndez D; Galdós MC. *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos: Revisión bibliográfica. *AMC*; 2005; 9(1): 142-152.

52. Mandell GL; Bennett JE; Olin R. Staphylococcus aureus. Principles and practice of infectious diseases. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2005.
53. Watts A; Ke D; Wang Q; Pillay A; Staphylococcus aureus Strain that express serotype 5 or serotype 8 capsular polisaccharides differs in virulence. Infect Immun. 2005; 73: 3502-3511.
54. Leo FR; Diep BA; Otto M. Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23: 17-34
55. Lina G; Piemont Y; Godail-Gamont F; Bes M. Involvement of Panton Valentine Leukocidin producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29: 1128-1132.
56. Vandenech F; Naemi T; Enright MC; Lina G; Nimmo GR; Hefferan H. Community acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus carrying Panton Valentine Leukocidin genes: Worldwide emergence. Emer Infect Dis. 2003; 9: 978-984
57. Dinges MM; Orwen PM; Schlievet PM; Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 16-34. 37. Ulrich RG. Evolving superantigens Staphylococcus aureus. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 27: 1-7
58. Brooks G; Carroll KC. Staphylococcus. En Jawetz, ed. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. (25a edición). Estados Unidos: McGraw-Hill 2011; pp. 185-194. ISBN 978-607-15-0503-3.
59. Novick RP. Movil genetic elements and bacterial toxins: The superantigens encoding pathogenicity islands of Staphylococcus aureus. Olsmid. 2003; 49: 93-105.
60. Kuroda M; Ohta T; Uchiyama I; Baba T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. 2001; 357: 1225-1240.
61. Brakstad OG; Aasbakk K; Maeland JA. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992; 30:1654-60.
62. Aida H; Samuel G; Jaime B. Identificación de Staphylococcus aureus utilizando como marcadores los genes nucA y femB. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco, México. ELSEVIER. Ciencias Clínicas. 2015; 16:37-41.
63. Fernández-Olmos A; García de la Fuente C; Sáez-Nieto JA; Valdezate-Ramos S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2010. SEIMC. ISBN-978-84-614-7932-0
64. Jeffries CD; Holtman DF; Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J Bacteriol. 1957 Apr;73(4):590-1. DOI: 10.1128/jb.73.4.590-591.1957. PMID: 13428699; PMCID: PMC314626
65. Britania Lab. Ficha Técnica de medio de cultivo Sangre Agar Base. Revisión 02. Argentina. 2021; Pág. 1. britanialab.com
66. Marcos-Vivoni A, Meurer MB. Application of molecular techniques in the study of Staphylococcus aureus clonal evolution-A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 693-98.
67. Rodríguez PA; Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción. Carta al editor. DCMQ. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. México. 2018; Volumen 16 / Número 2 / pág. 166 – 167.

68. Britania Lab. Ficha técnica tinción de Gram. Laboratorios Britania S.A. CABA–Argentina. REV. 2017; 08 – 31613. Página 1-2.
69. Enright MC; Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. 1999; 7: 482-487.
70. Saiki R; Scharf S; Faloona F. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (New York, N.Y.). 1985; 230(4732), 1350–1354.
71. Adam R; Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. Expert Rev. 2010; 8(12):1441–1450.
72. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):430-449. DOI: 10.1093/femsre/fux007.
73. Chatterjee SS; Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. Journal of Clinical Epidemiology, 2013; 5: 205-17.
74. Johnson FR; Lima S.P. Etiopatogenia microbiológica Género *Staphylococcus*. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2nd ed. FEFMUR;2016; 259-266
75. Pasachova-Garzón J; Ramirez-Martinez S; Muñoz-Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. NOVA. 2019; 17 (32): 25-38.
76. García-Alvarez L; Holdel MT; Lindsay H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. The Lancet Infectious Diseases, 2011; 11(8): 595-603.
77. Gardete S; Tomas A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. The journal of Clinical Investigation, 2015; 124(7): 2836-40.
78. Compennolle V; Verscheraegen G; Claeys G. Combined Use of Pastorex staph-plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and Chromagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2007; 45: 154-158. 16.
79. Cortes JA; Gómez CA; Cuervo SI; Leal AL. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. Rev. Salud Publica (Bogotá). 2007; 9:448-54.
80. Haque N; Bari MS; Bilkis L; Haque S; Sultana S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* — an overview. Mymensingh Med J. 2011; 20:159-64.
81. Brakstad OG; Aasbakk K; Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J Clin Microbiol. 1992; 30:16-54-60.
82. Aida HP; Samuel GG; Jaime BM. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. Ciencias Clínicas. 2015;16(2):37-41.
83. Resman F; Thegerström J; Månsson FA; Tham J; Riesbeck K. The prevalence, population structure and screening test specificity of penicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Malmö, Sweden. J Infect. 2016; 73:129–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.05.011>.
84. Butler-Laporte G; Lee TC; Cheng MP. Increasing Rates of Penicillin Sensitivity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62: e00680–718, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00680-18>.

85. Richter SS; Doern GV; Heilmann KP; Miner S; Tendolkar S; Riahi F. Detection and prevalence of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013. *J Clin Microbiol.* 2016; 5:812–4, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03109-15>.
86. Resman F; Thegerström J; Månsson F; Ahl; Tham J; Riesbeck K. The prevalence, population structure and screening test specificity of penicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Malmö, Sweden. *J Infect.* 2016; 73:129–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.05.011>.
87. Katayama Y; Ito T; Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1549-55.
88. Butler-Laporte G; Lee TC; Cheng MP. Increasing Rates of Penicillin Sensitivity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62: e00680–718, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00680-18>.
89. Richter SS; Doern GV; Heilmann KP; Miner S; Tendolkar S Riahi F, et al. Detection and prevalence of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013. *J Clin Microbiol.* 2016; 5:812–4, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03109-15>.
90. D.Jonás, H; Grundmann D F.D; Daschner KJ. Towner. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 18 (1999), pp. 643-647
91. Gonzáles R; Elizalde B; Cortés M; & Orduña, M. Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. México: UNAM; 2020.
92. Popescu A; Doyle RJ. The Gram stain after more than a century. *NHI.* 1996; 71(3):145-51. DOI: 10.3109/10520299609117151.
93. CLSI. 2021. Hindler JA, Clinical and Laboratory Standards Institute. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data.
94. PCR Master Mix (2X). Thermo Scientific. Product Information. 2012. Fisher Scientific. Invitrogen PCR Master Mix Starter Pac. Pag 1-2.
95. Pérez de Castro AM. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Politécnica de Valencia, España. Departamento de Biotecnología. 2016; Vol 4, Núm. 11, Pag 4-6.
96. Kobayashi N; H Wu; Kojima K. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of *Staphylococci* using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1994;113, 259-266.
97. Schnellmann C; V Gerber; A Rossano; V Jaquier; Y Panchaud, MG Doherr, A Thomann, R Straub, V Perreten. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. 2006. *J Clin Microbiol* 44.
98. Invitrogen PCR Master Mix Starter Pack. Fisher Scientific S.L. C/ Anabel Segura. Centro Empresarial Vega Norte 28108 - Alcobendas (Madrid), ESPAÑA. 2023 Thermo Fisher Scientific Inc.
99. Brakstad OG; Aasbakk K; Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:1654-60.
100. Francisco Fierro. Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. UAM México. 2011; 22, 29-30.

101. Ubicación de la provincia del Cañar, Ecuador en el mapa (Fuente: <https://earth.google.com/web/@-2.63605561,-78.7672988,3531.48405258a,247095>)
102. Vargas M; Chávez A; Pinedo R; Morales S; Suarez F. Parasitismo gastrointestinal en dos épocas del año en cuyes (*Cavia porcellus*) de Oxapampa, Pasco. *Rev Inv Vet Perú*, 2014; 25 (2): 276 - 283
103. Morales S. Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar-comercial en tres distritos de la Provincia de Bolognesi, Departamento de Ancash en época de seca. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 2017; 72
104. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Salud Pública Méx* 2005; 47:381-7.
105. García A, Martínez C; Juárez RI; Téllez R, Paredes MA, Herrera MR, et al. Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. *Biomédica*. 2019; 39:513-23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>
106. Suaréz Del Aguila-Usmán J, Iglesias-Osores S, Moreno-Mantilla. Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte de Perú. *Gac Med Bol*. 2020; 43(1): 49-55. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000100009&lng=es.
107. Sanabria G. Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*. Artículo de revisión. *Rev. Inst. MSP. Med. Trop. Paraguay*. 2015; Vol 3(2) 27-39.
108. Fernández M; Feinstein R; Sánchez S. Estado sanitario: control y prevención de roedores: Zuñiga j., Tur J., Milocco S., Piñeiro R. *Ciencia y tecnología en 66 protección y experimentación animal*. 1ra Ed. Madrid: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana., 2017; 208 p.
109. Harkness JE; Wagner JE. *Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. 4th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995; 153, 229–230, 259–260.
110. Matsuura A; Morales S; Calle E, Ara M. Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella* entérica aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Ancash. *Rev Inv Vet Perú* 2010; 21(1): 93-99
111. Morales S. Sanidad en Sistemas de Crianza Comercial de Cuyes. XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación de Producción Animal. 2013: 38-44
112. Mescco R. Sensibilidad farmaco-lógica del agente etiológico de la linfadenitis en cuyes del centro de producción de reproductores Huayllapampa-San Jerónimo, Agencia Agraria Cusco. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú: Univ. Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2019; 116
113. Rybak MJ; Le J. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 2020 May 19;77(11):835-864. DOI: 10.1093/ajhp/zxaa036. PMID: 32191793.
114. Cong Y; Yang S and Rao C. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*. 2020; 21:169-176.

115. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
116. CLSI. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data. 5th ed. CLSI guideline M39. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
117. Weinstein MP. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2729–2731.

ANEXOS



Figura 10.- Proceso de aislamiento de cepas de *S. aureus* en medio de cultivo manitol sal, mediante estriado de muestras en cabina de flujo laminar.

Tabla 13. Condiciones para ensayos de susceptibilidad in vitro para *Staphylococcus aureus* según técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer) y según normativa CLSI 2021 (93).

Medio	Agar Müller – Hinton
Inoculo	Suspensión bacteriana directa
Temperatura	35°C
Tiempo de incubación	24 horas para vancomicina y oxacilina
	18 horas para otros
Lectura	Luz transmitida por debajo de la placa

Tabla 14. Parámetros para interpretación de halos de inhibición en ensayo de susceptibilidad mediante difusión en agar (Kirby Bauer) para *Staphylococcus aureus*, CLSI-2021 (93, 113, 114, 115, 116, 117).

S: Sensible I: Intermedio R: Resistente	CATEGORIAS		
ANTIMICROBIANOS	S (mm)	I (mm)	R (mm)
- Cefoxitina 30 µg	≥ 25	20-24	≤ 19
- Oxacilina 1mcg			
- Vancomicina 30mcg	-	-	≤ 15
- Rifampicina 5mcg	≥ 20	17-19	≤ 16
- Penicilina 10 µg	≥ 29	-	≤ 28
- Gentamicina 10mcg	≥ 15	13-14	≤ 12
- Azitromicina 15mcg	≥ 18	14-17	≤ 13
- Teicoplanina 30 µg	-	-	-
- Ciprofloxacina 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
- Linezolid 30mcg	≥ 21	-	≤ 20
- Cloranfenicol 30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
- Trimetoprima/Sulfametoxazol 1.25/23.75 mcg	≥ 16	11-15	≤ 10
- Tetraciclina 30mcg	≥ 14	15-18	≤ 19
- Ampicilina 10mcg	-	-	-
- Amoxicilina 25mcg	-	-	-
- Eritromicina 15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
- Clindamicina 2mcg	≥ 21	15-20	≤ 14

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Yo **Ponce Morocho Andrea Maribel** portador(a) de la cédula de ciudadanía N.º **0106800451**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*) criados en la provincia de Cañar (Ecuador, 2021)**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **11 de abril de 2024**

F: 
Ponce Morocho Andrea Maribel
C.I. **0106800451**