TESIS DOCTORAL

ACCIÓN DE LA APITOXINA SOBRE SALMONELLA Y OTRAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS EN COBAYOS (*Cavia porcellus*) DURANTE LA FASE DE ENGORDE

Vicente Arteaga Cadena

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

AÑO 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DOCTORAL

ACCIÓN DE LA APITOXINA SOBRE SALMONELLA Y OTRAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS EN COBAYOS (*Cavia porcellus*) DURANTE LA FASE DE ENGORDE

Fdo.....

Vicente Arteaga Cadena

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

AÑO 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

"Acción de la apitoxina sobre *Salmonella* y otras cepas de enterobacterias patógenas en cobayos (*Cavia porcellus*) durante la fase de engorde"

D./ Vicente Arteaga Cadena

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
3) *La tesis es la version definitiva presentada para su defensa y coincide con la version enviada en formato electrónico.*
4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.*

En Lugo, 15 de julio de 2021

Fdo----------

-El autor declara que no tiene ningún conflicto de interés.

-En Ecuador (país donde se realizó la experimentación animal) no existe un organismo específico para la autorización de experimentación animal. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a los estándares internacionales de bienestar animal.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

"Acción de la apitoxina sobre *Salmonella* y otras cepas de enterobacterias patógenas en cobayos (*Cavia porcellus*) durante la fase de engorde"

D. Carlos Manuel Franco Abuín

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Don Vicente Arteaga Cadena, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Lugo, a 15 de julio de 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mi esposa y a mis dos queridos hijos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Dejo constancia expresa de mi agradecimiento, primero a Dios por su protección constante durante toda mi vida, luego a todas las personas que me han prestado ayuda y colaboración en la realización de esta tesis doctoral:

A mi familia,
A mi esposa Nancy, soportar horas y horas de ausencia, de sacrificio y mucha paciencia, comprensión y apoyo incondiconal como siempre lo hace.
A mis hijos Roger y David, por el apoyo y cariño demostrado siempre, su actitud me animó más cada vez.
A mi director de tesis, el Dr. Carlos Manuel Franco Abuín, sus horas dedicadas a este trabajo de tesis están plasmadas en cada una de las frases que asumió como inoportunas, pues están las correctas y por eso se terminó el trabajo.
A mis compañeros de universidad, que de una u otra manera cooperaron en el avance de mi investigación.
A las familias que se dedican a la crianza de cuyes, por haberme dado el espacio para comprender la problemática que hay en torno a estas miniempresas rurales, que hoy más que antes adquieren potencialidad de subsistencia.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

Esta investigación desenvolveuse, tanto nos Laboratorios e granxa experimental da Pontificia Universidade Católica do Ecuador Sede Ibarra, como nos Laboratorios de Hixiene, Inspección e Control de Alimentos da Facultade de Veterinaria da Universidade de Santiago de Compostela (USC). O obxectivo era determinar a acción da apitoxina sobre as salmonelas e outras cepas de enterobacterias patóxenas en cobaias (*Cavia porcellus*) durante a fase de engorde para buscar tratamentos alternativos. Para conseguilo, fixéronse coleccións de apitoxina a partir de cinco apiarios de Imbabura, o produto caracterizouse para o seu uso posterior, portadores de cobaias de *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Salmonella* Typhimurium, causantes de enfermidades entéricas mortais para os coellos de Indias; Estas bacterias foron tomadas de mostras, cultivadas, illadas, identificadas e caracterizadas molecularmente, coas que se realizaron antibiogramas mediante o método de difusión en agar, empregando solucións acuosas de apitoxina en concentracións de 600, 700, 800 e 900 µg/ml, así como, Tetraciclina a 150 µg/ml, diante dun control absoluto, sen ningún produto. Tamén foron probados os efectos da apitoxina obtida fronte a unha ampla colección de cepas de *Salmonella*, obtendo unha Concentración Mínima Inhibitoria de 512 µg/ml que foi capaz de inhibir o 90% das cepas de *Salmonella* mediante o método de microdilución en medio líquido. A apitoxina tamén puxo de manifesto actividade fronte a motilidade de *Salmonella* así como un efecto variable na transcriptómica de *Salmonella* relacionada coa formación de biopelículas, xenes de virulencia e ARNs pequenos deste microorganismo. Os resultados das probas de susceptibilidade bacteriana tamén se realizaron nun estudo de campo con 450 cobaias, 75 como controis absolutos e 375 recibiron doses parenterais diarias e durante tres días consecutivos dos produtos e concentracións de referencia; Para este propósito, os cobaias destinados a tratamentos infectáronse oralmente con 1 ml de caldo de cultivo de cada enterobacteria de interese. Para a interpretación dos resultados, cultiváronse mostras de feces e tecidos de cobaias de cada grupo, incluídos os controis, en agar e controlaronse as poboacións de cada bacteria. Os resultados confirmaron que as solucións de apitoxina: 700 µg/ dose/ día controlaron *Escherichia coli*, do mesmo xeito 800 µg/dose/día de *Salmonella* Typhimurium e *Yersinia pseudotuberculosis*, incluso mellor que a Tetraciclina; ademais, con estas doses, lográronse 2 veces máis ganancias de peso corporal en relación aos cobayos do grupo control.

Palabras clave: Apitoxina, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, cobaias, antimicrobiano.

RESUMEN

Esta investigación se desarrollo, tanto en los Laboratorios y granja experimental de la Pontifica Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, como en los Laboratorios de de Higiene Inspección y Control de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). El objetivo fue determinar la acción de la apitoxina sobre salmonelas y otras cepas de enterobacterias patógenas en cobayos (C*avia porcellus*) durante la fase de engorde para la búsqueda de tratamientos alternativos. Para su logro, se realizaron colectas de apitoxina de cinco apiarios de Imbabura, se caracterizó el producto para su uso posterior, se identificaron cuyes portadores de *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium, causantes de enfermedades entéricas mortales para estos animales; se muestrearon, cultivaron, aislaron, identificaron y caracterizaron molecularmente a estas bacterias, con las que se realizaron antibiogramas mediante el método de difusión en agar, empleando soluciones acuosas de apitoxina en concentraciones de 600, 700, 800 y 900 µg/ml, como contraste se empleó Tetraciclina en 150 µg/ml, así como un control, sin producto alguno. También fueron probados los efectos de la apitoxina obtenida frente a una amplia colección de cepas de *Salmonella*, obteniendo una Concentración Mínima Inhibitoria de 512 µg/ml que fue capaz de inhibir el 90% de las cepas de *Salmonella* mediante el método de microdilución en medio líquido. La apitoxina también puso de manifiesto actividad frente a la movilidad de *Salmonella*, así como un efecto variable en la transcriptómica de *Salmonella* relacionada con la formación de biopelículas, genes de virulencia y ARN pequeños de este microorganismo. Los resultados de las pruebas de sensibilidad bacteriana también se probaron en un ensayo de campo con 450 cuyes, 75 como testigos absolutos y 375 recibieron dosis parenterales diarias y por tres días consecutivos de los productos y concentraciones en referencia. Para este propósito, se infectaron vía oral a los cuyes desinados a tratamientos con 1ml de caldo de cultivo de cada enterobacteria de interés. Para la interpretación de resultados se tomaron muestras de heces y tejidos de cuyes de cada grupo, incluidos los testigos, se cultivaron en agar y controlaron los recuentos de poblaciones de cada bacteria. Los resultados confirmaron que las soluciones de apitoxina: 700µg/dosis/día controlaron a *Escherichia coli,* asimismo 800µg/dosis/día a *Salmonella* Typhimurium y *Yersinia pseudotuberculosis*, incluso mejor que la Tetraciclina; además, con estas dosis se lograron 2 veces más ganancias de peso corporal en relación a cuyes del grupo control.

Palabras Clave: Apitoxina, *Salmonella*, enterobacterias, cobayos, antimicrobiano.

SUMARY

This research was developed, both in the Laboratories and experimental farm of the Pontifical Catholic University of Ecuador Sede Ibarra, and in the Laboratories of Hygiene, Inspection and Food Control of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Santiago of Compostela (USC). The objective was to determine the action of apitoxin on *Salmonella* and other strains of pathogenic enterobacteria in guinea pigs (*Cavia porcellus*) during the fattening phase in order to search for alternative treatments. To achieve this, apitoxin collections were made from five apiaries of Imbabura, the product was characterized for later use, guinea pig carriers of *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis* and *Salmonella* Typhimurium, cause of deadly enteric diseases for guinea pigs; These bacteria were sampled, cultured, isolated, identified and molecularly characterized, with which antibiograms using the disk diffusion method were performed using aqueous solutions of apitoxin in concentrations of 600, 700, 800 and 900 µg/ml, in contrast, Tetracycline at 150 µg/ml, in front of an absolute control, without any product. The effects of the obtained apitoxin were also tested against a broad collection of *Salmonella* strains, obtaining a Minimum Inhibitory Concentration of 512 µg/ml which was able to inhibit 90% of the *Salmonella* strains by the liquid microdilution method. Apitoxin also showed activity against *Salmonella* motility, as well as a variable effect on Salmonella transcriptomics related to biofilm formation, virulence genes and small RNA of this microorganism.The results of the bacterial susceptibility tests also were carried out in a field study with 450 guinea pigs, 75 as absolute controls and 375 received daily parenteral doses and for three consecutive days of the products and concentrations in reference; For this purpose, guinea pigs destined to treatments were infected orally with 1 ml of culture broth with each enterobacteria of interest. For interpretation of results, samples of feces and tissues of guinea pigs from each group, including controls, were cultured on agar and the population of each bacteria was controlled. The results confirmed that the apitoxin solutions: 700µg/dose/day controlled *Escherichia coli*, likewise 800 µg/dose/day *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia pseudotuberculosis*, even better than with the use of Tetracycline; Furthermore, with these apitoxin doses, body weight increased 2 times more than guinea pigs in the control group.

Key Words: Apitoxin, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, guinea pigs, antimicrobial.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN EXTENDIDO

Este trabajo de investigación se desarrolló en la ciudad de Ibarra, en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI), tanto en los laboratorios de Microbiología, Bioquímica y de Biotecnología, como en la granja de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA). También una parte experimental se realizó en los Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Se tomó como objeto de investigación la apitoxina en diferentes concentraciones y en solución acuosa, para encontrar respuesta a la presencia de enterobacterias que afectan la salud de los cobayos (*Cavia porcellus*), considerados fuente popular de proteína animal de muy buena calidad. También el profundizar a nivel molecular sobre los efectos que puede causar en *Salmonella enterica* como uno de los patógenos de referencia.

El cuy como animal de producción entre las comunidades andinas, tanto de Ecuador, como de Perú, Bolivia, sur de Colombia, tiene un raigambre ancestral muy importante, forma parte de la idiosincrasia de estos pueblos, de su cultura y constituye el modus vivendi de centenares de familias del medio rural que encuentran en esta especie animal un recurso dinamizador de las actividades hogareñas habituales, puesto que niños, jóvenes, adultos, hombres y mujeres contribuyen al cuidado y manejo diario de estos animales, llegándose inclusive a tomarlo como elemento de sanaciones y ritos medicinales alternativos.

Cada vez son más las demandas que se dan por el consumo de carne de cuy, ya sea para reuniones familiares, en fiestas religiosas y onomásticas. Se considera que es el mejor ingrediente natural que alimenta, reúne y fortalece las relaciones entre comunidades rurales de la serranía ecuatoriana.

El problema que deben afrontar los criadores de cuyes es la presencia de enfermedades provocadas por enterobacterias, que causan pérdidas económicas y disminución en la calidad de la carne de estos animales, constituyéndose en una prioridad el contar con alternativas que solucionen estos problemas de tipo sanitario, teniendo en cuenta que el uso indiscriminado de antibióticos deja residuos que a la postre afectan la salud de los consumidores de estos cobayos así tratados. Por tanto, la búsqueda de una salida a este problema de tipo infeccioso, es sin duda una causa común para productores y consumidores de cobayos.

El veneno de abejas (*Apis mellifera*), es utilizado por el hombre para tratar de solucionar dolencias tales como artritis, dermatitis y dolores musculares, tanto es así que pueblos antiguos como el egipcio y el hindú encontraron en la colmena de abejas alternativas para proteger hasta los cadáveres de sus seres queridos con el uso de cera de abejas, la miel como cosmético, el veneno como terapéutico de dolores musculares y reumas.

USC DE COMPOSTELA

La apitoxina o veneno de abejas es un producto integrado por más de 18 componentes, tales como diversos polipéptidos, fosfolipasas, apamina y la melitina entre otros, constituyéndose en un elemento con importante potencial medicamentoso, a cambio de una aplicación cuidadosa y basada en la experiencia, ya sea en presentaciones para uso tópico, mediante aguijonadas de las abejas directamente sobre los pacientes, así como también formando parte de diversos ungüentos y hasta en soluciones de uso oral para absorción, a través del epitelio sub-lingual.

A partir de la hipótesis que dice: "el veneno de abejas tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias enteropatógenas aisladas de los cuyes", se tomaron muestras de tejidos como ganglios mesentéricos, de heces, mediante hisopados rectales, se cultivaron en medios específicos para la identificación y aislamiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis y Salmonella* Typhimurium.

Posteriormente se desarrollaron pruebas de sensibilidad mediante técnicas de difusión y dilución, con apitoxina y con el producto comercial Tetraciclina®, lográndose resultados coincidentes, ya sea como difusión para resultados sensibles (S) y en dilución en forma de concentración mínima inhibitoria (CMI). Se resumen los resultados de la siguiente manera: con apitoxina, con 700 µg/ml para *Escherichia coli,* mientras que con 800 µg/ml para *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium. Para la Tetraciclina, con una concentración de 150µg/ml, se obtuvieron resultados inhibitorios similares a los logrados con apitoxina para los tres agentes patógenos.

Asimismo, al margen de la determinación de la capacidad inhibitoria de la apitoxina en las enterobacterias señaladas, también se estudió la actividad de esta sustancia para inhibir la formación de biofilm en 16 cepas de *Salmonella*, estudiando al mismo tiempo como influye en la motilidad característica de la mayoría de los serotipos de esta especie, su influencia en la transcriptómica de diversos genes involucrados en la formación de biofilm por estas bacterias, así como relacionados con la virulencia de los mismos. De este modo, se pudo determinar que concentraciones subinhibitorias de apitoxina reducen significativamente la formación de biofilm en 14 de 16 cepas probadas, que asimismo manifestaron un incremento en su motilidad. De igual manera, concentraciones inhibitorias de esta sustancia fueron capaces de eliminar una importante parte de biofilm preformado. Los estudios de transcriptómica pusieron de manifiesto una regulación positiva de los RNAs pequeños dsrA y *csr*B relacionados con la resistencia a antimicrobianos.

USC
DE COMPOSTELA

Las mejores concentraciones acuosas de apitoxina, de acuerdo con los estudio de difusión en agar validados en el laboratorio, fueron trasladadas a estudios de campo, administradas parenteralmente a cuyes previamente infectados vía oral con las enterobacterias de interés, obteniéndose resultados positivos en los cobayos, ya que los cuyes del ensayo superaron las infecciones con ganancia de peso corporal, para las tres enterobacterias y con concentraciones de 700 µg/ml y 800 µg/ml de apitoxina en

agua ultra pura o de calidad MILLI-Q, superando, en promedio con 13,72 g el peso frente a los tratados con tetraciclina, mientras que frente al grupo control, esa diferencia fue de 96,06 g en un tiempo de 15 días.

Se concluye que la apitoxina, es un producto natural que podría ser utilizado como antimicrobiano a niveles de 700 µg/ml y 800 µg/ml para el control de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium en cuyes (*Cavia porcellus*). Asimismo, sus propiedades se plasman en diversos cambios a nivel de la transcriptómica de *Salmonella*, justificando su efecto antimicrobiano, y mostrando una actividad antibiofilm mediante el uso de niveles subinhibitorios de esta sustancia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIA: ácido indol acético
- ADN: (DNA)- ácido desoxiribunucleico
- Asp: Asparagina
- °C: grados centígrados
- ECAA: Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución).
- MAGAP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- PUCESI: Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra
- ®: marca registrada
- Ser: Serina
- SIM: Sulfide Indole Motility (Medio de sulfuro indol para movilidad)
- SS- Agar Salmonella Shigella.
- T.S.I. Agar: Triple Sugar Iron agar.
- µl- microlitros
- µg- microgramos
- UFC-unidades formadoras de colonias
- UV- ultravioleta

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

pag

CAPÍTULO I **1**

ANTECEDENTES **1**

1.1 GENERALIDADES E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA 1
1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS 2
1.3 TENENCIA DE CUYES POR FAMILIAS CAMPESINAS DE ECUADOR Y OTROS PAÍSES DE AMÉRICA LATINA 2
1.4. JUSTIFICACIÓN 6
1.5. OBJETIVOS: 9

CAPITULO II **11**

2.1. SISTEMAS DE CRIANZA Y PRODUCCIÓN DE CUYES 11
2.1.1. Sistema de producción familiar *11*
2.1.2. Sistema familiar-comercial *13*
2.1.3. Sistema comercial *14*
2.2. ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LOS CUYES 15
2.2.1. Patologías enterobacterianas de los cuyes *16*
2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS MÁS COMUNES PARA LOS CUYES 18
2.3.1. Colibacilosis en cuyes *18*
2.3.2. Salmonelosis en cuyes *21*
2.3.3. Yersiniosis en cuyes *24*
2.4. LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS 26
2.5. MECANISMOS DE VIRULENCIA BACTERIANA 28
2.5.1. Fase temprana de patogenicidad bacteriana *28*
2.5.2. Fase tardía de patogenicidad bacteriana *30*
2.6. EL VENENO DE *APIS MELLIFERA,* PROPIEDADES GENERALES 31
2.6.1. Composición química del veneno de abeja *33*
2.6.2. Usos de la apitoxina *41*
2.6.3. Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos *42*
2.7. MACRODILUCIÓN 43

CAPÍTULO III **47**

3. MATERIALES Y MÉTODOS **47**

3.1. LOS LABORATORIOS EN LOS QUE SE TRABAJÓ: 47
3.2. COMUNIDADES INVOLUCRADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN 48
3.3. EQUIPOS Y MATERIALES 48
3.3.1. De laboratorio: *48*
3.1.2. De Campo *54*
3.4. METODOLOGÍA 56
3.4.1. Cosecha y Manejo de Apitoxina *56*
3.4.2. Caracterización físico- química de la apitoxina *57*
3.4.3. Análisis de Apitoxina por HPLC-UV *58*
3.4.3.1. Equipos y Materiales 58
3.4.3.2. Procedimiento modificado de Rybak- Chmielewska y Szczsna por Laboratorios ECAA 59
3.4.3.3. Método 59
3.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ENTEROBACTERIAS Y SU IDENTIFICACIÓN 60
3.5.1. Identificación de cepas bacterianas *62*
3.5.2. Identificación molecular de patógenos enterobacterianos *65*
3.5.3. Protocolo de extracción de ADN *66*

USFQ UNIVERSIDAD DE SAN FRANCISCO DE QUITO

3.5.4. Purificación de ADN bacteriano 66
3.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA APITOXINA SOBRE LAS BACTERIAS ENTÉRICAS OBJETO DE ESTUDIO: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR 68
3.6.1. Ensayos del poder antimicrobiano de la apitoxina mediante la técnica de microdilución en placa 70
3.6.2. Efecto de la apitoxina en la motilidad de Salmonella 70
3.6.3. Efecto de la apitoxina sobre la formación de biopelículas de Salmonella en poliestireno 70
3.6.4. Test de destrucción de biopelícula 71
3.6.5. Extracción de RNA y reacción de Real Time PCR para cuantificar la expresión génica 71
3.7. EVALUACIÓN DE LAS POBLACIONES DE ENTEROBACTERIAS EN CUYES TRATADOS CON APITOXINA 72
3.7.1. Pruebas de campo en cuyes infectados con patógenos y tratados con apitoxina 73
3.7.2. Muestreo con hisopados rectales y tisulares para recuento de enterobacterias 76
3.7.3. Controles de efectos colaterales y ganancia de pesos corporales 77
3.7.4. Análisis estadístico 77

CAPITULO IV **79**

4.1. RESULTADOS 79
4.1.1. Cosecha de apitoxina 79
4.1.2. Caracterización de la apitoxina (melitina) 80
4.2. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS PARA CUYES 82
4.2.1. Aislamiento e identificación de enterobacterias 82
4.2.2. Caracterización molecular de las enterobacterias 83
4.2.3. Amplificación del gen ADNr 16S 83
4.3. ACCIÓN INHIBITORIA DE LA APITOXINA: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR 86
4.3.1. Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Concentraciones bactericidas mediante el método de microdilución en placa para Salmonella 88
4.3.2. Estudio del efecto de la apitoxina sobre la movilidad de cepas de Salmonella y la formación de biopelículas 89
4.3.3. Efecto de la apitoxina sobre la transcriptómica relacionada con la formación de biopelículas y genes de virulencia de Salmonella. 91
4.4. RECUENTOS DE ENTEROBACTERIAS EN MUESTRAS DE HECES Y DE TEJIDOS DE CUYES TRATADOS CON APITOXINA Y TETRACICLINA. 92
4.4.1. Recuentos de Escherichia coli en hisopados rectales y muestras de tejidos 93
4.4.2. Recuentos de Salmonella Typhimurium en hisopados rectales y muestras de tejidos 94
4.4.3. Recuentos de Yersinia pseudotuberculosis en hisopados rectales y muestras de tejidos 95
4.5. GANANCIA DE PESOS CORPORALES DE LOS CUYES EN EL ENSAYO 96
4.5.1. Evaluación de los cuyes a los tratamientos: síntomas y muertes 97

CAPITULO V **101**

5. DISCUSIÓN **101**

5.1. COLECTA DE APITOXINA 101
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA APITOXINA (MELITINA) 103
5.3. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS PARA CUYES. 104
5.4. INHIBICIÓN BACTERIANA DE LA APITOXINA POR DISCO-DIFUSIÓN EN AGAR 105
5.5. LA APITOXINA EN LAS CMI Y CMB, FORMACIÓN DE BIOFILMS. TRANSCRIPTÓMICA DE BIOPELÍCULAS Y VIRULENCIA DE SALMONELLA. 108
5.6. RECUENTOS DE ENTEROBACTERIAS EN MUESTRAS DE HECES Y TEJIDOS DE CUYES TRATADOS CON APITOXINA Y TETRACICLINA. 111

5.7. GANANCIA DE PESOS CORPORALES DE CUYES DURANTE EL ENSAYO 112
5.8. EVALUACIÓN DE LOS CUYES A LOS TRATAMIENTOS: SÍNTOMAS Y MUERTES 115
CAPITULO VI 117
CONCLUSIONES 117
CAPÍTULO VII 119
REFERENCIAS 119
ANEXO 137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del veneno de Apis melífera y Dosis Letal en mg/kg 34

Tabla 2. Secuencias de cebadores para cuantificación de genes relacionados con la formación de Biopelículas, virulencia y RNAs pequeños. 53

Tabla 3. Preparación de la fase móvil para cromatografía por gradientes empleada en determinaciones de apitoxina 59

Tabla 4. Indicadores de Morfología de las colonias, tinción gram y pruebas bioquímicas comparativas entre las enterobacterias de interés. 65

Tabla 5. Secuencia de cebadores y tamaño esperado de los productos de PCR de la ampliación del gen 16s DNAr y región V3 del mismo gen 65

Tabla 6. Reactivos utilizados para la PCR 66

Tabla 7. Cosecha de apitoxina en cinco apiarios seleccionados en la provincia de Imbabura 79

Tabla 8. Registros del cromatograma con la separación de los distintos compuestos de la apitoxina, a partir de colectas de apiarios del presente estudio. 81

Tabla 9. Evaluación de muestras de apitoxina de cinco apiarios de la provincia de Imbabura, mediante HPLC y comparaciones de características cuantitativas y cualitativas. 82

Tabla 10. Secuencia de 599 pares de bases determinada para presunta Escherichia coli strain H105 Sequence ID: CP021454.1 longitud: 4978342 Range 1: 456411 to 457010 GenBankGraphics 84

Tabla 11. Secuencia de 340 pares de bases determinada para presunta Salmonella entérica subsp. entérica serovar Typhimurium strain 01ST04081 Sequence ID: CP029840.1 Length: 4870227. Range 1: 289587 to 289926 GenBankGraphics 84

Tabla 12. Secuencia de 273 pares de bases determinada para presunta Yersinia pseudotuberculosis PB1/+ Sequence ID: Length: 4695575. Range 1: 3943042 to 3943315 GenBankGraphics 85

Tabla 13. Porcentajes de identidad de las tres bacterias enteropatógenas objeto de esta investigación. 85

Tabla 14: Concentraciones Mínimas inhibitorias y Concentraciones Mínimas Bactericidas de la Apitoxina frente a diversos serotipos de Salmonella enterica. 89

Tabla 15: Efecto de la Apitoxina en la movilidad en agar para varios serotipos de Salmonella entérica. 90

Tabla 16: Efecto de la Apitoxina en la reducción de formación de biopelículas de diversos serotipos de Salmonella entérica, así como en la reducción de biopelícula preformada. 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química y secuencia de aminoácidos de la melitina 36

Figura 2. Ubicación geográfica de la provincia de Imbabura y ciudad de Ibarra 47

Figura 3. Cámara Neubauer Improved (MARIENFELD®) 50

Figura 4. Esquema de la estructura del eco colector de apitoxina 55

Figura 5. (a) Cosecha de apitoxina en el apiario de la ECAA. (b) Colecta de apitoxina en cámara de flujo laminar. 56

Figura 6. Ubicación geográfica de los apiarios en la provincia de Imbabura. 57

Figura 7. Representación esquemática de un sistema HPLC. 58

Figura 8. Análisis de apitoxina en el equipo HPLC (JASCO®) LC-Net II/ADC. 60

Figura 9. Representación de la localización de los criaderos de cuyes que se emplearon para los muestreos en la provincia de Imbabura. 61

Figura 10. Distribución de los cuyes en jaulas para el ensayo 73

Figura 11. Representación de la distribución de los cuyes para el ensayo 74

Figura 12. Niveles de producción de apitoxina en mg por colmenas y apiarios de Imbabura. 80

Nota: INC: apiario el Inca, CAR: apiario el Caranqui, CHA: apiario el Chaltura, COT: apiario el Cotacachi, ECA: apiario ECAA. 80

Figura 13. Imagen del HPLC JASCO®. LC-Net II/ADC, con componentes y accesorios: 81

Figura 14. Cromatografía de una muestra de apitoxina en la que se aprecia el pico de la melitina (imágenes en pantalla) 81

Figura 15. Placas Petri con cepas de bacterias: a). Escherichia coli, b) Salmonella Typhimurium y c). Yersinia pseudotuberculosis 83

Figura 16. Valor de los halos de inhibición tras 24 horas de incubación. 86

Figura 17. Valor de los halos de inhibición tras 48 horas de incubación. 87

Figura 18. Valor de los halos de inhibición tras 72 horas de incubación. 88

Figura 19. Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de varios genes relacionados con la virulencia de Salmonella y la formación de biopelículas. 91

Figura 20: Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de genes que codifican para RNAs pequeños que promueven la formación de biopelículas (arcZ, sroC, csrB). 92

Figura 21: Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de genes que codifican para RNAs pequeños que inhiben la formación de biopelículas (rprA, oxyS, dsrA) 92

Figura 22. Poblaciones de E. coli (UFC/g). (a) en hisopados rectales; (b) en muestras de tejidos. 94

Figura 23.Poblaciones de Salmonella Typhimurium (UFC/g) (a) en hisopados rectales; (b) muestras de tejidos 95

Figura 24. Poblaciones de Yersinia pseudotuberculosis (UFC/g).(a) en hisopados rectales; (b) en muestras de tejidos. 96

Figura 25. Ganancia de peso corporal de cuyes tratados con diversas dosis de apitoxina y Tetraciclina durante el presente trabajo 97

Figura 26. Escala sintomática y mortalidad de cuyes sometido a los tratamientos con los productos (apitoxina, tetraciclina y 0,0) 98

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades e importancia del problema

Frente a un panorama lleno de dificultades, tanto desde el punto de vista sanitario como productivo, en el que también se encuentran inmersos los sistemas de crianza y manejo de cobayos destinados al engorde, nada mejor que la búsqueda de bases sustentables, prácticas y concretas respecto al uso de alternativas naturales para preservar la salud de estos animales, tanto más que tienen excelente aceptación por parte de nuestros pueblos y comunidades andinas.

A las familias y pueblos de la Región Interandina del Ecuador, también les asiste la obligación de producir y el derecho a consumir productos limpios, libres de residuos de fármacos sintéticos que afectan a la salud de los consumidores. Esta sería una alternativa que sentaría bases firmes para nuevas y diversas investigaciones tendentes a contribuir con el buen vivir de los ecuatorianos y latinoamericanos.

Es necesarios resaltar lo anunciado por Caycedo (2000), Garmendia *et al*. (2000) y Chauca *et al*. (2006), quienes afirman que las enfermedades enterobacterianas constituyen uno de los mayores riesgos sanitarios en la crianza de cuyes, por lo que se deben encontrar alternativas de control y prevención para estas patologías; aún más, si se trata de la selección y utilización de productos naturales que no tengan acciones residuales, tanto para los animales como para los consumidores de carne de cuy.

En las provincias de la serranía ecuatoriana, caso especial la de Imbabura, para el sector rural campesino, la producción de cuyes constituye uno de los puntales para la economía familiar, incluso es el soporte para la alimentación, genera fuentes de trabajo, soluciona el subempleo a través de la inclusión, tanto de productores, intermediarios, comerciantes y personal de restaurantes que ofertan carne de cuy como plato exclusivo para eventos sociales especiales (Guamán, 2014).

En los actuales momentos, la competitividad en los emprendimientos, grandes o pequeños, exige la innovación de ventajas competitivas para el progreso de las actividades programadas. Así como señalan Caycedo *et al.* (2011), también para la cobayocultura y las diferentes formas de agregado de valor, se presentan exigencias de tipo sanitario, productos alimenticios libre de enfermedades, aptos para el consumo humano.

El cobayocultor para formar parte de un emprendimiento productivo y competitivo, necesita ofertar animales libres de enfermedades, sanos y nutritivos,

propósito que requiere del concurso de alternativas naturales factibles de implementarse en el medio rural, incluso de generar nuevos ingresos económicos, directos e indirectos, es el caso de la apicultura para producir miel, polen, propóleos, cera, jalea real y apitoxina para tratar, ya sea de forma preventiva como curar a sus cuyes.

1.2 Antecedentes históricos

Por una parte, Moreno (1989), señala que el cuy fue domesticado entre los años 2500 y 3600 antes de Cristo (a de C.). Este investigador sustenta su teoría en las evidencias logradas mediante trabajos arqueológicos practicados en diversos lugares de Ecuador y Perú, así como a través de estudios estratigráficos ejecutados en el templo del Cerro Sechín, donde se han encontrado depósitos de heces de cuyes que corresponden al primer periodo de la cultura Cavernaria.

Así también, Avilés (2016) respaldándose en evidencias arqueológicas, estima que el cuy fue domesticado entre 4500 y 7000 años a de C., demostrándose de esta manera que los habitantes de aquellas épocas ya se alimentaban con carne de cuy.

Otra fuente referencial la constituye el investigador Pulgar (1952), quien conoce que, en Ancón, ruinas de Huaycán, Cieneguillas, Málaga pertenecientes a Perú, así como en Las Tres Tolas de El Ángel y San José de Shansipamba en Ecuador, se han encontrado osamentas de cuyes en tumbas correspondientes a culturas incáicas; de igual manera ha identificado cráneos alargados y angostos en comparación con los actuales y que pertenecen a piezas óseas de cuyes ancestrales y también de esta época.

Según Moreno (1989), los hallazgos de esqueletos de cuyes (*Cavia porcellus)* encontrados junto a restos humanos, son propios de América del Sur, constituyéndose en testimonios que evidencian la presencia y uso de esta especie animal en épocas precolombinas, lo que permite afirmar que la carne del cuy, junto con la de venado fueron alimentos preferidos por los ejércitos conquistadores del Tahuantinsuyo.

1.3 Tenencia de cuyes por familias campesinas de Ecuador y otros países de América Latina

En los países andinos de América del Sur, es la mujer campesina la que asume la responsabilidad de las tareas domésticas, sin embargo, se encarga también de una multitud de tareas productivas en el campo, siendo la crianza y manejo de los cuyes un dominio exclusivo de las mujeres de familia que lo comparten con los niños (Aliaga *et al*. 2009).

El cuy (*Cavia porcellus*), también llamado cobayo, es un mamífero roedor originario de la zona andina de los países como Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia, es empleado para consumo alimenticio por su alto valor biológico. Se trata de una especie animal herbívora, de ciclo reproductivo corto, se adapta muy bien a diferentes

ecosistemas y en su alimentación utiliza otros elementos, la mayoría de ellos no empleados en la alimentación de otros monogástricos (Chauca y Zaldivar 1985).

La aparición del cuy es tan antigua que se confunde con la del hombre andino, por lo menos hace 2.500 a 3.600 años (a de C), constituye la época en la que los nativos de América del Sur criaban a este roedor y lo utilizaban como fuente de alimento (Caycedo *et al.* 2011).

Esta especie animal es, en el momento actual, un producto alimenticio de alta demanda en el mercado nacional e internacional, tiene un gran valor nutritivo y económico a la vez. Desde el enfoque de la producción y productividad es considerado un animal ejemplar muy estratégico, porque es precoz y prolífico. Presenta buenos índices de conversión alimenticia y es considerado un excelente productor de carne dotada de propiedades especiales como sabor y valor nutritivo (Bustamante, 1993; y Caycedo *et al*. 2011).

La proteína de la carne del cuy es muy digerible, valorada como una excelente fuente de aminoácidos esenciales, información proporcionada por Aliaga *et al*. (2009); y Morales, (2013), quienes, además confirman que el cuy contribuye a la alimentación de la población rural de escasos recursos.

La FAO (2010), señala que la distribución de la población de cuyes en Perú y Ecuador es amplia; se encuentra en casi todo el territorio, mientras que en los países como Colombia y Bolivia la difusión del cuy es regional y con poblaciones menores, pese a que tiene una gran capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas; a los cuyes se los encuentra desde la costa o el llano hasta alturas de 4500 metros sobre el nivel del mar, de igual manera, en zonas tanto frías como cálidas.

Amaguaña (2012), en referencia a la crianza de cuyes manifiesta que se trata de un animal poseedor de muchas ventajas para su producción, tanto es así que en el Ecuador la crianza del cuye se ha convertido en una actividad básica para el autoconsumo y sostenibilidad alimentaria, especialmente en las zonas rurales del sector alto andino.

En la provincia de Imbabura, a partir de información proporcionada por el Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social (2014), se sabe que existe una gran demanda de producción de cuyes, no solo en la parte rural sino también en la urbana, ya que se trata de un tipo de animal de gran comercialización para alimentación, de manera especial como componente de platos típicos en distintas comunidades, tal es el caso de Chaltura y Otavalo dentro de esta jurisdicción provincial.

USC
DE COMPOSTELA

Como menciona el Instituto Nacional de Estadística y Censo (2012), el cuy se ha convertido en un alimento lucrativo y de buena comercialización, a manera de ejemplo señala el incremento de la demanda de carne congelada. En el Ecuador, la población de cuyes registrada en el año 2000, según el III censo agropecuario fue de 5 millones

de animales. Se ha calculado la tasa de crecimiento por año en un 14,29%, estimándose que para el 2021, el consumo de carne rondará los 13 millones de cuyes en fase de engorde.

De conformidad con lo señalado por Caycedo (2000), para América Latina y para los pueblos de la serranía ecuatoriana, del sur de Colombia, del centro sierra del Perú y gran parte de Bolivia, el cuy constituye un símbolo cultural, folklórico, alimento popular ancestral y hasta recurso medicinal; forma parte de ceremonias familiares populares, de la cultura e idiosincrasia de comunidades indígenas y mestizas que habitan a lo largo y ancho de la Región Andina de gran parte de América del Sur.

Chauca *et al*. (2006), coinciden con los argumentos anteriores y manifiestan de manera concluyente que, esas son las razones por las cuales este animal forma parte de la vida socio-cultural campesina, convirtiéndose en un elemento de sustento alimenticio y económico familiar.

Jaramillo (2007) y Zumárraga (2011), afirman que, si bien se han logrado avances en nutrición y tecnificación de los sistemas de producción de cuyes, sin embargo, los cuidados sanitarios y epidemiológicos en favor de esta especie animal son deficientes, incluso desordenados y sin fundamentos técnicos en su aplicación práctica, razones por las cuales, las enfermedades infecciosas forman parte de las barreras que limitan el incremento de la producción que buscan desarrollar los cobayocultores.

Chauca (2013), considera que el cuy es susceptible a sufrir distintas enfermedades tanto parasitarias como infecciosas, tal es el caso de las enterobacteriosis como salmonelosis, yersiniosis y colibacilosis entre otras, así como enfermedades traumáticas, dérmicas, metabólicas, parasitarias y hasta carenciales; sin embargo, es factible prevenirlas empleando medidas adecuadas, oportunas y con adherencia a las normas de bioseguridad.

Las enfermedades de cualquier etiología se hacen presentes, en especial, si se dan factores predisponentes tales como: presencia de cambios bruscos de temperatura, humedad y corrientes de aire, presencia de charcos y jaulas sucias, así como cambios drásticos en la alimentación (Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social, 2014).

Por las Razones expuestas antes, en Ecuador el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), desarrolla programas de capacitación sobre manejo técnico de cuyes en el área sanitaria, control de enfermedades bacterianas y parasitarias. De igual manera, el faenamiento artesanal e industrial de estos animales, la aplicación de normas de bioseguridad para el manejo higiénico de la carne, a cargo de técnicos extensionistas del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), esperándose que en un futuro inmediato se tengan cambios concretos en beneficio de la cobayocultura (INIAP 2015).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La presencia de enfermedades infectocontagiosas en la crianza de *Cavia porcellus* y los riesgos por la presencia de residuos de antibióticos, debido al uso desmedido de estos productos por parte de los caviacultores ecuatorianos son, según Chauca (2013), los problemas fundamentales que esperan una solución permanente de tipo práctico.

De acuerdo con Caycedo *et al.* (2011), el uso y abuso de los antibióticos constituye un serio problema, puesto que involucra a productores y consumidores de carne de cuy, poniendo en entredicho esta oferta de proteína de origen animal, tan aceptada para el consumo popular. Nada mejor que encontrar ventajas competitivas, que potencien la oferta de alimentos para consumo humano, con el concurso de productos naturales que fortifiquen la productividad y garanticen el bienestar de los consumidores.

Como contrapartida a la aparente bonanza para los criadores de cuyes, sean bajo la modalidad de los sistemas familiares, comerciales o mixtos (familiares-comerciales), se encuentran latentes los problemas sanitarios provenientes de la presencia de agentes patógenos como las Enterobacteriaceas, entre las que se destacan como manifiestan Caycedo (2000) y Chauca *et al* (2006), los siguientes agentes etiológicos: *Escherichia coli, Yersinia pesutotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium, entre otros microorganismos.

Tal como señala Jaramillo (2007), los agentes bacterianos enteropatógenos de los cuyes, tienen una gran capacidad invasiva que les confiere la posibilidad de desarrollar infecciones sistémicas y causar daños mayores a los animales infectados.

Entre los caviacultores de las comunidades rurales ecuatorianas, de acuerdo con Guamán (2014), una estrategia muy común, con la pretensión de controlar a los agentes microbianos que producen enfermedades con altos índices de mortalidad en los cuyes, se dan casos caracterizados por el empleo masivo de antibióticos de amplio espectro, sustentándose en experiencias anteriores de medicación, muchas veces sin criterio diagnóstico previo. Esta práctica lleva a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y con ello hay el gran riesgo de causar serias repercusiones en la salud del consumidor de carne de cuyes que han sido medicados de manera desordenada.

De acuerdo con Hoelzer *et al* (2017), los productos cárnicos ofertados provienen de los más diversos y sofisticados sistemas de producción, los que se rigen por paquetes tecnológicos preestablecidos, afianzándose en el uso de quimioterápicos, anabólicos, hormonales, antibióticos e inmunológicos de síntesis o industriales, productos que tarde o temprano dejan acciones residuales en los alimentos así producidos.

USC DE COMPOSTELA

Los habitantes de la región andina ecuatoriana y latinoamericana, como señalan Avilés *et al*. (2014) y Guamán (2014), exigen alimentos de calidad para su bienestar alimenticio, de manera especial cárnicos, lácteos y huevos en sus diferentes agregados

de valor y presentaciones. Nada mejor que los productos naturales de línea limpia; entre ellos la carne de cuyes alimentados y tratados orgánicamente.

El cuy (*Cavia porcellus*), llamado también *conejillo de Indias*, terminología que para Kaiser *et al*. (2010), constituye un sinónimo de experimentación científica. De acuerdo con Guo *et al*. (2012) y De Oliveira *et al*. (2013), el cuy es conocido como uno de los estándares de oro para estudios de patologías infecciosas y parasitarias, como modelos de Biología Molecular y Celular enfocados a estudiar el sistema inmune humano, tomándose en cuenta que los genes relacionados con aspectos inmunitarios de los cuyes son similares a los de las personas. Con relación a todo lo comentado para al presente trabajo se puede formular la siguiente hipótesis:

Hipótesis: Si se aplica una concentración de apitoxina en un tiempo adecuado, entonces el proceso de control terapéutico para enterobacterias en cuyes es eficiente en un 50%
Ho= $\mu i = \mu j$
Ho= $\mu i \neq \mu j$

Animal objeto de estudio: Proceso de aplicación terapéutica de la apitoxina en cuyes (*Cavia porcellus*)

Agentes etiológicos: Apitoxina en Enterobacterias.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Desde el enfoque que la sabia naturaleza brinda para beneficios del hombre como custodio de sus bienes y prodigios, así como a partir de las resistencias frente a los antimicrobianos convencionales que desarrollan los microorganismos patógenos, no solamente en el organismo humano sino también en las especies animales de interés, tenemos el caso de los cuyes (*Cavia porcellus*) que benefician a muchas familias de la serranía ecuatoriana y latinoamericana.

Como prodigio natural, se cuenta con la presencia de insectos benéficos como las abejas (*Apis mellifera*), dedicadas a la producción de miel, polen, jalea real, propoleo, cera y un producto exclusivo de glándulas abdominales, el veneno de abejas, conocido también como apitoxina. De manera especial este último producto, ha despertado el interés como un recurso natural de acción terapéutica, ya sea como antirreumático, antinflamatorio y como antimicrobiano.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Por otro lado, la crianza de cuyes (*Cavia porcellus*), considerado un eslabón importante para la alimentación y subsistencia de centenares de familias del medio rural andino de varios países de América Latina: Colombia, parte de Venezuela, Ecuador, Perú, y Bolivia. Para el caso de Ecuador, de acuerdo la revista Líderes (15 de mayo de 2017), que para el análisis de la noticia toma como referencia las proyecciones que realiza el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), así

como en base a los resultados del Censo Agropecuario desarrollado en el 2011, estableciendo que en el año 2016 se produjeron, aproximadamente 4,9 millones de cuyes en las provincias centrales de la serranía ecuatoriana, esto es: Azuay, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo; además, Imbabura, Carchi y norte de Pichincha han contribuido también para sumar una producción nacional de 6,6 millones de cuyes para este mismo año.

La presencia de enfermedades enterobacterianas, producidas por agentes patógenos como: *Yersinia pseudotubersulosis, Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium, son las principales causas de pérdidas económicas llegando hasta la extinción de varias unidades productivas de cuyes, razón por la que se ha convertido en uno de los problemas prioritarios desde el punto de vista de la salud de estos animales.

Por el hecho de haberse generado usos y abuso de fármacos, entre ellos los antibióticos y las sulfamidas, se ha llegado al uso incontrolado de estos y otros productos, generándose resistencia microbianas, acciones residuales en carne de cuyes tratados de esta manera, poniendo en entredicho la salud de los consumidores de carne de cuy. Frente a esta problemática presentada, una de las opciones es el uso de productos naturales como la apitoxina por vía parenteral y en dosis fundamentadas en pruebas de laboratorio como las de sensibilidad mediante la prueba de disco difusión con soluciones acuosas de apitoxina, entre 900µg/ml, 800 µg/ml, 700µg/ml, 600µg/ml, comparadas con 150 µg/ml de tetraciclina y 0,0, µg/ml como testigo absoluto.

Si se tiene animales sanos, es evidente que se tendrán incrementos de pesos corporales, que permiten atribuir acciones benéficas a un producto utilizado de manera planificada y ordenada.

De manera que la apitoxina como alternativa terapéutica de tipo natural, es valorada para que tenga sustento teórico práctico su uso entre los criadores de cuyes, no solamente imbabureños, sino peruanos, colombianos, es decir entre los latinoamericanos. Para una problemática sanitaria rural, una alternativa natural proveniente del trabajo de abejas, investigadores y cobayocultores seguros de su trabajo honrado, con la satisfacción del deber cumplido.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.5. OBJETIVOS:

a. Objetivo general

Determinar la acción de la apitoxina sobre Salmonelas y otras cepas de enterobacterias patógenas en cobayos (C*avia porcellus*) durante la fase de engorde para la búsqueda de tratamientos alternativos.

b. Objetivos específicos

* Establecer un sistema de cosecha de apitoxina en los apiarios de la provincia de Imbabura (Ecuador), mediante procedimientos operativos prácticos, tanto para una evaluación de las posibles incidencias geo climáticas en el producto como de su uso en el tratamiento curativo de cuyes.

* Determinar las sensibilidad bacteriana a la apitoxina, a través del método de disco difusión en agar y en comparación con tetraciclina, para *Salmonella* y otras bacterias entéricas de interés.

* Evaluar el efecto de la apitoxina sobre diversos serotipos de *Salmonella* para comprobar si existen diferencias en cuanto al efecto antimicrobiano de esta sustancia.

* Evaluar el efecto de la apitoxina sobre la capacidad para la formación de biopelículas y la movilidad de *Salmonella* así como su efecto sobre la virulencia de este agente mediante el estudio de su efecto sobre la transcriptómica de genes relacionados con estas características.

- Evaluar las respuestas de cuyes clínicamente enfermos al uso parenteral de concentraciones de apitoxina y tetraciclina frente a un testigo absoluto, mediante realización de recuentos a las 24, 48 y 72 horas, estudios de los pesos corporales de los cobayos y signos clínicos post-tratamientos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Sistemas de crianza y producción de cuyes

A lo largo y ancho de la Región Andina de América Latina, en los países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, parte de Venezuela y Argentina, según Chauca *et al*. (2006); Caycedo (2000) y Guamán (2014), son tres los sistemas de producción de cuyes, ya sean comunitarios o individuales; estos sistemas son: el familiar, el familiar-comercial y el comercial, recalcándose de manera unánime por parte de los investigadores que, el desarrollo de la crianza rural de cobayos ha conllevado alternancia entre los tres sistemas como fases experienciales y de innovación.

Para Caycedo (2000); Jaramillo (2010) y Zumárraga (2011), el sistema familiar contribuye directamente a la seguridad alimentaria de las familias campesinas y por supuesto, también a la sostenibilidad del sistema entre los pequeños cobayocultores; en cambio los sistemas familiar-comercial y comercial contribuyen a la generación de una empresa por parte de los productores, a la creación de fuentes de trabajo y por tanto, evitar la emigración fuera de su suelo natal por parte de los jóvenes campesinos especialmente.

2.1.1. Sistema de producción familiar

De conformidad con Chauca (2013), el sistema de crianza familiar de cuyes es el más ancestral y difundido en la región andina latinoamericana, caso práctico de Ecuador, convirtiéndose en una de sus características fundamentales, la generación del sistema en base a insumos y mano de obra familiares, ya que todos los miembros de los hogares campesinos, de forma integral, colaboran en el mantenimiento de sus núcleos familiares.

De manera que, como señalan Caycedo (2000); Jaramillo (2010) y Zumárraga (2011), el cuidado de los cuyes lo realizan los hijos en edad escolar, las amas de casa y otros miembros de la familia que comparten la vivienda, recalcándose que el esposo o jefe de familia casi nunca participa, puesto que sale de su hogar a buscar trabajos en la construcción fundamentalmente; es decir, el cuidado de los cuyes corre a cargo de las mujeres y niños.

Un detalle importante es el enunciado por Zaldívar *et al.* (1990) y Zumárraga (2011), quienes afirman que más del 50% de los productores campesinos crían a los cuyes de manera exclusiva para autoconsumo, forma en la cual disponen de una fuente de proteína de origen animal. Las familias que disponen de excedentes de animales, los comercializan hasta un promedio del 35% con el fin de obtener ingresos económicos para sustentar las necesidades primarias de la familia.

Otra de las ventajas de este sistema radica en el uso de insumos alimenticios que son obtenidos dentro del medio de convivencia, tal es el caso de malezas forrajeras, hierbas de los bordes de los caminos, desperdicios de cocina y de cosechas agrícolas. Asimismo, el ambiente de crianza es comúnmente la cocina, considerándose que una fuente de calor es el fogón, así como, en algunos casos se construyen ambientes colindantes a la vivienda principal, aprovechándose de manera eficiente los recursos existentes en la finca familiar (Caycedo, 2000 y Chauca, 2013).

El número de cuyes por familia, en promedio está entre 25 y 30, en todo caso se determina en relación a los recursos alimenticios disponibles, forma en la que los cuyes criados bajo este sistema constituyen fuentes alimenticias de bajo costo de producción y se encuentran a disponibilidad diaria de la familia para satisfacer sus necesidades alimenticias (Jaramillo, 2007).

De acuerdo con lo manifestado por Chauca (2013), hay dos características fundamentales que se mantienen en este sistema de crianza. La primera que está marcada por el manejo mínimo indispensable, ya que al total de cuyes se los mantiene en un grupo común sin consideraciones de sexo, tamaño corporal, edad, etapa fisiológica y de producción, a tal punto que es muy común la consanguinidad y por ende una alta mortalidad de crías, en especial por aplastamientos ocasionados por los adultos a los recién nacidos.

Mientras que la segunda característica del sistema es la selección negativa que se realiza con los reproductores, puesto que, sin miramientos de ninguna naturaleza, se sacrifican o venden a los animales más grandes. En todo caso se mantiene un alto porcentaje de reproductores mientras que el promedio de crías por madre al año no pasa de 2 a 4 gazapos o recién nacidos (Chauca 2013).

Según Caycedo *et al*. (2011), en este sistema de explotación de cuyes se han realizado intentos por mejorar los ambientes de crianza, a través de espacios rectangulares cercados con madera o barro cocido por los cuatro lados, llamados sistema de pozas, también la renovación periódica de las camas para disminuir la humedad proveniente de las deyecciones de los animales, así como mejoras en la alimentación y un manejo racional del destete para las crías.

Para Chauca (2013) y Amaguaña (2012), las mejoras en el manejo dentro de los protocolos de este sistema de crianza de cuyes, han permitido un crecimiento de la población y con ello mayor capitalización familiar, tomándose en cuenta que esos animales tiene un papel social, nutricional y económico muy preponderante para aquellas familias del medio rural que carecen de recursos.

USC
DE COMPOSTELA

2.1.2. Sistema familiar-comercial

La narrativa referente a este sistema de crianza se respalda en las experiencias de López (1987), quien asegura que este tipo de crianza de cuyes se deriva necesariamente de una crianza familiar organizada, la misma que se encuentra circunscrita al área rural, en lugares muy próximos a sectores urbanos, donde se puede comercializar el producto principal como es la carne de cuy.

Como dicen Caycedo *et al.* (2011), es importante destacar que las vías de comunicación, adecuadas para vehículos motorizados de transporte permiten el acceso a los centros de producción, facilitando de esta manera la salida de los cuyes para la venta o el ingreso de los compradores intermediarios, quienes están siempre presentes para aprovechar las mínimas oportunidades de negocio, desde luego con la consigna de ofrecer precios bajos.

Ataucusi (2015), manifiesta que los productores de cuyes, dentro de este sistema se ven obligados a invertir recursos económicos en infraestructura, tierra destinada a la siembra de pastos y mano de obra familiar para el manejo de la crianza. Los productores que desarrollan este sistema de producción de cuyes disponen de áreas para el cultivo de forrajes o usan subproductos de otros cultivos agrícolas, tales como tallos y cortezas de vainas de leguminosas como judías, guisantes, entre otras.

En este sistema de producción, tal como lo expresa Chauca (2013), el tamaño de la explotación dependerá de la disponibilidad de recursos alimenticios, de manera general se mantienen entre 100 y 500 cuyes, con un número máximo de 150 madres reproductoras. Toda la población se maneja en un mismo galpón, agrupándose a los animales por edades, sexo y categorías de reproductores, recrías y engorde.

Como destacan Caycedo *et al.* (2011), un detalle importante dentro de esta modalidad de explotación de cuyes es la producción de forrajes en áreas exclusivas para estos animales y que se encuentren cercanas o adjuntas al galpón de producción, todo lo cual exige una mayor presencia de mano de obra, tanto para el manejo de los animales como para el mantenimiento de las pasturas. Las instalaciones se construyen especialmente para este fin, utilizando materiales de la zona.

Para Chauca (2013), el tipo de cuyes que se mantienen en este sistema de producción denominado familiar-comercial es el mestizo, manejándose cruzamientos llamados *de mejora*, debido a que se busca el concurso de animales con cualidades corporales sobresalientes, ya sea mediante la clasificación de animales del mismo galpón como a partir de reproductores seleccionados de otras comunidades, sin caer en la consanguinidad.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este tipo de crianza se emplean técnicas de manejo más rigurosas, reflejándose fundamentalmente en la composición del plantel de animales, ya que de manera especial se toman como indicadores de calidad, por un lado, la composición de la

población integrada en una tercera parte por reproductores y por otra parte se tiene en cuenta el índice productivo (IP), el mismo que debe ser de 9,62 cuyes/madre/año, siempre y cuando los animales reciban una suplementación alimenticia (Chauca, 2013).

Tal como afirman Caycedo *et al.* (2011), una característica dentro de este sistema de producción de cuyes es el destete de gazapos que se hace como máximo a los 10 días de nacidos así como una selección oportuna de animales descartados por: su precocidad, tamaño corporal, y otras características morfológicas También hay que tener en cuenta los que se destinan como reproductores, de igual manera, las reposiciones o renovaciones de cuyes se realizan a los tres meses, con el fin de relizar la renovación de reproductores una vez estabilizada la población.

Por otra parte, Avilés *et al*. (2014) manifiestan que un indicador para este sistema es el tamaño de la explotación, más grande que la de tipo familiar, ya que se trata de una microempresa que al involucrar más trabajo, ofrece oportunidades para que los miembros de la familia eviten la costumbre de emigrar, justificándose esta alternativa ya que la unidad productora al encontrarse integrada por 150 madres reproductoras, seguro producirá como mínimo 900 cuyes anuales para el mercado, aumentando de esta manera las necesidades de mano de obra y por supuesto los ingresos económicos familiares.

En Ecuador, tal como afirma Zumárraga (2011), la crianza familiar-comercial es una actividad que data desde aproximadamente 6 años, tiene un nivel más tecnificado y se encuentra conformada por animales mejorados en su mayoría y con parámetros productivos y reproductivos que permiten una buena rentabilidad económica para la familia. Las utilidades productivas conocidas hasta hoy, son susceptibles de mejora, ya que la comercialización está sujeta a la intermediación. La oferta se da bajo la modalidad de animales vivos, ya sea para carne o para cría, con comercializaciones dentro de la misma granja y con precios dados según el tamaño de los animales.

2.1.3. Sistema comercial

Esta modalidad de producción está muy limitada, es poco difundida y se halla circunscrita a los valles andinos cercanos a áreas urbanas. Cabe destacar que se trata de la formación y dinamismo de una verdadera empresa agropecuaria, donde se debe trabajar con eficiencia y una muy buena tecnología, se manejan cuyes de líneas mejoradas, precoces, prolíficos y de excelente conversión alimenticia. El desarrollo de este sistema está orientado a contribuir con la ofertar de carne de cuyes en las áreas urbanas donde, de momento hay escasez (Chauca, 2013).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por principio, una granja destinada a la producción comercial de cuyes mantiene áreas específicas para siembra de forraje destinado a la alimentación de estos animales, se complementa con el uso de una alimentación balanceada, los índices de producción son superiores a 7,6 cuyes/madre/año, con presencia de animales destinados al

engorde, los que salen al mercado con pesos mínimos de 900 gramos y edades no mayores a las diez semanas (Caycedo *et al*. 2011).

En esta modalidad de producción, los reproductores y cuyes de recría se manejan en instalaciones diferentes con material apropiado para cada etapa productiva, se mantienen registros de producción, considerados instrumentos indispensables para garantizar la eficiencia y rentabilidad de la explotación. Dichos registros de producción, guían el manejo de conformidad con los dictámenes de un verdadero sistema comercial (Avilés *et al*. 2014).

2.2. Enfermedades infecciosas en los cuyes

Tal y como señalan Prescott *et al*. (2010), las enfermedades se conocen por la presencia de una serie de síntomas, que a su vez son resultantes de las alteraciones y cambios producidos a nivel humoral, en células, tejidos y estructuras orgánicas.

Garmendia *et al*. (2000) y Chauca (2013), manifiestan que las enfermedades se dividen en dos grupos: infecciosas y no infecciosas; las primeras son las causadas por agentes, tales como bacterias, virus, hongos, o protozoos; a su vez pueden ser locales o sistémicas.

Por cierto, como sostiene Tunkel (2016), por el solo hecho que esté presente un microorganismo en los animales o el hombre, no constituye una infección, ya que para que adquiera naturaleza infecciosa, los microorganismos deben multiplicarse en el cuerpo objeto del ataque, por tanto, habrá presencia de síntomas específicos y/o generales, así como cambios histológicos y tisulares.

Se pueden definir a las enfermedades no infecciosas como las causadas por traumatismos, tóxicos vegetales, minerales o animales, por cambios bruscos de temperatura y alteraciones climáticas, deficiencias nutricionales, así como las debidas a alteraciones fisiológicas y/o crecimientos tisulares anómalos (Ataucusi 2015).

Chauca *et al.* (2006) afirma que los cuyes como animales de producción, se encuentran sujetos a los diversos tipos de enfermedades, de manera especial las infecciosas de orden entérico. Es necesario recordar que los sistemas de crianza se fundamentan en el suministro de forrajes, procedentes de áreas destinadas exclusivamente para los cobayos, como sobrantes del pastoreo de otros herbívoros, los que se encuentran en los bordes de cercas y otros lugares de fácil contaminación. De tal manera que no hay garantía que sean pastos libres de fuentes infecciosas; incluso, el mismo proceso de manipulación los expone a que sean objeto de contaminaciones.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

De acuerdo con Caycedo *et al.* (2011), se puede asegurar que las enfermedades de tipo bacteriano que atacan al sistema entérico de los cuyes, son las de mayor afectación para las unidades productivas de cobayos.

Es necesario recordar que las variables presentes en una enfermedad son de dos tipos: unas debidas intrínsicamente a los agentes patógenos y otras que son propias del hospedador; es importante saber discernir los efectos derivados de las interacciones de estos dos tipos de variables para determinar con precisión el diagnóstico correspondiente a la patología presente (Ataucusi, 2015).

2.2.1. Patologías enterobacterianas de los cuyes

La FAO (2010), señala que, dadas las características que acompañan a los sistemas familiares y rurales de producción agropecuaria, las explotaciones de animales de interés zootécnico también llevan asociadas una serie de dificultades que deben ser solventadas. Esto es, la presencia de enfermedades enterobacterianas en la crianza de *Cavia porcellus* y los riesgos por la presencia de residuos, en relación al uso de fármacos en general, así como los antimicrobianos en particular.

Como contrapartida pues, a la aparente bonanza para los cobayocultores, se encuentran latentes los problemas sanitarios dados por la presencia de agentes patógenos como las Enterobacteriaceas, entre las que se destacan, como manifiestan Caycedo (2000) y Chauca (2013), *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium, microorganismos que de por si constituyen un problema potencial que ha llegado a diezmar poblaciones de cuyes que no han sido manejadas técnicamente.

Para Ortega *et al*. (2015), Layme *et al*. (2011), la salmonelosis es la enfermedad más grave para los cobayos, deja altos índices de mortalidad y morbilidad. Enfermedad que es producida por varios serotipos del género Salmonella, y dela especie *Salmonella enterica* subespecie *enterica* principalmente por *Salmonella* Typhimurium. Se trata de bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, es común en los animales jóvenes, en los que deja niveles altos de mortalidad. En cambio, los adultos, después de una aparente mejoría se convierten frecuentemente en portadores asintomáticos.

Los patógenos como *Salmonella* tienen diferentes mecanismos para persistir en la cadena alimentaria. De todos esos mecanismos la formación de biopelículas (*Biofilms*) es uno de los que causan mayor preocupación. Las biopelículas son un riesgo potencial tanto en la industria alimentaria como a nivel de producción animal y son una fuente persistente de contaminación (Lamas *et al.* 2018a).

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades estructuradas de microorganismos de la misma especie o de varias especies incluidas en una matriz polimérica auto producida por dichos microorganismos que puede adherirse tanto a superficies inorgánicas como orgánicas. En contraste con las células planctónicas (células vegetativas libres), las células en las biopelículas son mucho más resistentes a las condiciones de estrés, así como a la acción de desinfectantes, y agentes físicos y químicos. De forma específica las bacterias en las biopelículas tienen incrementada su

resistencia frente a los biocidas comúnmente empleados en limpieza y desinfección (Steenackers *et al.* 2012, Donlan y Costerton 2002). Bajo esta óptica es importante evaluar sustancias alternativas que puedan eliminar las biopelículas, sobre todo aquellas formadas por enterobacterias en general y por *Salmonella* en particular.

La salmonelosis, según Caycedo *et al.* (2011), se caracteriza por la presencia de diarreas, anorexia, decaimiento, pelo erizado, madres que abortan, congestión y hemorragias generalizadas en bazo, vesícula biliar, hígado con focos necróticos de coloración blanco amarillenta, hepatomegalia, esplenomegalia, enteritis, hiperplasia de nódulos linfáticos, peritonitis fibrinosa y septicemia.

Por otra parte, Ataucusi (2015), considera que la yersiniosis es una zoonosis que afecta a roedores, cerdos y aves, su agente causal es una enterobacteria Gram negativa, cuyo género está formado por al menos 11 especies, de las cuales tres son consideradas patógenos para los animales y humanos: *Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica y Yersinia pseudotuberculosis*.

Ortega *et al*. (2015), manifiesta que en los cuyes es común la *Yersinia pseudotuberculosis,* ya que esta bacteria se encuentra en el agua y alimentos contaminados, siendo la vía digestiva la predilecta para que los cuyes padezcan esta enfermedad, de manera especial si el plan sanitario en los criaderos de estos animales no es óptimo en cuanto bioseguridad, tal es el caso de forrajes contaminados con heces y orina infectados.

Según señala Lara (2011), se han identificado tres formas de yersiniosis: la septicemia aguda, con inflamación de los ganglios mesentéricos que presentan focos purulentos, hay muerte violenta a causa de la ruptura de estos linfonódulos; la septicemia crónica, con decaimiento progresivo, presencia de linfonódulos cervicales infartados y muertes entre 3 a 4 semanas; finalmente, afectaciones hereditarias, las mismas que se hacen evidentes al nacimiento y crecimiento de los descendientes de reproductores infectados.

Para Caycedo (2000); Chauca *et al*. (2006) y Arévalo (2011), la colibacilosis es una enfermedad producida por la bacteria *Escherichia coli* fundamentalmente, se caracteriza por atacar al tracto digestivo de los cobayos.

Las células bacterianas de *Escherichia coli*, se unen a la pared intestinal a través de estructuras pilosas llamadas fimbrias, que se encuentran estructuradas a partir de lecitinas. Estos lípidos saponificables con funciones emulgentes identifican y se combinan selectivamente con receptores específicos de la pared intestinal, iniciándose un complejo proceso patológico que se desencadena con disentería en los cuyes infectados (Chauca *et al.* 2006).

Si bien es cierto que las diarreas pueden ser causadas por diversidad de microorganismos, sin embargo, como menciona Arévalo (2011) los principales

agentes etiológicos son los coccidios (protozoos, parásitos), *Escherichia coli* y *Salmonella* entre las enterobacterias.

Los síntomas de la colibacilosis en los cuyes se caracterizan por presencia de diarreas profusas, caquexia, temperaturas superiores a los 39,6°C, muchas veces el intestino delgado se encuentra distendido con presencia de líquido incoloro, incluso se pueden presentar nódulos a lo largo del intestino (Ortega *et al*. 2015).

2.3. Características de las enterobacterias patógenas más comunes para los Cuyes

A partir del enunciado dado por Prescott *et al*. (2010), quienes consideran que las enfermedades que mayor incidencia y estragos causan, debido a una alta mortalidad y pérdidas económicas son las originadas por enterobacterias, las mismas que tiene como agentes causales a *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis y Salmonella* Typhimurium*,* las tres son cocobacilos Gram-negativos no esporulados, se las incluye en la familia *Enterobacteriaceae*.

De conformidad con Quinn y Markey (2005), se puede establecer que las enterobacterias tienen las siguientes características:

- Están ampliamente distribuidas en la naturaleza.
- Se encuentran en el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves.
- Crecen muy bien en medios de cultivo generales.
- Varias especies tiene flagelos para su movilidad, sin embargo, algunas especies no son móviles.
- Algunas de ellas son muy virulentas.
- Generalmente estas enterobacterias producen toxinas.
- Son oxidasa negativa, pues carecen de la enzima citocromo oxidasa.
- Necesitan para su crecimiento compuestos simples de carbono y nitrógeno, unas especies requieren D-glucosa, otras demandan aminoácidos y vitaminas.
- Son anaerobias facultativas.
- La temperatura óptima para su crecimiento está entre 22 y 37ºC.
- Son capaces de reducir nitritos a nitratos.
- En condiciones anaeróbicas fermentan a los carbohidratos, glucosa y lactosa con producción o no de gases.
- En medios aeróbicos son oxidadoras de una amplia gama de sustratos.

2.3.1. Colibacilosis en cuyes

USC UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las enterobacterias conocidas como *Escherichia coli,* además de las características propias de la familia *Enterobacteriaceae*, producen indol a partir de triptófano, fermentan la glucosa y lactosa con producción de gas, y se desarrollan de manera eficiente a temperaturas corporales de los animales y el hombre, razón por la

cual es importante destacar la necesidad de conservar las carnes a bajas temperaturas para evitar proliferación de estas bacterias (Caycedo, 2000).

a. Etiología

De conformidad con lo postulado por Caycedo *et al*. (2011), *Escherichia coli*, es un pequeño bacilo bacteriano, Gram-negativo, tiene forma de un bastón, es aerobio y anaerobio facultativo, bastante resistente a los desinfectantes químicos y a la desecación.

Se han identificado múltiples serotipos, de manera especial si se toman en cuenta la presencia de antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (F); en general, se puede decir que el hábitat preferido de esta bacteria patógena es el tracto intestinal de mamíferos y aves. Su virulencia se relaciona tanto con su capacidad invasiva como con la de generar toxinas (Álvarez *et al.* 2008).

En cuanto a las propiedades bioquímicas de esta bacteria, Prescott *et al*. (2010), afirman que produce ácido y gas a partir de glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa y manitol; según los casos puede fermentar o no la sacarosa, rafinosa y glicerina, muy rara vez fermenta la pectina y el adonitol. Nunca fermenta dextrina, almidón, inositol o glucógeno.

Las células bacterianas pertenecientes a *Escherichia coli,* en los cobayos infectados provocan un proceso morboso que termina con la muerte en 48 horas, comprobándose que los animales mueren con una peritonitis fibrinopurulenta y por septicemia, debido a la presencia de endotoxinas producto del metabolismo bacteriano en los tejidos del animal infectado (Chauca *et al*. 2006).

Las células vegetativas de *Escherichia coli* se encuentran presentes en el intestino de los gazapos sanos, y en conjunción con otros factores predisponentes como las malas condiciones sanitarias en los ambientes de crianza de los cuyes, debilidad orgánica por mala nutrición, estrés y cambios bruscos de manejo y alimentación, van a favorecer el desarrollo del potencial patógeno de esta bacteria en el tracto digestivo (Caycedo *et al*. 2011).

El ataque entérico se da en las células de las microvellosidades intestinales, cuyas estructuras aumentan la superficie de absorción de los nutrientes, convirtiéndose en células diana para *Escherichia coli* que desencadena cuadros de enteritis con presencia de diarreas agudas (Ataucusi, 2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Es importante resaltar una vez más que deben de existir condiciones predisponentes, tal es el caso de los niveles inmunitarios o nutricionales deficientes, presencia o ausencia de factores de sobrecarga o estrés, entre otras, para que la enfermedad esté dirigida por la presencia del agente infeccioso Prescott *et al*. (2010).

Chauca *et al.* (2006) hacen hincapié en la necesidad de establecer una clara distinción entre infección y enfermedad, puesto que hay animales sanos que albergan a un agente infeccioso, razón por la cual son llamados portadores asintomáticos.

b. Síntomas

Chauca (2013) y Ataucusi (2015) consideran que para el desarrollo de la enteritis por *E. coli* en cuyes hay tres factores predisponentes como son: por una parte, el estado inmunitario de los animales, las características de la cepa de *E coli* y finalmente la capacidad del patógeno para generar enterotoxinas. Las cepas enteropatógenas desarrollan directamente una fuerte destrucción de la mucosa intestinal, provocando diarrea y muerte del animal.

Las cepas menos virulentas, causan una destrucción no muy grave de la mucosa intestinal, provocando únicamente un retardo en el crecimiento, e índices de conversión muy elevados; es decir, excesivo consumo de alimento para escasa conversión en producto (carne o crías), hay diarreas pasajeras que son superadas espontáneamente (Chauca, 2013).

La bacteria necesita de una clara alteración del medio intestinal para su proliferación, ya que si no hay factores favorables no puede causar infección. Es el caso de ingesta excesiva, alimentos muy enriquecidos, factores que favorecen la ausencia de motilidad intestinal por indigestiones, incrementándose la población de enterobacterias, con el agravamiento del cuadro patológico (Caycedo *et al.* 2011).

La microbiota intestinal no equilibrada, carga microbiana muy alta dentro de la explotación, falta de confort, condiciones ambientales excesivamente húmedas, con corrientes de aire y cambios bruscos de temperatura, así como la presencia de animales portadores asintomáticos que son el reservorio de la enfermedad (Jaramillo, 2007 y Caycedo, 2000).

En síntesis, los síntomas más destacados son los siguientes: los cuyes atacados por *Escherichia coli* se encuentran aislados del resto de animales, se ven apáticos, pelaje erizado, tienen fiebre de 39°C, falta de apetito, presencia de diarrea abundante y alta mortalidad (Álvarez *et al.* 2008).

c. Tratamiento

El tratamiento contra la colibacilosis, según Ataucusi (2015), consiste en administrar al enfermo antibióticos sistémicos (intraluminales, mediante sondas que permiten llevar alimentos al estómago), que sean de absorción intestinal, para ello la administración debe ser oral, es el caso de enrofloxacina al 10%, (2 a 3 gotas vía oral por tres días seguidos). En todo caso, para la selección del antibiótico deben tomarse muestras de heces y de sangre para cultivo y realización posterior de

antibiogramas a las bacterias causales. Además, es recomendable eliminar dicho agente causal, lavando y desinfectando las instalaciones.

Como medidas de profilaxis son recomendables la limpieza de los ambientes de crianza, manejo técnico y sin estrés para los animales, medidas de bioseguridad rigurosamente ejecutadas y de cumplimiento obligatorio.

2.3.2. Salmonelosis en cuyes

Los cuyes por naturaleza demuestran una gran susceptibilidad a la salmonelosis, considerada una de las enfermedades de mayor importancia en los sistemas productivos de cuyes, presentándose cuadros patológicos con altos niveles de mortalidad y presencia de abortos en las madres gestantes, de manera general los animales enfermos presentan pérdida del apetito, anemia, erizamiento de pelos, diarreas, jadeo y parálisis de los miembros posteriores, los gazapos o cuyes lactantes son los más afectados ya que basta una sobrecarga o estrés para que se active la virulencia de la bacteria que se encuentra en estado latente (Layme *et al*. 2011).

a. Etiología

La salmonelosis es causada por serotipos del género Salmonella, un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriacea*, con prevalencia del serotipo *Salmonella* Typhimurium que supera el 95% en relación a otros serotipos (Chauca *et al.* 2006). La principal fuente de infección son los alimentos contaminados. Sin embargo, también existen otras vías de infección como la intrauterina y la leche de madres infectadas contribuyen también al desarrollo de esta patología (Junoda *et al*. 2013).

El género Salmonella está integrado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que conviven en el intestino de varias especies animales y del hombre. Género que está constituido por bacilos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, móviles (flagelos peritricos), fermentan la glucosa, maltosa y manitol, pero no la lactosa ni la sacarosa (Chauca, 2013).

Por otra parte, tal como afirman Álvarez *et al.* (2008), las Salmonellas poseen antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y pueden tener antígeno de virulencia (Vi), considerado este último como un polisacárido termolábil localizado en la cápsula bacteriana.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b. Vía de infección

Se debe de recalcar, tal como señalan Ortega *et al*. (2015), que al introducir, en la unidad de producción de cuyes, a animales nuevos de procedencia desconocida, la sobrecarga de animales en los ambientes de crianza (promiscuidad), la presencia de plagas como ratas, de aves silvestres portadoras que contaminan el alimento con sus

deyecciones; o bien el personal que está encargado del manejo de los animales son elementos potencialmente transmisores de salmonelas ya que pisan los forrajes y otros alimentos.

c. Tipos de Salmonelosis en cuyes

La salmonelosis como enfermedad de tipo infectocontagiosa, tiene dos modalidades de presentación: aguda y crónica. La de tipo agudo, que presenta características específicas como mortalidades sin previos síntomas; decaimiento, postración, erizamiento de pelos, anorexia y parálisis de los miembros posteriores, muchas veces diarreas con mucus, así como los abortos en hembras gestantes; todos estos síntomas catalogados como propios de esta patogenia en este grado sintomatológico (Guamán, 2014).

Para los casos crónicos, es típica la presencia de pérdida de peso corporal de manera paulatina, pelaje sin brillo, presencia de vientre abultado por cuadro ascítico (Ataucusi, 2015).

De conformidad con lo manifestado por Caycedo *et al*. (2011), en la necropsia de cuyes infectados por salmonelosis se observan, tanto el hígado como el bazo hipertrofiados con presencia de focos necróticos. En cuyes adultos el intestino delgado se encuentra congestionado, hemorrágico con ulceraciones y focos purulentos a manera de petequias.

Las afecciones de la mayoría de órganos constituyen evidencias del tipo septicémico de la enfermedad, los riñones y el sistema urinario se presentan congestionados y con infiltraciones de células inflamatorias; de igual manera, los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran hipertrofiados, congestionados, incluso en ocasiones hay presencia de abscesos sobresalientes de la superficie de los órganos infectados (FAO, 2010).

d. Profilaxis

Caycedo (2000), considera que, para el caso la salmonelosis, las acciones preventivas son muy difíciles de ser llevadas a cabo, sin embargo, se pueden poner en práctica medidas tales como:

- Manejo de alimentos con las precauciones del caso para evitar contagios sucesivos;
- Evitar al máximo los factores predisponentes de sobrecargas o estrés en los cobayos, por ejemplo, los cambios bruscos en la alimentación, en la temperatura del ambiente de crianza, así como visitas constantes e inesperadas que estresan a los animales;
- Practicar desinfecciones periódicas de todas las instalaciones;

USC UNIVERSIDAD SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Pasar por cuarentena a todos los cobayos procedentes de otros criaderos;
- Evitar a toda costa la presencia de portadores, tal es el caso de aves silvestres y otros roedores;
- Incinerar a todo cobayo muerto;
- Eliminar a todos los cuyes que sobreviven a un brote de salmonelosis, si se trata de animales de recría, es recomendable concluir su engorde y venderlos; y,
- Nunca reagrupar a los animales sobrevivientes de enfermedades infectocontagiosas, más bien encalar las camas antes de que sean removidas.

e. Tratamiento

De acuerdo con Matsuura *et al*. (2010), los medicamentos que mejores resultados han demostrado en casos clínicos de salmonelosis en cuyes son: sulfamidas + trimetoprim, estreptomicina en dosis de 2 g/litro de agua y enrofloxacina al 10%, 0,5 ml/litro de agua de bebida durante 3 días consecutivos, descartándose la amoxicilina, nitrofuranos, cloranfenicoles, macrólidos y lincosamidas ya que son tóxicos para estos animales y algunos están prohibidos por diversas normativas como los nitrofuranos y el cloranfenicol.

Si bien es cierto, que en un momento dado se han logrado resultados positivos para tratar casos de *Salmonella* Typhimurium, con antibacterianos antes referidos, su uso indiscriminado y hasta exagerado por parte de los cobayocultores ha generado resistencia bacteriana e inseguridad en los tratamientos practicados (Caycedo 2000). Además, se debe recalcar el aspecto negativo que supone la presencia de acciones residuales, producto del uso y abuso en las dosificaciones de fármacos antibacterianos, así como el uso de sustancias prohibidas en otras zonas del mundo a causa de los efectos colaterales graves para los animales y los consumidores de carne de cobayos.

De manera especial se recomienda tener en cuenta a los animales que aparentemente superan el cuadro clínico y se convierten en portadores asintomáticos de esta enfermedad, con susceptibilidad para los otros integrantes de lotes de crianza y engorde, razón por la que se debe de eliminar a todo animal infectado por estos microrganismos patógenos (Ataucusi, 2015).

f. *Salmonella* y salud pública

Un aspecto fundamental que tiene importancia al tratarse de las salmonelas como agentes patógenos es no perder de vista el poder desarrollado por estos microorganismos que son de transmisión alimentaria también para las personas, condición que le da máxima relevancia por tratarse de un problema de salud pública y que tiene alcance global. En 2017, este agente fue el responsable de 91.662 casos confirmados de salmonelosis humana en la Unión Europea (EFSA 2018). De este modo, todos los aspectos relacionados con resistencia a antimicrobianos de

USC DE COMPOSTELA

Salmonella, factores de virulencia, formación de biopelículas etc. tienen más importancia en relación a *Salmonella* que en relación a otros patógenos.

2.3.3. Yersiniosis en cuyes

La yersiniosis se encuentra distribuida por todo el mundo, produce epizootias espontáneas, de manera especial en cobayos y otros roedores (Caycedo *et al*. 2011). Esta enfermedad causada por *Yersinia pseudotuberculosis* es conocida también simplemente como pseudotuberculosis, se trata de una patología infectocontagiosa altamente trasmisible y que es causa de muchas bajas en los cuyes, razón por la que es considerada como causa primaria de pérdidas económicas entre los cobayocultores (Ataucusi, 2015).

La yersiniosis, conocida también como achaque o papera, de conformidad con Chauca *et al*. (2006), es una enfermedad que ataca a los cuyes de cualquier edad, afecta a todos los animales de las unidades productivas. Se debe tomar muy en cuenta que si no se controla a tiempo puede causar la baja de toda la población de los criaderos. Esta enfermedad puede perdurar por muchos años en las explotaciones y reaparecer en varias ocasiones.

Las yersinias son bacterias que viven dentro del cuerpo de otros animales tales como pájaros, conejos, ratas y ratones sin causarles daño alguno, convirtiéndose en portadores asintomáticos siendo elementos fundamentales en la cadena infectocontagiosa, ya que infectan con sus deyecciones los pastos, alimentos y utensilios que se utilizan para el manejo de la crianza de los cobayos (Caycedo, 2000).

Por tanto, la yersiniosis puede llegar a las cuyeras a través de alimentos que han tenido contacto con las heces, saliva y orina de ratas y ratones, razón por la cual estos hospedadores constituyen el peligro mayor si conviven en las jaulas, pozas y otras instalaciones en las que se cría a los cobayos; además, es necesario tener en cuenta que animales nuevos procedentes de otros criaderos, también constituyen potenciales fuentes de contagio (Patiño 2000).

a. Etiología

El agente causal de esta enfermedad es un cocobacilo Gran-negativo, aerobio y anaerobio facultativo, no esporula ni forma cápsula, incluye 15 especies; de éstas, tres son invasivas, capaces de resistir la respuesta inmune y producir patología en animales y humanos: *Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis y Yersinia enterocolitica;* sin embargo, la más conocida entre los cobayocultores es *Yersinia pseudotuberculosis* (Caycedo 2000 y Álvarez *et al.* 2008).

USC DE CAMPOALEGRE

b. Factores predisponentes para la presencia de yersiniosis en cuyes

Para Álvarez *et al*. (2008), entre los factores predisponentes o que favorecen la presencia de esta terrible enfermedad se encuentran:

- Defensas orgánicas de los cuyes disminuidas a consecuencia de cambios violentos de temperatura dentro del galpón de crianza;
- Alimentos escasos y de mala calidad;
- Sobrecargas orgánicas en los animales, tales como manejo desordenado, visitas inesperadas, presencia de animales tales como perros, gallinas y otros roedores en el criadero;
- Compra indiscriminada de cuyes para renovación de reproductores y sin tomar en cuenta antecedentes sanitarios de las explotaciones;
- Falta de higiene y medidas sanitarias en torno a la unidad productiva;
- Ausencia de medidas de bioseguridad en los galpones de explotación de cuyes;
- No practicar controles de presencia de parásitos internos y externos que constituyen agentes predisponentes para que los cobayos sean presa de cualesquier patógeno.

c. Síntomas

De las experiencias de Caycedo *et al.* (2011), se conoce que hay tres formas de yersiniosis en los cobayos:

- La aguda o septicémica, con muertes violentas debido a la ruptura de los nódulos linfáticos mesentéricos;
- La crónica que se presenta con decaimiento progresivo en los cobayos afectados, así como muerte entre las 3 a 4 semanas, razón por la cual se le da esta categoría; y,
- Finalmente, la infección congénita que se inicia inmediatamente después del nacimiento de los gazapos.

d. Patogenia

Caycedo *et al.* (2011), manifiestan que, si el tipo de yersiniosis es agudo, a la necropsia se presentan lesiones en forma de masas redondas llenas de material purulento, pueden ser pequeñas como la cabeza de un alfiler o grandes como granos de maíz e incluso mayores, las mismas se encuentran en el hígado, bazo, pulmones y ganglios linfáticos de los cobayos.

En la forma crónica también se encuentran nódulos con contenido purulento en hígado y bazo, raras veces en pulmones, pleura y peritoneo. En los linfonódulos de la

cabeza y cuello de los animales jóvenes, se presentan lesiones que están repletas de un contenido caseoso purulento (Álvarez *et al.* 2008).

e. Tratamiento y Control

Según experiencias de Caycedo *et al*. (2011), para el control de la yersiniosis se recomienda dehidroestreptomicina en dosis de 1.25 mg/kg de peso, dos veces al día, ya sea vía oral o parenteral (muscular). Se deben considerar también para el tratamiento: cloromicetina, tetraciclina y eritromicina.

Desde la experiencia de Chauca *et al.* (2006), en casos de yersiniosis es mejor prevenir que curar, razón por la cual las medidas higiénicas y sanitarias deben ser de aplicación estricta, evitar la presencia de animales tales como perros, otros roedores, gallinas en el galpón de crianza de cobayos.

De manera categórica, Caycedo *et al*. (2011), recomiendan que se realicen desparasitaciones con rigurosa frecuencia para controlar piojos, pulgas, moscas con el uso de Bayticol® (flumetrina), Neguvón® (triclorfón), Bolfo® (carbamato) y otros insecticidas de amplio espectro de acción y según dosis de los fabricantes.

Una vez que se cuente con el diagnóstico de la yersiniosis, Guamán (2014), respecto al tratamiento recomienda la instauración de un plan de profilaxis muy riguroso, incluso renovar los pies de cría. Como tratamiento curativo sugiere el uso de Bactrim® (sulfametoxazol y trimetoprima) en suspensión y de uso humano, en dosis de 3 ml vía oral, durante seis días.

2.4. La resistencia bacteriana a los antibióticos

En las décadas más recientes, la presencia de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas se ha convertido en uno de los problemas de salud humana más importantes, estimándose que causa 25.000 muertes al año en la Unión Europea y 700.000 muertes en todo el mundo. Además, la resistencia bacteriana causa un serio daño económico estimado en 1,5 trillones de dólares en todo el mundo sumando costes de salud a los costes causados por la baja productividad (Comisión Europea 2016, Comisión Europea 2017).

Para Murray *et al*. (2009), y Brunton *et al*. (2006), con el descubrimiento de la penicilina, y posteriormente con la generalización en su producción surge un problema debido a la gran capacidad de respuesta y adaptación de las poblaciones de bacterias, lográndose desarrollar resistencia a este antibiótico. A este respecto se desarrollaron investigaciones relacionadas con la resistencia bacteriana, descubriéndose, tal como señalan Finlay y McFadden (2006), que las bacterias sintetizan una enzima denominada □-lactamasa, considerada como uno de los principales elementos que confieren resistencia frente a la penicilina y otros antibióticos similares. Weigel *et al*. (2003) señalan que hay cepas de enterococos,

Pseudomonas y *Enterobacter* que son resistentes a la mayoría de los antibióticos existentes.

La resistencia a los antimicrobianos se puede transmitir horizontalmente entre diferentes especies e incluso géneros bacterianos, según, Juhas *et al.* (2009), es un proceso muy rápido, en el que se emplean varios mecanismos que, tal y como manifiestan Murray *et al.* (2009), se puede llevar a cabo mediante transducción bacteriana con transferencia del material genético a través de un bacteriófago o conjugación, esto es el paso del ADN a través de un puente intracitoplasmático formado entre una bacteria donante y otra receptora. Además, su uso en producción de animales destinados a la alimentación para las personas es considerada la responsable de la alta resistencia que suelen presentar los patógenos de transmisión alimentaria, los que a su vez se ven sometidos a la presión selectiva del empleo de los antimicrobianos, de modo que las bacterias resistentes pueden persistir y alcanzar al consumidor (Cahill *et al*. 2017, Hudson *et al.* 2017). En este sentido, datos de 2015 muestran que las tetraciclinas, las penicilinas y las sulfonamidas son los antimicrobianos más ampliamente usados en producción animal (European Medicines Agency, 2017).

De tal manera que, el uso de estos antimicrobianos se correlaciona con la resistencia encontrada a nivel de clínica en cepas de *Salmonella*. En el Informe de la EFSA sobre resistencias en bacterias causantes de zoonosis aisladas de personas en 2015, fueron encontradas altas tasas de resistencias en *Salmonella* frente a antimicrobianos como las sulfonamidas, las tetraciclinas, los β-lactámicos y las quinolonas. Estas resistencias fueron más altas en cepas de *Salmonella* Typhimurium en comparación con otros serotipos de *Salmonella* (EFSA 2017). Este último hecho es causa de preocupación dado que S. Typhimurium y S. Enteritidis son los principales serotipos responsables de la salmonelosis humana.

Debido al incremento de las resistencias antimicrobianas, durante las últimas décadas, se han evaluado distintas sustancias alternativas como potenciales reemplazantes de los antimicrobianos, como los péptidos antimicrobianos (Ghosh *et al.* 2019, Palmieri *et al.* 2016) que causan una inhibición de las bacterias patógenas inespecífica uniéndose a grupos aniónicos de la superficie celular y formando poros letales para las bacterias. También algunas de estas sustancias tienen dianas intracelulares capaces de matar las células bacterianas (Laverty *et al*. 2011, Aoki y Ueda, 2013).

De este modo los péptidos antimicrobianos han demostrado tener una prometedora actividad bactericida y antibiofilm contra bacterias transmitidas por los alimentos como *L. monocytogenes* o *S aureus* (Colagiorgi *et al*. 2020, Palmieri *et al*. 2018). En el caso de la apitoxina, uno de sus componentes como es la melitina, ha demostrado poder inhibir el crecimiento de *S. aureus, E. coli, L. monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* (Picoli *et al*., 2017, Wu y Narsimhan 2017). Aspectos relativos a la melitina serán comentados en otro apartado posterior.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

2.5. Mecanismos de Virulencia bacteriana

Juhas *et al*. (2009), hacen referencia al descubrimiento de la penicilina y posteriores investigaciones dirigidas a la resistencia bacteriana para este antibiótico, así como los mecanismos de patogenicidad que las bacterias desarrollan en el proceso de invasión a un organismo, demostrando agresividad y factores de virulencia.

Weigel *et al.* (2003), respecto a la virulencia, consideran que es la cuantificación de la patogenicidad de una bacteria dotada de mecanismos muy específicos que se hacen manifiestos al suspender las defensas de un organismo hospedador, aceptándose que un agente bacteriano patógeno cuenta con la capacidad de hacer daño a un hospedador susceptible, a cualquier nivel y en relación directa con el grado de eficiencia de dicho mecanismo, en etapas tempranas o tardías según el caso.

Es necesario recalcar junto con Sánchez (2011), que las bacterias a lo largo de su adaptabilidad evolutiva han adquirido características que les permiten invadir el ambiente del hospedador, desarrollar receptores superficiales especializados para su adhesión. La capacidad de virulencia se encuentra regulada genéticamente. En ocasiones como para el caso de *Salmonella*, dichos genes se encuentran localizados en plásmidos de virulencia y diferentes grupos de genes que se denominan "islas de patogenicidad ". En el caso de *Salmonella* son 5 las islas de patogenicidad (Lamas *et al*. 2018).

Meylan *et al*. (2006), consideran que la virulencia es la capacidad de permanecer en estos sitios como individuos que desarrollan procesos colonizadores, tanto más como señalan Diacovich y Gorvel (2010), evaden al sistema inmune para finalmente causar daños en los tejidos para acceder a nutrientes que necesitan para su forma de vida y reproducción.

Por otro lado, Tortora *et al*. (2007) y Wu, *et al.* (2008), confirman que un factor de virulencia constituye un ingrediente microbiano que es capaz de favorecer su crecimiento o subsistencia durante el desarrollo de un proceso de infección ocasionado por bacterias patógenas.

Como manifiestan Cárdenas-Perea *et al*. (2014), para comprender de manera clara y concreta los mecanismos de patogenicidad de las bacterias, es mejor y más útil tratarlos en dos fases: temprana y tardía.

2.5.1. Fase temprana de patogenicidad bacteriana

USC
DE COMPOSTELA

Para el proceso de esta fase, según Mayland *et al.* (2006), tienen que cumplir las bacterias patógenas con el ingreso al organismo, objeto del ataque, a través de una puerta de entrada o vías de ingreso que son diversas. Tal es el caso de las mucosas, la piel o las membranas orgánicas, llamada vía parenteral.

Por otra parte, y de conformidad con lo manifestado por Cárdenas-Perea *et al*. (2014), quienes destacan que, pese al ingreso de bacterias al organismo, no siempre causan manifestaciones clínicas, ya que la aparición de la patología como tal, depende de muchos factores. Entre los más destacados se encuentra la vía de ingreso, ya que los microorganismos tienen un acceso preferencial, transformándose en un requisito indispensable para desarrollar la enfermedad.

Wu, *et al*. (2008), aseguran que otra estrategia de virulencia bacteriana es la adherencia, la misma que se desarrolla inmediatamente de la entrada o invasión del microbio, puesto que cada patógena cuenta con medios apropiados para fijarse a los tejidos ya que es un paso necesario para el proceso de patogenicidad bacteriano, tanto es así que, si no se adhiere la bacteria, será eliminada por las secreciones mucosas y otros líquidos que cubren la superficie de los tejidos. Dentro de este apartado también cabría señalar aspectos como son la formación de biopelículas o *biofilms* que les permite a las bactarias adherirse a las superficies tanto orgánicas como inorgánicas y constituirse en fortalezas para la supervivencia bacteriana, tópico ya tratado anteriormente.

De igual manera, Meylan *et al*. (2006), en coincidencia con Wu, *et al.* (2008) consideran que para que se de la adherencia entre el microorganismo y la superficie de un tejido del hospedador, el patógeno necesita estructuras externas denominadas adhesinas o ligandos, que se unen específicamente a receptores complementarios de ciertos tejidos del hospedador, incluso se conoce que cada receptor tiene funciones específicas que les permite transformar su grado de virulencia.

Dentro de esta fase temprana, de acuerdo con González-Pedrajo *et al.* (2003), también se desarrollan estrategias como movilidad y quimiotaxis. Si bien es cierto que la primera consiste en la capacidad que tienen algunas bacterias para desplazarse aleatoriamente, cuentan para ello con flagelos. La movilidad es un mecanismo antagonista a la formación de biopelículas, sin embargo, ambos tipos de mecanismos se pueden relacionar con la virulencia bacteriana.

Tanto González-Pedrajo et al. (2003) como Meylan *et al*. (2006), consideran a la quimiotaxis como una segunda estrategia de patogenicidad que guía a las bacterias hacia un gradiente químico mediante sistemas de transducción de señales, cualidad que les permite movilizarse hacia las membranas, logrando de esta manera adherirse a la superficie tisular.

Tal como afirman Meylan *et al*. (2006), es necesario recalcar que las superficies mucosas del hospedador están protegidas contra la colonización bacteriana, para ello cuentan con dos atributos defensivos; uno sustentado en el peristaltismo rápido del tracto gastrointestinal y otro, debido al baño constante con líquidos que resguarda dicho tejido.

2.5.2. Fase tardía de patogenicidad bacteriana

Para el desarrollo de esta fase las bacterias patógenas tienen que sortear algunas condiciones imprescindibles y que guardan secuencia unas con otras. Una de estas condiciones es la supervivencia intracelular. A este respecto, a modo de ejemplo, Lambris *et al*. (2008), consideran que, para cumplir con la supervivencia intracelular, las bacterias necesitan de hierro como factor indispensable para su crecimiento.

De acuerdo con Lambris *et al*. (2008), el hierro en el organismo atacado no siempre está disponible, más aún en forma libre, ante cuya situación las bacterias secretan proteínas llamadas sideróforos que son de tres tipos: catecoles, hidroxamatos y una miscelánea, todos de bajo peso molecular y capaces de captar hierro con una sorprendente afinidad, de manera que, si las bacterias necesitan este elemento, liberan sideróforos al medio para captúralo y unirlo a proteínas transportadoras.

Al respecto Zipfel *et al*. (2007), afirman que algunas bacterias cuentan con receptores que se unen directamente con proteínas transportadoras de hierro y hemoglobina, incluso si escasea hierro en el organismo hay bacterias que producen toxinas con las que matan a las células adyacentes que liberan hierro para su usufructo internalizándolo e incorporándolo a las estructuras bacterianas.

Tal como señalan Finlay y McFadden (2006), las bacterias para el desarrollo de la fase tardía deben evadir la respuesta inmune y comprometer con modificaciones antigénicas al organismo atacado, pese a que algunas pueden causar daños directamente en las superficies de los tejidos.

En otros casos, como estrategia de patogenicidad se anticipan causando alteraciones de antígenos de superficie involucrando genes alternativos, de forma tal que cuando el organismo hospedador reconoce e implementa una respuesta inmunitaria contra la bacteria, como dicha bacteria ya mutó sus antígenos, estos no pueden ser reconocidos, por tanto, no se ve afectada por los anticuerpos (Murray *et al*. 2009).

Para el cumplimiento de la fase tardía de la virulencia, las bacterias desarrollan el sometimiento y/o la confrontación, estrategica que es explicada por Finlay y McFadden (2006), como la capacidad de causar daños directos al invadir y fijarse en las células del hospedador, forma en la cual obtienen nutrientes y generan reservas de sustancias para su vida.

USC
DE COMPOSTELA

Al este respecto, Munford (2008) afirma que las bacterias para aumentar su virulencia producen enzimas como la colagenasa, la hialuronidasa, así como otras enzimas que degradan coágulos de sangre, forma en la cual se dispersan entre los tejidos del hospedador. Munford (2008) también señala que algunas bacterias producen exotoxinas proteolíticas formadoras de poros, así como endotoxinas y otros metabolitos que aumenta la virulencia de las células bacterianas.

En resumen, en la fase tardía de patogenicidad, las bacterias ponen en juego mecanismos de supervivencia, captación de nutrientes mediante diversas estrategias y produciendo enzimas y toxinas que les ayudan a alcanzar estos objetivos firmemente asentadas en el huesped, empleando también estrategias para eludir el sistema inmune.

2.6. El veneno de *Apis mellifera,* propiedades generales

Las glándulas productoras de veneno en los insectos himenópteros como las abejas *Apis melífera*, constituyen un interesante ejemplo de un proceso evolutivo a partir de lo que fueran glándulas reproductoras femeninas accesorias de tipo ancestral, de manera exclusiva limitadas a insectos femeninos como las abejas.

Según Goodman, (2003) y De Graaf *et al.* (2010), si bien entre los miembros de una colmena de abejas, las reinas tienen aguijón y veneno que lo utilizan al momento de su liberación y en peleas con otras reinas, en cambio son las abejas obreras las que lo utilizan cuando tiene que defender la colmena, y de su propia vida si hay un peligro por presencia de depredadores; pues, son dos glándulas las responsables de sintetizar el veneno, el mismo que es inyectado en la víctima desde el momento de la picadura y hasta de 30 a 60 segundos después del desprendimiento del aguijón.

Es importante destacar lo manifestado, por Schumacher *et al*. (1989), quienes afirman que una abeja obrera madura puede inyectar entre 0,15 y 0,30 mg de veneno durante el proceso de una picadura, así como por Eze *et al*. (2016) que, en relación a la dosis letal media de este veneno para humanos, estiman que es de 2,8 mg/kg de peso.

Para Roodt *et al*. (2005); Lee, (2012) Y Ferreira *et al*. (2018), las reacciones a las picaduras de abejas por parte de los humanos, es posible que se presenten en tres niveles:

a. Local, caracterizado por la presencia de signos circunscritos al área de la picadura, destacándose una hinchazón inmediata, la que puede aumentar en pocas horas o días siguientes, es acompañada de enrojecimiento alrededor del área picada y sensación de ardor, signos que desaparecen en dos o tres días.

b. Sistémico, generalmente ocurre a los pocos minutos de la picadura y se puede manifestar con sarpullido en todo el cuerpo, respiración jadeante, náuseas, vómitos, dolor abdominal y desmayo.

c. Anafiláctico; es considerado el nivel más grave, ocurre a solo unos pocos segundos después de la picadura, los síntomas son: dificultad para respirar, confusión, vómitos y disminución de la presión sanguínea, lo cual puede llevar a la pérdida de consciencia e incluso la muerte, debido al desencadenamiento de problemas circulatorios y respiratorios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El veneno de abejas melíferas, llamado también apitoxina, es letal para otros insectos, en cambio para animales superiores, una sola picadura causa reacciones locales como dolor, hinchazón, rubor y escozor; si bien es cierto que se habla de casos de muertes por picaduras repetidas de abejas a un mismo animal, la muerte es debida a hipersensibilidad antes que a un envenenamiento en si mismo (Scharlaken *et al*. 2007). Tal como afirman Van Vaerenbergh *et al*. (2014), las picaduras de abejas conllevan a la producción de IgG1, IgG2, de igual manera y en menor nivel, la producción de anticuerpos IgG4 como respuesta humoral, no así las reacciones alérgicas ante este veneno que se encuentran reguladas por IgE, a causa de la fosfolipasa A2, hialuronidasa, fosfatasa ácida y melitina (Orsolic, 2012).

Winston (1987), en el interés de explicar la compleja naturaleza de la apitoxina, manifiesta que puede deberse a la amplia gama de insectos y vertebrados que actúan como plagas o depredadores de las abejas. Para Dani *et al*. (2005), la apitoxina de las abejas es considerado un recurso biológico de defensa para estos insectos, sin embargo, bajo la acción de varias de sus enzimas, se revierten los efectos para el logro de resultados benéficos de este producto apícola.

Matysiak *et al*. (2001); Son, *et al*. (2007); y Lee (2012), dicen que son muchas pues las propiedades biológicas y farmacológicas encontradas en este veneno que benefician a las personas y los seres superiores, es el caso de la capacidad de estimular los linfocitos del sistema inmune en mamíferos. De igual manera, tal como señalan Jang (2003) y Park e*t al*. (2010), se puede emplear en el tratamiento de reacciones alérgicas, quemaduras de la piel, como cicatrizante de heridas, como cosmético para contrarrestar el envejecimiento, para infecciones bacterianas. En coincidencia con Eze *et al*. (2016) y Shimpi *et al*. (2016), afirman que este producto apícola tiene propiedades antitumorales y efectos citotóxicos contra células cancerosas; además, según Han *et al.* (2007a), lo consideran una excelente foto protector.

El veneno de abejas (*Apis mellifera*), de conformidad con Villanueva-García *et al*. (2005), posee propiedades tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Estas acciones antagónicas las explican como sigue:

La primera por la presencia en el veneno de abejas de muchas aminas como histamina, dopamina y serotonina, péptidos como la melitina, los degranuladores de los mastocitos y la apamina, así como fosfolipasa A2 y hialuronidasa, estos son componentes que contribuyen a reacciones locales con propiedades inflamatorias y vaso activas (Park e*t al*. 2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cambio, la acción antiinflamatoria se encuentra sustentada por la presencia del péptido 401, la apamina, eficaz supresor del dolor. De igual manera, a causa de la melitina que actúa sobre el sistema inmunológico, tal es el caso de corregir el ataque de anticuerpos a las articulaciones (Peña, *et al.* 2008). La presencia de fosfolipasa A2 que cataliza la formación de isolecitinas, enzimas transferasas que contribuyen al

traspaso de grupos acilo para acelerar otras reacciones, contribuyen a la lisis de membranas. El veneno de abejas estimula al sistema hipotálamo-hipófisis-suprarrenal a través del cual mejora la producción de corticoides adrenales y sus derivados, interviene en procesos analgésicos, mejora la circulación sanguínea (Delgado *et al*. 2006 y Lee *et al*. 2005).

Más aún, si se toma en cuenta los conocimientos de Kwon *et al*. (2002), citado en Villanueva-García (2005), la fracción hidrosoluble del veneno de abejas, posee acciones antiinflamatorias y antinociceptivas; la primera que se caracteriza por la inhibición selectiva de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), con ello logra bloquear la síntesis de prostaciclina, una prostaglandina involucrada en la inflamación o promotora de fenómenos inflamatorios. Mientras que la segunda, hace referencia a la capacidad de inhibir, revertir o anular la sensibilidad a estímulos inherentes a la intensidad del dolor.

Lazarev *et al*. (2004) han confirmado la acción antimicrobiana de la melitina, principal componente del veneno de abejas; de igual manera, Park *et al*. (2014) han identificado algunos péptidos antimicrobianos, procedentes de insectos, que ayudarían a combatir infecciones, procesos inflamatorios y hasta casos de tumores malignos.

Peters *et al*. (2010), le atribuyen otra cualidad a estos péptidos antimicrobianos, la escasa toxicidad para las células de los animales, como Johnston *et al*. (2016) destacan la ausencia de resistencia desarrollada por los microrganismos debido a la diversidad de mecanismos de acción que poseen a su favor estos polipéptidos. La apitoxina ha mostrado actividad antimicrobiana frente a *Borrelia burgdorferi*, así como frente a bacterias comunes patógenas de la microbiota de la *boca* (Leandro *et al.* 2015, Socarras *et al.* 2017).

2.6.1. Composición química del veneno de abeja

El veneno de abejas es un líquido trasparente con un pH ácido (4,5 a 5,5), al hacer contacto con el aire se seca rápidamente, dando como resultado cristales de color blanco grisáceo (Mahmoud, 2012). Al respecto, Shimpi et al., (2016), Son *et al*. (2007) y Eze *et al*. (2016), manifiestan que luego de varios estudios realizados para conocer la composición química de la apitoxina, se han detectado al menos 18 compuestos farmacológicamente activos, a los que se hace referencia con con datos de varios investigadores.

Shimpi *et al*. (2016), encontraron que el veneno de abejas contiene componentes enzimáticos tales como: fosfolipasa A2, fosfolipasa B, hialuronidasa, fosfatasa y ◘-glucosadas; de igual manera, entre proteínas y péptidos, identificaron: melitina, apamina, sapina, pamina, minimina, adolapina, procamina A y B, inhibidores tanto de la terpina como de la proteasa; las aminas: histamina, dopamina y norepinefrina; los carbohidratos: glucosa y fructosa; los aminoácidos: ácido amino butírico y alfa aminoácidos; los minerales: fósforo, calcio y magnesio; además, ingredientes volátiles y fosfolípidos.

Los componentes de la apitoxina son principalmente una mezcla de proteínas y péptidos, la melitina es el más importante, pues alcanza hasta el 52 % de su peso seco, del que también forman parte otros compuestos como proteínas enzimáticas y muchas otras diastasas en el 10 al 12%, así como el 2 a 3% dado por lisolecitina, y apamina (Sobral *et al*. 2016).

Según Han *et al*. (2007b); Han *et al*. (2007a) y Bogando (2015), hay una diferencia en la composición química entre el veneno de abeja fresco y seco, principalmente en lo que respecta a las sustancias nitrogenadas, muy ricas en este producto apícola, así como los ácidos volátiles que, en conjunto desaparecen con el proceso de desecación, mientras que la actividad biológica se mantiene constante.

Peña *et al*. (2006), asegura que el veneno de abejas, tanto por su composición como al tratarse de un arma defensiva de la colmena, es capaz de causar la muerte. Para ratones, la dosis letal DL_{100} es de 6 mg/kg por vía intravenosa, mientras que la DL_{50} es de 2.5 a 2.8 mg/kg por la misma vía; además, causa dolor por acción de la melitina, condición que constituye un aviso para los depredadores.

A continuación, con la finalidad de presentar una información concreta y ordenada, en la tabla 1 se indican los componentes del veneno de abejas, así como la dosis letal 50 (DL_{50}) en ratones.

Tabla 1. *Componentes del veneno de Apis melífera y Dosis Letal en mg/kg*

Componentes del veneno de *Apis mellifera*		Dosis Letal en mg/kg Vía Intravenosa para ratones
Veneno o apitoxina total		DL_{100} 6 mg/kg DL_{50} 2,3 -2.8mg/kg
Péptidos	Melitina	DL_{50} 3,5 mg/kg
	Apamina	DL_{50} 4 mg/kg
	M.C.D, péptido (péptido degranulador de mastocitos)	DL_{50} 40mg/kg
Aminas Biógenas	Histamina, adrenalina Noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina	
Enzimas	Fosfolipasa A2 Fosfolipasa B Hialuronidasa	

Fuente: Peña *et al*. (2006).Toxinas Naturales: abejas y su veneno. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 25 (1): 6-10.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a. La melitina

Según Raghuraman y Chattopadhyay (2007) y Bogdanov (2015), la melitina es un péptido citolítico que se encuentra conformada por una secuencia de 26 aminoácidos. De acuerdo con Peña *et al.* (2006), para este péptido, la dosis letal 50 es de 3,5 mg/kg vía endovenosa en ratones.

Lima y Brocheto-Braga (2003), afirman que la melitina es un componente fundamental de la apitoxina, que tiene características anfifílicas o anfipáticas, esto es dotada de un extremo hidrófobo (liposoluble) y otro hidrófilo (hidrosoluble); por tanto, estos aminoácidos de la melitina le permiten interactuar con las membranas lipídicas y aumentar la permeabilidad de los eritrocitos y otras membranas celulares.

Según afirman Johnston *et al.* (2016), gracias a la acción de los polipéptidos antimicrobianos de la apitoxina, tal es el caso de la melitina, se sensibilizan las membranas celulares de los patógenos, facilitando que moléculas como los antibióticos clásicos penetren con facilidad y ejerzan su acción bactericida. De esta manera se pueden combinar con estas otras sustancias para encontrar sinergismo terapéutico.

Raghuraman y Chattopadhyay (2007), confirman que la melitina induce la formación de poros en las membranas celulares, incrementando de esta manera la permeabilidad de las mismas, incluso llega a romperlas. Asimismo, le atribuyen a este péptido el papel de inhibidor de Ca^{2+}ATPasa; $H^{+}K^{+}$ATPasa; $Na^{+}K^{+}$ATPasa y de la proteína quinasa.

La melitina como señalan Huang *et al.* (2013), es un producto con gran potencial contra el cáncer ya que es capaz de superar la resistencia a fármacos de ciertos tumores debido a sus propiedades líticas demostradas para células de melanomas. Este péptido apícola también provoca la apoptosis celular, de células malignas a través de la activación de la caspasa y metaloproteinasas de la matriz (Orsolic, 2012).

Al recurrir a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se pueden apreciar los componentes principales de las proteínas de la apitoxina: la melitina, fosfolipasa A2 y apamina, mediante separación, identificación y determinación cuantitativa de los principales compuestos de la apitoxina.

De acuerdo con las afirmaciones de Raghuraman y Chattopadhyay (2007), también tiene una acción hemolítica demostrada con los eritrocitos, para cuyo efecto el péptido se fusiona con los lípidos de las membranas de estas células en lugar de hacerlo mediante receptores específicos. Además, recalcan la capacidad de la melitina, a través de procesos osmóticos coloidales y bajo temperatura ambiente, de incitar a la lisis de membranas celulares. Cualidad sustentada en la constatación de la permeabilidad acelerada de iones debido a la formación de poros membranosos durante la exposiciones celulares a la acción de la melitina.

USC
DE COMPOSTELA

Respecto a esta teoría de lisis membranosa de la melitina, Park *et al.* (2014), confirman que este proceso se desarrolla en dos fases claramente identificadas; es decir, a través de una fase rápida y otra lenta, las dos claramente dependientes de la concentración de este péptido y de las fluctuaciones de temperatura entre 4 y 37ºC respectivamente. La primera fase tiene relación con la concentración de melitina en los exteriores de las membranas, produciéndose alteraciones estructurales y

fisiológicas en las mismas, en cambio en la fase lenta, el proceso se desarrolla en razón de la pausada descomposición y reorganización de los péptidos que al final contribuyen con alteraciones en las membranas celulares con las que entran en contacto.

La teoría planteada por Alía (2013), también hace referencia a la formación de canales en las membranas celulares y que son inducidos por la acción de la melitina, dando como resultado el aumenta de la permeabilidad a los iones en las membranas lipídicas, incluso se ha demostrado la existencia de selectividad para cationes gracias a la acumulación de polaridad (positiva) en el extremo carboxi-terminal de la molécula de melitina, resaltándose de esta manera que la función anfipática desempeña un papel importante, sin embargo no exclusivo, en el la entrada de cargas eléctricas en bicapas de membranas celulares.

b. Estructura de la Melitina

Raghuraman y Amitabha-Chattopadhyay (2007), confirman que la melitina se encuentra estructurada por una cadena de aminoácidos (Gli-Iso-Gli-Ala-Val-Leu-Lis-Val-Leu-Tre-Tre-Gli-Leu-Pro-Ala-Leu-Iso-Ser-Tri-Iso-Lis-Arg-Lis-Arg-Glu-Glu), con el extremo amino-terminal, hidrófobo (aminoácidos 1 a 21) con afinidad por los lípidos; mientras que el extremo carboxi-terminal, integrado por los (aminoácidos 21 al 26), es hidrófilo y polar, se hidrata con facilidad, razón por la que Huang *et al.* (2013), manifiesta que gracias a la anfipatía la melitina es soluble en agua y a su vez se asocia libremente con lípidos en las membranas celulares.

En la Figura 1 se pueden apreciar las estructura de los 26 aminoácidos que conforman la molécula de la melitina; dicha cadena de aminoácidos es: Gli-Iso-Gli-Ala-Val-Leu-Lis-Val-Leu-Tre-Tre-Gli-Leu-Pro-Ala-Leu-Iso-Ser-Tri-Iso-Lis-Arg-Lis-Arg-Glu-Glu.

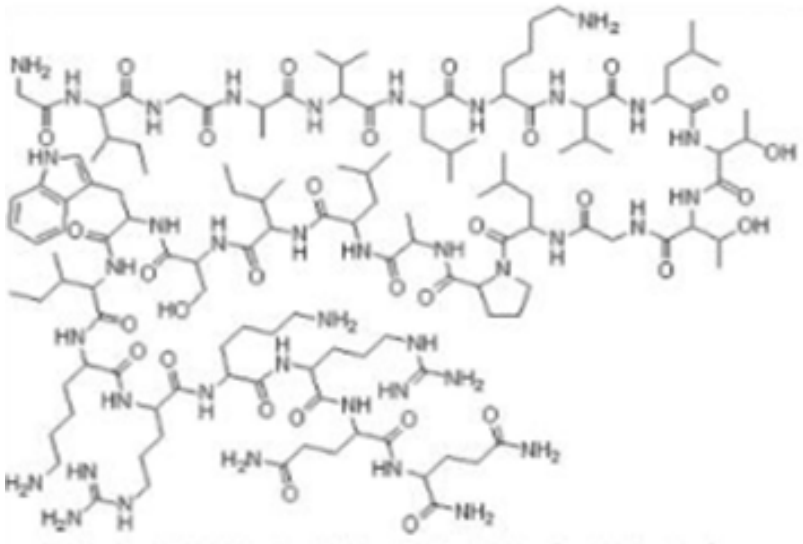


Figura 1. *Estructura Química y secuencia de aminoácidos de la melitina*
Nota Fuente: Adaptado de Ahumada (2016). El veneno de abejas. Disponible en: https://issuu.com/qorganicaestructural/docs/revista_química

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Según Bogdanov (2015), si se toma en cuenta la estructura tridimensional de la melitina, se tiene la formación de un tetrámero con cuatro monómeros helicoidales de melitina, los cuales permiten el anclaje de cadenas hidrofóbicas laterales que se distribuyen asimétricamente. Estructuras que a su vez son polares (+) y apolares (-), razón por la cual, Raghuraman y Chattopadhyay (2007) afirman que la secuencia de aminoácidos en cadena de la melitina tiene un área terminal amino que es hidrófoba, un área central con áreas hidrófobas e hidrófilas, así como un área totalmente hidrófila carboxi-terminal.

De acuerdo con las afirmaciones de Raghuraman y Chattopadhyay (2007), una de las características de la melitina es su acción hemolítica, a través de la que cumple el papel de fusionarse con los lípidos de la membrana de los eritrocitos, liberando así hemoglobina al medio extracelular.

De igual manera, estos investigadores, han demostrado que la melitina incita la hemólisis de membranas celulares mediante un proceso osmótico coloidal a temperatura ambiente, así como en condiciones de estrés osmótico. Este proceso permite evaluar las propiedades de las membranas y el efecto en el volumen intracelular, así como la permeabilidad rápida a los iones debido a la formación de poros y la liberación de hemoglobina durante la exposición a la melitina (Bogdanov, 2015).

Park *et al.* (2014), confirman que el proceso de lisis de membranas se desarrolla en proporción directa a la concentracion presentes de melitina y a la temperatura, que puede fluctuar entre 4 y 27°C. Por tanto, dicho proceso está supeditado a los cambios en la estructura y fisiología de la membrana, debido a una acelerada acumulación de melitina en el exterior de la membrana de los eritrocitos. De igual manera, también como consecuencia de una pausada descomposición y reorganización de los péptidos y lípidos de membrana.

c. Formación de canales dependientes de voltaje por la melitina.

La melitina, en las membranas lipídicas induce a la formación de canales y selectividad de poros formados mayormente más para aniones que para cationes, ya que hay acumulación de cargas positivas en la región C-terminal de la melitina. De manera sorprendente, en la región R-NH_2 de este péptido, estas mismas cargas eléctricas generan una actividad importante pero no exclusiva en la entrada de voltaje en los canales de bicapas lipídicas (Raghuraman y Chattopadhyay, 2007).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

d. Formación de micelas y fusión de las bicapas por la melitina.

En las membranas que tiene en su composición fosfatidilcolinas saturadas, con dependencia de la temperatura de la fase lipídica, la melitina causa la ruptura de las membranas en micelas. La presencia de concentraciones intermedias de melitina

comprometen a los liposomas en micelas o pequeñas partículas. Por tanto, la melitina propicia una organización estructural de los conjuntos de lípidos incluyendo vesicularización de multicapas, la fusión de pequeñas vesículas de lípidos y la fragmentación en discos y pequeñas partículas o micelas (Lazarev *et al.* 2004).

e. Actividad Biológica de la melitina

Una de las propiedades de la melitina que ponen de relieve Raghuraman, y Chattopadhyay, (2007) es la capacidad que tiene para alterar la fisiología de las proteínas de membrana, de tal manera que provoca la agregación e inmovilización de las mismas y en el plano de bicapas lipídicas, forman múltiples agregados y poros que son dependientes de la temperatura, pH, fuerza iónica y composición de los lípidos.

De manera especial se destacan las versiones dadas por Park *et al*. (2014), quienes sostienen que la melitina es uno de los péptidos más utilizados para demostrar interacciones dadas entre lípidos y proteínas a nivel molecular, resaltándose para el efecto, tanto su tamaño molecular como la fácil disponibilidad en la naturaleza.

Se han identificado nueve polimorfismos en la región codificante de la melitina en las poblaciones de abejas; uno de ellos da lugar a la sustitución de serina (Ser) por asparagina (Asp), afectando potencialmente a las actividades biológicas del péptido. Así pues, con serina, la melitina mostró un mayor efecto citotóxico que con asparagina contra *E. coli* (Park *et al*. 2014). Además, ambas variedades presentaban diferentes efectos inhibidores sobre la producción de factores inflamatorios tales como la interleucina IL^{-6} y la citocina TNF-□ en células BV-2 de la microglia (Lazarev et al. 2004; Alía *et al.* 2013).

La melitina y la fosfolipasa A2 (PLA2) tienen la capacidad de inducir la necrosis en células del músculo (Fletcher *et al*.1990), ya que les estimula cambios tempranos relacionados con la ruptura de la membrana plasmática y la hipercontracción de las miofibrillas.

Estos resultados indican que tanto la melitina como la PLA2 del veneno de abeja son capaces de inducir actividades catalíticas y miotóxicas. Además, pueden actuar sinérgicamente para inducir un efecto miotóxico más fuerte (Park *et al.* 2014).

En un estudio de Alía *et al*. (2013), se demuestra la capacidad de la melitina de hiperactivar la fosfolipasa A2 (PLA2), en células transformadas con oncogenes, genes que participan mediante mecanismos muy diversos, en el establecimiento y la progresión de los procesos malignos, por la mediación de una mayor afluencia de iones de calcio (Fletcher *et al*. 1990). Tanto la melitina como la hiperactivación mediada por PLA2 requieren de Ca^{2+}, de manera especial la primera que es fuertemente dependiente de este catión. Otros estudios revelan una estrecha correlación entre el grado de hiperactivación de PLA2 y la movilización de Ca^{2+}, lo que sugiere una relación causal (Lazarev *et al*. 2004).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los productos naturales, en especial los que desarrollan actividad antimicrobiana, tal es el caso de los péptidos antimicrobianos (AMs) están a la expectativa de los investigadores y han ganado un lugar relevante en el campo biomédico actual. Al respecto, Lazarev *et al*. (2004), consideran que los péptidos de ciertos insectos como las abejas *Apis mellifera*, son capaces de inducir actividad in vitro, en concentraciones micromolares, de donde surge la posibilidad de sintetizar péptidos análogos con propiedades antimicrobianas.

De conformidad con Peters *et al.* (2010), dentro de las opciones de usos biomédicos de los péptidos antimicrobianos (PA), además de la acción antimicrobiana, se debe resaltar su baja toxicidad para las células de los animales. De igual manera como la proyección que destacan Johnston *et al*. (2016) referente al uso combinado con otras sustancias antimicrobianas con el fin de hallar sinergismo a la acción de los PA, ya que éstos alterarían las membranas celulares de los patógenos, dejando la puerta abierta para la acción de otras moléculas como los antibióticos sintéticos, contribuyendo de esta manera a lograr un buen efecto bactericida.

f. La apamina

La apamina es un péptido de 18 aminoácidos, se considera una neurotoxina que es capaz de inhibir de manera selectiva a los canales de K+ activados con Ca^{2+} dentro del sistema nervioso central, así como también en los tejidos periféricos (De Graaf *et al*. 2010).

g. Enzimas de la apitoxina

De conformidad con Peters *et al.* (2010), y Park *et al.* (2014), las PLA2 constituyen una súper familia creciente de enzimas polipeptídicas que están reguladas por el ion Ca^{2+} y la fosforilación. En especial, han llamado la atención por su considerable interés como objetivo farmacológico, por su intervención en el tráfico y remodelación de fosfolípidos de membranas, fundamentalmente en la génesis de moléculas de señalización lipídica, y en la intervención de estados inflamatorios.

Para Park *et al.* (2014), estas enzimas PLA2 están activas dentro y alrededor de las células fisiológicamente interactuantes, en busca de liberar con frecuencia al ácido araquidónico (AA), en forma de ácido graso libre, el que a su vez constituye el principal precursor de eicosanoides, tales como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TBxs) y lipoxinas (LPxs).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Matysiak *et al.* (2011), señala que las PLA2 desarrollan su actividad catalítica en base a la secuencia de aminoácidos que las estructuran, a la longitud de la cadena, así como en base a los modelos de disulfuro de carbonos; además, tienen un sitio activo de histidina y una necesidad absoluta de Ca^{2+} durante el proceso de catálisis, tanto es

así que a estas enzimas se las considera una gran familia de proteínas presentes en los tejidos de mamíferos, de artrópodos y en venenos de serpientes, escorpiones y abejas.

Al respecto Nevalainen *et al.* (2008), consideran que las PLA2, debido a la propiedad de poseer un bajo peso molecular, tienen gran potencial inmunogénico y una alta actividad catalítica. También han demostrado amplias acciones antibacterianas y anticoagulantes y un activo papel en la generación de mediadores químicos, proliferación celular, contracción muscular y una interesante participación en procesos anti-inflamatorios.

Para Van Vaerenbergh *et al.* (2014), la hialuronidasa es la enzima encargada de hidrolizar los sulfatos de hialuronano y condroitina, considerados como los glicosaminoglicanos de mayor abundancia en la matriz extracelular de los vertebrados, de tal manera que son los encargados de la difusión de los elementos integrantes del veneno de abejas por el organismo animal que ha recibido la inoculación con este producto.

h. Formación de dominios

En la composición del veneno de abejas se han encontrado dominios polipeptídicos que, de acuerdo con Téllez y Castaño (2010), son unidades estructurales compactas, estables, dentro de una zona molecular proteica. Están formadas por el plegamiento independiente de segmentos de una cadena peptídica, con estructura funcional relativamente autónoma y diferente a las otras regiones de la proteína. Por tanto, generan efectos interesantes como: enlazar a otras proteínas y a pequeños ligandos, atravesar a la membrana plasmática, portar agentes catalíticos (enzimas), enlazar a factores de DNA como transcripciones (Urquizo, 2008).

De igual manera, como lo expresan Van Vaerenbergh *et al.* (2014), una proteína puede tener varias cadenas polipeptídicas y a su vez, cada una de estas puede portar uno o varios dominios compartidos dentro de las cadenas polipeptídicas. Los dominios serán funcionales o estructurales, si desarrollan acciones bioquímicas determinadas o si se toman en cuenta componentes de organización estable respectivamente.

Scharlaken (2007), considera que el reconocimiento biológico de una molécula está dado por los sitios de mayor densidad o plegamiento; es decir, por el sitio preferente de unión entre una molécula con otra, tal es el caso de las proteínas que en el lugar del plegamiento constituye la base para reconocer de manera específica y selectiva los sitios recombinantes. Esta propiedad es más manifiesta en enzimas, hormonas, lecitina, anticuerpos y probablemente en todas las proteínas, recalcándose mejor en enzimas y anticuerpos, de manera especial al identificar su funcionalidad.

En unidad de criterios, tanto de Scharlaken *et al.* (2007), como De Graaf *et al*. (2010), coinciden en afirmar que hay dominios variantes (V) y otros constantes (C), es así que las moléculas polipeptídicas inmunológicas poseen dos sitos combinantes para

dos tipos de contactos o dominios: a) para anticuerpos y sistemas de complemento y b) anticuerpos y células de defensa no específicas para antígeno, constituyéndose estos dominios en los puntos de mayor densidad entre los elementos estructurales y funcionales para el desarrollo de una respuesta inmunológica en un organismo biológico.

De manera que, como afirman Roumenina *et al.* (2008), en estudios recientes se han reportado interacciones directas del dominio C1q globular con los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium), de forma directamente dependiente del catión $Ca^{2}+$, relación que también se encuentra presente en el veneno de abejas con este tipo de dominios, tanto enzimáticos como en anticuerpos y células no específicas para antígenos definidos.

2.6.2. Usos de la apitoxina

Se conoce por Pick (1986), que la apitoxina o VA se ha utilizado en terapia desde 700 años antes de la era cristiana, los egipcios los hindúes la utilizaban para dolores articulares, su aplicación puede ser mediante picaduras directas de abejas en la piel, como a través de administración enteral, mediante agua de bebida (Castro *et al*. 2005; Baek *et al*. 2006; Han, e*t al*. (2010a) y Han *et al*. (2010b).

Los investigadores Han *et al*. (2012), realizaron en Corea un estudio de sensibilización de piel en cobayos y ratones con el uso de apitoxina procedente de abejas melíferas (*Apis melífera)*, para lo cual utilizaron dosis de 1500 mg/kg de peso corporal vivo. Finalmente demostraron que es un producto bien tolerado por las dos especies animales, sin que se haya presentado irritación dérmica; llegándose a recomendar su uso como un ingrediente de aplicación tópica en animales. Todas estas afirmaciones son corroboradas también por Chaudhry *et al.* (2010), sin que tampoco se mencionen reacciones tisulares por contacto cutáneo en los animales así tratados.

De igual manera Han, *et al*. (2010b), Jáuregui, *et al.* (2017), realizaron estudios en pollos de engorde con apitoxina suministrada en el agua de bebida, encontrándose excelentes resultados tanto en el aumento de peso corporal vivo como en el mayor desarrollo de órganos linfoides tales como timo, bazo y bolsa de Fabricio, atribuible a la presencia de estímulos en el sistema inmunológico en pollos tratados con esta sustancia, frente a grupos testigo.

De otra parte, Akbar *et al*. (2012), estudiaron en ratas el efecto del veneno de abejas en la encefalomielitis alérgica experimental (EAE), para tal efecto administraron la apitoxina por vía parenteral en dosis diarias de 2 y 5 mg/kg de peso corporal vivo, durante diez días, obteniéndose como resultado una reducción considerable de la intensidad media de la EAE en los grupos ensayo comparado con grupos testigo.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Jang, (2003); Park *et al*. (2010) y Matysiak *et al*., (2011), le atribuyen a la apitoxina propiedades biológicas, farmacológicas especiales como estimular al sistema inmunológico y acciones antimicrobianas.

2.6.3. Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

Hay diferentes métodos de estudio y bases para interpretar la sensibilidad de las enterobacterias a los antimicrobianos in vitro. De conformidad con Toroco *et al*. (2008), estos métodos pueden clasificarse en cuantitativos y cualitativos; entre los cuantitativos se encuentran aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración mínima que inhibe el crecimiento microbiano (CMI) y la concentración mínima que induce a la muerte de las bacterias (CBM). Se define como CMI y CBM a la concentración mínima que inhibe el crecimiento microbiano y a la que induce a la muerte bacteriana respectivamente, en un período de tiempo establecido y con un inóculo que contiene una población bacteriana estandarizada, teoría respaldada también por Malbrán (2012).

Para Cercenado, y Saavedra-Lozano, (2009), el estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, a nivel de laboratorio, se realiza a través de métodos fenotípicos, llamados así por que reflejan las respuestas frente al ambiente de las bacterias, se desarrollan valiéndose de las técnicas de difusión y de dilución.

De acuerdo con Malbrán (2012), la técnica de dilución puede hacerse en medio líquido, por ejemplo, caldo cultivo, también puede desarrollársela en un medio sólido como agar; tanto en el medio líquido como en el sólido se debe disolver una concentración determinada del antimicrobiano a ser estudiado, luego se debe proceder al cultivo del microorganismo de interés en la investigación, siempre en referencia al Clínica and Laboratory Standards Institute (CLSI).

La técnica de disco difusión en agar, llamada también método de Kirby- Bauer, emplea discos de papel embebidos en un preparado ya estandarizado con un antimicrobiano, se los dispone en la superficie de un medio sólido, por ejemplo, agar Mueller Hinton, el que debe contener una suspensión con una población concreta de una bacteria específica, por la que hay interés por conocer su sensibilidad al antimicrobiano portado en el disco de papel (Malbrán, 2012).

Con el fin de estandarizar la densidad del inóculo, como señalan Taroco *et al*. (2006), se recomienda preparar un estándar de turbidez, para lo cual se usa una suspensión de sulfato de bario, preparado con ácido sulfúrico 99,5 ml y cloruro de bario 0,5 ml, la que corresponde a un 0,5 unidades del nefelómetro de McFarland y a 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Esta técnica permite la preparación de inóculos estandarizados o normalizados para los procedimientos de pruebas de sensibilidad.

USC DE COMPOSTELA

Una vez realizada la inoculación del agente bacteriano en un medio de cultivo y ubicados los discos de papel que contienen concentraciones específicas del antimicrobiano en estudio, se ponen a incubar durante 18 horas. En torno al disco antimicrobiano, se observa un halo cuyo diámetro está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo (Taroco *et al*. 2006).

De manera que la carga del disco puede estar ajustada para que los halos de inhibición den la oportunidad de diferenciar microorganismos sensibles de los resistentes. Halos pequeños tiene relación con valores altos de CMI o resistentes, mientras que halos de diámetros mayores se relacionan con CMI bajas o bacterias sensibles (Cercenado y Saavedra-Lozano 2009).

Lo anterior se puede interpretar como la lectura de halos pequeños para concentraciones altas del antibacteriano, es porque hay resistencia bacteriana, mientras que halos grandes para concentraciones bajas de antibacteriano, son relacionados con respuestas de sensibilidad por parte del microorganismo.

Respecto al estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos, Taroco *et al*. (2006); Cercenado, y Saavedra-Lozano (2009), concluyen que los métodos de dilución proporcionan resultados eminentemente cuantitativos, esto es la concentración mínima inhibitoria (CMI), en cambio, los métodos de difusión dan resultados cualitativos: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

Resulta oportuno recalcar lo señalado por Pasterán, y Galas (2008), quienes consideran que la CMI obtenida por el método de dilución, constituye una guía clave para quienes interpreten los resultados, puesto que la concentración de antibiótico que se debe alcanzar en el sitio de la infección para inhibir el desarrollo del microorganismo infectante es la correspondiente a dicha concentración. Por tanto, estos autores sostienen que la CMI real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la dilución inmediatamente inferior, la que incluso permite observar desarrollo del mismo.

2.7. Macrodilución

Es una metodología cuantitativa que tiene como fundamento preparar un inóculo bacteriano estandarizado, una concentración bacteriana conocida, de 10^8 UFC (0.5 de McFarland) y llevarla a concentraciones decrecientes de antimicrobiano (Taroco *et al*. 2006).

La determinación de la CMI puede realizarse por micro o macro dilución en caldo nutritivo, dilución en agar o E-test®. Métodos cualitativos (disco difusión) son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente (Malbrán, 2012).

Para Cercenado y Saavedra-Lozano (2009), la investigación de la sensibilidad a los antimicrobianos, sean sintéticos o industriales como naturales u orgánicos, para

enterobacterias aisladas a partir de muestras biológicas conduce a dos propósitos fundamentales:

- Por una parte, constituirse en una guía para el clínico con la finalidad de que pueda elegir el mejor tratamiento, así como para el control evolutivo de la resistencia bacteriana, con fines de reconsiderar el espectro del o los antimicrobianos y de esta manera actualizar los tratamientos prácticos.

- Medir la sensibilidad de una bacteria frente a varios antimicrobianos in vitro es el propósito de un antibiograma, de manera que se puedan predecir los efectos aplicados en organismos vivos. Procedimiento que permite conseguir evidencias cualitativas que demuestran la resistencia o sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano. De igual manera, se pueden obtener resultados cuantitativos que determinan la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano a concentraciones de µg/ml (mg/l) (Macgowan 2008).

Para la consideración de microorganismos sensibles, intermedios o resistentes desde el enfoque de un método fenotípico o antibiograma de acuerdo con Cercenado y Saavedra-Lozano (2009), la interpretación de los resultados se los hace en base a valores establecidos por oganismos como el propio CLSI, que están encargados de publicar periódicamente guías que establecen estándares de sensibilidad o resistencia de una bacteria frente a antimicrobianos específicos, para lo cual toman en cuenta propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica. Además, estos investigadores hacen referencia a las CMI que determinan la sensibilidad o resistencia las cuales son diferentes en concordancia tanto para cada antimicrobiano como para cada bacteria en particular.

Respecto a este tratado, Herrera (1999), manifiesta que es necesario tomar en cuenta las características del microorganismo y las propiedades del antimicrobianos en cuanto a tamaño de la molécula, la polaridad, peso molecular, entre otros, ya que de la interacción entre estos dos factores depende la capacidad de difusión del producto considerado como antimicrobiano. Por tanto, no se puede determinar que un microorganismo específico es más sensible que otro, en base a que el halo de inhibición sea mayor. Woods G. & Washington J. (citado en Herrera, 1999).

La técnica de dilución se puede hacer en medio líquido, también puede desarrollarse en un medio sólido como agar. Tanto en medio líquido como sólido se debe disolver una concentración determinada del antimicrobiano a ser estudiado, luego se debe proceder al cultivo del microorganismo de interés en la investigación (Malbrán 2012 y Junoda *et al*. 2013).

El Método de microdilución en medio líquido es especialmente útil ya que permite emplear placas de microtiter estériles de 96 pocillos (12 columnas x 8 filas) empleando en cada fila 10 diluciones diferentes del antimicrobiano de elección más un control

positivo y un control negativo. Normalmente, según la CLSI se emplean diluciones siguiendo un esquema de logaritmos de base 2, a partir de 0,125 µg/ml (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024) en los cuales tras la selección del rango de interés se va dividiendo entre 2 la concentración del antimicrobiano a probar, y tras inocular con la bacteria de interés toda la fila se establece el pocillo en el cual no crece dicha bacteria que constituye la CMI (CLSI 2012)

.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta Investigación se la desarrolló, tanto en los laboratorios como en la granja de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), la misma que se encuentra ubicada geográficamente en las siguientes coordenadas: latitud N 0°21□50”, longitud W 78°15□40” y altitud 2220 m.s.n.m. en el barrio La Victoria, Parroquia San Francisco, cantón Ibarra y provincia de Imbabura. La ubicación geográfica se muestra en la Figura 2.

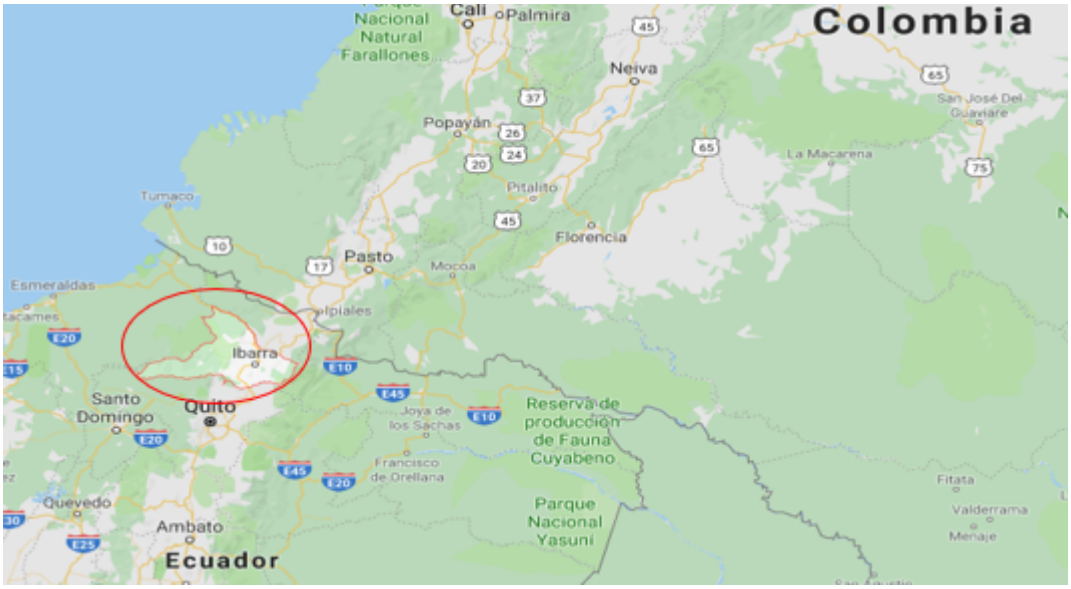


Figura 2. Ubicación geográfica de la provincia de Imbabura y ciudad de Ibarra.

Nota Fuente: Google Map. Encerrada en óvalo y delimitación línea de color rojo, provincia de Imbabura, cabecera provincial Ibarra.

3.1. Los laboratorios en los que se trabajó:

En los laboratorios de la PUCESI, tal es el caso del laboratorio de Microbiología para el cultivo e identificación de las enterobacterias de interés, antibiogramas mediante el método de difusión, conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/g), diluciones seriadas y para todos los análisis de Microbiología clásica con excepción de los estudios sobre biofilms, sensibilidad mediante microdilución de cepas de *Salmonella* y expresión génica.

El Laboratorio de Biotecnología (PUCESI), para colecta de la apitoxina en la cámara de flujo laminar, caracterización molecular de cada una de las enterobacterias objeto de estudio y preparación de las diluciones de apitoxina en agua ultra pura.

El laboratorio de Química (PUCESI), para caracterización de la apitoxina mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.

Los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular del Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) de la Facultad de Veterinaria de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela para los estudios de biofilms, CMIs mediante método de microdilución y estudios de expresión génica en cepas de *Salmonella.*

También se empleó la Granja Experimental (PUCESI), tanto para la colecta de apitoxina en el apiario correspondiente, como para los ensayos de campo con los cobayos (*Cavia porcellus*), para los tratamientos de control terapéutico de las tres enterobacterias en estudio.

3.2. Comunidades involucradas en esta investigación

- Los cobayocultores, ya sea de pequeñas, de medianas como de grandes explotaciones del área de influencia de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); esto es: Imbabura, Carchi y norte de Pichincha.
- Apicultores del sector de El Inca, cantón Pimampiro; Caracqui y ECAA, cantón Ibarra; Chaltura, cantón Antinio Ante, así como Cotacachi en el cantón Cotacachi.
- La comunidad educativa de la ECAA.

3.3. EQUIPOS Y MATERIALES

Los equipos y materiales empleados para la ejecución de esta investigación fueron:

3.3.1. De laboratorio:

a. Equipos:

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, (JASCO®) LC-Net II/ADC, con componentes y accesorios:
- Columna cromatográfica de HPLC: (MACHERY-NAGEL®) EC 250/4 Nucleosil 100/5 con empaque C18 Htec, (250 mm longitud, diámetro interno 4 mm, tamaño de partícula 5 µm).
- Patrón de Melitina Sigma®M2272-5MG (*Melittin from Honey*)
- Bee Venom 96.5% for HPLC.
- Columna C0-2067 PLUS
- Bomba PU-2089S PLUS
- Detector UV 2070 PLUS
- Purificador de agua Fisher Scientific® *Ultrapure UV*
- Acetonitrilo 0.1% ácido fosfórico MERCK®
- Agua ultrapura y 0.1% ácido fosfórico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Muestra de apitoxina preparada para HPLC.
- Ácido fosfórico al 85% (MERCK®).
- Jeringuillas de 10 ml con punta roma
- Fase Móvil
- Bomba: (JASCO®) PU-2089s Plus.
- Horno de termostatización para columna: (JASCO®) CO-2067 Plus.
- Fase Estacionaria (columna).
- Detector de ultra violeta:(JASCO®) UV-2070 Plus. Longitud de onda 220 nm
- Baño ultrasonido LAVA LAB
- Software Chrom NAV®(JASCO).
- Ordenador COMPAC®
- Autoclave (N-BIOTEK®) NB1080
- Microscopios binoculares de 100 x (AUSTRIA®).
- Cuenta colonias (STUART®) CAT. Nº SC6+. Serie R570001359.
- Cámara fotográfica (SONY®) serie ICES-3b/Continent N°601®.
- Ordenador Portátil (ACER®).
- Balanza Analítica (METTER TOLEDOV®) máximo de 220g y resolución de 0,0001g.
- Cámara de flujo laminar (marca N-BIOTEK®) Leading Biotechnology
- Termociclador *Real Time* de alto rendimiento QuantStudio 12K FLEX (Thermo Fisher Scientific) (LHICA).
- Balanza Analítica (OHAUS) (LHICA).
- Fluorometro portátil Qubit (INVITROGEN™, Thermo Fisher Scientific) (LHICA).
- Lector de Microplacas (630 nm) (DAS, Italy) (LHICA).
- Centrífuga PCR (EPPENDORF®) (LHICA).
- Discos papel filtro 6 mm ø, 3mg peso (Whatmann)

b. Material Fungible

- Placas Petri BOECO® y DELTALAB (LHICA).
- Tubos de ensayo BRAND GMBH®de 10 ml (tapa roscable y sin ella).
- Tubos tipo Eppendorf (LHICA).
- Gradillas de aluminio (FISHERBRAND®) para tubos de ensayo.
- Placas porta y cubre objetos CORNING®.
- Estufas (MEMMERT®) Modelo INB 500. Calor seco, horno de secado, térmico para esterilización, capacidad 32 L, temperatura 10°C- 300°C.
- Estufas (MEMMERT®) convección BE 500 (108 L) (LHICA)
- Pipetas graduadas (JVA®) de 1,5 y 10 ml.
- Pipetas aforadas (JVA®) 2, 5 y 10 ml.
- Micropipetas (GILSON® y EPPENDORF® (LHICA)) 1 ml, 0.2, 2, 10, 100 y 200 µl.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Filtros de jeringuilla estériles, tamaño de poro 0,22µ (WHATMAN)
- (LHICA)
- Vasos de precipitación (BOECO®) de 100, 200 y 1000 ml.
- Cubetas plásticas PIKA®.
- Láminas de vidrio color ambar para cosecha apitoxina (215 mm de largo, 185 mm de ancho y 4 mm de espesor).
- Cajas de disección (LHAURA®).
- Placas de poliestireno de microtiter de 96 pocillos estériles con tapa (DELTALAB®) (LHICA).
- Placas Petri de poliestireno estériles (DELTALAB®) (LHICA).
- Cámara de Neubauer Improved (MARIENFELD®) (0.01 mm–0.0025 mm^2); es un portaobjetos de cristal grueso de 70 mm de largo, 30 mm de ancho y 4 mm de espesor. Es un instrumento utilizado en Medicina y Biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, en un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y otros. Un ejemplo se presenta en la Figura 3.

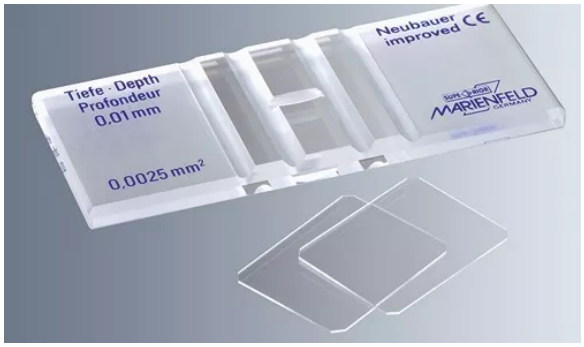


Figura 3. Cámara Neubauer Improved (MARIENFELD®)

Nota Fuente: https://articulo.mercadolibre.com.

- Jeringas hipodérmicas desechables
- Agujas hipodérmicas desechables.
- Guantes de latex (polímero sintético).
- Mandiles (de tela blanca).
- Trajes de apicultura (de tela blanca).
- Mecheros de Bunsen FISHER®.
- Agitador (ULTRA CRUZ®) con plato térmico y agitación magnética.
- Asas para inoculación tipo loop (1-10 µl).
- Hisopos QUICK SWAB® (3M).
- Pinzas
- Regla milimétrica.
- Calibrador o Verner micrométrico, electrónico.
- Pipetas Pasteur plásticas desechables

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

c. Soluciones, reactivos, medios de cultivo y kits comerciales

-Soluciones:

- Tampón Eluyente (TE), es un componente del sistema de aislamiento y purificación de DNA que se utiliza en el Kit de PROMEGA CORPORATION (2010). Solvente que mantiene estable pH e intercambio de iones en soluciones que tiene grupos funcionales con cargas, ya sean aniónicas o catiónicas. Por tanto, los iones del tampón eluyente interactúan, ya sea con los grupos cargados del ácido nucleico, como también con los grupos del intercambiador iónico, forma en la cual se mantiene libre de impurezas como proteínas, grasa y otros metabolitos el ácido nucléico.

- Agua ultrapura de calidad *Milli-Q*; este tipo de agua resulta de un proceso de osmosis inversa, conocido como des ionización, seguida de filtrado a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 µm. Se trata de agua que no tiene contaminantes constituidos por iones disueltos, coloides o materia orgánica. Es apropiada para los requisitos de análisis más exigentes, incluyendo la cromatografía liquida de alta resolución.

- Solución fisiológica estéril, 3 ml en tubos.

- Soluciones de apitoxina (soluto) en agua ultrapura de calidad *Milli-Q* (solvente), en concentraciones de: 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml y 900 µg/ml. El agua ultra pura, para uso en laboratorio, procesada en el equipo de Thermo Scientific® Ultrapure UV, Integral Water Purification System for Ultrapure Water.

- Solución de Tetraciclina® 150 µg/ml en agua de calidad Milli-Q como solución de contraste frente a las soluciones de apitoxina empleadas en los ensayos de laboratorio y de campo. Esta concentración se la toma como referencia de las experiencias logradas en investigaciones realizadas por Caycedo, *et al*. (2011) y Arciniega, *et al*. (2017), quienes trabajaron con enterobacterias provenientes de cuyes.

- Solución Estándar de Turbidez de McFarland para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, mediante comparación, entre los tubos de caldo cultivo del Estándar de Turbidez y los correspondientes a los cultivos de las tres enterobacterias.

  Estándares empleados ya sea para ajustar los cultivos microbianos, para iniciar los antibiogramas como para lecturas de UFC/ml mediante el método de contraste.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Solución de TRIzolTM (INVITROGEN™, Thermofisher Scientific) (LHICA)

Agar semisólido de movilidad para *Salmonella* según Karatzas *et al*. (2008) 10 g/L tryptona (Panreac, Applichem) 5 g/L NaCl (Panreac, Applichem) 4 g/L agar (Liofilchem, Italy), 3g/L extracto de carne de ternera (Oxoid, UK) y 0,05g/L de 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, Germany). El medio fue esterilizadao durante 15 m a 121 ºC y enfriado por debajo de 50 ºC.

-Reactivos:

- Cristal Violeta SERVILAB®.
- Solución de cristal violeta 0,1% (PANREAC, Applichem, España) (LHICA).
- Metanol (MERCK) (LHICA).
- Ácido acético (PANREACH, Applichem, España) (LHICA).
- Logo Iodo TM MEDIA®.
- Etanol 96% NOVACHEM®.
- Safranina SERVILAB®.
- Acohol acetona SERVILAB®
- Agua oxigenada (H_2O_2) de diez volúmenes SERVILAB®.
- Reactivo de oxidasa (N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina)

-Medios de cultivo:

- Caldo Triptosa Soya BRITANIA® (TSB) (para cultivos microbianos. en tubos estériles, en volúmenes de 4 a 5 ml/tubo).
- Triptosa Soja Caldo (OXOID®, UK) (LHICA).
- Caldo nutritivo (ACUMEDIA®).
- Caldo Mueller Hinton (PANREAC® Applichem, España) (LHICA).
- Agar Nutriente (PANREAC® Applichem, España) (LHICA).
- Eosina (ACUMEDIA®).
- Agar SS (MERCK®).
- Agar Yersinia (MERCK®).
- Agar sangre (ACUMEDIA®).
- Agar TSI (Triple Sugar Iron) (ACUMEDIA®).
- Agar SIM (Sulfuro Indol Movilidad) (ACUMEDIA®).
- Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

-Kits comerciales:

- El kit para la extracción del DNA *Yersinia pseudotuberculosis* Wizard® (Genomic DNA Purification Kit).
- Kit de Purificación de DNA Genómico Wisard® N° TM050.
- Mini kit de ADN genómico PureLink™.
- Kit Invitrogen™.
- Kit PROMEGA CORPORATION®.
- Kit de alta capacidad de Transcriptasa reversa para obtención de cDNA a partir de RNA total. (*Applied Biosystems*®, USA).
- Kit Mastermix POWER SYBR® Green para PCR cuantitativa (*Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific,* USA).
- Agua Libre de RNasas (Thermo Fisher™).
- Secuencias de cebadores empleadas para valorar la expresión génica de genes involucrados en la formación de biopelículas, virulencia bacteriana y RNAs pequeños (INVITROGEN™, Thermo Fisher), en la Tabla 2 se puede constatar esta información.
-

Tabla 2. Secuencias de cebadores para cuantificación de genes relacionados con la formación de Biopelículas, virulencia y RNAs pequeños.

Genes diana	Secuencia (5´-3´)	Referencia
16s rRNA	F: AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT R: GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG	[Lee et al. 2009]
csgD	F: TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA R: TATGATGGAAGCGGATAAGAA	[Barak et al. 2005]
adrA	F: GAAGCTCGTCGCTGGAAGTC R: TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	[Latasa et al. 2005]
hilA	F: AATGGTCACAGGCTGAGGTG R: ACATCGTCGCGACTTGTGAA	[Salaheen et al.2016]
invA	F: CGCGCTTGATGAGCTTTACC R: CTCGTAATTCGCCGCCATTG	[Salaheen et al.2016]
DsrA	F: CATCAGATTTCCTGGTGTAACGAA R: CCTACGGGTCGGGATCAAACT	[Ryan et al. 2016]
ArcZ	F: ACTGCGCCTTTGACATCATC R: CGAATACTGCGCCAACACCA	[Lamas *et al.* 2018a]
RprA	F: AGCATGGAAATCCCCTGAGTG R: CATCGTAGGAGACGGGCAAA	[Lamas *et al.* 2018a]
OxyS	F: TAACCCTTGAAGACACCGCC R: ACCAGAGGTCCGCAAAAGTT	[Lamas *et al.* 2018a]
CsrB	F: CAAAGTGGAAAGCGCAGGAT R: TGACCTTACGGCCTGTTCAT	[Lamas *et al.* 2018a]
SroC	F: GGGACTCCTGTCCTCTCGAT R: CAGCGCTACCCTCGAAGATT	[Lamas *et al.* 2018a]

Nota Fuente: Forward, R: Reverse

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

d. Cepas de Salmonella de colección:

Se emplearon un total de 16 cepas de la colección del Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Lugo. Todas las cepas fueron aisladas de granjas de pollos, así como de carne de pollo. Todas las cepas fueron identificadas siguiendo la Norma UNE-EN-

ISO 6579 para identificación de *Salmonella* de heces y fueron serotipadas siguiendo el esquema Kauffman-Whyte para la detección de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) con antisueros Standard (Bio-Rad California US). Las cepas pertenecieron a 11 serotipos diferentes y 2 subespecies de *Salmonella entérica* según se indica a continuación: S. Newport Lhica N2, S. Isangi Lhica IG1, *S. entérica* susp. Salamae Lhica SA3, S. Bardo Lhica B3, S. Infantis Lhica I17, S. Montevideo Lhica M1, S. Stanleyville Lhica ST1, S. Ndolo Lhica ND5, S. Dabou Lhica DA1, S. Typhimurium Lhica T14, S. Typhimurium Lhica T21, S. Typhimurium Lhica T22, S. Typhimurium Lhica T24, S. Enteritidis Lhica ET2. (laboratorio LHICA)

3.1.2. De Campo

a. Ecocolector de apitoxina

Se trata de un prototipo colector de apitoxina, es un diseño exclusivo y propio de la ECAA, con Patente Internacional N° H05C1/02-A01M23/38. Consiste en un módulo de madera de 40 cm de largo y 18 cm de ancho, en la superficie horizontal lleva 36 líneas de alambres de cobre N°40, ubicados de forma paralela y a una distancia de 0,5 cm entre hileras (Figura 4).

Una línea de hilos metálicos de cobre para flujo eléctrico positivo y otra para negativo; en el extremo terminal se conectan a un hardware (ARDUINO®) mega y a un inversor, encargados de transformar y regular el paso de energía, la misma que es administrada por un ordenador portatil o mediante un dispositivo Bluetooth y un panel solar.

Los dispositivos accesorios, hardware (ARDUINO®), Bluetooth y panel solar, se encuentran adosados en un extremo del módulo, en una caja pequeña para su protección. Se conectan gracias a un software preparado para este propósito, de manera que se puede regular las frecuencias de encendido, de apagado, el voltaje y amperaje, ya sea a partir de los comandos de un ordenador portátil como desde un teléfono celular que tengan la aplicación diseñada para este prototipo.

En la parte media horizontal del módulo se inserta una lámina de vidrio color ambar, en la que se colectan las descargas de apitoxina que depositan las abejas, al momento que son estimuladas por el campo magnético y eléctrico que se genera sobre las líneas de cobre; las abejas continúan vivas sin afectación alguna. A los 20 minutos se cambia de lámina de vidrio para una nueva colecta, sea de la misma colmena o de una nueva, dependiendo de la población de abejas.

USC UNIVERSIDADE

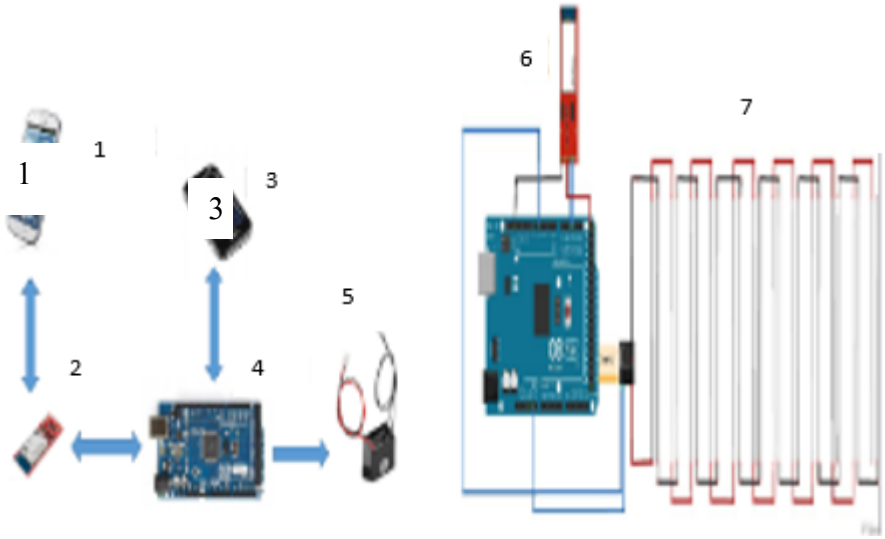


Figura 4. Esquema de la estructura del eco colector de apitoxina
Nota: 1. Interface Android; 2. Bluetooth; 3. Panel solar; 4. Arduino Mega. 5. Inversor; 6. Conexiones al Arduino Mega y 7. Hilos metálicos de cobre**.**

b. Unidades biológicas

Cuyes (*Cavia porcellus*), de línea genética mejorada, que es la más difundida en la serranía ecuatoriana, tanto animales clínicamente enfermos para el muestreo y aislamiento de las enterobactarias: *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium, así como cuyes sanos y en etapa de engorde.

c. Materiales y accesorios para los ensayos de campo

- Jaulas metálicas de fabricación artesana, con malla de alambre galvanizado con cuadros de 0,01 x 0,01 m, con divisiones de 2 m de largo por 1 m de ancho y 0,70 m de alto; un solo piso.
- Accesorios para la crianza y manejo, tales como recipientes de arcilla quemada, utilizados como bebederos, secadores de forraje (malla metálica horizontal) y comederos.
- Balanza de precisión (ADAMS®) modelo PW 254
- Forraje para los animales.

d. Varios

- Jeringas y agujas hipodérmicas desechables.
- Soluciones desinfectantes: tintura de yodo, alcohol antiséptico de 70° (Todos Medicamentos de carácter Oficial).
- Algodón aniséptico (200 g).
- Guantes de hule (polímero sintético),
- Mandiles y oberoles de tela gen
- Botas de goma

USC UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4. METODOLOGÍA

La metodología que se desarrolló en esta investigación, de conformidad con el objeto de estudio, fue Analítica (Físico-Química y Microbiológica) y tomando en cuenta la obtención de parámetros clínicos y/o productivos de los animales fue Descriptiva y Experimental de Campo.

3.4.1. Cosecha y Manejo de Apitoxina

Para obtener la apitoxina se puso en funcionamiento el prototipo que para este fin se diseñó y construyó en la ECAA, para cuyo propósito se utilizó un ordenador portátil (ACER®) que alimentó de energía a las líneas paralelas de alambres de cobre para la generación de un campo magnético y eléctrico que permitió las descargas de apitoxina por parte de cada una de las abejas que se ubicaron en dicho campo (Figura 5a). Para manejo de las colectas de apitoxina se esterilizaron materiales de vidrio como frascos y láminas (215 mm de largo, 185 mm de ancho y 4 mm de espesor), color ambar durante 15 minutos y a 121 °C.

Las láminas de vidrio con la apitoxina recolectada se llevaron al laboratorio de Biotecnología para obtener el veneno, mediante un raspado con una lámina portaobjetos en posición vertical y con recorridos perpendiculares a la lámina que contiene la apitoxina, trabajo que fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar, junto a un mechero Bunsen (Figura 5b), con la protección de guantes de hule, mascarillas naso bucales y gafas protectoras de los ojos, todo esto con la finalidad de obtener asepsia y evitar salpicaduras y reacciones con las partículas de los cristales de apitoxina.



(a) (b)

Figura 5. (a) Cosecha de apitoxina en el apiario de la ECAA. (b) Colecta de apitoxina en cámara de flujo laminar.

Para el almacenamiento y buen manejo de la apitoxina, se utilizaron frascos de vidrio color ambar de tapón de rosca y capacidad de 10 ml, previamente esterilizados, como ya se indicó antes. Una vez depositado el veneno de abejas en cada frasco, se identificaron con fechas, pesos del producto y lugar del apiario objeto de la cosecha, se guardaron en recipiente de madera adecuado para el propósito y en refrigeración para su correspondiente uso en las preparaciones de las diluciones en agua ultra pura de calidad *Milli-Q*, a razón de microgramos por mililitro de agua (µg/ml), según las necesidades de los cultivos y ensayos in vitro o in situ correspondientes.

Las colectas se efectuaron entre las 11h00 y las 13h00, desde el 9 de enero al 28 de mayo de 2016, con un intervalo de 21 días entre una colecta y las inmediatamente siguientes, hasta completar cinco colectas por apiario y colmena. La ubicación de los cinco apiarios sitos en la provincia de Imbabura se puede ver en la Figura 6, numerados en el orden de colecta, de la siguiente manera: El Inca del cantón Pimampiro, Caranqui del cantón Ibarra, Chaltura en el cantón Antonio Ante, Cotacachi en el cantón Cotacachi y apiario de la Escuela de Ciencias Agrícola y Ambientales (ECAA), ubicado también el cantón Ibarra.



Figura 6. Ubicación geográfica de los apiarios en la provincia de Imbabura.
Nota:1= apiario El Inca (Pimampiro); 2= apiario Caranqui (Ibarra); 3=apiario Chaltura (Antonio Ante); 4= apiario Cotacachi y 5=apiario ECAA (Cantón Ibarra).

3.4.2. Caracterización físico- química de la apitoxina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez recolectada y almacenada la apitoxina se procedió a caracterizarla físicamente, para lo cual se tomaron muestras para observación microscópica con el fin de identificar impurezas o presencia de algún cuerpo extraño. El color se calificó macroscópicamente y de conformidad con las procedencias o presencia de los apiarios en relación al entorno floral predominante.

La caracterización química se realizó en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI). Se empleó para ello el equipo de Cromatógrafía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en especial con enfoque a los niveles de melitina por ser el componente de mayor concentración en el veneno de abejas.

Se utilizaron: una columna de HPLC C18, y un patrón de melitina para HPLC tal como se ha señalado el apartado de materiales.

Para trabajar con el HPLC (JASCO) se tomó como referencia un estudio desarrollado por Rybak-Chmielewska y Szczsna (2004) con adaptaciones realizadas para los laboratorios de la ECAA.

3.4.3. Análisis de Apitoxina por HPLC-UV

3.4.3.1. Equipos y Materiales

En la Figura 7 se presenta un esquema de los componentes que tiene un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de manera que su funcionalidad es propia de un sistema que cuenta con elementos de entrada (fase móvil), la separación de compuestos a partir de la relación entre la fase móvil y la fase estacionaria (columna) y los valores que ofrece el detector que son un producto que se ve en forma de datos finales en el registrador o bien a través del oportuno programa de computador.

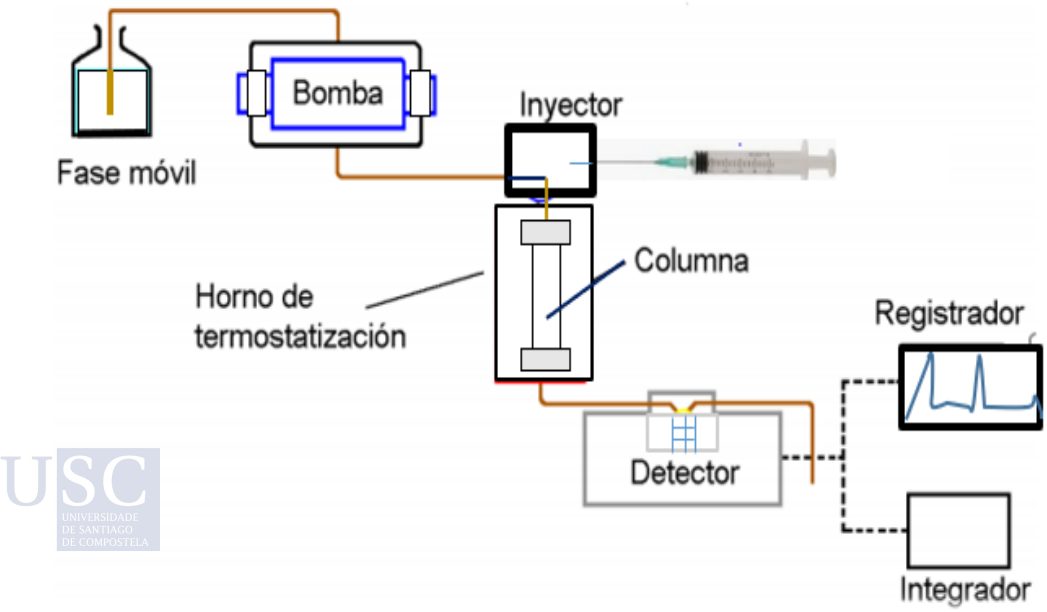


Figura 7. Representación esquemática de un sistema HPLC.

3.4.3.2. Procedimiento modificado de Rybak- Chmielewska y Szczsna por Laboratorios ECAA

(1) Preparación de eluyentes para el HPLC

Se utilizan 4 tipos de eluyentes, identificados como A, B, C y D
A. Ácido fosfórico en agua ultra pura.
B. Acetonitrilo en ácido fosfórico: agua ultrapura (80:20), 80 agua: 20 (C_2H_3N) en (H_3PO_4).
C. Acetonitrilo
D. Agua Ultrapura.

(2) El cromatograma por gradiente se ejecutó mediante el método lineal con eluyente 5%-80% de B en 45 min. Separación cromatográfica eluyente A: 0,1% de ácido fosfórico en agua ultrapura; eluyente B: 0,1% acetonitrilo en ácido fosfórico: agua ultrapura (80:20), 80 agua: 20 (C_2H_3N) en (H_3PO_4).

La velocidad de flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 ml min^{-1}, volumen de inyección manual con jeringuilla: 40 µl, temperatura de separación 25°C. Los datos del análisis se obtuvieron mediante el software Chrome NAV (JASCO), por tanto, la lectura de cromatogramas se realizó en la pantalla de ordenador conectado al HPLC (Kokot & Matysiak, 2009 y Zhou, *et al*. 2010).

(3) La composición de la fase móvil empleada en el proceso de análisis de la apitoxina se muestra de forma resumida en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de la fase móvil para cromatografía por gradientes empleada en determinaciones de apitoxina.

Etapa	Tiempo	Composición de Fase Móvil	
		Porcentaje de Acetonitrilo 0.1% Ácido Fosfórico	Porcentaje de agua MILLI-Q 0.1% Ácido Fosfórico
1	0.01	5.0	95.0
2	30.0	100.0	0.0
3	38.0	100.0	0.0
4	45.0	5.0	95.0

Nota Fuente: modificado de Rybak-Chmielewska y Szczsna (2004)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.3.3. Método

Para el análisis de la apitoxina se utiliza un método de gradiente lineal, con la ejecución de la cromatografía 5-80% de B en 45 minutos, ya que las condiciones del método empleado en el HPLC son las indicadas, tanto en el apartado 3.2.3.2. (1) Preparación de eluyentes para el HPLC como en la Tabla 3 que hace referencia a la

Preparación de la fase móvil por gradiente, ya que el método requiere de dos eluyentes que intervienen de conformidad con la programación en el HPLC.

Una de las adaptaciones realizadas en los Laboratorios ECAA al método de Rybak- Chmielewska y Szczsna (2004), es el uso de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% en lugar del ácido trifluoroacético (TFA) ($C_2HF_3O_2$) para esta fase, por ello se prepara una solución con ácido fosfórico y acetonitrilo (C_2H_3N) al 0.1% en 99.9% de agua ultra pura.

Tanto el patrón de melitina como la muestra de apitoxina de colecta propia se prepararon de conformidad con el protocolo dado por Rybak- Chmielewska y Szczsna (2004), confirmado por Kokot & Matysiak, (2011), Fernández, L. (2015) y con modificaciones realizadas por los laboratorios ECAA.

El patrón de melitina se obtuvo de Sigma con un 96,5% de pureza para uso en el HPLC. Los datos fueron recogidos a través del empleo del software Chrom NAV, mediante la lectura de los cromatogramas que presentó la pantalla conectada al equipo HPLC (Zhou, *et al* 2010).

En la Figura 8 se puede ver el equipo de cromatografía líquida de alta resolución en el momento en el que se hace una cromatografía de una muestra de apitoxina recolectada en el apiario de la ECAA.

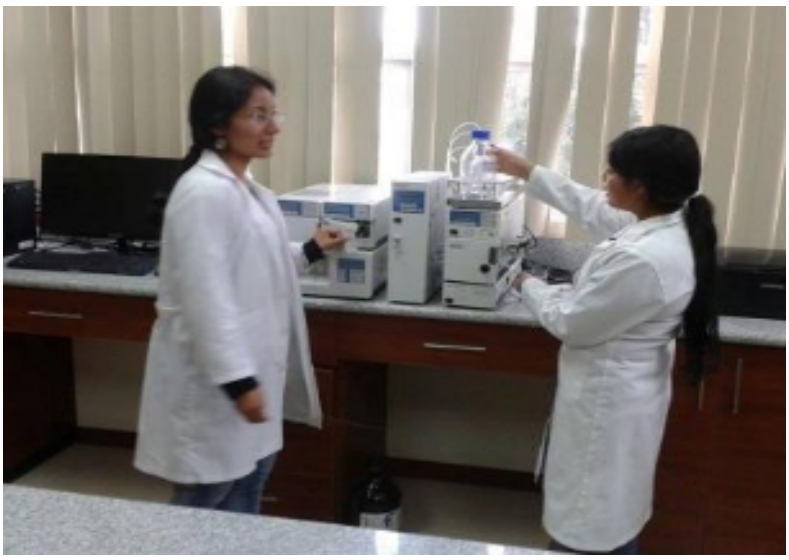


Figura 8. Análisis de apitoxina en el equipo HPLC (JASCO®) LC-Net II/ADC.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5. Recolección de muestras de enterobacterias y su identificación

Para el desarrollo de este estudio se identificaron como variable dependiente a los cuyes en fase de engorde, mientras que los factores de estudio fueron: factor uno bacterias: *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis y Salmonella* Typhimurium;

factor dos los productos: apitoxina (600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml y 900 µg/ml y Tetraciclina® 150 µg/ml, como testigo o animales control 0,0.

Los indicadores para la interacción de estos dos factores fueron: sensibilidad bacteriana expresada como: Sensible =S; Intermedio =I y Resistente =R, a partir del referente de diámetros de halos de sensibilidad (mm), UFC (número/g), a las 24, 48 y 72 horas de iniciado el ensayo; mortalidad en número de cuyes y ganancia de peso corporal vivo en gramos.

Para aislar e identificar a las bacterias enteropatógenas se seleccionaron cobayos de diferentes criaderos de la provincia de Imbabura, dos criaderos de Pimampiro, dos en Chaltura (Cantón Antonio Ante), dos de Caranqui (Cantón Ibarra) y dos Conrraqui (Cantón Urcuquí).

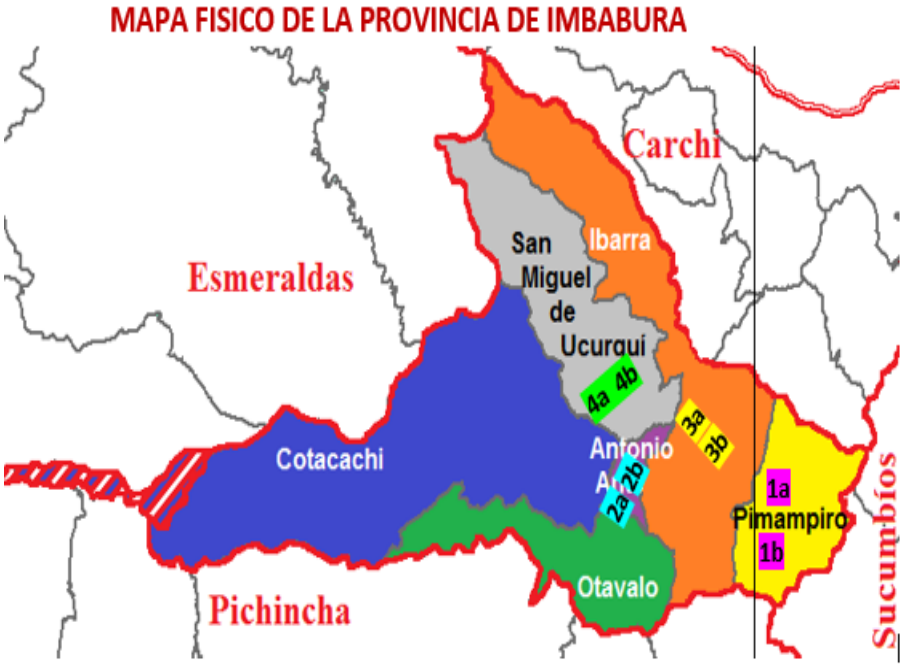


Figura 9. Representación de la localización de los criaderos de cuyes que se emplearon para los muestreos en la provincia de Imbabura.
Nota: 1a y 1b= criaderos en el cantón Pimampiro; 2a y 2b= criaderos en el cantón Antonio Ante; 3a y 3b= criaderos en el cantón Ibarra y 4a y 4b= criaderos en el cantón Urcuquí.

De cada uno de los criaderos determinados en la provincia de Imbabura, como se puede apreciar en la Figura 9, después de una elección al azar de cuyes en etapas de engorde y reproductores, se muestrearon dichos animales mediante hisopos QUICK SWAB vía rectal y toma de muestras de tejidos de órganos tales como hígado, bazo y ganglios mesentéricos. Estas muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI), las muestras tomadas mediante hisopos rectales, se cultivaron en caldo nutritivo, en una proporción de 1:9; esto es, 1 ml de muestra en 9 ml de caldo y en tubos que fueron preparados con los

procedimientos exigidos en dicho laboratorio, debidamente identificados, posteriormente se pusieron a incubar en una estufa a 35°C y por 24 horas.

3.5.1. Identificación de cepas bacterianas

A las 24 horas de incubación de las muestras, se observaron los tubos con caldo nutritivo y en los que sembraron las muestras recolectadas; los tubos con cultivos bacterianos, en los que se constataron resultados positivos se separaron para realizar nuevos sub cultivos en placas Petri y con medios selectivos: Agar SS para *Salmonella*, Agar eosina y azul de metileno para *Escherichia* y agar Yersinia para *Yersinia*; las muestras fueron sub cultivadas varias veces hasta obtener colonias puras.

Para la identificación de las cepas bacterianas, se realizaron pruebas morfológicas y funcionales básicas como las siguientes:

a. Morfología de las colonias

Escherichia coli, las colonias de esta bacteria son variadas según el medio de cultivo, en agar eosina azul de metileno se logran colonias circulares, bordes redondeados medianas, convexas, de color verde-metálico característico de *Escherichia coli* (Fernández, *et al*. 2010).

Salmonella Typhimurium produce colonias grandes grisáceas y lisas, a veces y de conformidad con el medio de cultivo presentan colonias verdes claras, con precipitados negro en el centro debido a la producción de sulfuro de hidrógeno (Garcés, 2015).

Yersinia pseudotuberculosis presenta colonias pequeñas, redondas y brillantes, según el medio de cultivo selectivo son lisas o rugosas y de coloración violeta, salmón y amarillento (Dworkin, *et al*. 2006 y Fernández, *et al*. 2010).

Para identificar a las enterobacterias en estudio, se procedió a realizar la prueba de tinción Gram, para lo que se desarrolló el protocolo que rige en el Laboratorio de Microbiología de la PUCESI.

De igual manera, se desarrollaron las pruebas bioquímicas siguientes:

b. Prueba de Catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, es una enzima. Descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono; si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas ($2H_20_2 \text{---} 2H_20 + 0_2$ = burbujas de gas). La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva (Fernández, *et al*. 2014).

c. Prueba de la oxidasa

Procedimiento: se utilizan tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa, se impregna la zona coloreada de la tira con reactivo en el cultivo bacteriano. También se toma una colonia del cultivo bacteriano con una asa de vidrio debidamente esterilizada y se frota sobre la zona del papel para observar la reacción de color. La oxidación se detecta como color azul-violeta (Dworkin, 2006).

d. Prueba de metabolismo de carbohidratos con agar TSI

El Agar T.S.I.(Triple Sugar Iron), es un medio de cultivo ampliamente utilizado para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos, sustentándose en la fermentación de carbohidratos, sacarosa, lactosa y glucosa que tiene en su composición, así como a la producción de H_2S. Las peptonas y el extracto de levadura aportan aminoácidos y nutrientes esenciales, la dextrosa, lactosa y sacarosa constituyen fuentes de energía y sustratos para la diferenciación basada en la actividad fermentativa sobre los azúcares; al momento en que dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Por tanto, se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización (Fernández, *et al.* 2010).

Si se toma en cuenta que los carbohidratos sacarosa y lactosa se encuentran en mayor cantidad en este agar test, tanto Fernández (2014) como Garcés, (2015), manifiestan que se forma ácido en la base del tubo que obedece a la fermentación de estos azúcares, mientras que la formación de ácido a partir de la glucosa únicamente, en el área inclinada del tubo es anulada por oxidación de una pequeña cantidad de ácido, en el área inclinada del tubo, generándose una reacción de pH neutro o alcalino.

Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o generarán productos alcalinos y el medio permanecerá rojo. La producción de H_2S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

Para *Escherichia coli,* debido a la fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa, el cultivo presentó color amarillo tanto en colonias como el medio y en torno a éstas. En el caso de *Salmonella Typhimurium,* al no existir fermentación de ninguno de los carbohidratos se presentaron colonias de color rosa, con manchas negras debido a la producción de ácido sulfhídrico, así como el medio de color rojo. Finalmente, y para los cultivos de *Yersinia pseudotuberculosis*, al no haber fermentación de los carbohidratos del medio de cultivo se observó de color rosa intenso.

USC DE COMPOSTELA

e. Asimilación de citrato

Esta prueba es útil para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como fuente exclusiva de nitrógeno en su metabolismo, de manera que se produzca una alcalinización en su medio. Las enterobacterias como *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium son incapaces de crecer a través del uso de citrato como única fuente de carbono (Fernández, *et al*. 2010).

f. Lisina descarboxilasa

La descarboxilación, tal como señalan Fernández, *et al.* (2014), es un proceso en el cual las decarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. La decarboxilación de lisina da cadaverina (diaminas). Como la decarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos fases: a) Por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6.0), apareciendo color amarillo. b) La descarboxilación que se da después que el medio se acidifica para dar lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.

g. Prueba del SIM (H_2S, Indol y movilidad)

Esta prueba tal como afirman Fernández, *et al*. (2010), permite determinar si la bacteria es capaz de degradar al Triptófano a indol a través de la acción de la enzima Triptofanasa; el indol es detectable por la habilidad que tiene de combinarse con ciertos aldehidos y formar un compuesto coloreado.

De igual manera, esta prueba permite conocer si hay producción de H_2S a partir de aminoácidos que contienen azufre, presentando una reacción visible de color negro; además, y de manera fundamental por la movilidad de algunas bacterias, según la consistencia del medio que así lo permita, observándose que los microorganismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden al medio produciendo turbidez, caso contrario, la bacteria crecen en la línea de inoculación (Fernández, *et al*. 2014).

En la Tabla 4 se pueden evidenciar a manera de resumen las pruebas morfológicas, coloración Gran, pruebas bioquímicas con los respectivos indicadores para cada una de las tres enterobacterias objeto de esta investigación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Indicadores de Morfología de las colonias, tinción gram y pruebas bioquímicas comparativas entre las enterobacterias de interés.

PRUEBAS		ENTEROBACTERIAS		
		Escherichia coli	*Salmonella Typhimurium*	*Yersinia pseudotuberculosisi*
MORFOLOGIA DE COLONIAS	INDICADORES			
	Pigmentación	Verde metálico, violeta con verde metálico	Verde claro, grisáceo con precipitación negro intenso	Violeta, salmón amarillento
	Tamaño	medio	Grande	Pequeño
	Forma	Circular con bordes redondos	Convexa-lisa	Lisa
	Aspecto Superficie	Metálico	Claro	Brillante
COLORACIÓN GRAM	INDICADORES			
	Azul-violáceo			
	Rosa-rojo grosella	Gram -	Gram -	Gram-
BIOQUIMICAS	INDICADORES			
TSI	Superficie/fondo	A/A	K/A	K/K
	Gas	+	-	-
	H_2S	-	+	-
	Fermentación:	+	+	+
	Glucosa	+	+	-
	Lactosa	+	-	-
	Sacarosa	-/+	-	-
SIM	INDICADORES			
	Motilidad 37°C.	+	+	-
	H_2S	-	+	-
	Producción de indol	+	-	-
OXIDASA	Presencia de Burbujas	-	-	-
CATALASA	Burbujas de gas	+	+	+
CITRATO	Crecimiento	-	-	-
	Color	V	Az	-
LISINA DESCARBOXILASA	Color Violáceo	+	+	-

Nota: coloración Gram (negativa -); para TSI: A= amarillo, K= violeta; para Citrato: V= Verde; Az= Azul.

3.5.2. Identificación molecular de patógenos enterobacterianos

Una vez realizadas las pruebas de morfología de colonias, de tinción gram y bioquímicas, se procedió la extracción del ADN bacteriano y posteriormente a su purificación. Luego se envió a los laboratorios MACROGEN para secuenciar.

En la Tabla 5 se muestran las secuencias de los cebadores o *primers* empleados, mientras que en la Tabla 6 se indica la mezcla de los reactivos para la PCR

Tabla 5. Secuencia de cebadores y tamaño esperado de los productos de PCR de la ampliación del gen 16s DNAr y región V3 del mismo gen

Partidores	Secuencia	Tamaño esperado	Referencias
907r	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	926 pb	Muyzer *et al.*, 1995
P3	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3		
P3	5'-40 GC+TAG GGG AGG CAG CAG-3'	193 pb	Wang et al., 2008
P2	5'ATT ACC GCG GCT GG-3'		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Reactivos utilizados para la PCR

REACTIVOS	VOLUMEN
Taq Polimerasa	12,5 µl
Partidores 907r (926r a una concentración de 0,10µM)	1 µl
P3 (341f a una concentración de 0,10µM)	1 µl
ADN (0,1 mg/ml)	5 µl
Agua libre de nucleasas (DNasa, RNasa)	5,5 µl
VOLUMEN TOTAL	**25 µl**

La amplificación del ADN fue realizada en el termociclador Multigene Optimax de Labnet. El protocolo base de amplificación en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94ºC por 5 minutos; luego 35 ciclos de desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos, seguido de esto un alineamiento a 55,6 ºC por 45 segundos y una elongación a 72ºC por 90 segundos. Posteriormente se realizó otro proceso de desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos seguido de un alineamiento a 55,6ºC por 45 segundos. Como último paso se realizó una extensión final a 72ºC por 90 segundos.

3.5.3. Protocolo de extracción de ADN

Para la identificación bacteriana a nivel molecular se empleo la amplificación mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región V3 de la secuencia del ADNr 16s. (León, 2013; Escalante, 2006) para su posterior secuenciación. El primer paso consiste en la extracción del DNA baceriano.

Para el proceso de extracción de ADN se utilizaron las cepas problema cultivadas en caldo nutritivo (Sigma). Para posteriormente extraer el ADN por medio del kit comercial Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) el cual provee 7 reactivos (Genomic Lysis/Binding Buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K). Para la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.5.4. Purificación de ADN bacteriano

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Se desarrolla todo el proceso de conformidad con el protocolo suministrado por el fabricante del kit de purificación (Promega-Corporation y MO BIO Laboratories Inc.) mediante el empleo de una resina y una minicolumna.

Se mezcla bien la solución *Wizard* ADN Clean-Up de la resina. Si hay presencia de cristales o agregados, se disuelve la resina por calentamiento a 37 °C durante 10

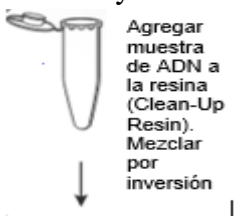
minutos. Se toma en cuenta que la resina en sí es insoluble. Se deja que se enfríe a 25-30 °C antes de su uso.

El volumen de la muestra está entre 50 y 500 µl. Si este volumen es menor a 50 µl, se lo lleva hasta un mínimo de 50 µl, para ello se agrega agua estéril.

- **La unión de DNA**

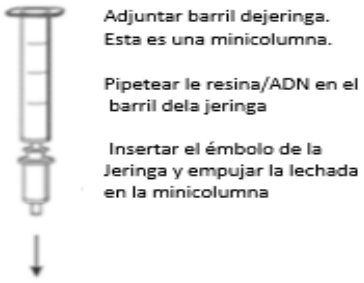
1. Se utiliza una Wizard mini columna para cada muestra. Se retira y deja de lado el émbolo de una jeringa desechable de 3 ml. Se conecta la jeringa barril a la extensión *Luer-Lok* de cada mini columna.

2. Se agrega 1 ml de ADN Wizard Clean-Up Resin (Resina) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añade la muestra (ADN > 50µl) al microtubo de la resina y se mezcla por inversión.



Fuente: (Promega Corporation, 2010)

3. Se pipetea la muestra de resina con ADN a la jeringa. Se inserta el émbolo de la jeringa lentamente y se empuja suavemente la suspensión en la minicolumna con el émbolo de la jeringa.

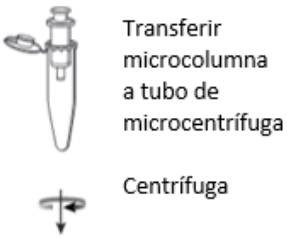


Fuente: (Promega Corporation, 2010)

- **Lavado**

4. Se separa la jeringa de la mini columna y se retira el émbolo de la jeringa. Se vuelve a colocar la jeringa barril a la mini columna. Se pipetean 2 ml de isopropanol al 80% en la jeringa. Nuevamente se vuelve a insertar el émbolo y se empuja la solución a través de la mini columna.
5. Se retira la jeringa del barril y la mini columna del tubo de 1,5 ml de microcentrífuga. Se centrifuga el tubo con el filtro a la velocidad máxima en una microcentrífuga durante 2 minutos para secar la resina.

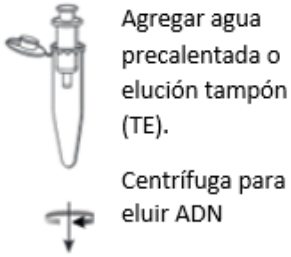
USC UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Fuente: (Promega Corporation, 2010)

- **La elución**

6. Se transfiere el filtro a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se aplican 50 ◘l de pre-calentado (65-70 °C), agua o tampón TE a la mini columna y se espera 1 minuto.
7. Se centrifuga la mini columna durante 20 segundos a velocidad máxima.



Fuente: (Promega Corporation, 2010)

El ADN se almacena en un tubo de microcentrífuga a -20 ° C.

Es necesario recalcar que para la secuenciación el gen fue del ADN ribosomal 16s y de la región variable V3. Para las secuenciaciones correspondientes a los genes de cada cepa bacteriana objeto de esta investigación se enviaron directamente los ADN bacterianos extraídos a la empresa Sur-Koreana MICROGEN, posteriormente fueron editadas y alineadas mediante el uso de la herramienta informática MEGA y cotejadas mediante el empleo de la herramienta BLAST (NCBI) para confirmar la identidad bacteriana a nivel de especie de cada una de las cepas.

3.6. Determinación del efecto de la apitoxina sobre las bacterias entéricas objeto de estudio: método de difusión en agar

La actividad antimicrobiana del veneno de abejas se la determinó a través del desarrollo de la metodología de antibiogramas o de disco difusión en agar, ejecutada para cultivos microbiológicos de tres especies de enterobacterias: *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella* Typhimurium, debidamente muestreadas a través de hisopados rectales de cuyes (*Cavia porcellus*) y de tejidos específicos: hígado, bazo y ganglios mesentéricos.

La metodología que se desarrolló corresponde a la que se ejecuta en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), por tanto el proceso es el siguiente:

1. Se preparan soluciones acuosas de apitoxina en concentraciones de interés en agua purificada.
2. Se preparan concentraciones de Tetraciclina® en agua ultrapura.
3. Se esterilizan los medios de cultivo Mueller-Hillton en solución, para las cepas de enterobacterias de interés, como placas Petri y discos de papel filtro durante 15 minutos y a 121°C.
4. Se embeben discos de papel de filtro estériles con 10µl de soluciones de apitoxina y tetraciclina de interés en agua purificada.
5. Se estandarizan los cultivos en caldo nutritivo y de cada cepa de enterobacteriana, ajustándose la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland (1,5 $*10^8$ UFC/ml).

Se realizan los cultivos microbianos de interés en medios sólidos (agares) en placas Petri y a partir de los inóculos estandarizados para cada cepa bacteriana. Se siembra con ayuda de un hisopo y en tres direcciones para correcta distribución del inóculo.

6. Se colocan los discos de papel filtro que portan 600 µg/ml), 700 µg/ml, 800 µg/ml y 900 µg/ml de apitoxina y 150 µg/ml tetraciclina respectivamente.
7. (Cada disco se embebe con 0,01ml de solución) con lo cual los discos impregnados con 600 µg/ml contendrán 6µg de apitoxina, los impregnados con 700, 800 o 900 µg/ml contendrán respectivamente, 7, 8 y 9 µg de apitoxina. Y para el caso de tetraciclina contendrán 1,5 µg de tetraciclina. Se hace con la ayuda de una pinza estéril y en las placas Petri inoculadas con el *microorganismo* de interés.
8. Se ubican los discos de papel con el antimicrobiano a distancia no menor a 24 mm de un disco a otro. Se hace una ligera presión en cada disco.
9. Se ponen a incubar las placas invertidas en estufa a 37°C, después de 15 minutos de la aplicación de los discos de papel. El tiempo de incubación es de 18 a 24 horas.
10. Se procede a las lecturas de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano a través de las escalas cualitativas: Sensible (S), Intermedio(I) y Resistente (R) (Cercenado y Saavedra, 2009 y Toroco, *et al*. 2006).
11. Para las lecturas de los halos de inhibición bacteriana, se toman en cuenta las experiencias y valoraciones dadas por Tatú, (1989); Pasterán y Galas (2008); Cercenado, et al. (2009); Jáuregui, et al. (2017b), quienes determinan para los diámetros de los halos de inhibición en pruebas de difusión en agar con apitoxina, 3 mm o más, Se considera Sensible (S); mayores a 2 mm y menores a 3 mm serán interpretadas como Intermedia (I), mientras que halos menores a 2 mm serán valorados como Resistentes (R).
12. Las placas Petri inoculadas se vuelven a la estufa a 37°C para nuevas lecturas a las 48 y 72 horas.
13. El ensayo se realiza para cada concentración y cepa bacteriana por un total de cinco veces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6.1. Ensayos del poder antimicrobiano de la apitoxina mediante la técnica de microdilución en placa (ver Anexo)

Las concentraciones mínimas inhibitorias CMIs de apitoxina en cepas de *Salmonella* obtenidas de medio ambiente y carne de pollo fueron determinadas mediante el método de microdilución en placa de microtiter. De acuerdo a las líneas generales de la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). La CMI fue definida como la concentración más baja de apitoxina que inhibe el crecimiento de *Salmonella*. De forma breve consiste en diluir el veneno de abeja o apitoxina en agua a una concentración inicial de 4096 µg/ml. Inmediatamente dicha dilución fue aún más diluída de foma seriada en caldo Mueller Hinton estéril hasta obtener una concentración final de 32 µg/ml. En una placa de poliestireno de 96 pocillos se colocan las diluciones de dicha apitoxina y a continuación se inoculan con las cepas de *Salmonella* de interés. Posteriormente se incuban las placas de microtiter en atmósfera húmeda a 37 ºC durante 24 h, tras lo cual se determinan las CMIs como la concentración más baja en la cual no se observa crecimiento bacteriano de forma visual. El líquido de los minituos de las placas de microtiter en los cuales no se observa crecimiento bacteriano de forma visual fueron transferidos a placas de agar nutriente para determinar la CMB (Concentración Mínima Bactericida). De este modo las placas fueron incubadas a 37 ºC durante 24 h y la concentración más baja en la que no hubo crecimiento bacteriano fue definida como la CMB.

3.6.2. Efecto de la apitoxina en la motilidad de Salmonella (ver Anexo)

Los efectos de concentraciones subinhibitorias de apitoxina sobre la motilidad de *Salmonella* fueron determinados usando un test de motilidad en un medio semisólido previamente descrito por Karatzas et al. (2008) tal cual se ha considerado en el apartado anterior correspondiente. Para el caso de los estudios con apitoxina, una dilución de apitoxina esterilizada mediante filtrado (0,22µm tamaño de poro) fue añadida al agar para obtener una placa con la mayor concentración subinhibitoria para cada cepa de Salmonalla ensayada. Cultivos de *Salmonella* (12h) fueron transferidos a placas control con el medio de movilidad y adicionadas de apitoxina mediante el empleo de torundas estériles. Las placas fueron incubadas a 37 ºC durante 24 h. El metabolismo de Salmonella tiene como resultado un color rojo al desplazarse las bacterias en el agar de movilidad debido a la reducción del cloruro de 2, 3, 5 triphenyltetrazolio a formazan. Finalmente, el porcentaje entre el lugar del inóculo y el borde del círculo rojo fue medido como test indicador de la movilidad, que fue realizado por triplicado.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6.3. Efecto de la apitoxina sobre la formación de biopelículas de *Salmonella* en poliestireno (ver Anexo)

La formación de biopelículas en microplacas de poliestireno fue determinada de acuerdo al método descrito por Stepanovic *et al.* (2004). De forma breve, un volumen

de 230µl de TSB fue añadido a cada pocillo en las placas de control, para las placas con apitoxina 230 µl de TSB suplementado con la más alta concentración sub-inhibitoria de apitoxina para cada una de las cepas de Salmonella probadas fue añadida a cada pocillo. Las cepas de *Salmonella* fueron incubadas en agar nutriente a 37 ºC durante 24 h. Tras la incubación las colonias de Salmonella fueron transferidas a solución salina (0,85% NaCl) para alcanzar una concentración final de 10^8 UFC/ml. Volúmenes de 20 µl de estas soluciones fueron añadidas a los pocillos de las placas de microtiter y las placas fueron incubadas a 28 ºC durante 24 h para promover la formación de biofilm por parte de *Salmonella*. Posteriormente las microplacas son vaciadas y lavadas tres veces con agua destilada para eliminar las células planctónicas de *Salmonella*. Una vez eliminadas las bacterias libres, las células de Salmonella adheridas a la pared de los pocillos fueron fijadas añadiendo 250µl de metanol durante 15 minutos. Posteriormente las microplacas son vaciadas de nuevo y 250µl de 0,1% solución de cristal violeta es añadida durante 5 minutos. El exceso de cristal violeta es eliminado mediante un flujo contínuo de agua. Luego el cristal violeta adherido a los pocillos es liberado empleando 250µl de una solución de ácido acético al 33%. Finalmente es leída la densidad óptica (OD) de cada pocillo mediante un lector de placas a 630 nm.

3.6.4. Test de destrucción de biopelícula (ver Anexo)

Tras preparar biopelículas tal y como se ha considerado en el apartado anterior y después de la incubación a 28 ºC durante 24 h, los pocillos son vaciados y lavados tres veces con agua destilada. Inmediatamente, los pocillos fueron llenados con 250µl de una solución de apitoxina con una concentración igual a la CMI de cada cepa. Pocillos con controles positvos para cada ceapa fueron llenados con agua destilada, y las placas fueron incubadas a 28 ºC durante 3 h. Tras la incubación los pocillos fueron vaciados y lavados tres veces con agua destilada y la densidad óptica fue medida tal como se consideró en el apartado anterior.

3.6.5. Extracción de RNA y reacción de Real Time PCR para cuantificar la expresión génica (ver Anexo)

El efecto de la apitoxina sobre la expresión génica de genes involucrados en la formación de biofilm, de la virulencia de *Salmonella*, así como RNAs pequeños fue estudiada para 3 cepas selecionadas (S. Enteritidis ET2, S. Typhimurium T22 y S. Newport Lhica N2), en medio control TSB, así como TSB suplementado con apitoxina, a los niveles subinhibitorios más altos encontrados para cada una de las cepas de *Salmonella*. Un volumen de 10 ml de TSB control, así como TSB con apitoxina, se inoculó con 10^3 UFC/ml de cada cepa probada e incubada a 37 ºC durante 24h. Tras la incubación, los pellets de *Salmonella* fueron obtenidos por centrifugación a 3500 revoluciones/minuto y durante 15 minutos. El pellet fue resuspendido en 1 ml de TRIzol™ y el ARN total fue obtenido siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN fue determinada mediante el uso de un fluorómetro portátil Qubit™.

El RNA total fue transcrito de forma reversa a ADA complementario (ADNc) empleando el Kit de alta capacidad de Transcriptasa Reversa de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La expresión de los genes de interés tal cual se indicaron anteriormente fue cuantificada mediante reacciones de PCR cuantitativa (20µl) compuesta del siguiente modo:

- 10µl de 2X POWER SYBR Green Mastermix
- 0,8 µl de cada cebador (10mM)
- 2µl de cDNA
- 6,4 µl de agua libre de ARNsas.

Las reacciones fueron llevadas a cabo usando el QuantStudio 12K Flex *Real-Time* PCR empleando las siguientes condiciones:

- desnaturalización inicial a 95 ºC durante 10 m.
- seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 ºC durante 15 s y extensión a 60 ºC durante 60s y un ciclo final de 15 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC seguido de un paso de disociación de 15s a 95 ºC. La cuantificación de la expresión del gen 16 ARNr fue usado para normalizar todas las reacciones.

Los niveles de expresión de los genes diana en comparación con el control interno del 16 rRNA fue evaluado usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak y Schmittgen (2001).

3.7. Evaluación de las poblaciones de enterobacterias en cuyes tratados con apitoxina

Para dar cumplimiento con esta fase de la investigación, se desarrollan pruebas de campo con cuyes que son infectados de forma directa y tratados con dosis de apitoxina y tetraciclina, dejándose además animales sin tratamiento alguno, considerados como grupo control o testigo.

De igual manera se hacen controles de recuentos de UFC a partir de muestras mediante hisopados rectales y muestras tisulares de órganos tales como ganglios mesentéricos, tanto de animales de los grupos ensayo como del control.

Finalmente, se hace un control de presencia de reacciones, síntomas y muertes de cuyes sometidos a los ensayos, así como también el control de pesos corporales en los cobayos. Los procesos fueron los siguientes:

3.7.1. Pruebas de campo en cuyes infectados con patógenos y tratados con apitoxina

El ensayo de campo se lo organizó con 450 cuyes de 2 y 3 meses de edad, machos y hembras, distribuidos en tres grupos, uno por cada bacteria de interés, cada grupo integrado por 5 sub-grupos, en cada una se incluyeron 6 unidades experimentales, cada unidad experimental (UE) integrada por 5 cuyes. Se emplearon cuatro concentraciones de apitoxina (900 µg/ml, 800 µg/ml, 700 µg/ml, 600 µg/ml) una de tetraciclina (150 µg/ml), además la unidad testigo absoluto sin producto alguno (0,0 µg/ml).



Figura 10. Distribución de los cuyes en jaulas para el ensayo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

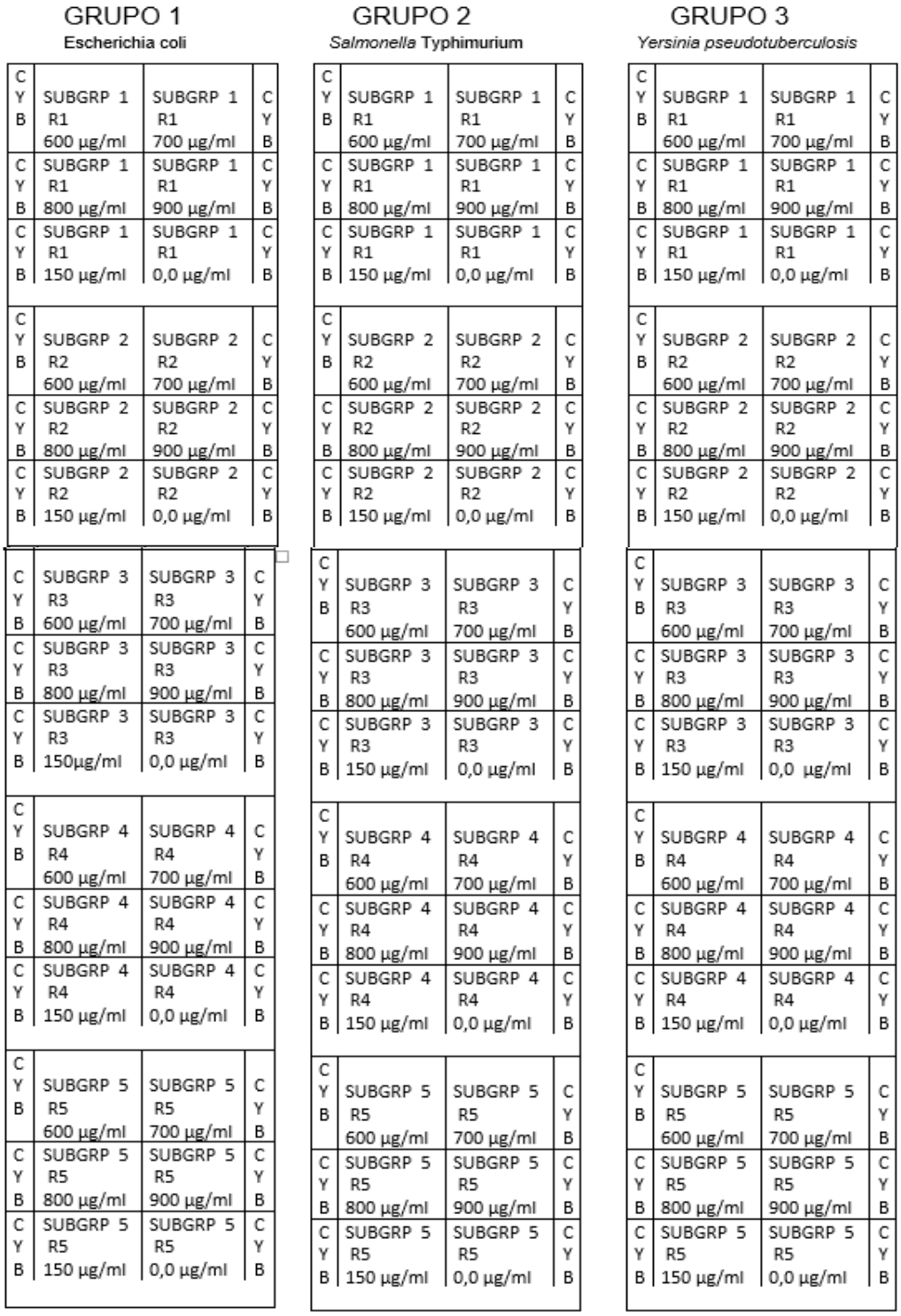


Figura 11. Representación de la distribución de los cuyes para el ensayo

Nota: Una UE= 5 cuyes, Las 6 unidades de cada sub-grupo y repetición (excepto el grupo control) recibieron vía parenteral dosis diarias: a) de **apitoxina** en solución y a concentraciones de µg por ml de agua de calidad Milli-Q esto es: 600 µg/dosis/día; 700 µg/dosis/día; 800 µg/dosis/día y 900 µg/dosis/día; b) de Tetraciclina 150 µg/dosis/día; además, la unidad control 0,0, sin producto alguno.

Para facilidad de manejo, a cada subgrupo de animales se los ubicó en jaulas de malla metálica (cuadros de 1 cm por 1 cm); con dimensiones de 1,50 m de largo por 1,50 m de ancho y 0,80 m de profundidad, con una tapa de la misma malla. A esta área se la dividió con esta malla en espacios cuadrados de 0,50 m por lado, con áreas laterales

de 0,25 m para comederos y bebederos, de manera que en cada uno de estos espacios se ubicó a una unidad experimental. Las distribuciones permitieron que todos los animales dispongan de comida y bebida. Lo dicho se puede constatar tanto en la Figuras 10 como la Figura 11.

De igual manera, en busca de facilitar el manejo específico de cada unidad experimental, tanto para la administración de las respectivas dosis de apitoxina, de tetraciclina, como para la tomas de muestras mediante hisopados rectales y controles de peso corporal vivo se procedió a separar a la unidad experimental a tratarse en una bandeja plástica fuera de la jaula. Una vez terminada la actividad se devuelven los animales a su respectiva ubicación como unidad experimental.

A los cinco cuyes de la unidad experimental (UE) y de cada subgrupo o repetición se los infectó vía oral con 1 ml de caldo cultivo, con 1,5 $x10^8$ bacterias patógenas de interés (estándar de McFarland 0,5), con la finalidad de contar con cuyes clínicamente enfermos. En cada subgrupo se dejó una unidad experimental sin tratamiento como unidad testigo absoluto.

A partir de las concentraciones de productos (apitoxina y tetraciclina) en investigación, tal como se señala en apartados anteriores y de acuerdo con los estudios de difusión en agar, se procedió a trasladar estas dosis de apitoxina y tetraciclina a tratamientos de campo, para lo cual se administraron a las unidades experimentales, debidamente identificadas, en cada sub-gupo y repetición, tres dosis por vía subcutánea, una dosis cada 24 horas y de concentraciones de apitoxina 900 µg/dosis/día, 800 µg/dosis/día, 700 µg/dosis/día, 600 µg/dosis/día, de tetraciclina 150 µg/dosis/día y para el grupo testigo 0.0 µg/0 producto.

Es necesario recalcar que para cada dosificación parenteral (subcutánea), se emplearon jeringuillas y agujas hipodérmicas desechables, una por cuy y por dosis, tratamientos realizados con toda la asepsia.

Tanto las 0 horas, antes del ensayo, como a las 24, 48 y 72 horas de iniciado el tratamiento con dosis parenterales de apitoxina, tetraciclina y grupo testigo, se tomaron muestras con hisopos QUICK SWAB (3M), uno por cuy y por muestra, cada hisopo cuenta con 1ml de caldo cultivo estéril. De igual manera, en los tiempos antes señalados, se eligió aleatoriamente, un cuy de cada UE, tratamiento de producto (apitoxina, Tetraciclina y testigo absoluto), de cada repetición y bacteria de interés, para la toma de muestras a partir de los ganglios mesentéricos.

USC
DE ZOOTECNIA
DE COMESTELA

Después de realizados los muestreos para siembras bacterianas y recuento de colonias a partir de, mediante hisopados rectales y muestras de tejidos, el número de cuyes se redujo a 90, los que fueron examinados todos los días para verificar su comportamiento y la presencia de cuyes con síntomas de reacciones a las dosis de productos administrados, así como la posibilidad de cuyes muertos.

Se controlaron los pesos corporales de los 90 cuyes, una vez a los 7 días de iniciado el ensayo, para que haya certeza de contar con cuyes viables; un segundo control de pesos corporales a los 21 días con la finalidad de conocer si hubo ganancia de peso corporal, en relación a 15 días transcurridos entre un pesaje y otro y a los tratamientos recibidos.

3.7.2. Muestreo con hisopados rectales y tisulares para recuento de enterobacterias

Se procede de la siguiente manera:

a. A los cuyes infectados vía oral, tratados con apitoxina y tetraciclina, así como los de los grupos testigos absolutos que no reciben producto alguno, como ya fue explicado en apartados anteriores, se les toman muestras de heces y de tejidos como ganglios mesentéricos destinados al recuento de bacterias (UFC/g).

b. A las 0, 24, 48 y 72 horas de iniciado el ensayo de campo, se toman las muestras mediante hisopados rectales a todos los cuyes, para ello es necesario dos personas, siempre los mismos operarios hacen el trabajo, una sujeta al animal y la otra toma la muestra con hisopos QUICK SWAB (3M).

c. De igual manera, a las horas antes señaladas, se elige aleatoriamente a un cuy por unidad experimental de los tratamientos y de la unidad testigo absoluto, estos animales se sacrifican mediante electronarcosis, con una descarga eléctrica de 110 voltios, de manera que se induzca al menor sufrimiento posible. Se realiza la disección respectiva y se toman muestras de ganglios mesentéricos. Cada muestra tisular se deposita en tubos por separado, bien identificados y con 10 ml de caldo de cultivo.

d. En el laboratorio, se hacen cultivos de cada bacteria en estudio y en caldo nutritivo estéril, a partir de éstos se hacen diluciones decimales seriadas. De estas diluciones se toma 1ml y se siembra “en masa” en medios específicos para cada bacteria de interés, o bien alícuotas de 100µl se siembran en superficie de medios solidificados previamente en placa y correctamente identificados, mediante el empleo de asa de Drigalsky.

e. Se incuban las placas, en posición invertida, a 37°C durante 18 - 24 horas.

USC
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

f. Se hace el conteo de las colonias de las placas que tienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC” (Camacho, *et al*. 2009).

g. Las lecturas se hacen sin abrir las placas, se emplea contador de colonias. El

recuento se multiplica por el factor de dilución correspondiente y se hace la media con los resultados obtenidos para cada una de las placas que resulten contables (25-250 colonias), multiplicado por su factor de dilución correspondiente.

3.7.3. Controles de efectos colaterales y ganancia de pesos corporales

Para la variable efectos colaterales, iniciado el ensayo para el tratamiento de los cuyes con productos (apitoxina, Tetraciclina y 0,0 producto) para las tres bacterias de interés, todos los días, tanto por la mañana como por la tarde, se realizarán observaciones de los cuyes, en busca la presencia de reacciones secundarias, de síntomas tales como elevación de temperatura corporal, dificultades respiratorias, taquicardia, decaimiento, erizamiento de pelos, falta de apetito, entre otros, así como la posible presencia de animales muertos.

A los animales que demuestren comportamiento diferente en relación a los compañeros de grupo, tal es el caso de aislamiento, jadeo, falta de apetito, se les controlará la temperatura corporal (37 a 39°C), frecuencia respiratoria (40 a 150 respira/minuto), latidos cardíacos (250 a 350 latidos/minuto).

A los cuyes con reacciones secundarias se les administrará epinefrina, vía subcutánea, en dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal, para lo que se diluye 1 ml de epinefrina (presentación de 1mg/ml) en 9 ml de solución fisiológica. Una dosis cada 24 horas, según los casos.

Para la variable ganancia de peso corporal, se procedió a pesar uno por uno a todos los cuyes, identificados con un arete auricular, mediante el uso de una bandeja plástica preparada para el efecto y una balanza con escala de gramos; se hace el tarado de la balanza con la bandeja previamente a colocar los animales, para que el peso de cada cuy sea neto. Este procedimiento se realizó a los 7 y 21 días de iniciado el ensayo; al valor resultante de la diferencia entre estos dos registros de pesos se lo consideró como ganancia de peso corporal vivo en 15 días de ensayo.

3.7.4. Análisis estadístico

Para la variable diámetro en milímetros de los halos en cultivos de las tres bacterias de interés, se utilizó el paquete de software Statistix 9.0 SPSS 18 para Windows (SPSS Inc. Chicago, USA). Cada experimento se desarrolló con cinco repeticiones, para lo cual se emplearos dosis de los productos: apitoxina 600mg/ml, 700 mg/ml, 800 mg/ml y 900 mg/ml, así como del antibiótico tetraciclina 150 mg/ml. Se realizaron pruebas de sensibilidad bacteriana a través del método disco-difusión. Las lecturas de los halos se realizaron mediante el uso de Vernier graduado hasta décimas de milímetro, tanto a las 24, 48 y 72 horas de incubación de los cultivos a 37°C.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El test T fue usado para determinar el nivel de significación en la motilidad de *Salmonella entérica*, formación y destrucción de biopelículas. Un test de ANOVA fue usado para determinar las diferencias en los perfiles de transcripción.

Para los recuentos de bacterias a partir de hisopados rectales y tejidos de cuyes en tratamiento y testigo, debido a que se trata de una variable cuantitativa, se utiliza un modelo lineal generalizado de Poisson, con un análisis de *deviance* y una prueba de verosimilitud, donde se desarrolla la prueba de X^2 de Poisson, para lo cual se empleó el Programa R Project versión 3.4.3, de tal manera que se presentan seis respuestas, tres para hisopados y tres para tejidos por cada una de las bacterias de interés.

Para la variable ganancia de pesos corporales de los cuyes en tratamiento se realizó un ANOVA con el fin de evaluar la significancia de la variabilidad entre los factores: producto dado en dosis de apitoxina y Tetraciclina y bacterias de interés. Programa R. Project versión 3.2.3.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Cosecha de apitoxina

Los resultados de la cosecha de apitoxina son los que a continuación se presentan:

En las cinco colectas de apitoxina realizadas en los cinco apiarios y en las cinco colmenas de cada uno de ellos, se obtuvieron valores medios que oscilan entre 34,348 y 39,852 mg por apiario. Como se puede apreciar en la Tabla 7, existe variabilidad en la producción de apitoxina por colecta y por apiario, así como en las medias de producción para cada una de las localidades.

Tabla 7. Cosecha de apitoxina en cinco apiarios seleccionados en la provincia de Imbabura

COSECHA	EL INCA	CARANQUI	CHALTURA	COTACACHI	ECAA
1	34,70	37,78	38,92	39,36	39,60
2	34,12	34,54	29,14	39,02	39,62
3	34,06	37,56	39,62	39,98	39,92
4	30,80	35,74	39,12	39,94	40,00
5	38,06	36,94	39,46	39,50	40,12
MEDIAS:	34,348	36,512	37,252	39,552	39,852

En la Figura 12 se señalan los valores individuales de cada una de las cinco colectas, en las cinco colmenas y que integran los cinco apiarios seleccionados en la provincia de Imbabura; se evidencia una producción muy heterogénea en las colmenas correspondientes a los apiarios de El Inca, Caranqui y Chaltura, mientras que los de Cotacachi y Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) son los más homogéneos y tienen una producción media similar.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

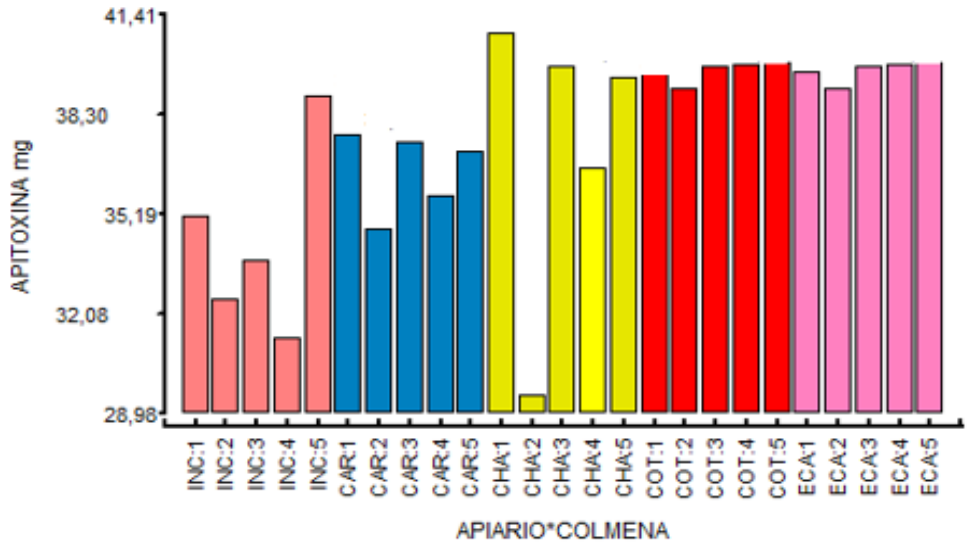


Figura 12. Niveles de producción de apitoxina en mg por colmenas y apiarios de Imbabura.
Nota: INC: apiario el Inca, CAR: apiario el Caranqui, CHA: apiario el Chaltura, COT: apiario el Cotacachi, ECA: apiario ECAA.

En Imbabura y en los sectores de Pimampiro, el Inca, y el Caranqui, la deforestación ha afectado directamente a la apicultura; en el primer caso la agricultura ha crecido de manera agresiva, con ella la aplicación de fitosanitarios que afectan a los apiarios; para el caso de Caranqui y Chaltura, el desarrollo de la agricultura minifundista y el urbanismo han invadido estos sectores y con ello la afectación a los apiarios cercanos a estos sectores, antecedentes que se reflejan en la producción también de apitoxina.

Para el caso de Cotacachi y la ECAA, poseen ambientes naturales diferentes, y se mantiene diversidad de vegetación melífera, de manera especial con bosque de ecucalipto (*Eucalyptus globulus*), presencia significativa de cholán (*Tacoma stans*), el arrayán (*Luma apiculata*), el tilo (*Tilo platyphillos*). Esta sería una de las causas para la diferencia de producción de apitoxina. De igual manera en Cotacachi y la ECAA prima un mejor manejo de las colmenas en los apiarios, no así en El Inca, Caranqui y Chaltura, donde se nota que hay descuido en especial en suplir a las colmenas con alimentación azucarada en épocas de escases de floración natural.

4.1.2. Caracterización de la apitoxina (melitina)

Las colectas realizadas en los diferentes apiarios seleccionados en la provincia de Imbabura, fueron analizadas con el empleo del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se dispone en los Laboratorios de Química de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, que a su vez pertenencen a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, En la Figura 13 se puede ver una imagen de dicho equipo.



Figura 13. Imagen del HPLC JASCO®. LC-Net II/ADC, con componentes y accesorios:

En la Figura 14 se aprecia un cromatograma en el que se ve la elución de los principales componentes de la apitoxina: apamina a los 9,0 minutos, PLA_2 a los 20,1 minutos y melitina a los 28,3 minutos, con un porcentaje de área de 40,919, y % de altura 36,188, lecturas que se las puede evidenciar también en la Tabla 8

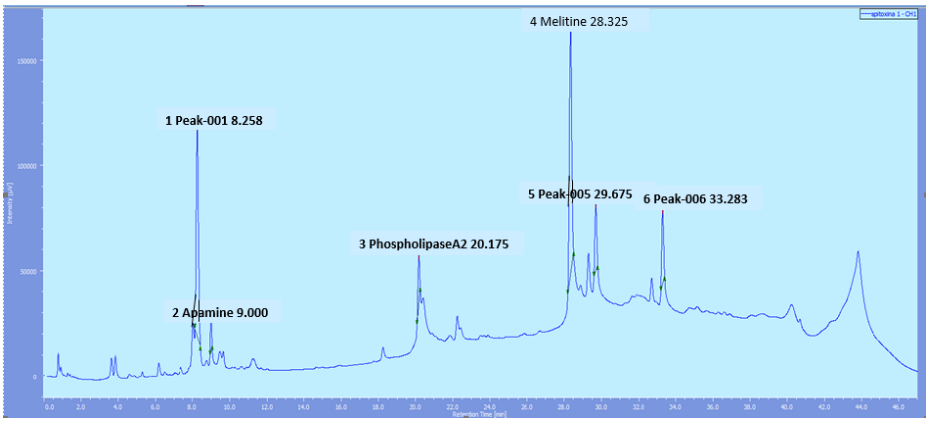


Figura 14. Cromatografía de una muestra de apitoxina en la que se aprecia el pico de la melitina (imágenes en pantalla)

Tabla 8. Registros del cromatograma con la separación de los distintos compuestos de la apitoxina, a partir de colectas de apiarios del presente estudio.

#	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Peak-001	1	8.258	801410	99210	32.117	30.613	N/A	22412	4.310	1.183	
2	Apamine	1	9.000	75401	17333	3.022	5.349	N/A	83704	75.839	0.936	
3	PhospholipaseA2	1	20.175	136365	22803	5.465	7.036	N/A	222264	40.042	0.886	
4	Melitine	1	28.325	1021050	117277	40.919	36.188	N/A	228577	6.250	1.036	
5	Peak-005	1	29.675	221453	32076	8.875	9.898	N/A	366063	18.659	1.044	
6	Peak-006	1	33.283	239640	35378	9.604	10.917	N/A	483771	N/A	1.048	

Los datos presentados mantienen una cierta similitud con los resultados encontrados por Rybak *et al.*(2004); esto es, melitina a los 28 minutos y con un pico

del 65% de área, PLA2 a los 20 minutos y con un pico del 12,98% de área, así como la apamina a los 9 minutos y con un pico del 3,13% de área.

En la Tabla 9 se puede ver la cantidad de apitoxina, nivel de melitina, valoraciones de color, textura, edad de colmenas y número de alzas por colmena en los apiarios considerados. Se presentan ligeras variaciónes tal y como señalan Rybak y Skubida (2007), citado por Araneda *et al.* (2011) y se ajustan a la escala de Lima y Brocheto-Braga (2003).

Tabla 9. Evaluación de muestras de apitoxina de cinco apiarios de la provincia de Imbabura, mediante HPLC y comparaciones de características cuantitativas y cualitativas.

Fecha	Apiario	Cantidad de Apitoxina (mg)	promedio de melitina para los 5 apiarios (µg/ml)	Color, Textura Apitoxina	Edad de colmenas (años)	Número de alzas por colmena
18/04/2016	El Inca	28		B/G	1-1,5	1-2
26/04/2016	Caranqui	31		B/G	2-3	2-3
15/05/2016	Chaltura	30	129,5	B/G	2-3	2-3
30/05/2016	Cotacachi	29		B/G	1-1,5	1-2
12/05/2016	ECAA	31		B/G	2-3	2-3

Nota: B/G= blanquecina/granular.

Es necesario destacar que, en consideración a los resultados obtenidos con las muestras de colectas en los diferentes apiario, en cuanto a contenidos de melitina, principal componente de la apitoxina, se decidió mezclar las colectas para utilizarlas como muestra común, incluso en base a las ligeras variaciones, entre 1 y 3 mg, en lo referente a cantidades de apitoxina por apiario delas colectas.

4.2. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de bacterias enteropatógenas para cuyes

4.2.1. Aislamiento e identificación de enterobacterias

Como parte del resultado referente al estudio del factor uno de esta investigación; esto es, la presencia de bacterias enteropatógernas para los cobayos en la provincia de Imbabura a partir de muestreos, tanto mediante hisopados rectales como muestras tisulares de ganglios mesentéricos, cultivos bacteriológicos específicos, pruebas morfológicas, de tinción Gram y bioquímicas, se identificaron cepas enterobacterianas: *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium y *Yersinia pseudotuberculosis,* tal como se evidencia en la Figura 15: a, b y c, que corresponden, en su orden, a las tres especies bacterianas.

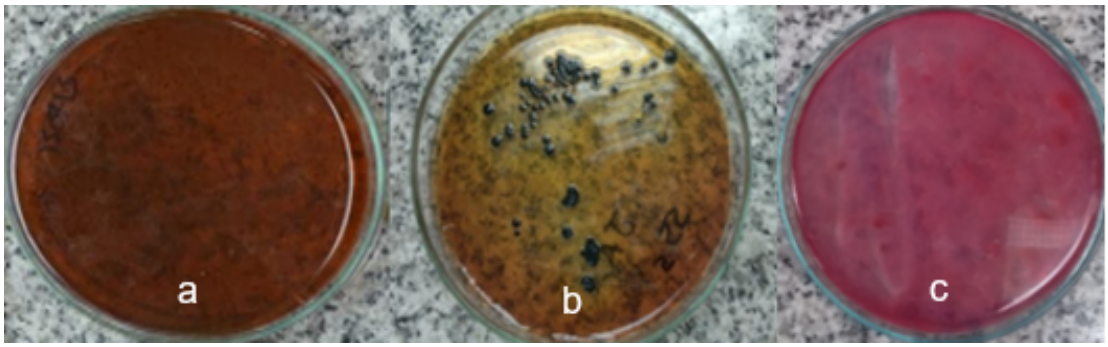


Figura 15. Placas Petri con cepas de bacterias: a). Escherichia coli, b) Salmonella Typhimurium y c). Yersinia pseudotuberculosis

4.2.2. Caracterización molecular de las enterobacterias

Las tres enterobacterias aisladas como agentes causales de enfermedades en los cuyes objeto de estudio fueron identificadas, primero en base a características morfológicas, funcionales y posteriormente mediante secuenciación del gen ribosomal de la subunidad 16s, región variable V3. Las secuencias de los genes correspondientes a cada cepa bacteriana objeto de esta investigación se obtuvieron mediante los servicios de la empresa Sur-Koreana MCROGEN, posteriormente se editaron y alinearon con el uso de un recurso informático MEGA, se cotejaron mediante BLAST (NCBI), confirmándose la identidad bacteriana a nivel de especie de cada una de las cepas.

Los *primers* empleados, así como las secuencias obtenidas se indican a continuación:

4.2.3. Amplificación del gen ADNr 16S

La amplificación del gen ADNr 16s se realiza en dos fases mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la primera fase se utilizan cebadores universales para el dominio bacterias, 907r (926r) y P3(341f).

El segundo paso consiste en una PCR anidada de la región V3 del gen 16S del ADNr; para esto se usan los cebadores P3 (341f) y P2 (534r) y el molde de ADN procedente de la PCR mediante el empleo del cebador 907r. El cebador P3 contiene 40 bases de GC los cuales ayudan a la disgregación en el análisis de DGGE.

A continuación, en las Tablas: 10, 11 y 12, se presentan las secuencias para cada una de las cepas bacterianas, en su orden: *Escherichia coli, Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium, así como de *Yersinia pseudotuberculosis.* Asimismo en la Tabla 13 se expone un resumen de las identificaciones de las tres presuntas bacterias patógenas.

Tabla 10. Secuencia de 599 pares de bases determinada para presunta *Escherichia coli strain H105 Sequence ID: CP021454.1 longitud: 4978342 Range 1: 456411 to 457010 GenBankGraphics*

```
TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
ATTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAG
ACGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAG
AATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGA
AATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGA
AATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGC
CATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGC
CGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CAGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAG
CGATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAG
CGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATAC
GTTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAG
GTA
```

Tabla 11. Secuencia de 340 pares de bases determinada para presunta *Salmonella entérica subsp. entérica serovar Typhimurium strain 01ST04081 Sequence ID: CP029840.1 Length: 4870227. Range 1: 289587 to 289926 GenBankGraphics*

```
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGA
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GCGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG
GATGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG
GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTT
GTTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTT
GTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAATGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTT
GTGCCCTCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTG
TGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGACGTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGTGAGGCGTGGCTTCCGGACGTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAG
```

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 12. Secuencia de 273 pares de bases determinada para presunta *Yersinia pseudotuberculosis PB1/+ Sequence ID: Length: 4695575. Range 1: 3943042 to 3943315* GenBankGraphics

GTTTACTCATTAAAGATTTTCGCAATATCGAATCGGCAGACTTGGCGCTGGCGGCGGGCTT
TAAGTGGCAAAACCAGTGTACTCGAGGCGGTTTATACCCTTGGTCATGGTAGGGCGTAGTT
TGCAAAGTGATACGTCACGAATGTGCTGAGTTTGGTTGCTTTCATAATGAACCCGACGGCC
TGGAGCAACCTAAAAAGGTTACTCAAGCTATGGCGACGCCGCGCTGCGCCAGGTTAGTCG
CTATACGCAAATCCGGGCTTGGGATCAGGATGAGCGTATCAGTGAATGGCGAGCGGCATA
CAGTGACGCGATTGCGGCGGATATTTCAGCCACTGTTCCTGCCAGAGTTCGCCCTGAGTTT
CTTTTTCCAGCGCGGCTGGGATAAAGAGAGTGACTTTCCGTGCGCACTGCGGTTAGCGCA
GGGTGAGTTTCTCACCCGACAGAGCGGGCGGCGTTGCCTGTAACGATTTTGCTTCCGAATT
GGACACCGGCCGCCGTCGATTGCTGGCCGAGCGTTTGAAAGCTACCCAGGCAGCGCAAC
AAGTTTTTGCCGATATGGTAGGTGAAAAG|

De tal forma que la identidad de las cepas bacterianas corresponde a: *Escherichia coli, Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella entérica subespecie serovar* Typhimurium, habiéndose obtenido las mismas a través de hisopados rectales de cuyes vivos y muestras tisulares de ganglios mesentéricos de cuyes sacrificados para este fin. Para estos trabajos se contó con el apoyo de los laboratorios de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI) y con la colaboración de los laboratorios MACROGEN (Korea).

Los porcentajes de identidad de estas secuenciaciónes en términos de identificación se pueden ver en la Tabla 13 a continuación:

Tabla 13. Porcentajes de identidad de las tres bacterias enteropatógenas objeto de esta investigación.

CÓDIGO	SECUENCIA REPRESENTATIVA	PORCENTAJE DE IDENTIDAD	ID NCBI
A1	*Yersinia pseudotuberculosis*	87	CP009780.1
A2	*Salmonella Entérica subespecie entérica serovar* Typhimurium	100	CP029840.1
A3	*Escherichia coli*	100	CP021454.1

Nota Fuente: laboratorios MACROGEN (Korea).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De tal manera que de acuerdo con las afirmaciones hechas por Caycedo, *et al* (2011); Amaguaña (2012); Chauca (2013); Ortega, *et al* (2015) y Layme, *et al* (2015), en la zona andina de América Latina, en los países como Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú que se crían cuyes, el problema de las enterobacterias como agentes *depredadores*

de esta línea de producción zootécnica está dado por la presencia de las especies bacterianas; *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, para el caso de Ecuador.

Así se confirma la identidad de las tres cepas bacterianas que, para la provincia de Imbabura, los casos de *Salmonellosis,* son para unos casos causada por *S. entérica,* serotipo Typhimurium*,* hoy perfectamente identificada como tal aunque también puede haber otros serotipos. Se trata en el caso de *Salmonella* del patógeno considerado como el que más perjuicios ha causado a medianos y pequeños productores de cuyes.

4.3. Acción inhibitoria de la apitoxina: método de difusión en agar

Una vez realizados los respectivos cultivos bacterianos y antibiogramas, mediante la metodología de disco-difusión en los laboratorios de Microbiología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), se procedió a las lecturas de los halos de la siguiente manera:

a. Lecturas de halos de Inhibición tras 24 horas de incubación.

De acuerdo con el análisis de varianza para el producto (apitoxina y Tetraciclina) y tiempo en horas se encuentran diferencias estadísticamente significativas ya que se presentaron valores de p<0,05. De igual manera, de conformidad con la Figura 16, se demuestra que hay diferencia significativa entre la dosis de apitoxina de 600 µg/ml (B) para las tres bacterias de interés con (A) Tetraciclina 150 µg/ml y (A) apitoxina 900 µg/ml para las tres bacterias, incluso con (A) 800 µg/ml de apitoxina y tanto para *Salmonella* Typhimurium como para *Yersinia pseudotuberculosis*.

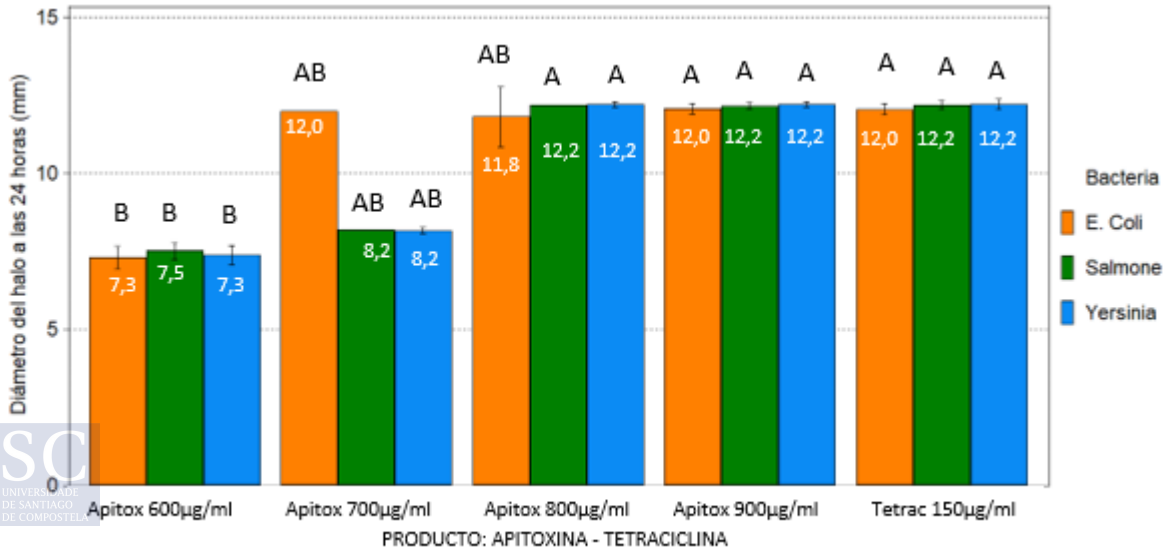


Figura 16. Valor de los halos de inhibición tras 24 horas de incubación.
Nota: A, AB y B=destacar que cuando dos medias no comparten una misma letra son significativamente diferentes (p<0,05). Si tienen notaciones idénticas no presentan diferencia significativa entre los valores de las medias. Bacterias: *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*.

b. Lecturas de Halos Inhibitorios a las 48 horas de iniciados los antibiogramas

De acuerdo con lo indicado en la Figura 17 al comparar las medias de los grupos correspondientes a los productos (apitoxina y Tetraciclina), en tras 48 horas de incubación de los cultivos bacterianos de interés, se encuentran diferencias significativas entre (B) dosis de 600 µg/ml de apitoxina y (A) correspondiente, tanto a Tetraciclina 150 µg/ml, (A) para 900 µg/ml de apitoxina para las tres bacterias de interés, incluso con A 800 µg/ml de apitoxina, ya sea para *Salmonella* Typhimurium como para *Yersinia pseudotuberculosis*; es decir, lecturas iguales que a la 24 horas de incubación de los cultivos bacterianos.

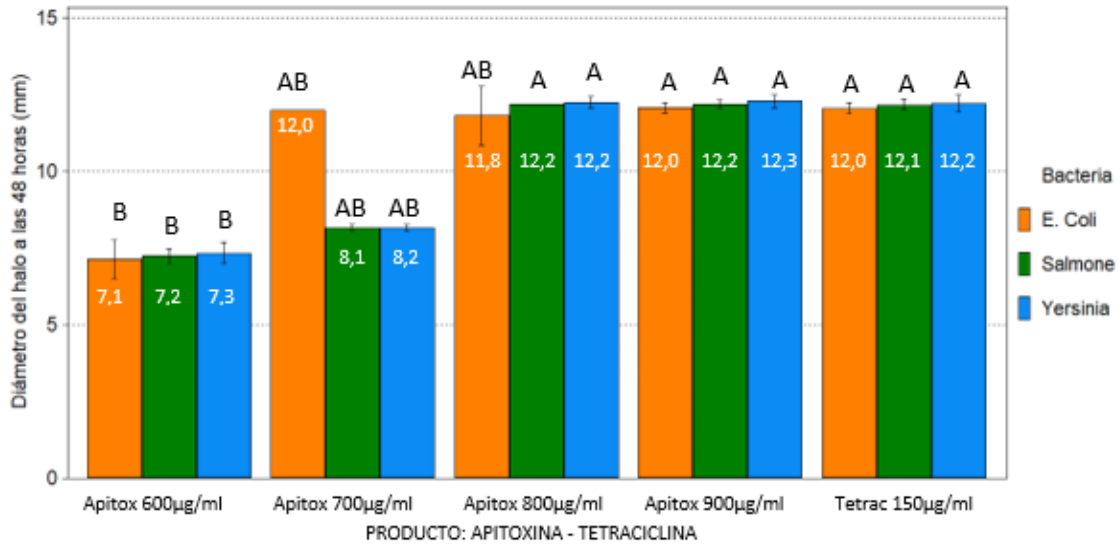


Figura 17. Valor de los halos de inhibición tras 48 horas de incubación.
Nota: A, AB y B=indican que cuando dos medias no comparten una misma letra son significativamente diferentes. Si tienen notaciones idénticas no presentan diferencia significativa entre los valores de la media. Bacterias: *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*.

c. Lecturas de Halos de Inhibición a las 72 horas de iniciados los antibiogramas

En la Figura 18, se puede ver similares resultados de comparación con las medias de grupos dados por productos (apitoxina y Tetraciclina) tras 72 horas de incubación, encontrándose diferencias significativas entre (B) correspondiente a 600 µg/ml de apitoxina y (A), tanto de Tetraciclina 150 µg/ml como con 900 µg/ml de apitoxina para las tres bacterias de interés; además, con (A) 800 µg/ml de apitoxina para *Yersinia pseudotuberculosis* como con *Salmonella* Typhimurium.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

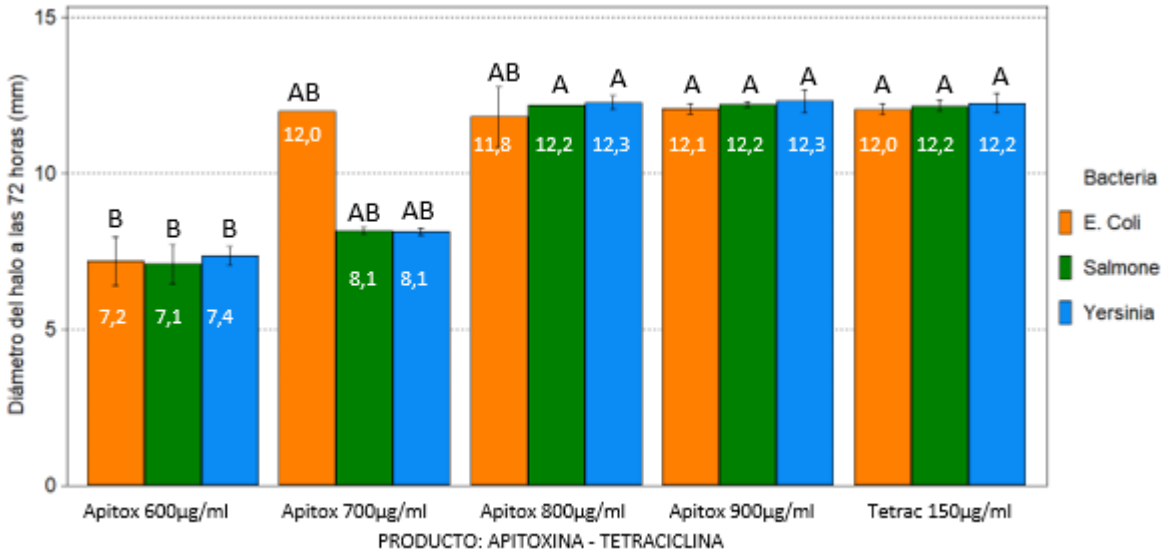


Figura 18. Valor de los halos de inhibición tras 72 horas de incubación.
Nota: A, AB y B= Determinan el hecho manifiesto por la presencia de dos medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes. Si tienen notaciones idénticas no presentan diferencia significativa entre los valores de las medias. Bactarias *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*.

La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición sean el método para establecer diferencias entre microorganismos sensibles y resistentes. Para el caso de la investigación, cada disco de papel filtro porta 10 mg de agua y, por tanto, 7 µg, 8 µg y 9 µg de apitoxina, así como 1,5 µg de Tetraciclina; productos antibacterianos que, para dan un halo de 12 mm de diámetro.

4.3.1. Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Concentraciones bactericidas mediante el método de microdilución en placa para *Salmonella* (ver Anexo)

La actividad antimicrobiana de la apitoxina se evaluó frente a 16 cepas de *Salmonella*. La Tabla 14 muestra los valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y CMB (Concentración Mínima Bactericida) para cada cepa en presencia de apitoxina. El valor más alto de CMI fue observado en la cepa S. entérica, subespecie entérica LHICA SA3, alcanzando 1.024 µg/ml en presencia de apitoxina. El valor más bajo de CMI observado fue de 256 µg/ml. Sin embargo, 512 µg/ml fue el valor más común de CMI observado. Todas las cepas presentaron el mismo CMI y CMB con la excepción del S. Typhimurium LHICA T21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 14: Concentraciones Mínimas inhibitorias y Concentraciones Mínimas Bactericidas de la Apitoxina frente a diversos serotipos de Salmonella enterica.

Cepa	Código	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
S. Newport	Lhica N2	512	512
S. Isangi	Lhica IG1	512	512
S. enterica subsp. salamae	Lhica SA3	1024	1024
S. Bardo	Lhica B3	512	512
S. Infantis	Lhica I7	512	512
S. Infantis	Lhica I17	512	512
S. Montevideo	Lhica M1	512	512
S. Stanleyville	Lhica ST1	512	512
S. Ndolo	Lhica ND5	512	512
S. Dabou	Lhica DA1	512	512
S. Typhimurium	Lhica T11	512	512
S. Typhimurium	Lhica T14	512	512
S. Typhimurium	Lhica T21	256	512
S. Typhimurium	Lhica T22	512	512
S. Typhimurium	Lhica T24	512	512
S. Enteritidis	Lhica ET2	512	512

4.3.2. Estudio del efecto de la apitoxina sobre la movilidad de cepas de *Salmonella* y la formación de biopelículas (ver Anexo)

La influencia de las concentraciones subinhibitorias de apitoxina en la motilidad de la *Salmonella* fue también evaluada. Los resultados observados en este estudio mostraron que la presencia de apitoxina en el agar influye en la motilidad de *Salmonella*. En este sentido, un total de 14 cepas aumentaron significativamente su motilidad en presencia de concentraciones subinhibitorias de apitoxina (Tabla 15). Sólo las cepas S. Isangi IG1 y S. Infantis I17 no muestran ninguna influencia de la apitoxina en su movilidad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 15: Efecto de la Apitoxina en la movilidad en agar para varios serotipos de Salmonella entérica.

Cepa	Código	Control	Apitoxina
S. Newport	Lhica N2	20,67±1,53	31,33±1,53**
S. Isangi	Lhica IG1	18,17±1,76	17,33±2,08
S. enterica subsp. salamae	Lhica SA3	17,67±0,58	29,33±1,53***
S. Bardo	Lhica B3	14,33±0,58	20,33±1,15**
S. Infantis	Lhica I7	14,33±0,58	23,00±1,00***
S. Infantis	Lhica I17	12,67±1,53	13,67±1,53
S. Montevideo	Lhica M1	13,17±0,76	17,33±1,55**
S. Stanleyville	Lhica ST1	15,00±1,00	22,00±1,00**
S. Ndolo	Lhica ND5	19,00±1,00	21,33±0,58*
S. Dabou	Lhica DA1	14,67±1,53	21,00±1,00**
S. Typhimurium	Lhica T11	19,00±1,00	27,00±2,00**
S. Typhimurium	Lhica T14	20,00±1,00	25,00±1,00**
S. Typhimurium	Lhica T21	15,33±0,58	20,00±1,00**
S. Typhimurium	Lhica T22	18,33±0,58	27,00±1,00***
S. Typhimurium	Lhica T24	15,33±1,53	20,67±1,15**
S. Enteritidis	Lhica ET2	22,33±1,53	33,33±1,53***

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Concentraciones subinhibitorias de apitoxina redujeron significativamente la formación de biopelículas de *Salmonella*, en 14 de las 16 cepas probadas en este estudio (Tabla 16).

Tabla 16: Efecto de la Apitoxina en la reducción de formación de biopelículas de diversos serotipos de Salmonella entérica, así como en la reducción de biopelícula preformada.

cepa	código	control	apitoxina	% reducción
S. Newport	Lhica N2	0,181±0,026	0,100±0,016**	46,96%
S. Isangi	Lhica IG1	0,137±0,024	0,084±0,014**	35,04%
S. enterica subsp. salamae	Lhica SA3	0,325±0,026	0,304±0,056	68,22%
S. Bardo	Lhica B3	0,163±0,020	0,081±0,010**	44,85%
S. Infantis	Lhica I7	0,177±0,012	0,089±0,013**	43,50%
S. Infantis	Lhica I17	0,171±0,031	0,082±0,010**	27,66%
S. Montevideo	Lhica M1	0,217±0,027	0,083±0,011**	53,46%
S. Stanleyville	Lhica ST1	0,187±0,014	0,082±0,008**	56,36%
S. Ndolo	Lhica ND5	0,168±0,029	0,099±0,021**	48,21%
S. Dabou	Lhica DA1	0,196±0,023	0,083±0,011**	45,41%
S. Typhimurium	Lhica T11	0,219±0,035	0,112±0,027**	58.58%
S. Typhimurium	Lhica T14	0,374±0,070	0,253±0,020*	39,49%
S. Typhimurium	Lhica T21	0,171±0,016	0,088±0,013**	42,69%
S. Typhimurium	Lhica T22	0,394±0,070	0,097±0,021**	60,15%
S. Typhimurium	Lhica T24	0,165±0,025	0,078±0,011**	50,91%
S. Enteritidis	Lhica ET2	0,250±0,054	0,206±0,023	30,52%

*p<0,001, **p<0,0001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sólo la formación de biopelícula de las cepas S. *enterica* subsp. salamae Lhica SA3 y *S.* Enteritidis Lhica ET2 no fue afectado por la apitoxina. El porcentaje de reducción de biopelícula preformada que fue observada osciló entre el 27,66% (S.

Infantis Lhica I17) y el 68,22% (S. enterica subsp. salamae SA3), con una considerable variabilidad entre las diferentes cepas de *Salmonella* probadas (Tabla 16).

4.3.3. Efecto de la apitoxina sobre la transcriptómica relacionada con la formación de biopelículas y genes de virulencia de *Salmonella*. (ver Anexo)

Tres cepas de *Salmonella* (*S.* Enteritidis Lhica ET2, S. Thyphimurium Lhica T22, *S.* Newport Lhica N2) fueron seleccionadas para evaluar los efectos de las concentraciones sub-inhibitorias de las concentraciones de apitoxina en la trascrpción de genes relativos a la formación de biopelículas, (*csg*D, *adr*A), genes de virulencia (*inv*A, *hil*A) y RNAs pequeños (*small* RNAs) relativos también a la formación de biopelículas (*arc*Z, *sro*C, *csr*B, *rpr*A, *oxy*S, *dsr*A) en comparación con la expresión que se observa en el caso de cultivos control en caldo de cultivo normal.

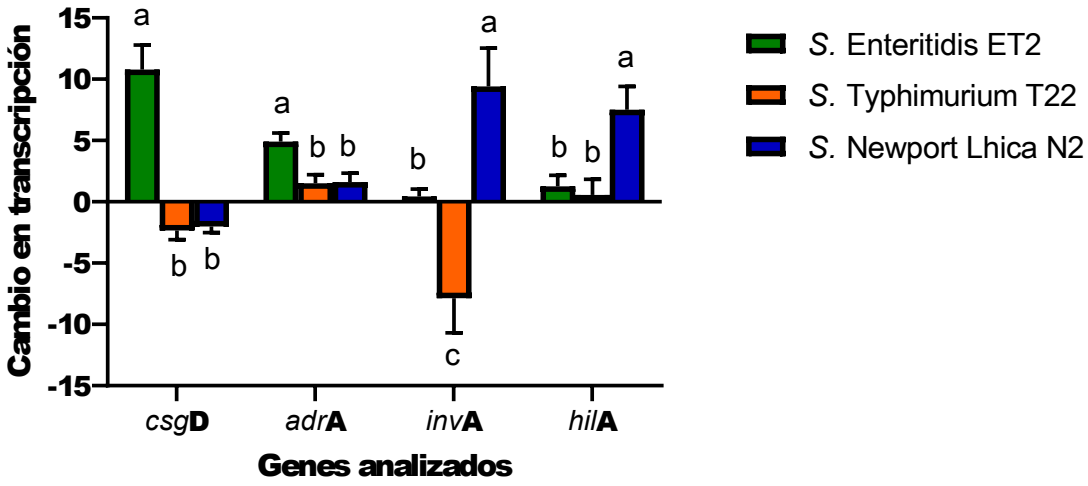


Figura 19. Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de varios genes relacionados con la virulencia de Salmonella y la formación de biopelículas.

La expresión de genes relacionados con la formación de biopelículas y genes relacionados con la virulencia fue significativamente dependiente por la cepa de *Salmonella* en concreto (Figura 19). Mientras que el gen *csg*D estuvo sobre regulado en *S.* Enteritidis ET2, sin embargo, se encontró regulado negativamente en *S.* Typhimurium T22 y *S.* Newport Lhica N2. En contraste con esto, *adr*A estuvo positivamente regulado para el caso de las tres cepas estudiadas. Por la contra, los genes de virulencia fueron significativamente sobre regulados en el caso de la presencia de apitoxina en la cepa *S.* Newport Lhica N2. Sin embargo, el gen *inv*A estuvo regulado de forma negativa en la presencia de apitoxina en *S.* Typhimurium T22. Estas diferencias demuestran la influencia de las cepas en las respuestas a la apitoxina.

La transcripción de genes que codifican para RNAs pequeños (sRNA o small RNAs) estuvo también influenciada por la presencia de apitoxina. De igual manera, hubo diferencias significativas entre las diferentes cepas probadas (Figura 20 y Figura

21). La presencia de apitoxina se tradujo en una sobrerregulación positiva de los genes codificantes para RNAs pequeños *arc*Z y *csr*B, que están relacionados con un incremento de la formación de biopelículas. De forma similar los *small* RNAs relacionados con la inhibición de la formación de bipopelículas *rpr*A, *oxy*S y *dsr*A estuvieron sobre regulados en *S.* Newport Lhica N2 y *S.* Typhimurium T22.

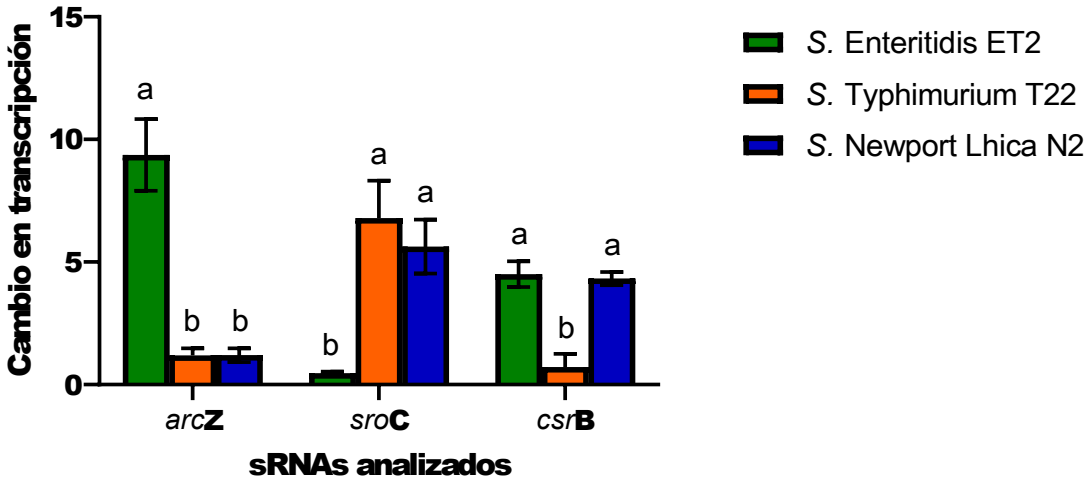


Figura 20: Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de genes que codifican para RNAs pequeños que promueven la formación de biopelículas (arcZ, sroC, csrB).

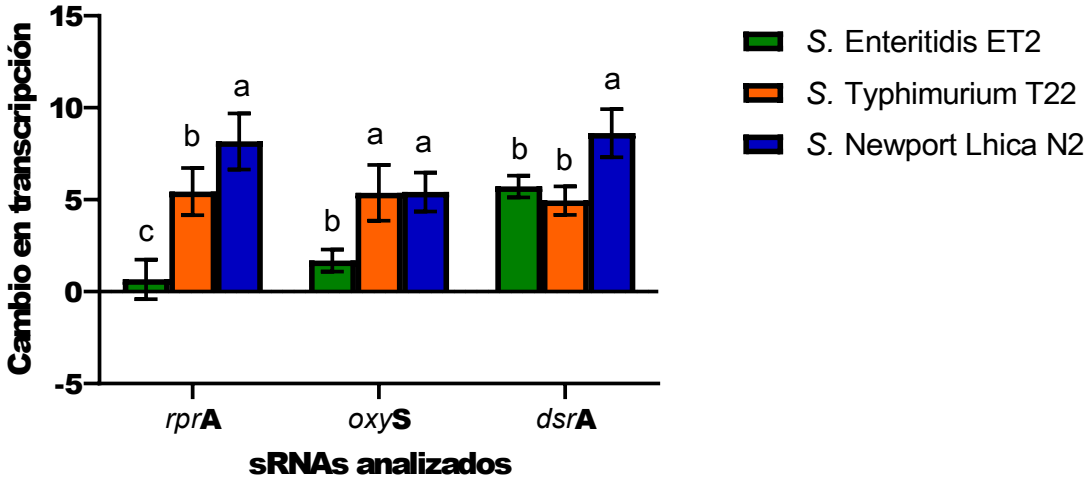


Figura 21: Valores de expresión génica, tomando como referencia la expresión del gen 16S RNA, de genes que codifican para RNAs pequeños que inhiben la formación de biopelículas (rprA, oxyS, dsrA).

4.4. Recuentos de enterobacterias en muestras de heces y de tejidos de cuyes tratados con apitoxina y tetraciclina.

Las Enterobacteriaceas objeto de estudio de esta investigación son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, bacilos Gram negativos, si el medio de crecimiento se encuentra a temperaturas entre los 15 y 35°C se comportan

como microorganismos mesófilos, en especial *Escherichia coli* como parte integrante de los coliformes descomponen la materia orgánica. Se trata de cepas bacterianas capaces de fermentar la glucosa, son catalasa positivos, producen gases, en especial *Salmonella* que genera H_2S a partir de aminoácidos azufrados, en general a temperaturas comprendidas entre 20 - 40°C son móviles (Fernández, *et al*. 2014).

De acuerdo con los análisis de *deviance*, con el modelo lineal generalizado de tipo Poisson, se encuentra que los factores: productos (apitoxina y Tetraciclina) y tiempo, tanto de forma individual como en interacción, muestran diferencias significativas ($p<0,05$), igual que con el factor muestras (hisopados y tejidos), demostrado a través de recuentos en UFC/g de las enterobacterias de interés.

4.4.1. Recuentos de *Escherichia coli* en hisopados rectales y muestras de tejidos

En el análisis de *deviance*, a través del modelo líneal generalizado de *Poisson*, se presentan resultados de interés referentes a la acción de la apitoxina y la tetraciclina, a través de cultivos bacterianos de muestreos recogidos de cuyes en ensayo.

Realizado el análisis de *deviance* con *Escherichia coli,* en relación a los factores*:* dosis del producto, con seis niveles: (0,0 µg/0 producto; 600, 700, 800, 900 µg/dosis/día de apitoxina y 150 µg/dosis/día de Tetraciclina); tiempo con 4 niveles (0, 24, 48 y 72 horas), así como con dos tipos de muestras (heces y tejidos), se obtiene que los resultados de recuentos de poblaciones bacterianas en UFC/g muestran diferencias significativas ($p<0,05$) para dosis, tiempo, tipo de muestra y para la interacción dosis tiempo.

En las Figuras 22(a) correspondiente a heces, como en la Figura 22 (b) referente a tejidos, para el caso de *Escherichia coli* se evidencia que las muestras con dosis control 0,0 µg producto indican unas poblaciones de los microorganismos estudiados en UFC/g constantes en el tiempo de alrededor de 9 log UFC/g. Se puede ver una diferencia de significativa entre las poblaciones microbianas en muestras de heces y tejidos, así como un patrón de comportamiento indicando una disminución de los recuentos en función de las dosis (apitoxina y tetraciclina), conforme pasa el tiempo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

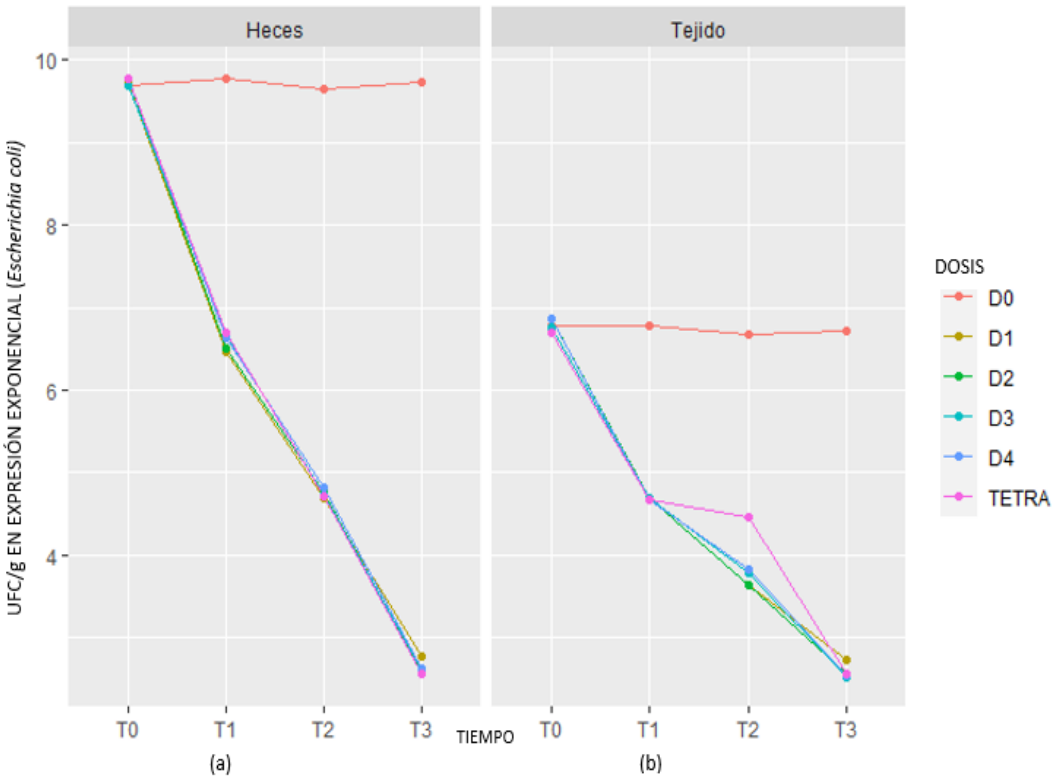


Figura 22. Poblaciones de E. coli (UFC/g). (a) en hisopados rectales; (b) en muestras de tejidos.
Nota: D0= 0 productos; D1= 600µg/dosis/día; D2= 700 µg/dosis/día; D3= 800µg/dosis/día; D4= 900µg/dosis/día; TETRA= 150µg/dosis/día; T0= 0 horas; T1=24 horas; T2= 48 horas y T3= 72 horas.

En el caso de tejidos, a las 48 horas se ha detectado para el caso de la tetraciclina, un incremento de las poblaciones de *E coli* de menos de un ciclo logarítmico, igualándose las poblaciones a las 72 horas con valores de alrededor de 3 log UFC/g para cualquiera de los tratamientos.

En cuanto a las interacciones entre dosis 0,0 µg/0 producto y las demás dosis (600, 700, 800 o 900 µg/dosis/día de apitoxina y 150 µg/dosis/día de tetraciclina) hay diferencias significativas ($p<0,05$), en relación al tiempo de muestreo 0,0 horas con 24, 48 y 72 horas, para las poblaciones de este microorganismo.

4.4.2. Recuentos de *Salmonella* Typhimurium en hisopados rectales y muestras de tejidos

Del análisis de *deviance* para *Salmonella* Typhimurium, en relación a los factores: muestras (heces y tejidos), tiempo en horas (0, 24, 48, y 72) y dosis del producto (0,0 µg/0 producto; 600, 700, 800, 900 µg/dosis/día de apitoxina y 150 µg/dosis/día de Tetraciclina) para las poblaciones de este agente, se observan diferencias significativas ($p<0,05$) para dosis, tiempo y muestras, así como para la interacción entre dosis y tiempo (Figura 23).

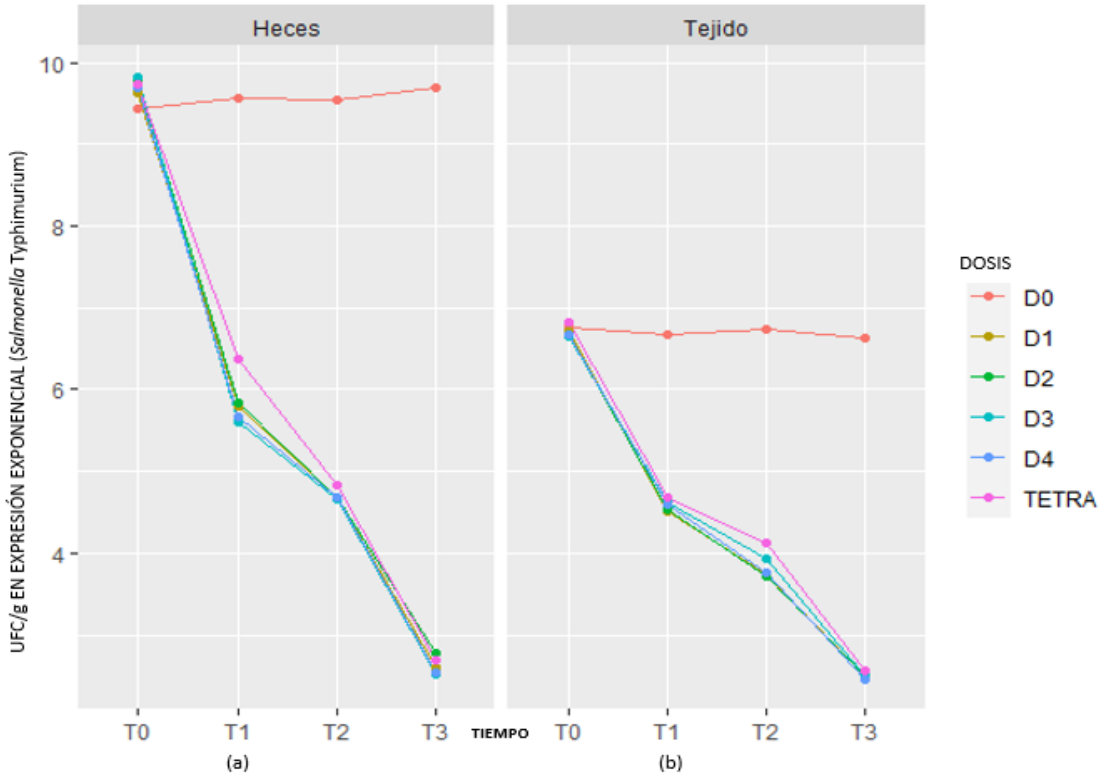


Figura 23.Poblaciones de Salmonella Typhimurium (*UFC/g) (a) en hisopados rectales; (b) muestras de tejidos.*

Nota: D0= 0 productos; D1= 600µg/dosis/día; D2= 700 600µg/dosis/día; D3= 800µg/dosis/día; D4= 900µg/dosis/día; TETRA= 150µg/dosis/día; T0= 0 horas; T1=24 horas; T2= 48 horas y T3= 72 horas.

En las Figuras 23 (a) y 23 (b), se pueden ver los resultados relativos a las poblaciones de S. Typhimurium (UFC/g), tanto para muestras de heces como de tejidos, se tiene el mismo patrón de comportamiento descrito en apartados anteriores para el recuento (UFC/g) de poblaciones de *Escherichia coli.*

4.4.3. Recuentos de *Yersinia pseudotuberculosis* en hisopados rectales y muestras de tejidos

Como parte del análisis de *deviance* a través del método de Poisson y con el tratamiento de los factores: dosis de producto (0,0 µg/0 producto; 600, 700, 800, 900 µg/dosis/día de apitoxina y 150 µg/dosis/día de Tetraciclina), muestras (heces y tejidos) y tiempo en horas (0, 24, 48 y 72) para cultivos bacterianos de *Yersinia pseudotuberculosis* (UFC/g), se tienen medias con valores altamente significativos ($p<0,05$) para dosis, tiempo y muestras, así como para la interacción entre dosis y tiempo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En las Figuras 24 (a) y 24 (b), se pueden ver los resultados correspondientes a la variable población (UFC/g) para *Yersinia pseudotuberculosis*, logrados a partir de cultivos bacterianos de muestras de heces, así como de tejidos, encontrándose la presencia del mismo patrón de comportamiento que en el caso de las otras bacterias

probadas (*E. coli* y *S. Typhimurium*), esto es, a medida que pasa el tiempo los recuentos de las poblaciones bacterianas tienen un descenso sostenido.

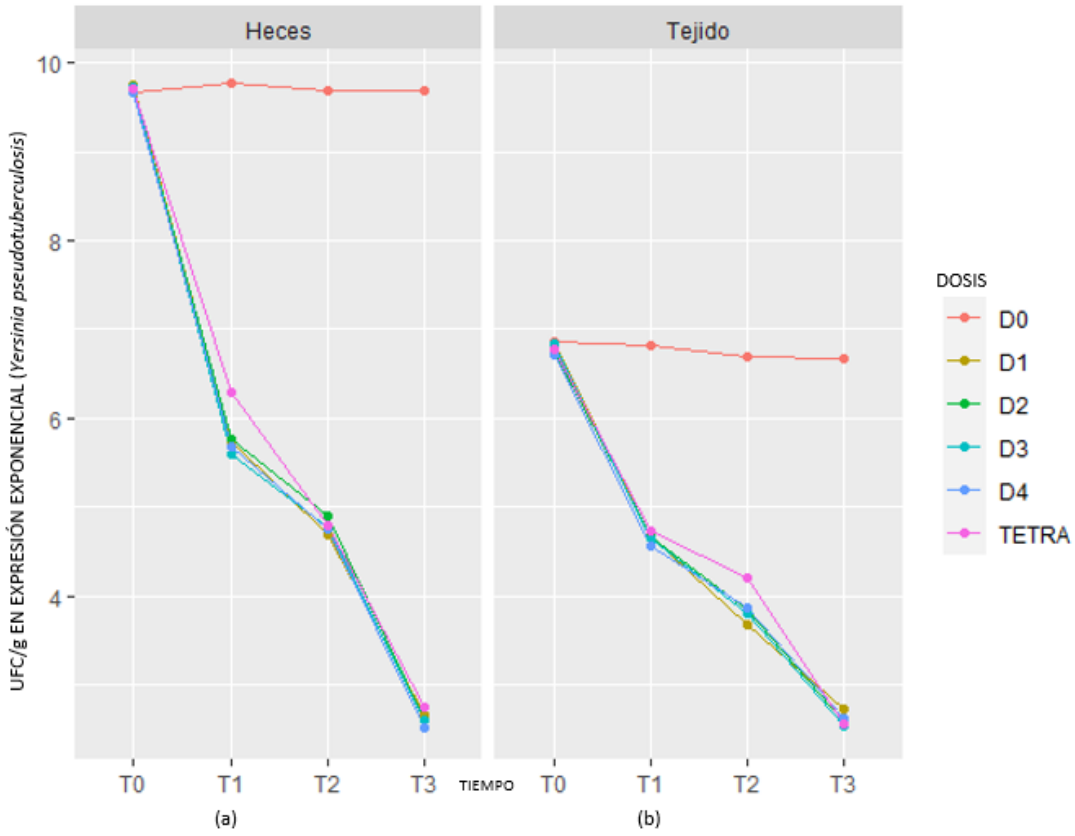


Figura 24. Poblaciones de Yersinia pseudotuberculosis (UFC/g).(a) en hisopados rectales; (b) en muestras de tejidos.
Nota: D0= 0 productos; D1= 600µg/dosis/día; D2= 700 600µg/dosis/día; D3= 800µg/dosis/día; D4= 900µg/dosis/día; TETRA= 150µg/dosis/día; T0= 0 horas; T1=24 horas; T2= 48 horas y T3= 72 horas.

Por otra parte, al prevalecer un decrecimiento bacteriano de las poblaciones bacterianas (UFC/g) con soluciones acuosas de apitoxina de 600 y 900 µg/dosis/día, incluso hasta las 72 horas, se pone de manifiesto la sostenibilidad del poder antimicrobiano de este producto procedente de las abejas.

4.5. Ganancia de pesos corporales de los cuyes en el ensayo

Se tomaron los pesos corporales a los 7 días del inicio del ensayo, a los cobayos que ya superaron las administraciones de productos de interés y los muestreos para siembras bacterianas. Posteriormente a los 21 días del ensayo se procedió a pesar por segunda vez a todos los cuyes para establecer las diferencias entre pesos corporales iniciales y finales, determinándose la diferencia expresada en gramos como pesos ganados por cada cuy dentro de 15 días y en relación a los tratamientos y repeticiones correspondientes.

Para el desarrollo del Análisis de la Varianza (ANOVA), se tomaron en cuenta los factores: bacterias de interés, producto (dosis) y la interacción entre bacterias versus producto (dosis) se establece un valor para considerar estadísticamente significativas las diferencias en las medias de los distintos grupos de animales ($p<0,05$). De igual manera, se tiene un CV de 29,9%.

En la Figura 25 se puede ver que se produce un incremento de los pesos corporales de los cobayos, siendo los más destacados los que se lograron con apitoxina a 800 µg/dosis/día con una media de 188,33 g de ganancia de peso; seguido de 900 µg/dosis/día, una media de 187 g de ganancia de peso; en tercer lugar el logrado con el empleo de Tetraciclina 150 µg/dosis/día, con una media de 183,06 g de ganancia de peso, en el caso del empleo de 700 µg/dosis/día, una media de 165,93 g de ganancia de peso, y finalmente para el empleo de 600 µg/dosis/día, una media de 106,06 g de ganancia de peso; por último con 0,0 µg/dosis/día (testigo), una media de 59,7 g de ganancia de peso.

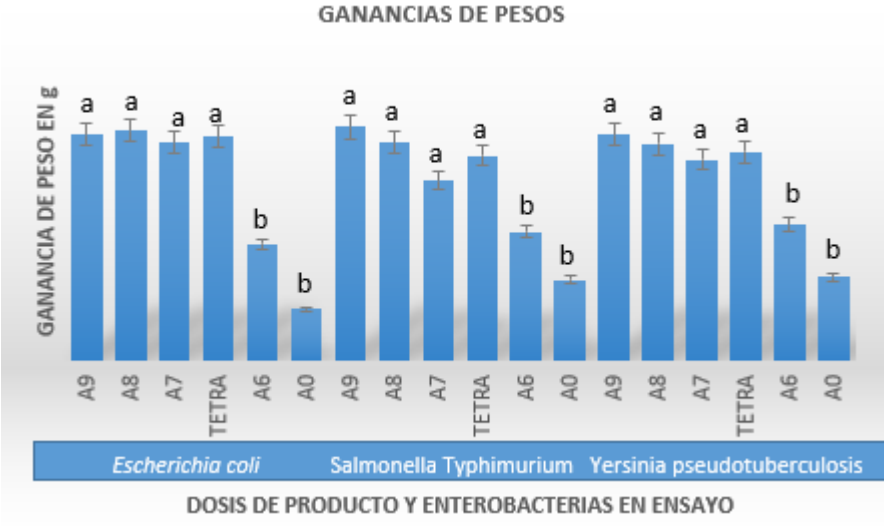


Figura 25. Ganancia de peso corporal de cuyes tratados con diversas dosis de apitoxina y Tetraciclina durante el presente trabajo

Nota: A9= Apitoxina 900 µg/dosis/día; A8= Apitoxina 800 µg/dosis/día; A7= Apitoxina 700 µg/dosis/día; TETRA = Tetraciclina 150 µg/dosis/día; A6=Apitoxina 600 µg/dosis/día; A0=Cero producto.

Realizado el Test de Tukey ($p<0,05$) se encontró que no existen diferencias significativas en el patrón de ganancia de peso entre los cobayos tratados con cualquiera de las tres bacterias empleadas en el presente trabajo.Tampoco existen diferencias significativas entre las ganancias de peso determinadas para los animales tratados con 700, 800 o 900 µg/dosis/día o 150 µg/dosis día de tetraciclina y existen diferencias significativas en las ganancias de peso con respecto a los lotes de animales no tratados o tratados con una dosis de 600 µg/dosis/día de apitoxina.

4.5.1. Evaluación de los cuyes a los tratamientos: síntomas y muertes

Durante los tratamientos de los cuyes con los productos de interés (apitoxina, Tetraciclina frente al testigo 0,0 producto), infectados con las bacterias en

investigación, se vigilaron constantemente los animales para identificar signos de reacciones secundarias, tanto para tratarlos oportunamente como para evaluar la evolución del proceso.

En la Figura 26 se puede comprobar el comportamiento de los animales de cada grupo de ensayo, en relación con una escala de presencia de sintomalogía, o presencia de animales muertos.

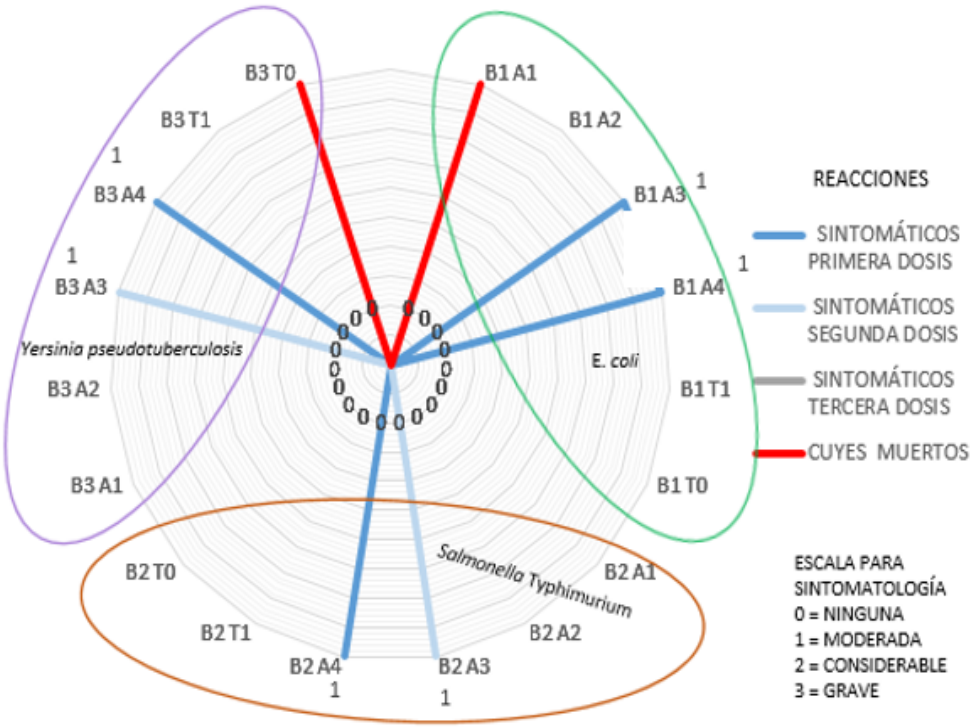


Figura 26. Escala sintomática y mortalidad de cuyes sometido a los tratamientos con los productos (apitoxina, tetraciclina y 0,0)

Nota: B1= *Escherichia coli*; B2= *Salmonella* Typhimurium; B3= *Yersinia pseudotuberculosis.* A1= Apitoxina 600 µg/dosis/día; A2= Apitoxina 700 µg/dosis/día; A3= Apitoxina 800 µg/dosis/día; A4= Apitoxina 900 µg/dosis/día; T1= Tetraciclina 150 µg/dosis/día; T0= 0,0 µg/dosis/día (sin producto).

Con respecto a la variable cuyes con reacciones secundarias o síntomas especiales, de conformidad con los registros de campo, se presentaron síntomas moderados a las 24 horas de la primera dosis: en 2 cuyes para *Escherichia coli*, 1 con 800 µg/dosis/día y 1 con 900 µg/dosis/día de apitoxina; en 1 cuy para *Salmonella* Typhimurium y con 900 µg/dosis/día de apitoxina; 1 cuy para *Yersinia pseudotuberculosis* con 900 µg/dosis/día de apitoxina.

A las 24 horas de la segunda dosis, se presentaron síntomas moderados en 1 cuy para *Salmonella* Typhimurium y en 1 cuy para *Yersinia pseudotuberculosis,* los dos con 800 µg/dosis/día de apitoxina.

Respecto a la variable cuyes muertos, a las 24 horas de la primera dosis se presentó 1 cuy muerto en el grupo *Escherichia coli* con 600 µg/dosis/día de apitoxina, así como 1 cuy en el grupo testigo absoluto (0,0 µg/ml), sin producto alguno.

A los cuyes con sintomatología moderada, se administró vía muscular epinefrina en dosis de 0,1 mg/kg. Para los casos presentados, fue suficiente una sola dosis y los animales volvieron a la normalidad a las 4 y 6 horas.

Excepto los 4 cuyes que presentaron síntomas moderados y los 2 muertos, los demás animales del ensayo siguieron sobrevivieron de forma natural.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPITULO V

5. DISCUSIÓN

5.1. Colecta de apitoxina

Se realizan cinco cosechas de apitoxina en los cinco apiarios designados y en las cinco colmenas de cada uno de ellos en la provincia de Imbabura a partir del 9 de enero hasta el 28 de mayo del año 2016, en horarios de 11:00h a 13:00h, con una diferencia de 21 días entre una colecta y otra, se logró obtener 4673 mg de apitoxina, para una media general de 37,4 mg por colmena (Figura 12).

Respecto a cantidades de apitoxina, se realizan comparaciones con otras informaciones como las dadas por: Duran, *et al. (*2011), en un ensayo a dos frecuencias de cosechas, 20 y 30 días, con electro estimulador, no encontraron variación significativa para la media de colecta de apitoxina de 58 y 79 mg por colonia, en función de la frecuencia de cosecha; Fakhim (1998), citado por Duran, *et al.* (2011), en Helsinki, Finlandia, obtuvo 26 mg/colmena cada 14 días; Omar, (2014), en Egipto, demostró que no hay variaciones significativas entre colmenas que produjeron una media de apitoxina de 36 a 39 mg/colecta y cada 21 a 30 días, aunque otros autores de la Universidad de Kenia-Egipto (Sanad y Mohanny, 2013) señalan cantidades menores de apitoxina de 18,5 mg por cosech.; Bucio-Villalobos, y Martínez-Jaime, (2018), en Guanajuato-México, lograron una colecta 62,5 mg/colmena. En Ecuador, según reporta Cabrera, (2014), se logran entre 26 y 28,5 mg de apitoxina por colmena con frecuencias de 21 días. La frecuencia de cosecha se encuentra entre 14 y 21 días. En Imbabura, en los apiarios considerados, se logró una media de 37,4 mg/colmena y cosecha, con una frecuencia de 21 días, lo que se puede considerar un buen rendimiento, encontrándose por lo tanto por encima de lo conseguido en Ecuador por otros investigadores (Cabrerra, 2014) si bien se encuentran por debajo de lo conseguido en México, y a pesar de las diferencias entre ambos entornos, la cosecha es similar a la conseguida en Egipto (Omar 2014) siendo por lo tanto en nuestro caso unos valores intermedios.

También en referencia a la producción de apitoxina, se debe de señalar que algún autor (Valderrama 2003) hace referencia a estudios comparativos de la producción de apitoxina entre abejas africanizadas venezolanas y europeas domésticas en Estados Unidos, encontrando que la agresividad de las abejas africanizadas obedece a su comportamiento defensivo, de igual manera la producción de veneno es menor ya que están preparadas para un mayor número de ataques con menores cantidades de veneno. Mientras tanto las abejas europeas que son más dóciles producen más cantidad de apitoxina, sin señalarse diferencias bioquímicas, siendo la melitina el principal compuesto de esta sustancia en ambos tipos de abejas, no parece pues que el emplear otro tipo de abejas como las africanizadas puedan suponer una mayor cantidad de apitoxina en la cosecha. Otros trabajos como el de Remache (2019) comparan las

características de la apitoxina de Georgia (EEUU) y de Ecuador, hallando una respuesta similar frente a la melitina existente en la apitoxina por parte de *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo CMIs similares entre los distintos orígenes de la apitoxina, con lo cual se puede concluir que no parece haber diferencias entre los distintos orígenes de la apitoxina. Sin embargo hay diferencias dependiendo del tipo de microorganismo estudiado. Estas circunstancias sustentan la decisión de hacer una única mezcla de los distintos apiarios, ya que la melitina está en todos los casos presente y es el principal elemento bioquímicamente constante en todos los orígenes de apitoxina (Valderrama 2003, Remache 2019). De este modo además, se ha obtenido suficiente cantidad de apitoxina para todos los ensayos realizados.

Junto a la presente experiencia, con el respaldo de ensayos como el de Guanajuato, (Bucio-Villalobos y Martínez-Jaime 2018) con cosechas durante 11 meses (agosto 2016 a junio 2017), en nuestro caso en Imbabura la cosecha fue de 5 meses, siendo de 9 meses, en otros casos. También hay que señalar que la frecuencia de recolección entre 14 y 21 días, es coincidente con lo realizado por otros autores. Asimismo el tiempo que dura la recolección entre 20 y 25 minutos. Sin embargo, cabe señalar que lo importante es tener en cuenta las condiciones ambientales imperantes en el entorno de los apiarios, así como las condiciones de manejo como lo demuestra el caso de la experiencia de Guanajuato en México, quienes suspendieron las cosechas en período de mayor producción de miel y también realizaron las colectas únicamente en colmenas libres de *Varroa destructor.*.

Las colectas de apitoxina, al igual que las otras actividades apícolas están sujetas a varios factores tales como presencia o ausencia de flora melífera, de tal manera que como manifiestan De La Torre, *et al*, (2008), en el Ecuador y en la región Interandina existen alrededor de 197 especies vegetales melíferas, de éstas la mayoría son nativas de la región; sin embargo, como señala Cabrera (2014), la apicultura en el país está en crisis por la deforestación de especies vegetales, el avance de la frontera agrícola es desordenado y ha diezmado a la mayoría de especies melíferas

Respecto a la metodología e instrumentos de cosecha, de acuerdo con los estudios señalados anteriormente, se utilizaron estimuladores eléctricos regulables entre 12 y 25 vatios, con tiempos de paso de energía eléctrica durante 1 y 2 segundos, y pausas de entre 3 y 5 segundos. Para el caso de esta investigación, el electroestimulador para la cosecha de apitoxina fue regulado a 12 voltios, un tiempo de paso de energía de 2 segundos y pausas de apagado de 3 segundos, con lo cual se obtuvieron de 21 a 23 abejas muertas por cosecha y colmena. En este sentido, resultados como los de Duran et al (2011), han obtenido un menor número de abejas muertas con un rango entre las 16 y 20, empleando unos voltajes similares de entre 11,5 y 13,5 voltios durante 3 segundos, pero con unas pausas de apagado de 6 segundos. Aunque los valores de voltaje, pausa en la estimulación etc. pueden no ser lós únicos involucrados en la mortalidad de las abejas deben de ser tenidos en cuenta para intentar rebajar la mortalidad de las abejas en futuras experiencias, sobre todo teniendo en cuenta además

que Duran y colaboradores obtienen valores de apitoxina superiores a los presentados en este trabajo.

Así mismo es necesario tener en cuenta ciertos caracteres de las colonias de abejas melíferas, tal como manifiesta Bogdanov (2015), respecto a la cosecha de apitoxina: la población de abejas, tipo de abejas, tiempos y horarios de colectas, áreas de almacenamiento de polen, de miel, de cría y actividades de alimentación. Todos estos factores intervienen en variaciones significativas en las diversas colectas, razones por las cuales se tiene diversidad en las cantidades de veneno recolectado en diferentes períodos de la temporada activa (Cabrera, 2014; Bucio-Villalobos, y Martínez-Jaime, 2018).

Para los casos de Imbabura, se deben destacar que los meses de enero a mayo son de floración de plantas melliferas silvestres como cholán (*Tecoma stans*) eucalipto (*Eucaliptus glóbulos*), ñachag (*Bidens andicola*), de cultivos tales como tréboles, blanco ladino (*Trifolium repens*), de aguacates (*Persa americana*) razón por la que esta es una época de producción de miel; sin embargo, el crecimiento de la frontera agrícola y las fumigaciones agresivas en los cultivos agrícolas limitan las poblaciones de abejas. En relación al tipo de abejas en los apiarios, la estirpe italiana (*Apis mellifera lingústica*) es la que predomina por su característica mansedumbre.

De todas maneras, la media de producción de apitoxina lograda en los apiarios de Imbabura con 37,4 mg/colmena y por cada colecta es buena en relación a las otras colectas referidas, igual que el número de abejas obreras muertas hasta 23 por colmena tal y como se ha señalado anteriormente. Para las cosechas realizadas en Imbabura, los mayores riesgos con respecto a la producción de apitoxina se dan por las labores y controles fitosanitarios practicados en las diferentes áreas, afectando a la población apícola.

5.2. Caracterización de la apitoxina (melitina)

Desde los resultados obtenidos para la caracterización de la apitoxina, respecto a las características cualitativas sensoriales como textura y color, estas características se corresponden con una textura granular y una coloración blanquecina. Dichas características son básicamente coincidentes con los resultados de Serna y Soto (2012), en cuanto a textura y color, quienes citan una coloración ligeramente amarilla y un aspecto grumoso en cuanto a textura. Por otra parte, Cabrera, (2014) quien ha trabajado con apitoxina, también ha encontrando colores crema y amarillento, en lugares con predominancia de eucalipto, y aguacate (*Persa americana*), mientras que para la apitoxina del presente estudio el color blanquecino y la textura granular se corresponde con lugares con predominio de cholán (*Tecoma stans*) y cultivos forrajeros con tréboles (*Trifolium repens*).

En cuanto a los principales compuestos de la apitoxina encontrados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se determinaron los componentes

principales de la apitoxina: la melitina, fosfolipasa A2 y apamina, mediante separación, identificación y determinación cuantitativa de dichos elementos que integran a la apitoxina, tal como se aprecia en la Figura 6 de los resultados, coincidiendo además con Serna y Soto (2012); Rybak-Chmielewska, y Szczêsna, (2004); Kokot y Matysiak (2009) y con Kokot *et al*. (2011), quienes emplearon una metodología similar para la separación de estos componentes principales del veneno de abeja, comprobándose el patrón de elución característico similar al determinado en el presente trabajo, eluyendo en primer lugar la apamina, luego la fosfolipasa A2 y finalmente la melitina, y siendo siempre el principal componente la melitina, siendo más de un 50% de los componentes cromatografiados de la apitoxina. Estos compuestos como se deriva de todo lo anterior guardan relación con las propiedades de interés de la apitoxina si bien en nuestro caso el porcentaje que supone la melitina en la apitoxina ha estado por debajo del 50% tal como se ha comentado en el apartado de resultados.

En todo caso, la apitoxina cosechada para esta investigación, de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de cromatografía líquida de alta resolución, alcanza para la melitina los valores más altos, siendo el polipéptido principal de la apitoxina, con unas cifras de alrededor de 120-130 µg/ml, coincidiendo en parte con los resultados de Kokot y Matysiak (2009), Rybak-Chmielewska, y Szczêsna, (2004), con concentraciones para la melitina de ese orden. Así Kokot y Matysiak determinan entre los años 2002 y 2007 valores de melitina que oscilan entre los 91,61 µg/ml y los 193,65, con valores en la mayoría de los casos por encima de los 120 µg/ml. En el caso de Rybak-Chmielewska y Szczêsna los valores consignados para la melitina fueron menores. Sobre la base de lo señalado, el rendimiento en la producción de apitoxina con actividad bioactiva es comparable a lo consignado en la bibliografía, lo cual justifica la aplicabilidad de la metodología usada.

5.3. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de enterobacterias patógenas para cuyes.

En relación con el aislamiento e identificación de bacterias de interés, de conformidad con los protocolos que rigen para los Laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI), así como en relación a lo manifestado por Fernández, *et al*. (2010); Fernández, *et al*. (2014); Garcés, (2015); y Dworkin, *et al*. (2006), quienes asignan características para las tres bacterias identificadas como causantes de patologías en los cuyes, tanto morfológicas, coloración Gram, reacciones bioquímicas, con sus respectivos indicadores tal como se indica en la Tabla 4 de resultados y que fueron las encontradas en esta investigación, se confirman particularidades propias de las bacterias de interés, permitiendo, con seguridad, continuar con la etapa de caracterización molecular.

Para determinar la identidad bacteriana de cada una de los tres aislamientos en estudio, se procedió a realizar la extracción del ADN bacteriano, posteriormente a la amplificación del Gen 16s DNAr y región V3; seguidamente, una PCR (reacción en

cadena de la polimerasa) de la región V3 del Gen 16s del ADNr, tal como confirman también Bolívar, *et al.* (2013), en especial en el hecho de estandarizar las aplicaciones de la PCR, con desarrollo de variantes de métodos, de conformidad con el laboratorio que realiza los procesos.

De manera concreta y en relación a las reacciones en cadena de la polimerasa, con el respaldo de pruebas previas de Balsalobre-Arenas y Alarcón Cavero, (2017), se confirma que la PCR reproduce el proceso fisiológico de la duplicación del ADN en las células, así como exponencialmente aumentan la secuencia específica del Gen 16S del ADN. El incremento del número de copias de una secuencia permite muchas aproximaciones posteriores como es la secuenciación del amplicón lo cual ha permitido la identificación a nivel molecular de las bacterias de interés en este documento como son *E coli*, *S* Typhimurium y *Y pseudotuberculosis*. Si bien los resultados para el caso de *E coli* y *S* Typhimurium son óptimos con un 100% de similitud, no ha sido óptimo para el caso de *Yersinia pseudotuberculosis*, en donde también el tamaño del amplicón ha sido menor. Si bien *Y pseudotuberculosis* tiene una marcada similitud con otras especies de *Yersinia* como es *Y pestis* (Kim *et al*. 2003, Jaspers and Overmann 2004). El hecho de que sean secuencias idénticas las obtenidas a partir del 16S hace que pueda haber problemas en la identificación en el caso de emplear esta única herramienta.

5.4. Inhibición bacteriana de la apitoxina por disco-difusión en agar

Para el estudio de la sensibilidad de las enterobacterias patógenas para cuyes determinadas frente a distintas concentraciones de los compuestos de interés (Apitoxina) así como el compuesto de contraste (Tetraciclina), los resultados de esta investigación reflejan que *Escherichia coli* es sensible ante la presencia de 700 µg/ml, 800 µg/ml 900 µg/ml y con 150 µg/ml de Tetraciclina con la obtención de halos de inhibición entre 11,8 y 12 mm de diámetro, mientras que, tanto para *Salmonella* Typhimurium como para *Yersinia pseudotuberculosis*, se obtuvieron halos de inhibición mayores, de entre 12,2 y 12,3 mm de diámetro con concentraciones de 800 µg/ml, 900 µg/ml de apitoxina, igual que con 150µg/ml de Tetraciclina, manteniéndose estos valores tanto a las 24, como a las 48 y 72 horas.

Las pocas Investigaciones previas realizadas con soluciones acuosas de apitoxina frente a bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, obtienen resultados similares a los hallados en este estudio, ya sea en los halos inhibitorios de los cultivos bacterianos como en los tiempos de incubación para las respectivas lecturas. Es así como Arciniega, *et al.* (2017), quienes con 0,55 mg/ml, 0,60 mg/ml y 0,65 mg/ml de apitoxina en solución acuosa, obtuvieron halos de 9,3 y 9,7 mm para 0,60 y 0,65 mg/ml de apitoxina, frente a halos de 9,5 para 150 mg/ml de Tetraciclina; Aldás, (2019) en muestras de leche de vaca encontró halos de 9,4 mm para *Escherichia coli* y con 0,9 mg/ml de apitoxina a las 48 horas de incubación de los cultivos; Tatú, (1989), Yarlequé y Wong, (2018), con concentraciones del 1% de apitoxina comercial, lograron, el primero para *Salmonella* Typhimurium halos de 9 mm, para *Escherichia coli* halos de

USC DE COMPOSTELA

8 mm, lo cual es similar al presente caso en donde también ha mostrado más sensibilidad *Salmonella* Typhimurium y *Yersinia pseudotuberculosis* que *E coli.* En cambio Yarlequé y Wong (2018), frente a *Staphylococcus aureus,* obtuvieron halos de inhibición de entre los 15-17 mm a las 72 horas, demostrando para el caso de esta bacteria gram positiva una mayor sensibilidad, frente a este agente, por cuanto los halos de inhibición son mayores. Si tenemos en cuenta los resultados del presente trabajo, se puede señalar que la actividad antimicrobiana se mantiene con el paso del tiempo dado que no han existido diferencias en relación al tiempo de incubación. De esta manera se abre la posibilidad de encontrar en productos naturales como la apitoxina una alternativa para control de enfermedades bacterianas en cuyes y en otros animales para beneficio de productores y consumidores de proteina animal.

Son muy escasos los trabajos que documentan el estudio del efecto clínico del veneno de abeja o apitoxina frente a procesos causados por bacterias sobre todo en humanos. Sin embargo, son muchos los documentos sobre el empleo en clínica de esta sustancia para el tratamiento de la artritis reumatoide y otros procesos dolorosos tratados mediante el empleo de la acupuntura (Lee *et al*. 2005, Lee *et al*. 2014, Kim *et al.* 2014) u otros procesos no infecciosos como el parkinson (Hartmann *et al*. 2016) o el cáncer (Orsolic 2012).

Trabajos de investigación realizados por Cercenado y Saavedra-Lozano (2009); Jáuregui, *et al*. (2017) con pollos de engorde y con apitoxina en el agua de bebida, por tanto, lograron controlar a enterobacterias de las aves así tratadas. Zolfagharian *et al* (2016), al realizar estudios de antibiogramas con apitoxina en concentraciones de 25, 35 y 45 µg/ml, obtuvieron halos de inhibición de 11.4 mm, 13.2 mm y 15.5 mm respectivamente, frente a bacterias Gram positivas y en 24 y 48 horas de incubación de los cultivos microbianos siendo esta una referencia que publica resultados de inhibición mejores a los del presente trabajo, al emplear concentraciones más bajas para unos halos de inhibición similares. Además, los halos de inhibición y por lo tanto el efecto frente a *E coli* es mayor que el demostrado frente a *Salmonella* o *S aureus*. También Jáuregui, *et al*. (2017b) en otro trabajo probaron antibiogramas que hallaron niveles de sensibilidad para enterobacterias en cuyes y con soluciones de apitoxina similares a las del presente documento, de entre 0,70 y 0,90 mg/ml, atribuyéndo sensibilidad a los halos de 8 y 10,5 mm mediante disco difusión en cultivos de agar. En cualquier caso las diferentes cepas empleadas en los estudios realizados pertenecientes a las diferentes especies de bacterias probadas parecen tener una influencia decisiva en la mayor o menor efectividad de la apitoxina como agente antimicrobiano.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para la clasificación de los resultados de los antibiogramas como sensibles, intermedios y/o resistentes, de acuerdo con Cercenado y Saavedra-Lozano (2009), se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), entre otros, los que toman en cuenta propiedades microbiológicas y farmacocinéticas para definir la sensibilidad o resistencia de las diferentes especies bacterianas para cada antimicrobiano; sin

embargo, al tratarse de un producto natural alternativo como la apitoxina que no tiene estándares respecto a perfiles fenotípicos de sensibilidad o resistencia, se parte de precisiones tales como las de Herrera (1999), quien recomienda tomar en cuenta, tanto la identidad del microorganismo (género, especie, fenotipo de sensibilidad) así como las propiedades del antimicrobiano (tamaño de la molécula, polaridad y peso molecular), puesto que, de la interacción de estas dos variables depende el nivel de difusión del antibacteriano; de igual manera Cercenado y Saavedra-Lozano (2009), señalan que las CMI que definen la sensibilidad o resistencia son diferentes para cada especie bacteriana y cada antimicrobiano.

De manera que no se puede afirmar que un microrganismo determinado sea más sensible a un antimicrobiano que a otro, solo porque uno de ellos presente un halo de inhibición mayor Woods & Washington (citado en Herrera, 1999). Es decir que es distinta la sensibilidad *in vitro* que la sensibilidad *in vivo*. Así mismo Pasterán y Galas (2008), afirman que un microorganismo patógeno se considera como sensible a un producto antibacteriano cuando se espera que la infección causada por el patógeno responda al tratamiento con el producto y a la dosis recomendada.

Sensibilidad bacteriana para soluciones acuosas de apitoxina en concentraciones de 0,104 µg/ml y 0,121 µg/ml en pacientes humanos y con *Streptococcus pyogenes* como microorganismo diana, fue demostrada en investigaciones realizadas por Han, *et al*. (2010), quienes atribuyen acción bactericida de la apitoxina para este microorganismo. Así también, Villarruel, *et al.* (2004) confirman acción bactericida de los péptidos contenidos en venenos de ciertos insectos en concentraciones micromolares y en soluciones acuosas. Además, como dicen Peters, *et al*. (2010) esta sustancia no causa toxicidad celular en los animales tratados con estos péptidos, afirmación que es corroborada por Choi, *et al*. (2015), quienes comprobaron que el veneno de abejas in vivo y hasta 20 mg/kg (parenteral), no provocó signos de toxicidad en ratones CD1 sometidos a investigación.

Lo dicho confirma la acción antibacteriana de la apitoxina en solución acuosa y a diferentes concentraciones, de acuerdo con cada investigador y con diferentes bacterias patógenas, tal como los resultados logrados por Tatú, (1989); Cercenado y Saavedra-Galaz (2009); Jáuregui, et al. (2017b) y Arciniega, *et al.* (2017), quienes trabajaron con apitoxina, en especial los dos últimos autores que hacen referencia a valoraciones de antibiogramas con discos conteniendo apitoxina.

En cuanto a la lectura de halos de inhibición, lograda *in vitro*, debido a la acción de un producto antibacteriano, tal como se ha señalado antes, no es absoluta, según Cercenado y Saavedra-Galaz (2009) y Pasterán y Galas (2008), es información que se la debe tomar con mucha cautela, en especial para la aplicación terapéutica *in situ*, ya que lo interesante son las concentraciones del antibacteriano que llegan a nivel sanguíneo, al sitio de la infección, además otros factores como la patogenia del microorganismo, los efectos secundarios y la farmacocinética.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La información recabada de investigaciones anteriores, que hacen relación al uso terapéutico alternativo de la apitoxina frente a bacterias tanto Gram positivas como negativas, tal como afirman Nevalainen, et al. (2008), mantendrían una correlación directa con la diversidad estructural y bioquímica que existe entre las bacterias, incluso entre variantes o serovares que desarrollan las diferentes especies de bacterias patógenas para los animales.

De manera más específica y en relación a la acción antibacteriana de la apitoxina, con la información existente hasta el momento, hay que señalar que las investigaciones se han enfocado de forma concreta a la melitina, ya que es el péptido principal constituyente de este producto apícola, tanto es así que de acuerdo con Raghuraman y Chattopadhyay (2007), una de las características del péptido melitina es su acción hemolítica, de manera que provoca la fusión molecular de lípidos y proteínas en la membrana celular bacteriana, con la intervención de un proceso osmótico coloidal, produciendo agregados, canales y poros, los mismos que dependen de la temperatura ambiente, pH, composición de los lípidos y fuerza iónica, (Bogdanov, 2015), demostrándose, como dicen Raghuraman y Chattopadhyay (2007), la presencia acumulativa de cargas positivas en la región C-terminal de la melitina, mientras que en la región amino terminal ($R\text{-}NH_2$) se da la entrada de voltaje por los canales y poros de bicapas lipídicas.

Los productos naturales como los venenos de insectos y que contienen péptidos antimicrobianos están en la mirada de muchos investigadores y han ganado en relevancia en el campo de la Biomedicina actual, más aún como dicen Lazarev *et al*. (2004) sin desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos como autodefensa, de manera que se proyectaría la posibilidad de sintetizar péptidos análogos con propiedades antimicrobianas.

De conformidad con Peters *et al.* (2010), dentro de las opciones de usos biomédicos de los péptidos antimicrobianos (PA), además de la acción antimicrobiana, se debe resaltar su baja toxicidad para las células de los animales, como ya se ha señalado anteriormente. De igual manera como la proyección que destacan Johnston *et al*. (2016), referente al uso combinado con otras sustancias antibióticas con el fin de hallar sinergismo a la acción de los PA, ya que éstos alterarían las membranas celulares de los patógenos, dejando la puerta abierta para la acción de otras moléculas como los antibióticos sintéticos, contribuyendo de esta manera a lograr un buen efecto bactericida.

5.5. La apitoxina en las CMI y CMB, formación de biofilms. transcriptómica de biopelículas y virulencia de Salmonella. (ver Anexo)

Diversos estudios han evaluado los efectos antimicrobianos de la melitina pura, así como de la fosfolipasa A (Picoli *et al.* 2017, Wu y Narsimhan 2017, Nevalainen et al 2008, Dosler *et al.* 2016). Sin embargo, es escasa la información relativa a la acción de la apitoxina como producto puro y complejo sobre patógenos de transmisión

alimentaria. Además, el efecto de este veneno sobre cepas o aislados de *Salmonella,* no ha sido investigado previamente. Un estudio anterior mostró que los valores de CMIs de apitoxina disponible de forma comercial frente a bacterias de la boca arrojaron valores entre 20 y 40 µg/ml (Leandro *et al*. 2015). Los valores de CMI observados en dicho estudio fueron relativamente bajos en comparación con los valores mostrados en el presente trabajo que se han situado entre los 256 y los 512 µg/ml, en la mayoría de las cepas probadas. Leandro *et al.* (2015) probaron bacterias Gram positivas tales como *Enterococcus faecalis*, o *Streptococcus salivarius* mientras que *Salmonella* es una bacteria Gram negativa. En este sentido, Picoli *et al.* (2017) observaron que las bacterias Gram postivias *S. aureus* arrojaron valores de CMI más bajos, del orden de 6-7 µg/ml, para la melitina, siendo notablemente más bajos que los obtenidos para el caso de la Gram negativa *E. coli* (40-42,5 µg/ml), o los valores obtenidos para *P. aeruginosa* (65-70 µg/ml). Estas diferencias podrían estar relacionadas directamente con las variaciones estructurales que se presentan entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Nevalainen *et al*. 2008, Dathe y Wieprecht 1999, Boutrin *et al.* 2008). Por lo tanto, la combinación de apitoxina con otras sustancias que producen una disrupción de la membrana externa de bacterias Gram negativas podría incrementar la actividad antimicrobiana de la apitoxina.

La formación de biopelículas por parte de *Salmonella* estuvo altamente influenciada por la presencia de concentraciones subinhibitorias de apitoxina presentes en el medio de cultivo empleado para el crecimiento de las bacterias en los ensayos de formación de biopelículas. Un estudio previo había señalado que las CMI de la melitina reducen la formación de biopelículas en tasas mayores del 50% en *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* de leche de vaca (Picoli *et al.* 2017). Adicionalmente a esto, la capacidad para inhibir biopelículas decreció con concentraciones decrecientes de melitina, lo cual supone también una confirmación de este efecto. Este trabajo demuestra que la apitoxina es capaz de reducir la formación de biopelículas por parte de cepas de *Salmonella enterica*. Se debe remarcar en cualquier caso que la formación de biopelículas no estuvo influenciada por la presencia de apitoxina para el caso de las cepas de *S.* enterica Lhica SA3 y *S.* Enteritidis Lhica ET2. Resulta especialmente curioso que *S.* enterica Lhica SA3 fue también la cepa con la más alta CMI para la apitoxina, es decir la que muestra una mayor resistencia frente a esta sustancia. Si bien la apitoxina es una sustancia prometedora que puede ser usada para inhibir el crecimiento de bacterias de transmisión alimentaria del género *Salmonella*, algunas cepas son capaces de presentar una resistencia mayor frente a esta sustancia, indicando de nuevo la importancia de la variabilidad en la resistencia a condiciones estresantes por parte de este patógeno (Lianou y Koutsoumanis, 2012).

Las CMIs de apitoxina fueron empleadas en los estudios de destrucción de biopelículas exponiendo dichas biopelículas preformadas al efecto de la apitoxina durante 3 horas. El porcentaje de biopelículas destruidas osciló de forma muy importante entre las distintas cepas, con valores que oscilaron entre el 27,66 y el 68,22%. De igual modo estudios anteriores han demostrado que la melitina sola o en combinación con antimicrobianos comunes va a causar la destrucción de las

biopelículas preformadas por patógenos de transmisión alimentaria, así como otros patógenos de las personas como puede ser *Acinetobacter baumannii* (Picoli *et al.* 2017, Bardbari *et al.* 2018). En base a los resultados de esta investigación, así como a otros estudios previos, la apitoxina se configura como una alternativa potencial en combinación con otras sustancias para la eliminación de biopelículas en fases avanzadas en diferentes tipos de superficies.

La formación de biopelículas y la motilidad bacteriana son dos procesos antagonistas en las bacterias. Los resultados del presente estudio han puesto de manifiesto que concentraciones subinhibitorias de apitoxina incrementaron de forma significativa la motilidad en las cepas de *Salmonella* estudiadas. Sin embargo, para el caso de *S.* Isangi Lhica IG1 y *S.* Infantis Lhica I17, la motilidad no se vio significativamente afectada por este veneno. El resultado observado para el caso de la movilidad de estas bacterias es similar a la observada en los estudios de biopelículas. En este sentido, una reducción de la formación de biopelículas por la apitoxina se acompañó de una mayor movilidad. La movilidad de estos agentes se debe probablemente a un incremento en la síntesis de flagelos, acompañándose de un incremento en la virulencia de las células de *Salmonella* (Fabrega y Vila, 2013). De este modo una regulación significativamente positiva de los genes de virulencia *inv*A e *hil*A fue observada en *S*. Newport Lhica N2 en la presencia de apitoxina. Sin embargo *S*. Typhimurium Lhica T22 mostró una regulación significativamente negativa de *inv*A. Un estudio anterior evaluando los efectos de conservantes de los alimentos sobre la expresión génica en *Salmonella* puso de manifiesto que la transcripción de los genes de virulencia fue dependiente de cada cepa en concreto (Lamas *et al*. 2018c, 2018b). Otro estudio también observó diferentes perfiles de transcripción de diferentes cepas de *S*. Typhimurium en un medio ácido (O'Leary *et al* 2015). La expresión del gen *csg*D estuvo regulado de forma negativa en *S*. Typhimurium y *S.* Newport en la presencia de apitoxina, lo cual se correlaciona con una menor formación de biopelículas, circunstancia que se ha observado en estas cepas. Un estudio previo llevado a cabo en *Acinetobacter baumannii* demostró una inhibición de la transcripción de genes relativos a la formación de biopelículas en presencia de melitina (Bardbari *et al* 2018). Sin embargo, a cepa de *S*. Enteritidis ET2 mostró una regulación positiva del gen *csg*D. En esta cepa, hemos observado que no hay inhibición de la formación de biopelículas en presencia de apitoxina, lo que es probablemente debido a la sobrerregulación positiva del gen *csg*D como un mecanismo que se contrapone a los efectos de la apitoxina.

En este estudio, la transcripción de los tres RNAs pequeños (sRNA) (*arc*Z, *sro*C, *csr*B) que promueven la formación de biopelículas, así como los tres RNAs pequeños (*rpr*A, *oxy*S, *dsr*A) que inhiben la formación de biopelículas fue también evaluada. La transcripción positiva de *sro*C, principalmente en *S*. Typhimurium Lhica T22 y *S*. Newport Lhica N2 debe de ser tenida en cuenta. Este RNA pequeño causa la regulación negativa de *Mgr*R mediante la unión a su mRNA. Esta regulación negativa se relaciona con cambios en los lipopolisacáridos de la membrana celular, que conllevan un incremento a la resistencia a la Polymixina B, un antibiótico que se une a la membrana

de la célula bacteriana y altera su estructura (Acuña *et al.* 2016). Por lo tanto, la sobrerregulación de *sro*C puede considerarse como un mecanismo de defensa frente a los efectos de la apitoxina en las membranas de la célula bacteriana. La sobrerregulación de *arc*Z en *S*. Enteritidis Lhica ET2 es también algo digno de ser remarcado. Este RNA pequeño activa la transcripción de *csg*D e incrementa la formación de biopelículas. Por lo tanto, se correlaciona con el hecho de que no existe un cambio aparente en la formación de biopelículas por parte de esta cepa (Monteiro *et al*. 2012). Los RNAs pequeños que inhiben la formación de biopelículas (*rpr*A, *oxy*S y *dsr*A) estuvieron especialmente sobre regulados en la presencia de apitoxina en las cepas de *S*. Typhimurium Lhica T22 y *S*. Newport Lhica N2, indicando una baja formación de biopelículas en estas cepas en la presencia de apitoxina. En el caso del gen *dsr*A, este RNA pequeño estuvo sobre regulado en las tres cepas estudiadas. Esta sobrerregulación incrementa la expresión de bombas de expulsión de fármacos en la presencia de antibióticos. Es posible que las presencias intracelulares de algunos componentes de la apitoxina tengan como efecto un incremento de la expresión de estas bombas de expulsión de fármacos como un método para eliminar estos compuestos. Los resultados de los estudios de transcriptómica observados en este trabajo han mostrado que concentraciones subinhibitorias de apitoxina causan una modificación del perfil de transcripción de *Salmonella*.

5.6. Recuentos de enterobacterias en muestras de heces y tejidos de cuyes tratados con apitoxina y tetraciclina.

Los recuentos de los microorganismos estudiados (UFC/g), tanto para muestreos de hisopados rectales como de tejidos, tales como ganglios mesentéricos, tomados de cuyes que fueron infectados con: *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Escherichia coli,* para someterlos a ensayo con el propósito de evaluar el proceso de aplicación terapéutico de cuatro concentraciones de apitoxina, una de Tetraciclina y frente a animales control. Se ha podido comprobar que las diferencias mínimas significativas, en general, se encuentran entre 700 y 900 µg/dosis/día de apitoxina, para valores de las medias entre 2,6 a 2,8 Log UFC/g y a las 72 horas. Por otra parte, para el empleo de tetraciclina como factor de comparación, tanto para hisopados rectales como para tejidos, se tienen medias entre 2,6 a 3,8 log UFC/g a las 72 horas y con la concentración única que es 150 µg/dosis/día del antibacteriano. Vemos por lo tanto que se alcanzan poblaciones mayores de bacterias con el empleo de la tetraciclina en comparación con el empleo de apitoxina. Por otra parte se ha puesto de manifiesto en los resultados la gran diferencia existente con respecto al caso de los animales que no fueron sometidos a tratamiento ni con apitoxina nin con tetraciclina, lo cual supone una confirmación genérica de las propiedades antimicrobianas “in vivo” de esta sustancia.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Con estos resultados se confirma la hipótesis que dice: “Si se administran parenteralmente concentraciones de apitoxina y en un tiempo adecuado, a cuyes portadores de cepas de enterobacterias patógenas, entonces el proceso de control

terapéutico bacteriano para cuyes en fase de engorde es eficiente en el 50% de los individuos".

Trabajos realizados por Jáuregui *et al*. (2017), tanto en cuyes para enterobacterias como también para pollos de engorde, señalan que hay acción antibacteriana de la apitoxina para cepas de enterobacterias patógenas para las dos especies animales señaladas; en esta misma línea de investigación, Han *et al.* (2010), investigaron el uso de apitoxina administrada en el agua de bebida a pollos de engorde, con el control de enfermedades bacterianas entéricas, reportadas en pollos. Aldás (2019), también controló colimastitis en vacas lecheras con 1mg/ml de apitoxina y con tres dosis parenterales de 1ml, suponiendo 1mg por cada 100 kg de peso vivo.

Investigaciones de Bogdanov (2015), demuestran que la melitina, principal péptido de la apitoxina, entre otras formas de actuar contra las células bacterianas, provoca también hemólisis mediante un proceso de ósmosis coloidal, así como en casos de estrés osmótica, con afectaciones de la membrana citoplasmática, al volumen intracelular y a la permeabilidad de los iones debido a la formación de poros que son dependientes de la temperatura, pH, fuerza iónica y composición de los lípidos.

Tal como manifiesta Husseneder *et al*. (2016), la melitina, componente principal de la apitoxina, tiene la capacidad de alterar la fisiología de las proteínas de membrana, siendo uno de los péptidos más utilizados para demostrar interacciones entre lípidos y proteínas a nivel molecular, forma en la que provoca la agregación e inmovilización de proteínas en presencia de bicapas lipídicas. Este mismo polipéptido estructural del veneno de abejas, por su complejidad estructural y sinergismo con otros péptidos naturales, según Raghuraman y Chattopadhyay, (2007), en la célula bacteriana provoca la formación de canales y la selectividad para la formación de poros, más para aniones que para cationes, ya que en el extremo carboxi-terminal (C-) se acumulan cationes, en cambio en el extremo amino terminal (R-NH_2) tal y como se ha comentado anteriormente.

Park, et al. (2014), señalan que la melitina y la PLA2 actúan sinérgicamente, coinciden además con Alía *et al*. (2013), quienes confirman la capacidad que tiene la melitina para hiperactivar a la fosfoliphasa A2 y de esta manera provocar ruptura de membranas plasmáticas, ya que las PLAS2 constituyen una superfamilia creciente de enzimas lipolíticas, actuando sobre sustratos membranosos al igual que actúa la melitina (Peters *et al.* 2010 y Park *et al.* 2014). De este modo el empleo de apitoxina, más que el uso de la melitina de forma individual puede conllevar efectos sinérgicos antimicrobianos entre los distintos compuestos de dicha sustancia que se han puesto de manifiesto con los buenos resultados obtenidos en los tratamientos de los cuyes.

USC
DE COMPOSTELA

5.7. Ganancia de pesos corporales de cuyes durante el ensayo

Es necesario recalcar que los cobayos del ensayo, por la naturaleza de las actividades llevadas a cabo, tales como las tomas de muestras mediante hisopados,

sacrificio de animales para muestreos de tejidos, inyecciones parenterales de apitoxina, razón por la que se emplearon los animales que pasaron todas estas pruebas, de manera que a partir de día 7 de iniciado el ensayo se tomaron pesos corporales que se consideraron como iniciales; posteriormente, y en consideración a no estresar a los cuyes, 21 días después se vuelve a controlar pesos corporales para establecer diferencias entre valores de peso iniciales y finales.

Estas investigaciones que han tomado como objeto de estudio a la apitoxina, confirman, al margen de las propiedades antimicrobinas, las propiedades sobre el metabolismo de los animales de esta sustancia, reflejándose en una mayor ganancia de peso vivo, en este caso para los cuyes, que como se ha demostrado en dos semanas de experimento, ha contribuído a superar el estrés sufrido por los animales durante la primera semana del ensayo.

Los resultados concernientes a ganancia de pesos corporales vivos de los cuyes objeto de esta investigación, durante 15 días, demuestran una clara ventaja, en relacióna la ganacia de peso, a favor de los grupos que recibieron, vía parenteral y por tres días consecutivos: apitoxina así como también tetraciclina, de manera especial con apitoxina en 800 µg/dosis /día, superando en media de peso al grupo control con 128,6 g.

En relación con otros trabajos que pueden explicar esta circunstancia, Aguilar, *et al*. (2014) hacen referencia a que el cortisol, como hormona esteroidea, está sujeta al eje hipotalámo-hipofisiario-adrenal, cuya deficiencia sérica en niños produce alteraciones en el tejido adiposo y alteraciones en el desarrollo físico. En este sentido Guerra, *et al*. (2018), administrando apitoxina a pollos de engorde en el agua de bebida, 0,15 - 0,35 y 0,50 mg/l/día/ durante 7 días consecutivos y alternado una semana sin apitoxina entre cada dosis, demostraron incrementos de cortisol en sangre, atribuyéndosele a la apitoxina también mejoras en los niveles de sanguíneos de amilasa, enzima que acelera la hidrolisis de carbohidratos, lográndose así una asimilación más eficiente. Los resultados logrados fueron incrementos de cortisol de 5,45 µg/dl y una ganancia de peso vivo de 2015,80 g frene a los testigos que obtuvieron 3,9 µg/dl de cortisol y una ganancia de peso vivo de 1870,37 g. El empleo de corticosteroides conjuntamente con otras sustancias para el engorde del ganado es un hecho conocido. De este modo, la apitoxina parece funcionar induciendo mayores liberaciones de cortisol endógeno que estarían relacionados con una mayor ganancia de peso de los cuyes tratados.

En la misma línea de lo mencionado, la apitoxina, según los resultados de estudios reportados por Vick, *et al.* (1972); Vick*, et al*.(1976); Silvano-Días, *et al*. (2020) y Pacheco, *et al.* (2014), a través de la melitina y la apamina estimula el eje hipotálamo-hipofisiario-suprarenal para contribuir al incremento de los niveles plasmáticos de cortisol en animales tratados con dosis de apitoxina, específicamente Vick, et al (1972 y 1976), trabajando en monos Rhesus y en perros, encontraron elevación de los niveles de cortisol hasta por 7 días después de una dosis de apitoxina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Varios autores han empleado la apitoxina como sustancia promotora del crecimiento siendo la especie más probada para su empleo en broilers (Han, *et al*. 2010b; Rabie, *et al* 2018; Kim *et al.* 2018; Jáuregui*, et al.* 2017 y Guerra, *et al*. 2018), también se ha probado en cerdos (Han, *et al*. 2009). Después de la prohibición del empleo de antimicrobianos como promotores del crecimiento en Europa, la alternativa de tratamiento basadas en el empleo de sustancias naturales ha ganado una gran importancia y podría ser una opción el empleo de apitoxina.

Sin embargo, en el caso de los tratamientos en broilers referenciados anteriormente (Han, *et al*. 2010b; Rabie, *et al*. 2018; Kim, *et al.* 2018, Jáuregui, *et al*, 2017 y Guerra, *et al*. 2018) el empleo de esta sustancia fue en el agua de bebida o bien en el pienso, siendo empleada en el agua de bebida a razón de 0,5-1 mg de apitoxina por litro de agua de bebida (Han, *et al.* 2010b), incluso hasta 2 mg/l de agua (Rabie, *et al*. 2018). Han, *et al*. (2010) observaron una mejora en la ingesta de pienso y un mayor incremento de peso de los broilers a los 28 días tanto en el lote tratado con 0,5 mg por litro de agua de bebida, como en el caso del lote tratado con 1mg, con una ganancia próxima, en este último caso, a los 200 g en relación al grupo control.

También Rabie, *et al*. (2018) encuentran ganancias de peso, si bien menores a los antes referidos, sin embargo, concluyen que no siempre las dosis mayores (2 mg/litro de agua), igual que los resultados de esta investigación (900 µg/ml), son las que obtienen mayores ganancias de peso, lo cual justifica un estudio pormenorizado de las dosis a emplear cuando se hace uso de estas sustancias como promotoras del crecimiento.

De manera especial, los hallazgos reseñados ponen de manifiesto que el empleo de apitoxina en agua de bebida puede ser una alternativa más simple y que puede obtener resultados de interés. Por su parte, mediante el empleo de dosis menores de 10 a 500 µg/kg de pienso también determinaron incremento del peso y del índice de conversión. De igual manera, el tratamiento en cerdos a dosis de hasta 2,5 mg/kg de peso (Han, *et al*. 2009) ha puesto de manifiesto un importante incremento de IgG y otras mejoras que pueden tener un efecto clínico en los animales.

En este trabajo realizado en cobayos, no sólo se ha detectado un incremento de peso significativo en los animales tratados en relación a los animales control, sino que también se han observado efectos clínicos de interés como se ha puesto de manifiesto por la disminución de los recuentos de bacterias patógenas. También Jang, (2003); Park, *et al*. (2010) y Matysiak, *et al*., (2011) le atribuyen a la apitoxina propiedades estimulantes del sistema inmunológico. De igual manera, los trabajos de investigación de Guerra, *et al.* (2018), si bien realizados en pollos de engorde, demuestran las bondades de la apitoxina para generar cortisol en el organismo del animal estresado y de esta manera estimular el equilibrio homeostático para superar situaciones de sobrecarga en el animal siendo por lo tanto un elemento importante en el mantenimiento de los animales en este tipo de situaciones. También Vassili, et al.

(2004) y Jung, *et al.* (2013) señalan la contribución a la mejora del metabolismo que induce la apitoxina y que se traduciría en una ganancia de peso de entre el 10 y el 26%.

5.8. Evaluación de los cuyes a los tratamientos: síntomas y muertes

De las lecturas de los cultivos bacterianos, tanto de hisopados rectales como a partir de muestras de tejidos tales como ganglios mesentéricos, se encontró que la apitoxina en soluciones actúan significativamente sobre cepas de enterobacterias en cuyes infectados, además causan reacciones secundarias muy esporádicas en cuyes así tratados, razón por la que se registraron 2 muertes, 1 para el grupo infectado con *Escherichia coli* y 1 para el grupo control (0,0). Las causas de las muertes fueron probablemente la asfixia debida a aglomeraciones. También se observaron cuyes con reacciones clínicas post-tratamiento 3 (1,6%): 1 para *Salmonella* Typhimurium y 2 para *Yersinia pseudotuberculosis.*

Estas reacciones secundarias mostradas por los animales han sido muy esporádicas en cuyes así tratados. Todas estas reacciones de grado moderado frente a las inyecciones de apitoxina, mostraron una recuperación satisfactoria, antes de las 4 horas.

Al respecto, de lo anterior Han, *et al.* (2010b); Arciniega, *et al.* (2017); Jáuregui, *et al* (2017); Guerra, *et al* (2018) y Aldás (2019), investigadores que han trabajado con pollo, cuyes y bovinos, no han reportado reacciones orgánicas en los animales tratados con apitoxina. Estos resultados demuestran el margen de seguridad que se tiene con el uso parenteral de la apitoxina en estos animales, producto que sería una buena alternativa para evitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1) Se ha puesto a punto una metodología para la obtención de apitoxina de 5 diferentes apiarios localizados en Ecuador, que ha demostrado un buen rendimiento con valores medios obtenidos para esta sustancia que oscilan entre 34 y 40 mg por apiario y unas características en cuanto a composición de esta toxina de origen natural similares a las obtenidas por la mayoría de otros autores que han trabajado con esta toxina. La melitina con un valor del 41% del total de compuestos de la apitoxina ha sido el principal péptido presente en esta sustancia.

2) *E. coli, Salmonella* Typhimurium y *Yersinia pseudotuberculosis* se han obtenido identificado y caracterizado mediante métodos microbiológicos clásicos, así como mediante métodos moleculares de secuenciación del gen 16S, siendo estos tres aislados de enterobacterias considerados causantes principales de enfermedades en cobayos criados en Ecuador.

3) El poder antimicrobiano de soluciones de apitoxina mediante el método de difusión en agar para soluciones de 600, 700, 800 y 900 µg/ml, ha sido caracterizado comparando los halos de inhibición con un control en el que se ha empleado una solución de 150 µg/ml de tetraciclina. El método de difusion ha puesto de manifiesto una efectividad similar entre las soluciones de apitoxina de 800 y 900 µg/ml (8 y 9 µg de apitoxina por disco respectivamente) y la solución de 150 µg/ml de tetraciclina (1,5µg de apitoxina por disco) en base a la obtención de unos halos de inhibición similares para las enterobacterias en estudio.

4) Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMBs) frente a 11 diferentes serotipos de *Salmonella* mediante el método de microdilución en medio líquido han obtenido valores de CMI entre 256 y 1024 µg/ml y una CMI_{90} de 512 µg/ml y una CMB entre 512 y 1024 µg/ml mostrando una mayor resistencia *S. enterica* subespecie salamae que los otros serotipos probados.

5) Las concentraciones subinhibitorias de apitoxina han mostrado capacidad para aumentar la motilidad de *Salmonella* en 14 cepas de un total de 16 cepas probadas y también han mostrado capacidad para reducer significativamente la formación de biopelículas por parte de *Salmonella* en 14 de 16 cepas probadas.

6) Las concentraciones subinhibitorias de apitoxina han mostrado un efecto variable sobre la transcriptomica relacionada con la formación de biopelículas y genes de virulencia y RNAs pequeños de *Salmonella.* La influencia de esta sustancia es variable en función de la cepa de *Salmonella* probada en concreto,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de tal modo que el mismo gen de virulencia o involucrado en la formación de biopelículas puede estar regulado positivamente en unas cepas y negativamente en otras mediante el empleo de esta toxina.

7) El tratamiento via parenteral con apitoxina de cobayas infectados con enterobacterias, aisladas previamente, causantes de enfermedades ha demostrado efectividad *in vivo*, al recontarse poblaciones menores de los patógenos a partir de muestras de hisopados rectales y diversos tejidos de los cobayas, mostrando diferencias significativas con respecto a los recuentos de los animales que no recibieron tratamiento y siendo comparables a los obtenidos mediante el tratamiento de los animales con tetraciclina. El tratamiento vía parenteral con apitoxina causó un bajo nivel de sintomatología adversa y un reducido número de bajas en los cobayas tratados con esta sustancia.

8) Los cobayas tratados con apitoxina (800-900 µg/ml/día) han mostrado una ganancia de peso significativamente mayor que los animales pertenecientes al grupo control con valores medios que llegaron a ser de 128,6 g superiores a los del grupo control. Estos valores de ganancia de peso por encima de los obtenidos por el grupo control han sido superiores también a los obtenidos mediante la administración de dosis de 150 µg/ml/día de tetraciclina, por lo que cabria la posibilidad de ser empleada como promotor del crecimiento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

Acuña, L.G., M.J. Barros, D. Peñaloza, P.I. Rodas, D. Paredes-Sabja, J.A. Fuentes F. Gil and I.L. Calderon (2016). A feed-forward loop between SroC and MgrR Small RNAs modulates the expression of *ept*B and the susceptibility to polymyxin B in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology* 162, 1996-2004.

Aguilar, C. M,J.,Sánchez, L.A.M., Mur, V.N.,, García. G. I., Rodríguez, L. M.A., Ortegón, P. A. y Cortes, C. E. (2014). Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico en niños y adultos; revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*. 29(5). Madrid. En: http://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.29.5.7273.

Ahumada,S.O (2016) El veneno de las abejas tiene propiedades curativas para el cáncer. Revista Química. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores Monterrey Campus Toluca, México, Disponible en: https://issuu.com/qorganicaestructural/docs/revista_quimica

Akbar-Karimi, Farhad-Ahmadi, Kazem-Parivar, Mohammad-Nabiuni, Saied-Haghi ghi, Sohrab-Imani y Hossein-Afrouzi, (2012). Effect of Honey Bee Venom on Lewis Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis, a Model for Multiple Sclerosis, *Department of Biology, Science and Research Branch*, Islamic Azad University, Tehran, Iran J Pharm Res. Spring;11(2):671-8.

Al-Ani, I., S. Zimmermann, J. Reichling, M. Wink (2015). Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, 22, 245-255.

Aldás, Ch, B. (2019). Potencial bactericida o bacteriostático del veneno de abejas (*Apis melifera*) para microorganismos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras. (Tesis de grado inédita). Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra. Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Ibarra- Ecuador.

Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E. & Caycedo, A. (2009). Producción de Cuyes.Fondo editorial de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Lima, Perú, 484pp.

Álvarez, M, M., Buesa, G, J., Castillo, G.J. y Vila, E.J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. ISBN-978-84-612-7852-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aoki, W., M. Ueda, (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics, *Pharmaceuticals*. 6, 1055-1081.

Araneda, D.; Leichtle, C, y Morales, U. (2011). Evaluación de dos frecuencias de colecta de apitoxina extraída de colmenas de *Apis mellifera* L. durante la época estival en la Región de La Araucanía, *IDESIA*, Chile, 2(29), pp. 145-150. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000200019

Arciniega, J. Mafla, S., Monroy A., Haro, L., Arteaga, V. *(*2017). Acción in vitro de la Apitoxina en entero bacterias de mayor prevalencia patógena procedente de cobayos. *Revista Veterinaria Redvet*, 18(9), Disponible en:https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009039.pdf

Arévalo, L. M.A., (2011). Efecto de la utilización del ajo macerado (Allium sativum) en el control de Yersinia pseudotuberculosis y Escherichia coli en cuyes, etapa crecimiento-engorde. (Tesis de grado, inédita), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela de Ingeniería Zootécnica, Riobamba - Ecuador.

Amaguaña, L. B. (2012). Estudio de Factibilidad para la reación de una Empresa de Producción y Comercialización de cuyes a través de la Asociatividad de los Pequeños Productores de la Parroquia rural Ascázubi del cantón Cayambe, provincia de Pichincha. Tesis previa a la obtención del título de Economista, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Económicas, Quito-Ecuador.

Ataucusi, Q. S., (2015). Manejo Técnico de la Crianza de Cuyes en la Sierra del Perú. Programa PRA Buenaventura CSE Arequipa. Editado por: *Cáritas del Perú*. JPG Corporación S.A.C.

Avilés, D., Martínez, MA., Landi, V., & Delgado JV. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*). Un recurso andino de interés agroalimentario. *Recursos Genéticos Animales*. 55: 87-91pp.

Avilés, D. (2016). Cracterización Genética del Cuy doméstico en América del Sur Mediante Marcadores Moleculares. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, *Departamento de Genética*, España.pp. 121-122.

Baek, Y.H., Huh, J.E., Lee, J.D., Choi, Do. Y. and Park, D.S.(2006), Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: *Mediation by (2- adrenoceptors. Brain Research*. 16, 305-310. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.086.

Balsalobre-Arenas, L. y Alarcón-Cavero, T. (2017). Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin;* 35(6): 367–376. doi: 10.1016/j.eimc.2017.01.002.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bardbari, A.M., Arabestani, M.R., Karami, M. *et al.* (2018). Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,* **37,** 443–454. https://doi.org/10.1007/s10096-018-3189-7

Bauer, A. W., Kirby, W. M. Sherris, J. C. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:497.

Bolívar, A. M., Rojas, A. y García-Lugo, P. (2013). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica Mérida-Venezuela, 3: pp. 25-33.

Bogdanov, S. (2015). Bee Venom: Composition, Health, Medicine. Recuperado de: http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/pdf.

Boutrin, M.F., H.A. Foster, W.W Pentreath (2008). The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. *Experimental Parasitology*, 119, 246-251.

Brunton, L., Lazo, J. y Parker, K. (2006). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Ed. Mc Graw Hill.

Bucio-Villalobos, C. y Martínez-Jaime, O. (2018). Extraction of apitoxin with an electric collector in Irapuato, Guanajuato, Mexico. Disponible en: https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/33987/37669

Cabrera, J. (2014). La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos. Quito: Laboratorios de melífera Ecuador.

Cahill, S.M., P. Desmarchelier, V. Fattori, A. Bruno, A. Cannavan (2017). Global perspectives on antimicrobial resistance in the food chain, *Food Protection Trends*, 37 353-360.

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos, 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Cárdenas-Perea, M. E., et al. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*. 94 pp.35-43.

Castro, H.J., Mendez-Lnocencio, J.I., Omidvar, B., Omidvar, J., Santilli, J., Nielsen., H.S., Pavot, A.P., Richert., J.R. and Bellanti, J. A. (2005), A Phase I Study of the safety of honey bee venom estract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Allergy & Asthma Projections*. 26, 470-476.

Caycedo, L. A., (2000). Experiencia Investigativas en la Producción de Cuyes: Contribución al Desarrollo Tecnológico de la Especie. Universidad de Nariño-Colombia. Facultad de Ciencias Pecuarias.

Caycedo, A., Zamora-Burbano, A., Echevarry-Potosí, S., Enríquez, R., Ortega-David, E., Burgos, M. y Caycedo, M. (2011). Producción sostenible de cuyes. Colombia: Asindetec.

Cercenado. E. y Saavedra-Lozano, J (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Desde el Laboratorio a La Clínica*. DOI: 10.1016/S1696-2818(09)71927-4

Chauca, L y Zaldívar, A. M. (1985). Investigaciones realizadas en nutrición selección y mejoramiento de cuyes en el Perú. INIPA, 2:30.

Chauca, L., Higaona, R., Muscari, R. y Pinto, J., (2006). Caracterización de la carcasa de seis genotipos de cuyes. En: Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancayo: APPA.

Chauca, L. (2013). Crianza del cuy Cavia porcellus y su impacto en el desarrollo rural. Instituto Nacional de Innovación Agraria. XXXVIII Reunión de la Asociación Peruana de Producción Animal APPA.

Chaudhry, Q, Piclin, N, Cotterill, J, Pintore, M, Price, N.R, Chrétien, J.R. and Roncaglioni, A. (2010). Global QSAR models of skin sensitisers for regulatory purposes. *Chemintry Central Journal*. 4: 51-55.

Choi J.H, Jang A.Y, Lin S, Lim S, Kim D, Park K, Han S.M, Yeo J.H, Seo H.S. (2015). Melittin, un péptido antimicrobiano derivado de veneno de abeja melífera, puede dirigirse a Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. *Molecular Medicine Reports* 12 (5): 6483-6490 [PubMed]. Disponible en: https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4275

Chopra, I. and M. Roberts (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, june 2001, 232-260.

Colagiorgi, A., R. Festa, P.A. Di Ciccio, M. Gogliettino, M. Balestrieri, G. Palmieri, A. Anastasio, A Ianieri, (2020). Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: a new potential tool to fight bacterial biofilms, *Food Control*. 107. 106815.

Comisión Europea, (2017). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance, pp. 1-24.

Comisión Europea, (2016). Eurobarometer Results on Antimicrobial Resistance Awareness, pp. 1-2.

Dathe, M, T. Wieprecht (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potentialto modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1462, 71-87.

De La Torre, L., Navarrete, H., Muriel M, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuados.

De Oliveira, S., Nogueira, R., Toledo da F., Rezende, F. y Miglino, M. A. (2013). Aspectos microscópicos de los órganos linfoides en el conejillo de indias (*Cavia porcellus*). Department of Surgery, *School of Veterinary Medicine and Animal Science* University of São Paulo, Brasil.

Delgado, B. G., Zuárez, D., Dayas, D., Ali, A. y Oliva, M. (2008). El veneno de abejas.Vigilancia Tecnológica mediante el estudio de las citas de patentes. *Revista* CENIC *Ciencias Biológicas*. 39(3): 149- 157.

Diacovich, L. And Gorvel, J. P.(2010). Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Reviews Microbiology*. 8, pp.117-128.

Donlan, R.M, J.W. Costerton, (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 167-193.

Dosler, S., E. Karaaslan, A.A. Gerceker (2016). Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy* 28, 95-103.

Durán, A.X.,Cifuentes, Y.L. y Ulloa, M. D.(2011). Evaluación de dos frecuencias de colecta de apitoxina extraída de colmenas de Apis mellifera L. durante la época estival en la Región de La Araucanía. IDESIA-Chile, 29(2),145-150. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v29n2/art19.pdf.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg,E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (Editores). (2006). The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition. Volume 6: *Proteobacteria*: Gamma Subclass, Edit Springer. Printed in Singapore. (BS/KYO).

EFSA (2017). European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015, EFSA J. 15 (2017) e04694,n/a.

EFSA (2018) European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, EFSA, and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, EFSA J. 16 (2018) e05.

European Medicines Agency, (2017). Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 30 European Countries in 2015, pp. 1-184.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Eze, O.B., Nwodo, O. F., and Ogugua, V. N. (2016). Therapeutic effect of honey bee venom. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 4(1):48-53. ISSN: 2348-7658.

Fábrega A, J. Vila (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 308-341.

FAO, Departamento de Agricultura (2010). Preoducción de Cuyes (*Cavia porcellus*). [en línea] disponible en: http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s01.htm.

Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz,N. J., y Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología¸ *Procedimientos en Microbiología Clínica*, Editorial Seimic, Epaña. ISBN-978-84-614-7932-0.

Fernández, C., Mardones, M. y Velásquez, L. (2014). Guía de Laboratorio de Microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina. Quito, Ecuador.

Fernández, J. (2015). Fundamentos Del Análisis Cromatografico. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Departamento de Ingeniería Química. Grupo de Investigación QUIMYTEC-UPCT.

Ferreira, M.T.L., Campelo-Batalha-Cox-Moore, D., Mancino-Da-Luz-Caixeta, D., Dos-Santos-Salú, M., Barreto-Farias, C.V., and Almeida-de-Azevedo, Z.M. (2018). Multiple bee stings, multiple organs involved: a case report. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. 51:560-562. doi:10.1590/0037-8682-0341-2017.

Finlay, B. B. and McFadden, G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Trends in Food Science & Technology*.124, pp.767-82. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.007

Fratini, F., G. Cilia, B. Turchi, A Felicioli (2017). Insects, archnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon* 130, 91-103.

Garcés, R. (2015). Incidencia de enterobacterias en cuyes del caserío Acapulco en el Cantón Mocha. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Medicina Veterinaria, Cevallos- Ecuador.

Garmendia, M., Selgrad, S., y Alezones, F., (2000). Salmonelosis en animales de laboratorio. *FONIAP DIVULGA*. Recuperado de: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd68/texto/mgarmendia.htm.

González-Pedrajo, B. y Dreyfus, G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*. 27, 45-63. En:http://www.facmed.unam.mx/deptos/

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Goodman, L.J. (2003). Form and function in the honey bee. *International Bee Research Association*, Cardiff, GBR.

Ghosh, C., P. Sarkar, R. Issa, J. Haldar, (2019). Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance, *Trends in Microbiology*. 27 323-338.

Guamán, P. M. V., (2014). Determinación del género y especie de Salmonella en cuyes Mestizos en Diferentes Sistemas de Crianza en la Comunidad de Oñacapac del Cantón Saraguro. Tesis de grado no publicada, Universidad politécnica Salesiana Sede Cuenca, Facultad de MEDICINA Veterinaria y Zootecnia.

Guerra, D, F., Espinosa, M., Arteaga, C. V. y Mafla, A, S. (2018). Acción de la apitoxina en la biosíntesis de cortisol y su efecto en el comportamiento productivo de pollos broiler. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra- Ecuador.

Guo,Y., Bao, Y., Meng, O.,Hu, X., Meng, O., Ren, L., Li, N. y Zhao, Y. (2012). Genómica de Inmunoglobulinas en el cobayo (*Cavia porcellus*). *Plos One*, 7(6): e39298. https: //doi.org/10.1371/journal.pone.0039298.

Han, S.M., Lee, K.G., Yeo, J.H., Kweon, H.Y., Woo, S.O., Lee, M.Y., Baek, H.J. and Park, K.K. (2007). Inhibitory effect of bee venom against ultraviolet B induced MMP-1 and MMP-3 in human dermal fibroblasts. *Journal of Apicultural Research*, 46, 94-98. doi.org/10.1080/00218839.2007.

Han S. M., Lee K. G., Yeo J. H., Hwang S. J., Jang C. H., Chenoweth P. J., Pak S. C.(2009).Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *American Journal of Chinese Medicine*, 37: 253–260. doi: 10.1142/S0192415X09006813.

Han, S.M., Lee, G.G. y Pak, K.K.(2010a), Antibacterial and antinflamatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(6):459-464.http:/doi:10.5897/JMPR09.427

Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Oh, B. Y.,Kim, B. S., Lee, W., Baek, H. J., Kim, S. T., Hwang, S. J. y Park, S. C. (2010b). Efect of honeybee venom supplementation in drinking wáter on growth performance perfomance of broiler chickens. *Poultry Science Association* Inc, Korea, 42: 253-268, doi: 10.3382/ps. 2010-00915.

Hartmann, A., J. Müllner, N. Meier, H. Hesekamp, P. van Meerbeeck, M.O. Habert, A. Kas, M.L. Tanguy, M. Mazmanian, H. Oya, N. Abuaf, H. Gaouar, S. Salhi, F. C. Beaupel, M.H. Fievet, D. Galanaud, S. Arguillere, E. Roze, B. Degos, D. Grabli, L. Lacomblez, C. Hubsch, M. Vidailhet, A.M. Bonnet, J.C. Corvol, M. Schüpbach (2016). Bee Venom for the treatment of Parkinson disease – A Randomized Controlled Clinical Trial. *Plos One* 11 (7): e0158235.

Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de Laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera.* San José- Costa Rica. Disponible en:

https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017854619990001 00010.

Hoelzer, K, Wong, N., Thomas, J, Talkington, K, Jungman, E. and Coukell, A. (2017). Antmicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: ¿what, and how strong, is the evidence? Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5496648/DOI: 10.1186/s12917-017-1131-3

Huang, C., Jin, H., Qian, Y., Qi, Sh., Luo, H., Luo, Q. and Zhang, Zh. (2013). Hybrid Melittin Cytolytic Peptide-Driven Ultrasmall Lipid Nanoparticles Block Melanoma Growth in Vivo. *ACS Nano,* 7, 7, 5791-5800.

Hudson, J.A. L.J. Frewer, G. Jones, P.A. Brereton, M.J. Whittingham, G. Stewart, (2017). The agri-food chain and antimicrobial resistance: a review, *Trends in Food Sciences &Technology*. 69, 131-147.

INIAP.(2013).ManejoTécnico de cuyes[en línea], disponible en: http:// www.iniap.gob.ec/ http://www.iniap.gob.ec/web/conocimientos-en-manejo-tecnico-de-cuyes-permite-mejoras-en-manejo-de-la-carne/.

Instituto Nacional de Estadística y Censo, (2012). Productos cárnicos.Disponible en: http://www.inec.gob.ec/estadisticas/SIN/co_alimentos.php?id=21139.03.01.

Jaramillo, R. P. (2007). Detección molecular por PCR yersinia pseudotuberculosis en material fecal de cuyes (Cavia porcellus). *Centro de Estudio en Salud*., 29-39.

Jang, M.H. (2003), Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of eyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *Journal Pharmacology Sciencies*. 91, 95-104.

Jaspers, E. and Overmann, J. (2004). Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can be found in Bacteria with Highly divergent Genomes and Ecophysiologies. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 70 (8): 4831-4839.

Jáuregui, S. D. *et al.* (2017a). Incidencia de la apitoxina en los órganos linfáticos de pollos broiler, en Avances, desarrollo y sustentabilidad agroambiental en Ecuador y Venezuela. Universidad de Los Andes (ULA), Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI). ISBN (digital) 978-9978-375-33-4 (Ecuador).

Jáuregui, S. D. *et al.* (2017b). Potencial del veneno de abejas (*Apis melífera*) en el control in vitro de enterobacterias patógenas para cuyes (*Cavia porcellus*), en Avances, desarrollo y sustentabilidad agroambiental en Ecuador y Venezuela. Universidad de Los Andes (ULA), Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI). ISBN (digital) 978-9978-375-33-4 (Ecuador).

Johnston, P., Dobson, A., & Rolff, J. (2016). Genomic Signatures of Experimental Adaptation to Antimicrobial Peptides in Staphylococcus aureus. *G3:Genes/ Genomes/ Genetics: Genetics of Immunity. (Bethesda).* doi: 10.1534/g3.115.023622.

Juhas, M., Van der Meer, J. R., Gaillard, M., Ardino, R. M., Hood, D. W. and Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Letters* 33, pp. 376-393.

Jung, B.G., Lee, J.A., Park,S.B., Hyun, P.M., Park, J.K., Suh, H.S., and Lee, B.J. (2013). Immunoprophylactic Effects of Administering Honeybee (*Apis melifera*) Venom Spray against *Salmonella* Gallinarum in Broiler Chicks. The Japanese Society of Veterinary Science. doi: 10.1292/jvms.13-0045

Junoda, T., López-Martina, J. y Gädickea, P. (2013). Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* entérica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Médica de Chile.* 141: 298-304.

Kaiser, S. Krüger, Ch.and Sacher, N. (2010). The Guinea Pig. En Handbook The Care and Management of Laboratory an Other Reseaech Animals, Edited by Robert *Hebrecht and James Kirkword*, Printed in Singapur.

Karatzas, K.A.G., L.P. Randall, M. Webber, L.J.V. Piddock, T.J. Humphrey,M.J. Woodward, N.G. Coldham (2008). Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants, *Applied and Environmental Microbiology*. 74, (5 00099-2240)/08: doi:10.1128/AEM.01931-07.

Kenner, R. (Director), (2012), Alimentos Contaminados [Película], Minesota, EEUU: *Magnolia Picture/ Riverroad Entertaimment*.

Kim, D.H., S.M. Han, M.C. Keum, S. Lee, B.K. An, S.R Lee & K.W. Lee (2018). Evaluation of bee venom as a novel feed additive in fast-growing broilers. *British Poultry Science*, 59 (4), 435-442. DOI: 10.1080/00071668.2018.1476675

Kim, S.T, Ji-Young Hwang, Myoung-Suk Sung, So-Yang Je, Dong-Rok Bae, Sang-Mi Han, and Sung-Hae Lee (2006). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Bee Venom against bacteria isolated from pigs and chickens. *Korean Journal of Veterinary Service* 29 (1): 19-26.

Kim, J.M., H.J. Jeon, H.J. Kim, C.K. Cho, H.S. Yoo (2014). Bee Venom Pharmacopuncture: An Effective Treatment for Complex Regional Pain Syndrome. *Journal of Pharmacopuncture*, 17(4) 066-069.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kim, W., Song Mi-Ok, Song, W., Kim, Ki-Jung, Chung, S.ln, Choi, Ch.-Soon, and Yong-Ha Park (2003). Comparison of 16S rDNA analysis and rep-PCR genomic fingerprinting for molecular identification of *Yersinia pseudotuberculosis. Antoine van Leeuwenhoek* 83:125-133.

Kokot, Z. J., & Matysiak,J.(2009). Simultaneous Determination of Major Constituents of Honeybee Venom by LC-DAD*, Chromatographia,* 69, nº 11-12. DOI: 10.1365/s10337-009-1052-9

Kokot, Z. J., Matysiak, J., Urbaniak, B. y Derezi□ski, P. (2011). New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 399 (7): 2487-2494. doi: 10.1007/s00216-010-4627-2.

Lamas, A., J.M. Miranda, P. Regal, B. Vázquez, C.M. Franco, A. Cepeda (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*. 206, 60-73.

Lamas, A., P. Regal, B. Vázquez, J.M. Miranda, A. Cepeda, C.M. Franco, (2018a). Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*, *Food Control.* 90, 1-9.

Lamas, A., P. Regal, B. Vázquez, J.M. Miranda, A. Cepeda, C.M. Franco, (2018b). *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assesment from farm to fork, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98, 4014-4032.

Lamas, A, A.M. Paz-Mendez, P. Regal, B. Vázquez, J.M. Miranda, A. Cepeda, C.M. Franco (2018c). Food preservatives influence biofilm formation, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*, *LWT* 97, 1-8.

Lambris, J. D., Ricklin, D. and Geisbrecht, B.V.(2008). Complement evasion By human pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 6, pp. 132-142.

Lara, M. A. (2011). "Efecto de la utilización del ajo macerado (*Allium sativum*) en el control de *Yersinia pseudotuberculosis* y *Escherichia coli* en cuyes, etapa crecimiento – engorde". Riobamba – Ecuador.

Laverty, G., S.P. Gorman, B.F. Gilmore, (2011). The potential of antimicrobial peptides as biocides, *International Journal of Molecular Sciences*. 12 6566-6596.

Layme, M. A., Perales C. R., Chavera C. A., César Gavidia C. C. y Calle E. S., (2011). Lesiones anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de salmonella sp. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, (2)4. ISSN 1609-9117.

Lazarev, V., Stipkovits, L., Biro, J., Miklodi, D., Shkarupeta, M., Titova, G., Govorun, V. (2004). Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and Infection*, 6: 536–541.

Leandro, L.F., C.A. Mendes, L.A. Casemiro, A.H.C. Vinholis, W.R. Cunha, R. De Almeida, C.H.G. Martins, (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and

phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87, 147-155.

Lee, J.A., M.J. Son, J. Choi, J.H. Jun, J. Kim, M. S. Lee (2014). Bee venom acupuncture for rheumatoid arthritis: a systematic review of randomised clinical trials. *BMJ Open*, 4, e006140
.
Lee, J.D., H.J. Park, Y. Chae, and S. Lim (2005). An overview of Bee Venom Acupuncture in the treatment of Arthritis. *eCam*, 2(1), 79-84.

Lee, K. (2012). Correlation between the constitution of sasang and sexual difference in the hypersensitive reaction of sweet bee venom. *Journal of Pharmacopuncture*. 15(3):45-47. doi:10.3831/KPI.2012.15.005.

Lianou, A., K.P. Koutsoumanis (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160 (2) 171-178.

Livak, K.J., T.D. Schmittgen, (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25, 402-408.

Mahmoud, A. (2012). Studies on bee venom and its medical uses. International *Journal of Advancements in Research & Technology* . 1(2):1-15.

Malbrán, G. C. (2012). Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. MIC, *Testing Clinical and Laboratory Standars Institute*. 32(2).

Matsuura, S. A., Morales, S. C., Calle,E.S. y Ara, G. M. (2010). Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de Salmonella entérica aislada de cuyes de crianza familiar commercial en la provincia de Carhuaz, Ancash. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, ISSN 1609-n9117.*

Matysiak, J.; Schmelzer, E.C. M .; Neubert, R.H. H.; Kokot, Z. J. (2011), *Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nano ESI-QqTOF mass spectrometry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54 (2) 273–278.

Meylan, E., Tschopp, J. and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 7098, pp. 39-44.

Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social (2014). Crianza de cuyes. *En fondo de cooperacion para el desarrollo social*. pp 35.

Monteiro, C., K. Papenfort, K. Hentrich, I. Ahmad, S. Le Guyon, R. Reimann N. Grantcharova & U. Römling (2012). Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *RNA Biology*, 9 489-502.

Morales, S. (2013). La sanidad en sistemas de crianza comercial de cuyes. En: XXXVI *Reunion Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. PP. 38-44.

Moreno, R.A.(1989). El cuy. 2ª ed. Lima, *UNA La Molina*. pp. 128.

Munford, R. S.(2008). Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: A human disease determinant? *Infection and Immunity*. 76(2), pp. 454-465.

Murray, P. R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M. A. (2009). Microbiología médica. Sexta. Editorial: *Elsevier Mosby*.

Nevalainen, T.J., G.G. Graham, K.F., Scott. (2008). Antibacterial actions of secreted phospholipases A2, Review. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781, 1-9.

O'Leary, D., E.M. McCabe, M.P. McCusker, M. Martins, S. Fanning, G. Duffy (2015). Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 7-16.

Ortega, O. G., Jiménez, A.R., Ara, G. M., Morales, C. S., (2015). La Salmonelosis como factor de riesgo de mortinatalidad en cuyes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. (26)4. Doi.org:10.15381.

Omar, R. E. (2014). Efecto de la recolección de veneno de abejas en la medición de la actividad de cría de la colonia de abejas *Apis mellifera L.* Middle East Journal of Agriculture. Egypto. 6(2), (409-414). En:https//www.curesweb.com>mejar>mejar.

Orsolic, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Springer Science+Business Media*, 31:173–194.

Pacheco, E. F. *et al*.(2014). Apitoxina e sua Atividade Anti-inflamatória e Antinociceptiva. *Acta Apicola Brasilica*, 2 (2) Downloads/2019-6377-1-PB%20(2).pdf

Palmieri, G., M. Balestrieri, Y.T.R. Proroga, L. Falcigno, A. Facchiano, A. Riccio, F. Capuano, R. Marrone, G. Neglia, A. Anastasio, (2016). New antimicrobial peptides against foodborne pathogens: from in silico design to experimental evidence, *Food Chemistry.* 211, 546-554.

Palmieri, G., M. Balestrieri, F. Capuano, Y.T.R. Proroga, F. Pomilio, P. Centorame, Riccio, R. Marrone, A. Anastasio, (2018). Bactericidal and antibiofilm activity of bactenecin-derivative peptides against the food-pathogen *Listeria monocytogenes*: new perspectives for food processing industry, *International Journal Food Microbiology*. 279, 33-42.

Park, M.H., Choi, M.S., Kwak, D.H., Oh, K.W., Yoon, D.Y., Han, S.B., Song, H.S., Song, M.J. and Hong, J.T. (2010). Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-B. *The Prostate*, 17, 801-812.

Park D. Je Won Jung, Mi Ok Lee, Si Young Lee, Boyun Kim, Hye Jun Jin, Jiyoung Kim, Young-Joon Ahn, Ki Won Lee, Yong Sang Song, Seunghun Hong, James E. Womack, Hyung Wook Kwon. (2014). Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Peptides.*, 53:185-193.

Pasterán F, Galas M. (2008) Manual de Dto. Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* de Referencia WHO Global Salm Surv para América del Sur.

Patiño, B. R. (2000). Conozca la Yersiniosis en los cuyes. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología. Proyecto 971523171. *CORPOICA.* San Juan de Pasto-Colombia.

Peña, L.; Pineda, M.; Hernández, M.; Rodríguez-Acosta, A. (2006). Toxinas Naturales: abejas y su veneno. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 25 (1): 6-10.

Peters, B., Shirtliff, M., & Jabra-Rizk, M. (2010). Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathogens.* 6(10):doi.org/10.1371/journal. ppat.1001067.

Picoli, T., C.M. Peter, J.L. Zani, S.B. Waller, M.G. Lopes, K.N. Boesche, G.D.A. Vargas, S. de Oliveira Hübner, G. Fisher, (2017). Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk, *Microbial Pathogenecis*. 112, 57-62.

Pick, T. (1986), Venom of the Hymenoptera. Biochemical. *Pharmacological and Behav-Journal Aspects. Academic Press*, London.

Prescott, M. L., Harley, P. H. y Klein, A. D.(2010). *Microbiologia*. Mc Graw Hill, Santa Fe de Bogotá-Colombia.

Promega Corporation (2010). Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Quick Protocol, FB022. Instrucciones para uso de productos A1120, A1123,A1125 AND A1620. *Printed in USA*. Disponible en: https://worldwide.promega.com/

Pulgar, V.J. (1952). El curí o cuy. Ministerio de Agricultura, Bogotá, Colombia.

Quinn, P. J. y Markey, B. K. (2005). Elementos de Microbiología Veterinaria, *Editorial Acribia, Barcelona*, España. ISBN: 9788420010571. pp. 290.

Rabie, A.H., A.M. El Kaiaty, M.S.H. Hassan and F.K.R. Stino (2018). Influence of some Honey Bee products and a growth promoter supplementation on productive and physiological performance of broiler chickens. *Egyptian Poultry Science Journal* 38, (11)513-531.

Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Springer Science+Business Media*, 27:189-223.

Remache, R Y.(2019).Comparación de la actividad antimicrobiana de dos muestras de apitoxina en función de la concentración de melitina frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella spp*. y *Candida albicans*. Tesis Química Farmacéutica, Universidad Central del Ecuador, Quito. En: http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20429/1/T-UCE-0008-CQU-211.pdf.

Roodt, A.R., Salomón, O.D., Orduna, T.A., Robles, O.L., Paniagua, S.J., Alagón, y C.A..(2005). Envenenamiento por picaduras de abeja. *Gaceta Médica México*. 141:215-222.

Rybak-Chmielewska, H. y Szczsna (2004). HPLC Study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Journal of Apicultural Science*., pp. 103-109.

Rybak, M. and Skubida, P. (2007). Application of coupled electrical and sound stimulation for honeybee venom collection. *Journal of Apicultural Science* 51 (2): 63-66.

Sanad, R.E.and Mohanny, K. M.(2013). The Efficacy of a New Modified Apparatus for Collecting Bee Venom in Relation to Some Biological Aspects of Honeybee Colonies. *Journal of American Science*. 9(10): 177-182 Disponible en: http://www.jofamericanscience.org.

Sánchez, C. (2011). Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions. *Nature Reviews Microbiolgy*. 9, pp. 630-631.

Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., and Egen. W.B., (1989). Lethality of killer bee stings. *Nature* 337:413. doi:0.1038/337413a0.

Serna, M., y Soto, D. (2012), Evaluación de la calidad de la Apitoxina en las abejas *Apis mellífera* de la Región de Onzaga-Santander mediante la cuantificación de los componentes melitina, apamina, fosfolipasa A2 y MCD. Disponible en: https://www.academia.edu/18641440/Articulo_tesis.

Shimpi, R., Chaudhari, P., Deshmukh, R., Devare,S., Bagad, Y., and Bhurat.M., (2016). A review: pharmacotherapeutics of bee venom. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (WJPPS) 5:656-667. doi:10.20959/wjpps20167-7187.

Silvano-Días, A., Da Silva-Ferreira, K., y Riveiro- De Oliveira, A. (2020). La apitoxina como recurso terapéutico para artritis reumatoide: Una revisión integrativa.

Revista NBC - Belo Horizonte, 19(10). Disponible en: www.metodista.br bio download

Sobral, F., Sampaio,A., Falcao,S., Queiroz,M.J., Calhelha, R.C., Vilas-Boas, M., and Ferreira.I.C., (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 94:172-177. doi:10.1016/j.fct.2016.06.008.

Socarras, K.M., P.A.S. Theophilus, J.P. Torres, K. Gupta, E. Sapi, (2017). Antimicrobial activity of bee venom and melittin against *Borrelia burgdorferi*. *Antibiotics Antibiotics. 6* (4), 31; https://doi.org/10.3390/antibiotics6040031

Steenackers, K. Hermans, J. Vanderleyden, S.C.J. De Keersmaecker, (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 45, 502-531.

Stepanovic, S., I. Cirkovic, L. Ranin, M. Svabic-Vlahovic, (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface, *Letters in Applied Microbiology*. 38, 428-432.

Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Método de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Editor Picazo J J.Disponible en: www.seimc.org.

Tatú, E. (1989), Contribution to the Antimicrobial action of bee venom. Romania: *Apimondia Funndation*. Recuperado de: http://apimondiafoundation.org/foundation/files/1989/Elena%20TATU.pdf

Téllez, G.A. y Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. Grupo de inmunología molecular, *Universidad del Quindío*, Armenia, Colombia. 14(1): 55-67.

Tortora, G. J., Berdell, R., Funke, B. R. and Case, C. L.(2007). Mecanismos de patogenicidad bacteriana. Introducción a la microbiología. 9a. Ed. *Editorial Panamericana*.

Tunkel, A. R. (2016). Introducción a la Biología de las Enfermedades Infecciosas. *Manual MSD*. Disponible en: http://www.msdmanuales.com/

Urquizo, H. H. (2008). Estructuras supersecundarias: Motivos y Dominios, *Wordpress.com*. Disponible en: https://temasdebioquimica.wordpress.com.

Valderama, H. R. (2003).Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*.En: http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v16n3/v16n3a3.pdf.

Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B and de Graaf D. C.(2014). Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *Journal of Proteomics*. 99:169-178. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot. 2013.04.039.

Vassili, N. L., Stipkovists, L., Biro, J., Miklodi, D., Shkarupeta, M., Titova, G. A., Akopian T. A., y Govorun,V. M. (2004). Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and Infection.* 6(6). 536-541 .DOI: 10.1016/j.micinf.2004.02.006.

Vick J.A, Mehlman B, Brooks R, Phillips SJ, Shipman W. (1972). Efecto del veneno de abeja y la melitina sobre el cortisol plasmático en el mono no anestesiado. Toxicon,10(4) 377-80 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5070576/ doi: 10.1016 / 0041-0101 (72) 90119-5.

Vick J.A, Warren G.B, Brooks R.B (1976). The effect of treatment with whole bee venom on cage activity and plasma cortisol levels in the arthritic dog. *Inflammation* 1, 167-174 doi: 10.1007 / BF00917527.

Villarruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sánchez, T., Islas, A. (2004). Péptidos Naturales Antimicrobianos: escudo esencial dela respuesta inmune. *Investigación en Salud*. Centro Universitario de Ciencias de la Salud México.VI (3). [en línea]. Disponible en: https://www.redalyc.org/artículo.oa?id=14260306.

Weigel, L. M. et al. (2003). Genetic analysis of a high level vancomicyn resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 5650. pp.1569-1571.

Winston, M.L. (1987). The biology of the honey bee. *Harvard University Press, Cambridge*, MA, USA.

Wu, H. J., Wang, A. H. J. and Jennings, M. P.(2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*.12, pp.93-101.

Wu, X., G. Narsimhan, (2017). Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of melittin against *Listeria monocytogenes*, LWT - *Food Science and Technology. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 75, 578-581.

Yarlequé, P. M. y Wong, Ch. J. (2018). Efecto antibacteriano in vitro de apitoxina comercial de Apis mellifera frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y su comparación con ceftriaxona, meropenem y penicilina benzatínica. Informe final de Tesis para título de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Química, Universidad María Auxiliadora, Lima- Perú. Disponible en: http://repositorio.uma.edu.pe/handle/UMA/166.

Yu, X. J., Mc Gourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E. and Holden, D. W.(2010). pH Sensing by Intracellular *Salmonella* Induces Effector Translocation. *Science*. 5981, pp.1040-1043. DOI: 10.1126/science.1189000

Zaldivar, *et al*. (1990). Producción de cuyes (*Cavia porcellus*), FAO, Lima-Perú.

Zipfel, P. F., Würzner, R. and Skerk, C. (2007). Review, Complement evasion of pathogens:Common strategies are shared by diverse organisms. *Molecular Immunology*. 16, 3850-3857.

Zhou, J.; Zhao, J.; Zhang, S.; Shen, J.; Qi, Y.; Xue, X.; Li, Y.; Wub, L.; Zhang, J.; Chen, F. y Chen, L. (2010). Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 404 (2) 171-178. doi:10.1016/j.ab.2010.05.014.

Zolfagharian H, Mohammad M, Babaie M., (2016). El veneno de abeja (*Apis mellifera*) una alternativa de potencial eficaz a la gentamicina para cepas de bacterias específicas. *Journal Pharmacopuncture*, sep 19(3): 225-230 [Pubmed].Doi: 10.3831/KPI.2016.19.023

Zumárranga, S. (2011). Invovaciones Gastronómicas del cuy. Imbabura disponible en: http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1139/2/06%

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO

Publicaciones

Parte de los apartados 3.6.1., 3.6.2., 3.6.3., 3.6.4., 3.6.5., 4.3.1., 4.3.2., 4.3.3 y 5.5. han dado lugar a la siguiente publicación:

Arteaga, V., Lamas A., Regal, P. Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A. and C.M. Franco (2019). Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. *Microbial Pathogenesis,* vol 137, article number 103771.

Todos los autores contribuyeron igualmente a la publicación

Microbial Pathogenesis ISSN: 0882-4010, Ed Elsevier
Journal Citation Reports(Clarivate Analytics): Factor de Impacto (2019): 2,914
SCOPUS citescore 2019: 4,4

La editorial autoriza la reproducción del contenido de los artículas para tesis doctorales

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA