



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE BACTERIAS
MULTIRESISTENTES A ANTIBIOTICOS AISLADAS
DE CARNE DE POLLO DE 3 DIFERENTES MARCAS
COMERCIALES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ROJAS LEÓN DIANA MARCELA

MÉXICO, D.F.

2005



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

m350903



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Profa. Biserka Sveshtarova Pekarkova

Vocal Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre

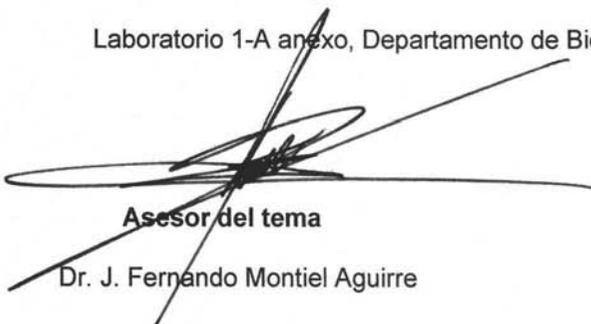
Secretario Profa. Beatriz de Guadalupe Serrano López

1er suplente Prof. Luciano Hernández Gómez

2do suplente Prof. José Ignacio Parámo Ramírez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 1-A anexo, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.



Asesor del tema

Dr. J. Fernando Montiel Aguirre



Supervisor Técnico

M. en C. Raquel Ortega Muñoz



Sustentante

Rojas León Diana Marcela

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recesional.

NOMBRE: Rojas León Diana
Marcela

FECHA: 01-NOV-05

FIRMA: [Handwritten Signature]

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Juan y Marcela por haberme dado la vida y la oportunidad de brindarme una carrera profesional. En especial a mi mamá por su apoyo y comprensión.

A mi esposo Víctor por sus consejos y regaños, por compartir mis triunfos y mis derrotas durante toda la carrera y ahora durante toda la vida.

A mis hermanos Juan y Pilar que aun estando lejos siempre me apoyaron.

A mis sobrinos Jonathan, Edgar y Mario por compartir sus sonrisas y su llanto cuando más lo necesitábamos.

Al profesor Fernando Montiel y a la profesora Raquel Ortega por haber confiado en mí y brindarme todo su apoyo para el termino de este proyecto.

A todos mis amigos que tuve durante la carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado un espacio donde pude realizar mis estudios y que con orgullo siempre recordare.

DEDICATORIA

Este ser vivo que cambio mi vida con sus sonrisas, llantos y travesuras es ahora la razón de seguir y luchar por nuevas metas. A ella dedico este proyecto.

A MI HIJA VANESA C. R.

INDICE	Pag.
I Resumen	7
II Introducción	8
II.1 Pollo como alimento de consumo humano	8
II.1.1 Definición de pollo	8
II.1.2 Consumo de pollo	8
II.2 Los riesgos microbiológicos de la carne de pollo	10
II.3 Antibióticos	12
II.3.1 Definición	12
II.3.2 Clasificación	13
II.3.3 Antibióticos en los alimentos para animales	14
II.3.4 Antibióticos en el pollo	15
II.4 Promotores de crecimiento	16
II.5 Bacterias resistentes a antibióticos	18
II.5.1 Causas de resistencia adquirida a antibióticos	21
II.6 Integrones	22
II.6.1 Definición	22
II.6.2 Estructura genética	23
II.6.3 Funcionamiento	23
II.6.4 Secuencia del integrón 1 en <i>Pseudomona aeruginosa</i>	26
III Justificación	29

	Pag.
IV Hipótesis	31
V Objetivos	
V.1 Objetivos generales	32
V.2 Objetivos particulares	32
VI Material y Método	
VI.1 Colección de muestras	33
VI.2 Aislamiento	33
VI.3 Caracterización	35
VI.4 Identificación presuntiva compruebas bioquímicas	35
VI.5 Prueba de sensibilidad antimicrobiana	40
VI.6 Identificación bioquímica con pruebas convencionales Api 20 Strep	42
VI.7 Extracción de ADN plasmídico	43
VI.8 Extracción de ADN total	46
VI.9 Técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	47
VII Resultados	50
VIII Discusión	69
IX Conclusión	77
X Referencias	78

XI Anexos

XI.1 Preparación de medios de cultivo utilizados en la extracción total de microorganismos	84
XI.2 Preparación de medios de cultivo para pruebas bioquímicas confirmativas	83
XI.3 Medios para la prueba de sensibilidad antimicrobiana	89
XI.4 Preparación de soluciones para la extracción de ADN plasmídico y total	87
XI.5 Resultados de resistencia antimicrobiana para las 62 cepas totales	91
XI.6 Determinación de los pesos moleculares de las bandas de ADN total y plasmídico	93
XI.7 Características del integrón 1 presente en el transposón Tn 1696 de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	94

I RESUMEN

Los antibióticos frecuentemente se utilizan en pequeñas proporciones para estimular el desarrollo de los animales destinados a la alimentación humana.⁴⁰

La adición de los antibióticos en el alimento de los animales ha sido uno de los factores determinantes para la aparición de bacterias resistentes a antibióticos.

Las bacterias que desarrollan esta resistencia pueden ser patógenas, patógenos oportunistas o bacterias comensales; por lo tanto, los genes de resistencia a antibióticos pueden encontrarse en animales y en humanos.³³

Debido a esto, se decidió investigar la resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de carne de pollo vendida al menudeo en tiendas de autoservicio. Se aislaron 62 cepas de enterococos. El 34% fue resistente a los antibióticos: cefalotina (45%), eritromicina (90%), ampicilina (74%), trimetropim sulfametoxazol (55%), ceftriaxona (65%), netilmicina(68%), enoxacina (77%), penicilina (68%), dicloxacilina (84%), clorafenicol (39%) y gentamicina (84%).

Seis cepas con una velocidad de crecimiento rápida y multiresistentes a antibióticos, fueron elegidas para su caracterización.

Las 6 cepas portan plásmidos así como al integron clase 1 lo que posiblemente confiere la resistencia a una gran variedad de antibióticos.

II INTRODUCCION

II.1 POLLO COMO ALIMENTO DE CONSUMO HUMANO

II.1.1 Definición de pollo.

El pollo es el ave gallinácea de cría, macho o hembra, sacrificada a una edad de 12 semanas⁴⁶ y máxima de 20 (5 meses) y un peso que oscila entre 1 y 3 kilos. En la actualidad, el pollo se cría de manera intensiva en las granjas, y en tres meses se consigue hasta 1 kilo de esta ave.⁵

El pollo que se adquiere en los supermercados es el pollo conocido como broiler. Su carne es blanca, tierna y jugosa, y su piel flexible y suave. Sus huesos son muy flexibles debido a que están poco calcificados.⁴⁶

La carne de pollo incluye todo un conjunto de productos, desde canales enteras hasta productos de despiece y otros de transformación.³ La selección avícola actual es una producción compleja y altamente especializada, superior a la de cualquier otra especie doméstica.

II.1.2 Consumo de pollo

El consumidor asocia mayoritariamente la carne de pollo a dos características fundamentales que definen su comportamiento en la cesta de la compra: su bajo precio y una imagen de seguridad generalmente alta⁵ por lo que su consumo se ha elevado en los últimos años.

Otros factores que han influido en el consumo de aves, en especial del pollo, ha sido el sabor y la textura que caracterizan a este tipo de carne, lo jugosa que es y la consistencia blanda.⁹

De acuerdo a la información registrada en el INEGI la producción de pollo en México ha ido en aumento, como se observa en el cuadro 1. En 1995 fue de 1 283 867 toneladas (ton) mientras que para el año 2002 fue de 2 011 513 ton y en el período de enero a julio del 2003 se han producido 1 175 028 ton.⁵² por lo que México se convierte en el quinto país consumidor de pollo y la cuarta potencia avícola a nivel mundial.²⁵

(toneladas) periodo	leche (miles de litros)		carne en canal					huevo	otros productos ^b
	Bovino	Caprino	Bovino	Porcino	Ovino	Caprino	Ave ^a		
1995	7 398 598	139 049	1 412 336	921 576	29 887	37 678	1 283 867	1 241 987	55 195
1996	7 586 422	122 925	1 329 947	910 290	29 443	35 879	1 264 366	1 235 872	55 036
1997	7 848 105	120 528	1 340 071	939 245	30 161	35 269	1 441 905	1 328 935	59 928
1998	8 315 711	127 744	1 379 768	960 689	30 389	38 264	1 598 921	1 461 153	84 200
1999	8 877 314	130 998	1 399 629	994 186	30 785	37 431	1 731 538	1 634 793	84 392
2000	9 311 444	131 177	1 408 618	1 029 955	33 390	38 760	1 825 249	1 787 942	88 936
2001	9 472 293	139 873	1 444 621	1 057 843	36 221	38 839	1 928 022	1 892 143	89 806
2002	9 597 556	147 287	1 450 881	1 085 876	37 423	42 279	2 011 513	1 896 040	86 767
2003									
Enero	738 925	11 855	116 171	86 036	2 914	3 430	161 166	141 632	4 664
Febrero	758 341	11 677	115 958	84 594	2 865	3 138	168 977	146 550	5 088
Marzo	776 001	12 191	114 056	80 768	3 050	3 091	170 205	150 082	7 168
Abril	763 804	11 864	113 337	84 169	3 109	3 063	173 466	137 131	12 040
Mayo	809 550	12 564	122 395	91 689	3 340	3 434	180 153	159 200	7 126
Junio	838 127	12 737	122 826	89 465	3 295	3 440	175 076	167 137	6 148
Julio	902 553	12 443	122 676	89 214	3 133	3 397	179 600	172 599	5 015

a Se refiere a pollo, gallina ligera y pesada que ha finalizado su ciclo de producción
b Incluye carne de guajolote, miel, cera en greña y lana sucia

Cuadro 1. Producción de derivados de origen animal (ciclo 1995-julio 2003)
fuente: INEGI

II.2 LOS RIESGOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CARNE DE POLLO

Al igual que cualquier otro tipo de carne, la carne de ave puede transportar agentes que representan un riesgo para la salud humana desde el punto de vista microbiológico.⁹

Las bacterias patógenas como: *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* son habitantes del tracto intestinal de animales domésticos, especialmente aquellos que consume el humano.³⁹

El pollo es especialmente susceptible de ser contaminado por *Salmonella* y *Campylobacter* y, en menor medida, por *Listeria monocytogenes* que pueden causar toxiinfecciones e infecciones en el consumidor.^{5, 9} La contaminación de los alimentos con estos patógenos puede ser múltiple ya sea por la cadena alimenticia o durante la producción, el procesamiento, distribución, venta y manipulación.³⁶

Además puede portar a *Pseudomonas* lo que reduce y desestabiliza la conservación comercial de este.⁹ Los microorganismos causantes de la alteración ingresan en el matadero, en gran número, por la piel y las plumas de las aves y en algunas ocasiones con el polvo.³

La piel de las aves vivas puede contener hasta 1,500 bacterias por centímetro cuadrado, lo que incluye la flora normal de la piel más otras bacterias que pueden proceder de patas, plumas o heces.¹⁴

Los tipos de microorganismos que se pueden aislar de los pollos depende del lugar de donde se toman las muestras y de la fase del sacrificio. Los aislamientos procedentes de las canales de aves y productos derivados incluyen

representantes de un gran número de géneros (cuadro 2).²⁰ Las patas, pechugas y región cloacal tienen contaminación fecal, con una elevada carga bacteriana mesófila. Otras bacterias mesófilas de origen intestinal pueden contaminar la canal a partir del tracto alimentario durante la evisceración.¹⁴

Datos del grupo de investigación del Observatorio de la Seguridad Alimentaria de la Universidad Autónoma de Barcelona indican que cuando se controla específicamente a estos microorganismos en los piensos de engorde y en las instalaciones, se puede reducir su prevalencia a menos de un 5% en la población de los animales.⁵¹

Producto	Microorganismos aislados	Cantidad aproximada
Aves al entrar	<i>Acinetobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i>	$10^2 - 10^3 / \text{cm}^2$
Aves faenadas	Bacterias: <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> entre otros. Levaduras: <i>Trichosporon</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> y <i>Rhodotorula</i> . Mohos: <i>Penicillium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> y otros.	$10^2 - 10^5 / \text{cm}^2$

Cuadro 2. Perfil microbiológico de las aves vivas y aves faenadas.
(Fuente: Fraizer, 1993)

Para conservar por más tiempo la carne de las aves se utilizan métodos físicos como el enlatado, la refrigeración (dura menos de un mes) y la congelación (duración hasta de tres meses) aunque este último tiene la desventaja de que si

no se realiza con la higiene adecuada, habrá un aumento de bacterias que crecen a temperaturas bajas tales como los géneros de *Proteus*, *Alcaligenes* y algunas bacterias coliformes. Otros métodos utilizados en la conservación de la carne son el empleo de conservadores, como son los antibióticos en bajas concentraciones que son destruidos durante la cocción. La administración de antibióticos a las aves incorporándolos al pienso puede dar lugar a un aumento de microorganismos resistentes en las heces y por lo tanto en las aves.²⁰

II.3 ANTIBIOTICOS

II.3.1 Definición

Se define como antibiótico a aquellas sustancias producidas por Microorganismos^{13,40} capaces de inhibir el crecimiento de otros organismos por tener acción bactericida, bacteriostática, fungistática o fungicida.³⁹ Al parecer las bacterias gram positivas pueden ser más sensibles a su acción que las gram negativas.⁴⁰ Los antibióticos bactericidas matan a las bacterias, los bacteriostáticos solo detienen su crecimiento.

El otro uso de los antibióticos, que no busca un efecto bactericida, es cuando se utiliza para aumentar la productividad animal dosificado en concentraciones subterapéuticas.³⁶

II.3.2 Clasificación de antibióticos

Una clasificación sugerida de los antibióticos, es la siguiente:

1. Penicilinas. Interfieren con las síntesis de la pared celular bacteriana, clasificadas como:

A. ácido lábiles: cristalina, procaina, benzatina, metilicina

B ácido estables

1 sensibles a penicilinas: fenoximetilpenicilina, fenoxietilpenicilina, amplio espectro (ampicilina, carbenicilina)

2 resistentes a penicilinas: metilicina, isoxazolilpenicilina (oxacilina, cloxacilina, nafcilina).

2. Cefalosporinas. Al igual que las penicilinas interfieren con la síntesis de la pared celular, la familia comprende a:

Cefalotina, cefalexina, ceforanid, cefotaxim, ceftazidim, cefaloridina, cefamandol, cefotixin, cefitoxim.

3. Macrólidos. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30s, incluyen a:

Eritromicina, azitromicina.

4. Aminoglicósidos. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30s, comprenden a:

Estreptomina, kanamicina, gentamicina, neomicina, metilmicina.

5. Tetraciclinas. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al RNA ribosomal 30S.

El grupo está formado por:

Tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina.

6. Quinolonas. Inhiben enzimas involucradas en la replicación del ADN, se clasifican en:

Ácido nalidixico, ciprofloxacino.

7. Sulfonamidas y trimetopim. Inhiben la síntesis de ADN al interferir con la síntesis de ácido tetrahidrofólico.

8. Nitrofuranos: nitrofurantoína, nitrofurazona.

9. Cloranfenicol. Inhibe la síntesis proteica.

10. Rifampicina. Inhibe a la transcripción y su unión a la ARN polimerasa.

11. Glicopéptidos. Interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana.

Dentro de este género está la vancomicina.

12. Peptidos: bacitracina y polimixina.

13. Oxazolidinonas (estreptograminas): eperzolidona, linezolidona, quinupristina, dalfopristina.⁴³

Las familias de antibióticos que se usan más en veterinaria y medicina son: penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglicosidos, estreptomina, nitrofuranos, sulfonamidas y trimetoprim.²⁶

II.3.3 Antibióticos en los alimentos para animales.

La adición de antibióticos en los alimentos destinados a producción animal es atractiva porque se consigue una acción contra microorganismos en general.⁴

En 1946 se informó que algunos antibióticos como estreptomina y sulfasuxidina incorporados a los alimentos en muy pequeñas cantidades, estimulaban el

desarrollo de los pollos.³⁶ También se comprobó que los subproductos de la elaboración de los antibióticos y otros productos de fermentación eran buenas fuentes de vitamina B₁₂ lo que permitía el buen desarrollo de los pollos.³⁸

Con la aparición de las tetraciclinas esta aplicación de los antibióticos cobró mayor impulso y en 1955 se estimaba que 13% de la producción mundial de los antibióticos se destinaba a estimular el desarrollo de distintos animales.⁴⁰

Actualmente solo Estados Unidos utiliza el 70% del total mundial de los antibióticos, que representa unas 11 mil toneladas, administrado en bajas dosis en los alimentos para cerdos, pollos y reses que promueven su crecimiento y engorda.⁴⁷

El aumento en la rapidez del crecimiento que se obtiene con el suministro de antibióticos varía con la clase del animal: es máximo para los pavos, un poco menor para las gallinas y mínimo para los patos.¹²

III.3.4 Antibióticos en el pollo.

Los antibióticos se utilizan para controlar enfermedades en las aves, causadas por bacterias y microorganismos relacionados.³³

Si la cantidad de antibiótico es pequeña y el número de las bacterias alto, el antibiótico no producirá su efecto completo. Los antibióticos también actúan modificando la flora intestinal y en consecuencia destruyen muchas bacterias benéficas. La mayor parte de los antibióticos se suministran en la ración.¹³

II.4 PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Algunos antibióticos se agregan en forma continua y en pequeñas dosis a la ración con el fin de mejorar el crecimiento y la conversión alimenticia.³⁶

Los antibióticos se incluyen en la dieta de los pollos durante su crecimiento. Con ello se consigue un incremento de 2 Kg de peso total en apenas dos meses, al mismo tiempo que controlan la presencia de patógenos que podrían retrasar la producción. Su uso, sin embargo, puede acarrear la aparición de residuos de antibióticos, los cuales suponen un riesgo para la salud de los consumidores, sobre todo por la inducción de resistencias en microorganismos patógenos.^{36, 46}

La efectividad de un antibiótico para promover el crecimiento se relaciona con su capacidad para "atacar a la enfermedad", de aquí que los antibióticos de amplio espectro sean los más efectivos.¹³

En general, se reconoce que los antibióticos y compuestos afines capaces de mejorar la productividad animal suprimen o disminuyen el crecimiento de algunos microorganismos⁷ siendo probablemente de la siguiente manera:

- Por la supresión de los microorganismos inhibidores o productores de toxinas
- Por estímulo de los antibióticos hacia los microorganismos que elaboran vitaminas conocidas o no identificadas, las cuales pueden ser utilizadas por el animal
- Por la supresión de los microorganismos que aprovechan ciertos principios nutritivos esenciales para el animal
- Por la supresión de los organismos patógenos del aparato digestivo.^{8, 14}

Además, una vez absorbidos se distribuyen por vía sanguínea por la totalidad del organismo, lo que hace un efecto protector en cualquier órgano, lo que permitiría que la energía y los nutrientes ingeridos puedan dedicarse a la producción y no a otros esfuerzos energéticos como la defensa en contra de enfermedades.⁹

El cuadro 3 indica que, independientemente del promotor de crecimiento que se emplee, es importante notar que la magnitud de la respuesta al antimicrobiano, en cuanto a la mejoría lograda en ganancia de peso en ambientes contaminados, es muy similar a la diferencia que existe al comparar ambientes limpios contra contaminados.¹³ Esto indica que aún la presencia de bacterias posiblemente patógenas en los corrales sucios no impide el crecimiento de los pollos.

Medio Ambiente	Tratamiento	Ganancia de peso g / 4 semanas	% de mejora
Casetas nuevas	Control	440	6.82
	Antibiótico	470	
Casetas previamente utilizadas	Control	336	19.05
	Antibiótico	400	
Casetas nuevas vs casetas usadas	-	455	23.64
	-	368	

Cuadro 3. Ganancia de peso en pollo alimentados con antibióticos bajo dos medios ambientes diferentes. (Fuente: Cuaron, 1990)

Desde este punto de vista, podría considerarse el uso de antibióticos como una técnica aceptable, ya que a bajo costo se consigue que los animales no enfermen, con los consiguientes beneficios para el bienestar animal, se obtiene una mejor producción y, si se aplican correctamente, no dejan residuos en la carne.⁴⁴

Sin embargo el uso de antibióticos como promotores de crecimiento contribuye al problema surgido hace varios años: la resistencia de las bacterias a los antibióticos.

II.5 BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

La resistencia a antibióticos es un problema clínico y socioeconómico que puede incrementarse hoy en día. Recientes estudios han observado que hay un enlace entre el uso de antibióticos en animales destinados para alimento y la resistencia de bacterias encontradas en humanos.^{18, 24} (Figura 1)

A los animales para consumo humano se les administra antibióticos para promover su crecimiento y además se les administra para profilaxis y terapias. Cuando los animales defecan hay presencia de bacterias que posiblemente ya son resistentes a antibióticos.

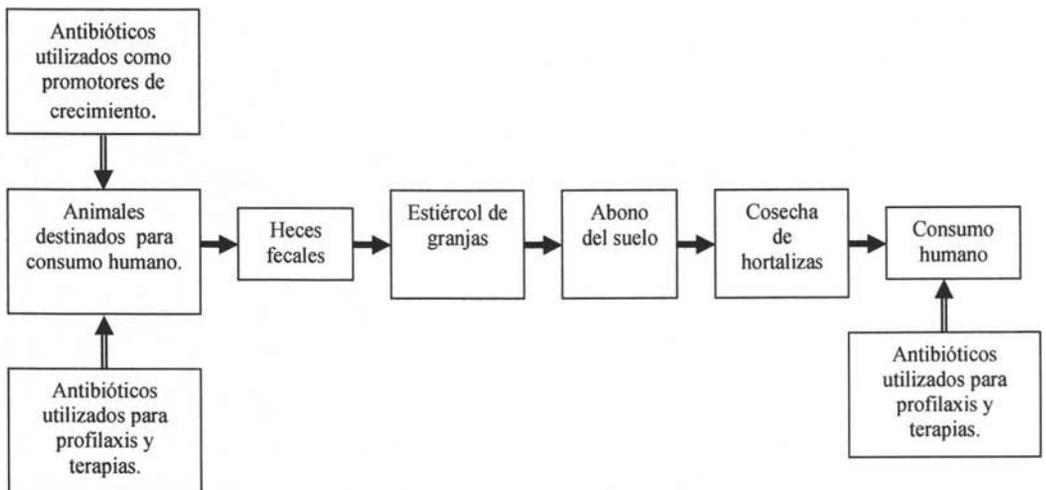


Figura 1. Transmisión de las bacterias resistentes a antibióticos de los animales de consumo humano hasta el hombre. (Fuente: Hasebe, 2004)

Estas heces son utilizadas como estiércol para abonar los campos que se utilizan para la siembra de vegetales y finalmente estos vegetales los consume el hombre. Una vez que el hombre haya adquirido estas bacterias, es posible que a él también se le administren antibióticos para terapias y profilaxis lo que contribuye aún más a que estas bacterias se vuelvan resistentes a otros antibióticos.

La resistencia puede ser natural o adquirida. Algunas especies de bacterias son altamente resistentes a un número determinado de antibióticos, mientras que otras son altamente susceptibles a los antibióticos, tales como los estreptococos del grupo A.²⁶

Como ya se dijo el abuso de antibióticos en animales de granja para terapias y profilaxis, como promotores de crecimiento y como complemento alimenticio han influido en la aparición de bacterias resistentes a antibióticos.³³ El uso no adecuado de estos o con la dosis incorrecta permite la sobrevivencia de algunas bacterias que se pueden volver resistentes.

De acuerdo con un reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), acerca de enfermedades infecciosas, en el año 2000, tales organismos han llegado a incrementarse prevalentemente en el mundo.³⁷ La práctica rutinaria de dar antibióticos a los animales para consumo humano para el tratamiento y prevención de enfermedades, así como promotores de crecimiento, son factores importantes para el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos que subsecuentemente se transfieren al hombre a través de la cadena alimenticia.¹⁶

Los antibióticos que coinciden en su uso terapéutico en la medicina humana y veterinaria son: penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglicosidos, espectomicinas, lincosamidas, trimetropim, sulfonamidas, polimixinas y quinolonas.⁴⁹

En octubre de 2001 el *New England Journal of Medicine*, publicó los resultados de un equipo de investigadores acerca del aislamiento de varios serotipos de *Salmonella* a partir de carne vendida al menudeo en la ciudad de Washington, D.C. los cuales se probaron a 17 antibióticos en concentración mínima de inhibición. Los resultados muestran que el 53% de las colonias aisladas son resistentes a por lo menos 3 antibióticos en los cuales se incluyen estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclinas.²¹

Los enterococos, bacterias comúnmente intestinales que provienen de animales y humanos, pueden causar serias enfermedades de infección intestinal, además de ser multiresistentes a diversos antibióticos. Los enterococos provenientes de animales pueden transferir sus genes de resistencia a las bacterias que habitan en la comida o que están presentes en humanos.⁴⁹

Los enterococos resistentes a antibióticos (*E. faecalis*, *E. casseliflvus*, *E. faecium*, *E. durans*) pueden estar presentes en alimentos que se preparan con verdura (por ejemplo ensalada verde) y en alimentos derivados de animales tales como quesos, embutidos de cerdo y de res. Principalmente *E. faecalis* y *E. faecium* muestran resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, nitrofurantoína, penicilina y tetracilina.⁴⁹

II.5.1 Causas de resistencia adquirida a antibióticos.

La adquisición de la resistencia a antibióticos ocurre algunas veces por mutación y en otras ocasiones por transferencia horizontal de genes, que llegan a estar situados en integrones, plásmidos o en transposones.³³ La resistencia adquirida a antibióticos por las bacterias se debe a la adquisición de genes de resistencia que se pueden transmitir entre las mismas bacterias principalmente por conjugación.³³

El primer componente significativo en el proceso de la adquisición de genes de resistencia en poblaciones microbianas es la captura de genes por medio de transposones los cuales pueden moverse de replicón a replicón y se diseminan a través de la conjugación.³⁸

Se han encontrado dos tipos de transposones: el transposon compuesto que se encuentra en bacterias gram positivas y gram negativas y otro transposon adjunto a un integrón el cual ha sido observado solamente en Enterobacterias y Pseudomonas.³⁸

Para cada clase de antibióticos hay usualmente un número de mecanismos que pueden ser causa de resistencia. Estos mecanismos pueden diferir, dependiendo de las especies de bacterias y su composición genética.

Los principales mecanismos de resistencia incluyen:

- 1) Aumento en la actividad del conducto de salida del antibiótico
- 2) Disminución de la concentración interna del antibiótico
- 3) Inactivación o modificación de la estructura del medicamento

- 4) Introducción de resistencia en el sitio de acción de un nuevo antibiótico
- 5) Hidrólisis del antibiótico
- 6) Modificación del antibiótico ³⁵

II. 6 INTEGRONES

II.6.1 Definición

Un integrón es un elemento genético de ADN que incorpora fragmentos de ADN con marcos abiertos de lectura (ORF'S por sus siglas en ingles) y así los convierte en genes funcionales; estos genes funcionales son frecuentemente genes de resistencia a antibióticos. También se dice que un integrón es dinámico, es decir los genes tienen la capacidad de escindirse en forma de círculos autónomos para integrarse a un nuevo integrón. ^{18, 22, 38}

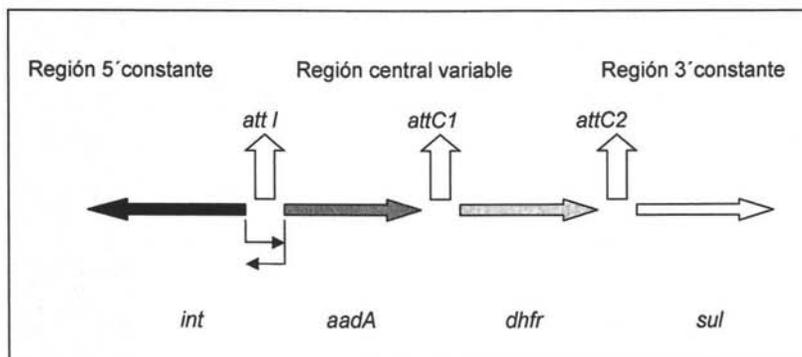


Figura 2. Esquema de la estructura del integrón. (Fuente: García L., 1998)

attI. Sitio de reconocimiento de la integrasa.

attC1 y 2. Genes que pueden actuar como terminadores de la transcripción.

Int. Gen de la integrasa.

aadA y dhfr. Genes adquiridos de resistencia.

Sul. Gen de resistencia a sulfamidas.

II.6.2 Estructura genética

Estructuralmente los integrones conocidos constan de tres regiones (Fig 2):

- 1) Una región constante 5' donde se encuentra el gen de la integrasa (int)
- 2) Una región central variable en la que se localizan los genes estructurales del integrón, en esta parte se encuentran los genes de resistencia (aadA, dhfr), es el sitio primario de recombinación (att I).
- 3) Una región constante 3' donde se localizan genes de resistencia a sulfamidas (sul) y otros dos marcos abiertos de lectura.^{18, 38}

Las plataformas del integrón son deficientes para realizar su propia transposición pero este defecto es frecuentemente complementado a través de la asociación con secuencias de inserción (IS), transposones y/o plásmidos que pueden servir como vehículos, inter o intra especies, para la transmisión de este material genético.³⁸

II.6.3 Funcionamiento

El esparcimiento de los genes de resistencia está aumentando grandemente debido a que son genes que forman parte de paquetes móviles, los cuales proveen algunos mecanismos de transferencia horizontal. Estos mecanismos incluyen:

- Movilización de paquetes de genes codificados por una integrasa para un elemento genético llamado integrón.
- Movimiento del integrón a un nuevo lugar, probablemente por transposición.

- Diseminación de grandes transposones tales como Tn21 que acarrean integrones.
- Movimiento de plásmidos, entre diferentes especies de bacterias, que contienen integrones.⁴⁸

La funcionalidad del integrón no está restringida a su tamaño, hay integrones interrumpidos o truncados que realizan su función completa; por ejemplo se reportó el hallazgo de un integrón truncado en una bacteria gram negativa, *M. fortuitum* y este mismo integrón se observó que aparecía en una bacteria gram positiva, *Corynebacterium glutamicum*.³⁸

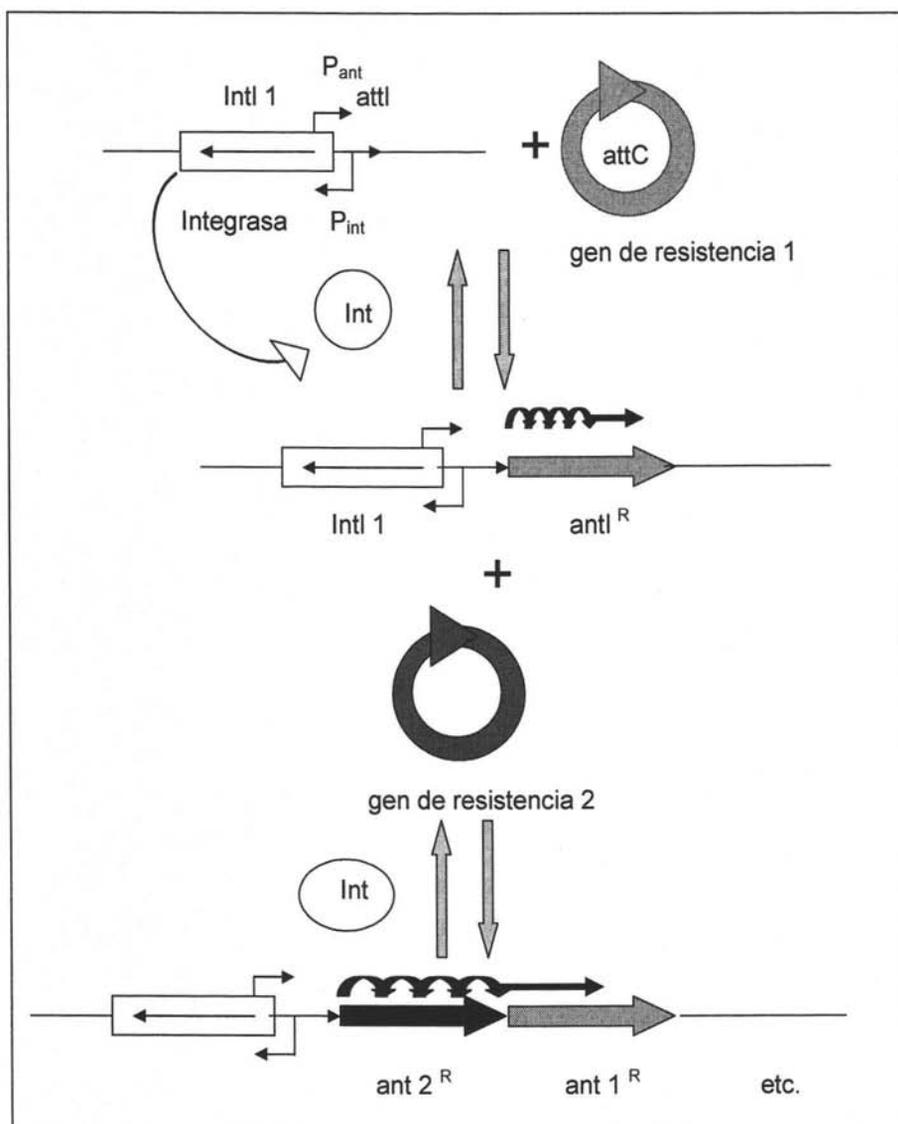


Figura 3. Modelo del intercambio de paquetes de genes en un integrón clase 1. Los genes de resistencia adquiridos (ant^R) son insertados en un sitio específico ($attI$), delante del promotor fuerte ($P_{ant intl 1}$). La flecha ondulada indica la dirección de la transcripción. Este proceso se repite de igual forma para cada gen de resistencia. (Fuente: Rowe, 1989)

II.6.4 Secuencia del integrón de *Pseudomonas aeruginosa*

Es importante mencionar, a manera de ejemplo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos que forma parte del integrón clase 1 el cual probablemente está confiriendo la resistencia a varios antibióticos en nuestras cepas de trabajo.⁵⁵

En el nucleótido 3872 del transposón Tn 1696 de *P. aeruginosa* comienza el integrón (intl 1), señalado con letras mayúsculas de color rojo; en los nucleótidos 4761 a 4789 se encuentra el promotor de la integrasa (P ant) señalado con letras de color azul; en los nucleótidos 4916 a 4933 se encuentra señalado con una línea la secuencia de uno de los *primers* que se ocuparon para la amplificación de las muestras (int F); del nucleótido 4978 a 5040 se encuentra el sitio de reconocimiento de la integrasa (attI) indicado con letras mayúsculas cursivas de color rojo; del nucleótido 9186 a 8206 se encuentra el otro *primer* que se ocupó para este experimento (sul1 B) señalado con letras rojas mayúsculas subrayadas; por último en el nucleótido 9564 termina la secuencia del integrón. Las letras en negro indican la secuencia de ADN del transposón Tn 1696 en donde está insertado el integrón.

Integrón clase 1

3721 agcagcggag gggttggatc catcaggcaa cgacgggctg ctgccggcca tcagcggacg
 3781 cagggaggac tttccgcaac cggccgcttc atgcccaccc gatggccttc ggcgaggggt
 3841 agtgaatccg ccaggattga cttgcegtgc cctacctctc actagtggag ggcggcagcg
 3901 catcaagcgg tgagccgact cggccacccg caactttcag cacatgctg taatcatcg
 3961 tcgtagagac gtcggaatgg ccgagcagat cctgacgggt tcgaatgtcg taaccgctgc
 4021 ggagcaagcc cgtcgcgaac gagtggcggg ggggtgtcgg tgtggcgggc ttcgtgatgc
 4081 ctgcttgttc tacggcacgt ttgaaggcgc gctgaaaggt ctggtcatac atgtgatggc
 4141 gacgcacgac accgctccgt ggatcggtcg aatgctgtg ctggcgaaaa acccagaacc
 4201 accgccagga atgccccggc cggcgatact tccgctcaag ggcctcggga agcccaaccg
 4261 cgctgcccgc ctggccctgg tccttcagcc accatgcccc tgcacgcgac agctgctcgc
 4321 gcagcgtggg tgccaagctc tcgggtaaca tcaaggcccc atccttggag cccttgccct
 4381 cccgacgat gatcgtgccc tgatcgaat ccagatcctt gaccgcagt tgcaaacctt
 4441 cactgatccg catgcccgtt ccatacagaa gctgggcgaa caaacgatgc tccgcttcca
 4501 gaaaaccgag gatgccaacc acttcatccg gggctcagcacc accggcaag cggccgacg
 4561 gccgaggtct tccgatctcc tgaagccagg gcagatccgt gcacagcacc ttgccgtaga
 4621 agaacagcaa gggcccaat gcctgacgat gctggagac cgaaaccttg cgcctgttcg
 4681 ccagccagga tagaamtgoc tgcacttcgc tctgcccaca ggttcccggg tgaccacac
 4741 cgtggaacg gatgaaggca cgaaccagt **tgacataagc** **ctgttcgggt** **cgtaactgt**
 4801 aatgcaagta gctgatgccc tcacgcaact ggtccagaac cttgaccgaa cgcagcgggt
 4861 gtaaccggcc agtggcgggt ttcattgctt gttatgact tttttttgta **cagtctatgc**
4921 ctccggcacc caagcagca **cgccgtaacg** **ccgtgggtcg** **atgtttgatg** **tattggaga**
4981 gcaacgatgt **tacgcagcag** **caacgatgtt** **accgacagc** **gcagtcgccc** **taaaacaaa**
 5041 ttagggtggc caagtatggg catcattcgc acatgtaggc tcggccctga ccaagtcaa
 5101 tccatgcccg ctgctcttga tcttttcggg cgtgagttcg gagacgtagc cacctactcc
 5161 caacatcagc cggactccga ttacctcggg aacttgctcc tagtaagac attcatccg
 5221 cttgctgccc tcgaccaaga agcgggtgtt ggcgctctcg cggcttacgt tctgcccagg
 5281 tttgagcagc cggctagtga gatctatc tatgatctcg cagctcctcg cgagcaccgg
 5341 aggcagggca ttgccaccgc gctcatcaat ctctcaagc atgaggccaa cggccttggt
 5401 gcttatgtga tctactgtca agcagattac ggtgaccgac ccccagtgcc tctctataca
 5461 aagtgggca tagcgggaga atgtgatcac tttgatatcg acccaagta cggcacactaa
 5521 caattcgttc aagccgagat cggcttccg gccgaggagt tgttcggtaa attgtcaaa
 5581 cgccgagcc gcaagcgcct ccggttaac tcaggcgta gttcccacac ccgctttatg
 5641 cgcgagcca cttatttcag cgtccgccc tgttccaaag gctttctagc cttttgggcc
 5701 tccaagcgtt gtcagcaag gccaccagc tatccttctt gcagcgtg cgcgctttcg
 5761 tggccagcg gttttcttg ggtcgcgcc ttcttcaagg ccggcgctc cctttggcc
 5821 ttcgggtcta actctcgggt caagcgacc cgcattctgc gggccgctta ccttggccgt
 5881 tagacatcat gagggtagcg gtgaccatcg aaatttcgaa ccaactatca gaggtgctaa
 5941 gctcattga gcgccactg gaatcaacgt tgcctggcgt gcaattgtac ggcctcagc
 6001 tggatggcgg cctgaagcca tacagcgata ttgatttggg ggttactgtg gccgtaaac
 6061 ttgatgaac gacgcgcgga gcaattgctc atgacctat ggaggcttc gctttccctg
 6121 gcgagagcga gacgctccgc gctatagaag tcaccctgt cgtgcatgac gatcatcc
 6181 cgtggcgta tccggctaag cgcgagctgc aatttgaga atggcagc gatgacatc
 6241 ttccgggtat ctcgagcca gccatgatc acattgatc agctatcctg cttcaaaaag
 6301 caagagaaca tagcgttggc ttggtaggtc cggcagcgga ggaattcttt gaccgggtc
 6361 ctgaacagga tctattcgag gcgctgagg aaacctgaa gctatggaac tcgagcccg
 6421 actgggcccg cgtgagcga aatgtagtgc ttacgttgc ccgatttgg tacagcgcaa
 6481 taaccggcaa aatcgcgccg aagatgtcg ctgccgact gcgaataaaa cgcctactc
 6541 cccagtatca gcccgctcta cttgaageta agcaagctta tctgggacaa aaagaagatc
 6601 acttggcctc acgcgcagat cacttgaag aatttatcg ctttgtgaaa ggcgagatca
 6661 tcaagtcatg tggtaaatga tgtctaaca ttcgttcaag ccgaccgcg taacgcgcc
 6721 gcttaactc cgcggttgg gcacaataa ggctccttg agagtctgtt gaaagtgtt
 6781 acgattcaaa ttcaatcatg agatagtcag cagatgagca cttccaagaa cgcagacaag

6841	taagccgcag	caaccttcat	ttttcggtg	ttgcccgtt	ctcatgaatc	cttttgcctc
6901	acgggagcgc	cgccaaatcc	ttgttcaag	gagatggttt	cgtgagctca	aaaaacttta
6961	gttgccggtg	ctcccttgcc	gccacggtgt	tggtgttatc	accgttcgat	ttattggcat
7021	cactcggcat	ggacatgtac	ttgccagcag	tgccgtttat	gccaaacgcg	cttggtacga
7081	cagcgagcac	aattcagctt	acgctgacaa	cgtacttggt	catgatgtgt	gccggtcagc
7141	tcttggttgg	accgctactg	gaccgactgg	ggcgcgccc	cgttctactg	ggaggtggcc
7201	tcgctacgt	tggtggctca	atgggacctg	ctcttacgct	atcggctgaa	gtctttctgg
7261	ggcttcggat	tcttcaggct	tgtggtgctt	cgcgctgctt	tgtttccaca	tttgcaacag
7321	tacgtgacat	ttacgcaggt	cgcgaggaaa	gtaatgtcat	ttacggcata	ctcggatcca
7381	tgctggccat	ggtcccggcg	gtaggcccat	tgctcggagc	gctcgtcgac	atgtggcttg
7441	ggtggcggcg	tatctttgcg	tttctaggtt	tgggcatgat	cgctgcatct	gcagcagcgt
7501	ggcgattctg	gcctgaaacc	cggttgcaac	gagttgcggg	cttgcaatgg	tcgcagctgc
7561	tactccccgt	taagtgcctg	aacttctggt	tgtacacggt	gtgttacgcc	gctggaatgg
7621	gtagcttctt	cgtcttttct	tccattgcgc	ccggactaat	gatggcgagg	caaggtgtgt
7681	ctcagcttgg	cttcagctcg	ctgttcgcca	cagtggcaat	gttctgggtg	ttacgctgct
7741	gttttatggg	gcgtgtgata	cccaagtggg	gcagcccaag	tgtcttgcca	atggggaatgg
7801	gatgcctgat	agctggagca	gtattgcttg	ccatcaccga	aatatgggct	ttgcagctccg
7861	tgtaggctt	tattgctcca	atgtggctag	tgggtattgg	tgctcgccaca	gcggtatctg
7921	tggcgccea	ggcgcctctt	cgaggattcg	accatgttgc	tggaaaggct	accgcagctt
7981	actctgctt	ggcgggtgta	ctcttaggaa	gcactcggaac	gttgatcatt	tcgctgttgc
8041	cgcgcaacac	ggcttggccg	gttgcctggt	actgtttgac	ccttgcaaca	gtcgtgctcg
8101	gtctgtcttg	tgtttccgca	gtgaaggctt	ctcgcggcca	gggggagcat	gatgtggctg
8161	gcctacaaa	tgccgggaagt	acatcaaatc	ccaatcgttg	agagaatgtg	gcaagctatc
8221	cgccaacaaa	tcgctcagct	gcaccaaaaa	ccgctacgcg	gttctgctcg	gctgactctc
8281	ggcgttagat	gcactaagca	cataattgct	cacagccaaa	ctatcaggctc	aagtctgctt
8341	ttattatttt	taagcgtgca	taataagccc	tacacaat	gggagatata	tcATGAAAGG
8401	CTGGCTTTT	CTTGTTATCG	CAATAGTTGG	CGAAGTAATC	GCAACATCCG	CATTAATAATC
8461	TAGCGAGGGC	TTTACTAAGC	TTGCCCTTC	CGCCGTTGTC	ATAATCGGTT	ATGGCATCGC
8521	ATTTTATTTT	CTTCTCTGG	TTCTGAAATC	CATCCCTGTC	GGTGTGTGCT	ATGCAGTCTG
8581	GTCGGGACTC	GGCGTCGTC	TAATTACAGC	CATTGCCTGG	TTGCTTCATG	GGCAAAGCT
8641	TGATGCGTGG	GGCTTTGTAG	GTATGGGGCT	CATAATTGCT	GCCTTTTTTG	TCGCCCGATC
8701	CCATCGTGG	AAGTCGCTGC	GGAGCCGAC	GCCATGGTGA	CGGTGTTCGG	CATTCTGAAT
8761	CTCACCGAGG	ACTCCTTCTT	CGATGAGAGC	CGGCCGGTAG	ACCCCGCCGG	CGCTGTCAAC
8821	GCGCGGATCG	AAATGCTGCG	AGTCGGATCA	GACGTCGTGG	ATGTCGGACC	GGCCGCCAGC
8881	CATCCGGACG	CGAGGCCGTG	ATCGCCGGCC	GATGAGATCA	GACGTATTGC	GCCGCTCTTA
8941	GACGCCCTGT	CCGATCAGAT	GCACCCTGTT	TCAATCGACA	GCTTCCAACC	GGAAACCCAG
9001	CGCTATGCGC	TCAAGCCGGG	CGTGGGCTAC	CTGAACGATA	TCCAAGGATT	TCCTGACCCCT
9061	GCGCTCTATC	CCGATATTGC	TGAGGCCGAC	TGCAGGCTGG	TGTTTATGCA	CTCAGCCGAG
9121	CGGGATGGCA	TCGCCACCCG	CACCGGTCAC	CTTCGACCCG	AAGACCGGCT	CGACGAGATT
9181	GTGCGGTCTT	TCGAGGCCGG	GGTTTCCGCC	TTGCGACGGA	GCGGGGTGCG	TGCCGACCCG
9241	CTCATCCTCG	ATCCGGGGAT	GGGATTTTTC	TTGAGCCCCG	CACCCGAAAC	ATCGCTGCAC
9301	GTGCTGTGCA	ACCTTCAAAA	GCTGAAGTCG	GCGTTGGGGC	TTCGCTATT	GGTCTCGGTG
9361	TCGCGGAAAT	CCTTCTTGGG	CGCCACCGTT	GGCCTTCCGT	TAAAGGATCT	GGGTCCAGCG
9421	AGCCTTGC	CGGAACCTCA	CGCGATCGGC	AATGGGCGTG	ACTACGTCCG	CACCCACCGG
9481	CCTGGAGATC	TGCGAAGCGC	AATCAACCTTC	TCGGAAACCC	TCGCGAAATT	TCGCGAGTCCG
9541	GACGCCAGAG	ACCGAGGGTT	AGATCATGCC	TAGCattcac	cttccggcgg	cccgctagcg
9601	gacctgtgct	aggttccgcg	aaggtggcgg	cagacatgct	gggctcgtca	ggatcaaact
9661	gcactatgag	gcggcggttc	ataccgcgcc	aggggagcga	atggacagcg	aggagctccc
9721	gaacgttctg	gtcgcctgct	cggtgatgat	cgacgaggtt	gtgcggctga	tgcacgagcg
9781	tgccgctggy	atgtccgcca	agggaacgcc	gcctcgggac	gtcgcgcgga	tcgaccggac
9841	attcggggag	accttgcctc	tgagatccga	gtcctagctc	gcgagttgca	gcgacggcat
9901	cgtcggctgt	tgcaacctgt	cgcccgagga	tcccagattc	tggcccagcg	ccctcaaggg
9961	ggaggccgca	tatctgcaca	agctcgcggt	gcgacggaca	catcgccggc	ggggtgtcag
10021	ctccgcctg	atcgagcctt	gccgccatgc	cgcgcgcaacg	caggggtgcg	ccaagctgcy
10081	gtcgcactgc	cacccgaacc	tgctgtgctt	atacagagcg	ctcggattca	cccacgtcga
10141	cactttcaat	cccgctggg	atccaacctt	catcgcagaa	cgctcagaac	tcgaaatcta
10201	acgtccgttc	gggcatcgag	gtccatgctg	gggtgggagc	ggcccgtggc	ttcaagatca

III JUSTIFICACION

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es actualmente uno de los problemas de salud pública debido a la aparición de éstas en los hospitales y a que son bacterias resistentes a los antibióticos administrados en la medicina humana. Además, ha ido en aumento el número de antibióticos al que pueden ser resistentes.

Este problema se ha investigado principalmente en los países de Estados Unidos, Inglaterra, Francia y España, entre otros.⁸ En México, es escasa la información acerca de este problema y probablemente se haga poca investigación sobre este tema y todavía no existen reportes que hablen acerca de la resistencia de las bacterias en carne de consumo humano como lo es la carne de res, cerdo, pollo y pavo.

Los reportes (de Dalsgaard, García, Cancho Grande, entre otros) que se han hecho acerca de este tema mencionan que las bacterias que más frecuentemente muestran resistencia son las Gram (-), sin embargo no solo existen este tipo de bacterias sino también hay bacterias Gram (+) que están presentes en la carne de consumo humano por lo que es pertinente dirigir la investigación hacia este grupo de bacterias, ya que no hay investigación dirigida hacia estas bacterias.

Se cuenta con reportes de importantes revistas de investigación (como el New England Journal of Medicine, Current Opinión in Microbiology, etc) acerca de la resistencia de las bacterias a antibióticos pero son relativamente pocos los que hacen referencia a los mecanismos genéticos involucrados. Existen varios elementos genéticos a los cuales se atribuye el transporte y expresión de los

genes de resistencia, pero en este trabajo solo haremos referencia a los integrones, quienes portan genes de resistencia, los cuales pueden estar presentes en ADN plasmídico o ADN cromosómico.

La importancia de esta investigación radica en varios puntos: el primero es que se realizó a partir de carne de pollo, cuyo consumo se ha incrementado por los mexicanos y es importante conocer sobre el control higiénico de la carne de las marcas de pollo que se venden en las tiendas de autoservicio.

Otra razón importante por la cual se realiza esta investigación es porque en México no hay reportes acerca de este tema siendo de gran importancia clínica ya que si existen bacterias resistentes a antibióticos en los hospitales, podría ser difícil combatirlas con los medicamentos tradicionales.

Por otro lado, es importante investigar a las bacterias Gram (+) ya que existen enterococos que podrían ser multiresistentes y que son de gran importancia ya que pueden participar en múltiples enfermedades infecciosas.

Por lo tanto el presente trabajo fue diseñado para estudiar la posible presencia de bacterias Gram (+) presentes en carne de pollo y multiresistentes a antibióticos. Así mismo, se planeó investigar la presencia del integrón 1 en dichas bacterias.

HIPOTESIS

La carne de pollo comprada en tiendas de autoservicio de cadenas prestigiadas puede estar contaminada con bacterias resistentes a por lo menos un antibiótico y ser portadoras de un integrón clase 1.

OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Aislar bacterias de carne de pollo y determinar su resistencia a diferentes antibióticos.
- ❖ Determinar la posible presencia del integrón clase 1 en las bacterias multiresistentes a antibióticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar bacterias a partir de carne de pollo.
- Realizar prueba de susceptibilidad a diferentes antibióticos a las colonias seleccionadas para el estudio.
- Elegir cepas multiresistentes e identificarlas con pruebas bioquímicas.
- Realizar extracción de ADN plasmídico para observar la posible presencia de plásmido.
- Extraer ADN total y ADN plasmídico para realizar estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

VI MATERIAL Y METODO

COLECCION DE MUESTRAS

Se recolectaron muestras de pechuga y muslo de pollo de tres marcas diferentes: Bachoco, Pilgrim's Pride y Toy, adquiridas en dos cadenas diferentes de supermercado (Comercial Mexicana y SAM'S) en el área cercana a Ciudad Universitaria.

AISLAMIENTO

- Pre-enriquecimiento:

En condiciones asépticas, se realizaron cortes de cada muestra en trozos pequeños, se pesaron 10 g de carne (refrigerada o congelada). En un vaso de licuadora estéril se colocó la cantidad de carne anteriormente dicha y se agregaron 90 ml de agua peptonada al 0.1% (ver anexo 1), se homogeneizaron 30 seg. a una velocidad mínima. Posteriormente el homogeneizado se colocó en un matraz estéril y se incubó a 35° C durante 24 hrs. para favorecer el crecimiento de las bacterias que probablemente se encontraban estresadas por la baja temperatura a la cual se mantuvo la carne y la manipulación de la misma.

- Enriquecimiento:

Se tomó 1 ml del homogeneizado anterior y se inoculó en caldo BHI (infusión cerebro corazón ver anexo 1) durante 24 hrs a 37° C. Esto se realizó con el fin de obtener abundante flora microbiana deseada para nuestro estudio.

Al término del tiempo se realizaron diluciones del cultivo anterior con agua peptonada al 0.1% de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. De cada una de éstas se tomó 1 ml y se colocaron en cajas estériles previamente etiquetadas para poder realizar la técnica de vertido en placa utilizando medio sólido agar BHI. (ver anexo 1) las cajas, una vez solidificadas, se incubaron a 37° C por 48 horas.

- Aislamiento de enterococos:

Los enterococos forman parte de la flora microbiana de pollos sanos pero además ocupan el segundo lugar, después de *E. coli*, en provocar enfermedades, adquiridas en los hospitales.³⁹ Por este motivo se decidió aislar este grupo de microorganismos.

Para aislar a este grupo de microorganismos se utilizó el agar KF para enterococos (ver anexo 1), adicionado con TTC (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro) que sirve como indicador. Si hay colonias en abundancia y presentan un viraje rojo entonces son enterococos, que pueden ser: *Ent. faecalis*, *Ent. mitis*, *Str. bovinus*, *Str. equinus*, *Str. salivarius*. Si hay crecimiento escaso de colonias y sin viraje de color se dice que son: *Lactococcus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*.³⁰

Para dicha selección se tomaron las diluciones anteriores y se colocó 1 ml de cada una en cajas petri, limpias y estériles y posteriormente se vertió el medio KF en cada una de las cajas previamente enfriado realizando movimientos giratorios para homogenizar.

Se incubaron las cajas (incubadora *Thermolyne type 41900*) a 35-37° C durante 24-48 horas.

CARACTERIZACIÓN

- **Morfología macroscópica.** Se observaron las cajas para ver el crecimiento y determinar la morfología colonial (borde, color, tamaño) de las colonias crecidas y así poder seleccionar a las colonias características.
- **Morfología microscópica.** Se realizó tinción diferencial de Gram, para saber si las bacterias son Gram positivas o negativas. Así mismo se pudo observar si las colonias están formadas por cocos, diplococos, estreptococos o estafilococos. (Para la técnica ver anexo 1)

IDENTIFICACION PRESUNTIVA CON PRUEBAS BIOQUIMICAS

Esta identificación nos permitió diferenciar entre estafilococos y/o estreptococos.

Prueba de hemólisis en agar sangre de carnero 5% (ASC)

Los *estreptococos* tienen enzimas (estreptolisinas) que pueden degradar a los glóbulos rojos. Estas pueden ser del tipo O ó S y pueden estar presentes ambas o ninguna o simplemente la S.²⁷

Cuando tienen la estreptolisina O y S se hace la destrucción total de los glóbulos rojos (superficial y fondo) y se produce la β -hemolisis. Esto se observa en las cajas con formación de halo transparente.²⁷

Cuando tienen la estreptolisina S se hace una destrucción parcial o superficial de los glóbulos rojos por lo que se produce α -hemolisis. Esto se observa en las cajas con un halo verdoso o rojizo.²⁷ (Preparación ver anexo 2)

Prueba de catalasa

La enzima catalasa la poseen las bacterias que tienen citocromos, a excepción de los estreptococos, por lo tanto no descomponen el H_2O_2 lo que indica que esta prueba debe ser negativa para este tipo de microorganismos.

En agar nutritivo (ver anexo 2) se siembran las cepas y se dejan incubar 12 a 24 horas a $35^\circ C$.³²

Posteriormente se agrega una gota de H_2O_2 al 30% directamente sobre la colonia.

Crecimiento en anaerobiosis

Los estreptococos son anaerobios facultativos y crecen muy bien en anaerobiosis y deben crecer en un medio adecuado para este tipo de microorganismos, por lo que se decidió sembrar en agar KF que contienen un inhibidor llamado azida sódica, que en altas concentraciones inhibe la síntesis de ATP pero no inhibe el crecimiento celular. La azida sodica tiene un efecto bacteriostático sobre

microorganismos gram negativos, pero no sobre microorganismos gram positivos (por ejemplo los enterococos) que carecen de un sistema citocromo y del ciclo tricarbónico. La degradación del hidrato de carbono presente en este medio se hace a través del ciclo de la hexosa difosfato, dando una reacción ácida por lo que el indicador (púrpura de bromocresol) cambia de púrpura a amarillo.³²

En las cajas petri con el medio KF (ver anexo 2) se realizó una siembra por cuadrante radial y se colocaron las cajas dentro de una cámara de anaerobiosis con dos sobres de gas pack (para eliminar el oxígeno presente) a una temperatura de 35-37° C durante 24-48 hrs.

Prueba de NaCl al 6.5%

Hay microorganismos que son tolerantes a altas concentraciones de sal como son los estreptococos. Se prepara caldo BHI como se indica en el anexo 2.

El resultado es positivo si el indicador cambia de color o el resultado es negativo si no hay cambio de color.¹⁹

Crecimiento a 35°C y 10°C

Se prepara medio líquido, rico en nutrientes que sirva para el buen crecimiento de las bacterias en estudio. En este caso se preparo medio caldo BHI.

Se inocularon los tubos con un cultivo puro y se incubaron a 35°C y 10°C por 48 horas.

Prueba de fermentación de hidratos de carbono

La fermentación de hidratos de carbono es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbico, dando como productos finales gases como el hidrógeno, anhídrido carbónico, algunos ácidos, algunos alcoholes y una cetona.

Las bacterias degradan los hidratos de carbono a compuestos más simples y la forma de fermentación de cada una ayuda a la identificación del grupo, género o especie.³²

Los tubos preparados con el medio (ver anexo 2) se inocularon con una asada de un cultivo puro con crecimiento de 24 horas. Se incubaron a 37° C de 24 a 48 hrs.

Prueba de Voges Proskauer

Se basa en la detección de la acetoína, producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa.

Las enterobacterias se clasifican característicamente como fermentadoras de ácidos mixtos, dando como producto final 2,3-butanediol.

Harden y Walpole afirman que la acetoína es una etapa intermediaria en la conversión en 2,3-butanediol, ambos son productos neutros de la fermentación de glucosa.

Es muy importante el pH del medio, evitando que sea ácido, porque no se formaría la acetoína, si bien debe ser inferior a 6,3.³²

Leche con azul de metileno

El azul de metileno puede sustituir a los aceptores de electrones naturales (oxígeno) en cualquier lugar de la cadena de transporte de electrones, donde actúan como reductores del sistema citocromo-c-citocromo oxidasa.

El azul de metileno indica los cambios en el potencial de oxidación-reducción producidos por un organismo. Dentro del género *Streptococcus*, solamente los organismos enterococos del grupo D son capaces de reducir el azul de metileno por completo.³²

Se inocularon los tubos de leche con azul de metileno (anexo 2) con un cultivo puro de 18-24 h, se mezclaron y se incubaron a 35° C de 18 a 24 h.

Prueba positiva: hay reducción del medio y se decolora completamente (por lo general son *Streptococos* del grupo D).

Prueba negativa: no hay reducción.

Prueba de licuefacción de gelatina

Las proteínas que se producen naturalmente son muy grandes para entrar en una célula bacteriana, por lo tanto, debe ser catabolizada en componentes más pequeños. Las enzimas proteolíticas, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias que ayudan a desdoblar a las proteínas (efecto llamado gelatinosis). Esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.³²

Se inculó la muestra en gelatina por picadura (anexo 2) hasta una profundidad de 1,5 a 2,5 cm. Se incubó a 35 °C de 24 h hasta 14 días.

La interpretación de los resultados se debe hacer en hielo debido a que a 35°C la gelatina se hace líquida. El traspaso de los tubos de la incubadora al baño de hielo debe hacerse sin agitar los tubos.

La prueba es positiva si el medio se observa licuado y con crecimiento en la parte superior. La prueba es negativa si el medio se mantiene sólido.³²

PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La resistencia a los antibióticos se determinó mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en discos (multidiscos^{MR} BioRad) para estudio *in vitro*. Se fundamenta en colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano sobre un medio sólido inoculado con bacterias.

El antimicrobiano difundirá formándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria.

Los antibióticos fueron:

Sensidiscos para microorganismos Gram positivos	Sensidiscos para microorganismos combinados (Gram positivos y Gram negativos)
AM Ampicilina 10 mcg	CF Cefalotina 30 mcg
CF Cefalotina 30 mcg	E Eritromicina 15 mcg
CTX Cefotaxima 30 mcg	AM Ampicilina 10 mcg
CAZ Ceftazidima 30 mcg	SXT Trimetroprim sulfametoxazol 25 mcg
CXM Cefuroxima 30 mcg	CRO Ceftriaxona 30 mcg
DC Dicloxacilina 1 mcg	NET Netilmicina 30 mcg
E Eritromicina 15 mcg	ENX Enoxacina 10 mcg
GE Gentamicina 10 mcg	PE Penicilina 10 U
PEF Pefloxacina 5 mcg	DC Dicloxacilina 1 mcg
PE Penicilina 10 U	CL Cloranfenicol 30 mcg
TE Tetraciclina 30 mcg	GE Gentamicina 10 mcg
SXT Trimetroprim sulfametoxazol 25 mcg	AK Amikacina 30 mcg

Técnica

1. Preparación de medio Luria (anexo 3)
2. Se colocan 10 ml del medio anterior, en tubos de 13 x 100 mm y se inoculan por asada. Se dejan incubar a 35° C por 8 horas.
3. Se preparan 10 ml (por caja petri) de medio para antibióticos (anexo 3), se vierte y se deja solidificar.

4. Se toma una alícuota de caldo Luria de 0.1 ml y se resuspende en otros 10 ml de medio para antibióticos a temperatura aproximadamente de 37° C. Posteriormente se vierte en las cajas petri que previamente tienen medio para antibióticos sólido.
5. Cuando el medio esté sólido se colocan los multidiscos combinados, con pinzas estériles, se acomodan de tal forma que queden en medio de la caja.
6. Se incuban a 35° C durante 24 horas. Al término del tiempo se miden los halos de inhibición.

Interpretación

Las cepas se clasificaran en Resistentes (R) ≤ 14 mm

Intermedias (I), 15-16 mm

Moderadamente Sensible (MS) $\geq 17 \leq 29$ mm

o Susceptibles (S), ≥ 30 mm

dependiendo del halo de Inhibición (incluyendo los 6 mm del disco).

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA CON PRUEBAS CONVENCIONALES POR API 20 STREP

Para corroborar los resultados presuntivos de la identificación de las bacterias se utilizó el sistema de identificación con tiras API para estreptococos (Api 20 strep), que permiten realizar un diagnóstico de grupo o por especie de la mayoría de los estreptococos.

La galería de API se compone de 20 microtubos con sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la tabla de lectura y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo analítico o del programa de identificación.

Procedimiento

1. Crear una atmósfera húmeda en los alvéolos de la galería
2. Resuspender una colonia de una cepa pura en 2 ml de medio API GP
3. Repartir la suspensión anterior en la galería colocando 3 gotas aproximadamente y cuidando que no se formen burbujas.
4. Incubar a 37° C y realizar una primera lectura a las 4 horas y una segunda lectura a las 24 horas.
5. Hacer el registro y la identificación.

EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDÍCO

Preparación de ADN plasmídico (BIRMBOIM y DOLY, 1979)

El ADN plasmídico es circular de doble hebra que puede transportar genes de resistencia, de producción de toxinas, etc. Se encuentra en el citoplasma de la célula y se replica autónomamente al cromosoma.⁴²

Se realiza la extracción de un control (*E. coli* 4097) el cual ya se sabe que tiene un plásmido silvestre de alto peso molecular, junto con las muestras.

Minipreparación

1. Crecer 5 ml de bacterias durante la noche (incubadora Thermolyne Type 41900) en medio luria.
2. Tomar 1.5 ml del cultivo anterior, pasarlo a un tubo eppendorf y centrifugar (microcentrifuga IEC micro-MB) por 1 min.
3. Decantar, dejando el pellet lo más seco posible.
4. Resuspender a las células en 100 μ l de solución I fría. (Ver anexo 4)
5. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 μ l de solución II fresca (Ver anexo 4). Mezclar por inmersión y no usar vortex.
7. Incubar 10 minutos en hielo
8. Agregar 150 μ l de solución III fría (Anexo 4). Mezclar por inmersión e incubar por 15 min. en hielo
9. Centrifugar por 5 minutos.
10. Recuperar el sobrenadante y centrifugar por 5 min.
11. Recuperar el sobrenadante y agregar RNAsa (20 μ g/ml) (OPCIONAL). Incubar 20 min. a 37° C
12. Agregar un volumen igual de fenol cloroformo (1:1) saturado con TE. Mezclar vigorosamente. Centrifugar 30 segundos.
13. Recuperar la fase acuosa y agregar 2.5 vol de etanol. Incubar a -70° C por 5 min.
14. Centrifugar por 5 minutos.

15. Decantar, enjuagar el pellet con etanol al 70%
16. Secar el pellet y resuspender en 20 μl de agua.

Una vez obtenido el ADN plasmídico, se observó en un gel de agarosa al 0.9% junto con el marcador de pesos que corresponde a 0.1 μg de ADN de fragmentos del fago λ por pocillo.

Colocar cuidadosamente la siguiente mezcla con las cantidades indicadas en el gel de agarosa al 0.9%

1 μL de buffer de carga

1 μL de agua destilada estéril

8 μL de muestra o control

Colocar el gel en una cámara de corrida (SIGMA Chemical modelo E0638 250 VCD) llena con solución Tris-borato 0.5x aplicando una diferencia de potencial de 120 V durante 1 hora o bien cuando las bandas de azul de bromofenol se encuentran a unos 4 cm del borde anódico del gel.

Para visualizar las bandas de ADN el gel se sumergió cuidadosamente en una solución de bromuro de etidio* (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 8 minutos. El exceso de bromuro de etidio se eliminó del gel enjuagando en un recipiente con agua destilada por 10 min.

Colocar el gel teñido sobre un transluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298 nm, T 1202 Sigma)

* Sustancia cancerígena, utilizar guantes, manejar con precaución.

EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

Protocolo General para la Extracción de ADN total modificado de Palumbi S., 1991.

1. Utilizar aproximadamente entre 0.1 g y 5.0 g de células. Para obtener esta cantidad de células, se inoculan 100 ml de medio BHI, y se incuban durante 18 h (incubadora con agitación New Brunswick scientific CO, INC)
2. Se centrifugan (centrifuga Dynac™ 211466) a 8000 g's durante 6 minutos y se retira el sobrenadante.
3. Se agregan 2 g de perlas pequeñas de vidrio estériles.
4. Agregar un volumen de 2 ml de buffer de lisis (anexo 4) y se agita en vortex, durante 8 minutos, girando constantemente.
5. Centrifugar a 10 000 g's, 10 minutos, a 4° C.
6. Recuperar el sobrenadante y extraerlo suavemente con un volumen igual de fenol equilibrado.
7. Separar a las fases centrifugando a 10 000 g's, 10 min., a 4° C
8. Recuperar la fase acuosa (superior) y agregar un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1). Mezclar suavemente.
9. Separar a las fases centrifugando igual que en el punto 6.
10. Recuperar la fase acuosa (superior) y agregar un volumen igual de cloroformo. Mezclar suavemente.
11. Separar a las fases centrifugando igual que en el punto 6.
12. Recuperar la fase acuosa (superior), midiendo su volumen.

13. Agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M (o bien, 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M).
14. Agregar 0.5 volúmenes de isopropanol o bien, 1.5 volúmenes de etanol.
Mezclar.
15. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 10 000 g's, 10 minutos, a temperatura ambiente.
17. Desechar cuidadosamente el sobrenadante. Lavar el pellet con etanol al 70%.
18. Centrifugar igual que en el punto 15.
19. Decantar cuidadosamente; secar el pellet y resuspender en 30 μ L de agua destilada estéril.

Observar las bandas de ADN total en un gel de agarosa al 0.9%, utilizando la técnica descrita en el protocolo del ADN plásmidico.

TÉCNICA DE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología que se basa en el principio de amplificar un fragmento de ADN en forma ilimitada en unas cuantas horas.

Para su realización se requiere que los reactivos básicos sean expuestos a ciclos de cambio de temperatura que permitan la amplificación exponencial del ADN.

Consta de tres ciclos que son: desnaturalización, hibridación y polimerización.^{2, 17}

Material

Tubos eppendorf de 1 ml nuevos estériles

Puntas para micropipeta nuevas estériles

Agua destilada desionizada estéril

Estuche de reactivos para PCR

Primers

Procedimiento

- Colocar los microtubos eppendorf en hielo
- Agregar los siguientes componentes en el orden descrito:
 - a) 45 μ l de buffer PCR *Supermix INVITROGEN* cat. 10572-014
 - b) Agregar 1 μ l de cada una de las soluciones de los *primers* SUL 1B e INT F (se recomienda tener una concentración final de 200 nM de cada uno)
 - c) Adicionar 1 μ l de ADN bacteriano (se recomienda tener una concentración de 1-3 ng)
 - d) Adicionar 2 μ l de agua desionizada estéril para obtener un volumen total de 50 μ l.
- Tapar y mezclar perfectamente el contenido de los tubos
- Colocar los tubos en el termociclador (Gene Amp 2400 Perkin Elmer)
- Comenzar con el programa de PCR

1. Arranque 3 min. a 96° C
2. Desnaturalización 15 seg. 96°C
3. Hibridación 30 seg. 55°C
4. Amplificación 90 seg. 72 °C
5. Etapa final 10 min. a 72°C

- Realizar un gel de agarosa 0.9% y correr las muestras junto con el marcador de pesos moleculares con una diferencia de potencial de 120 V durante 35 minutos
- Para observar las bandas de amplificación utilizar la misma técnica descrita en el protocolo de extracción de ADN plasmídico

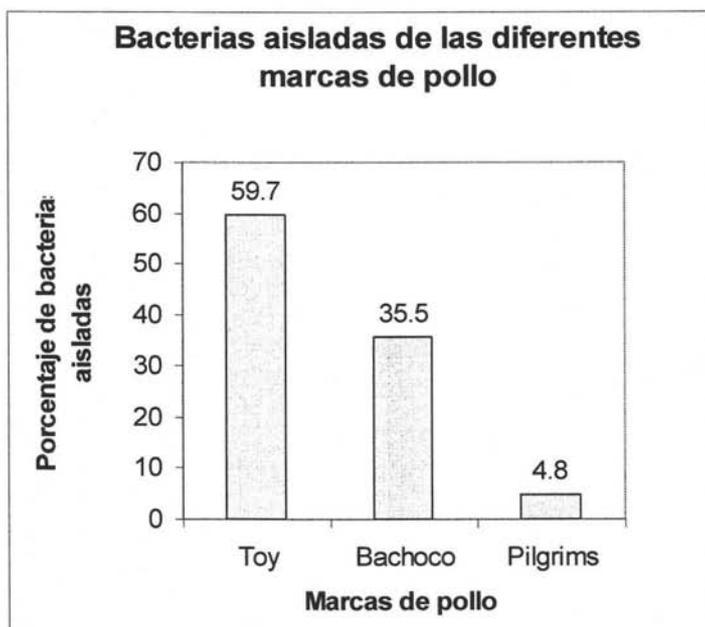
VII RESULTADOS

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS

El realizar el aislamiento de las bacterias a partir de la carne de pollo, implicó obtener una gran cantidad de microorganismos que de acuerdo a su morfología microscópica se clasificaron en cocos y bacilos.

Para la obtención únicamente de enterococos se utilizó el medio KF, ya que es un medio selectivo de crecimiento para este tipo de microorganismos.

Se obtuvieron 62 cepas de cocos de las cuales 37 fueron aisladas de la carne de pollo marca Toy (59.7%), 22 fueron de Bachoco (35.5%) y 3 fueron de Pilgrim's Pride (4.8%). (Gráfica 1)



Gráfica 1. Cantidad relativa de bacterias aisladas de las diferentes marcas de pollo estudiadas.

Todas las bacterias seleccionadas y aisladas fueron colonias pequeñas, con textura butirosa y de color rosa pálido (crecidas en medio KF con TTC).

Aparentemente, todas las cepas se observaban con características semejantes.

Se observa en el microscopio estereoscópico (figura 4) que las colonias de los microorganismos aislados son: redondas, con brillo, con elevación convexa y debido al tipo de medio de cultivo en el que se encuentra (KF) presentan un color café con precipitado al centro.

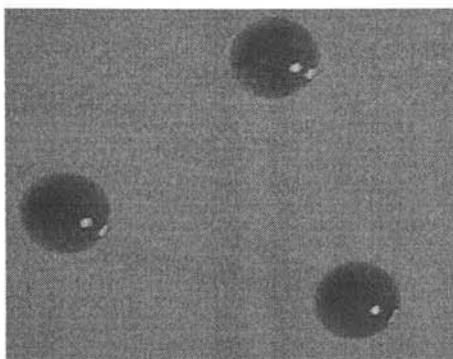


Figura 4. Morfología de las colonias aisladas de la cepa 9 bajo el microscopio estereoscópico.
(x40)

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Las características macroscópicas se determinaron a simple vista, observando la forma, el borde, la elevación, la textura y el color de las colonias.

Las características microscópicas se determinaron con ayuda de un microscopio para observar la morfología bacteriana mediante la tinción de Gram. A continuación se dan los resultados encontrados de algunas colonias ya que se omiten algunos debido a que en la mayoría de los casos son repetibles.

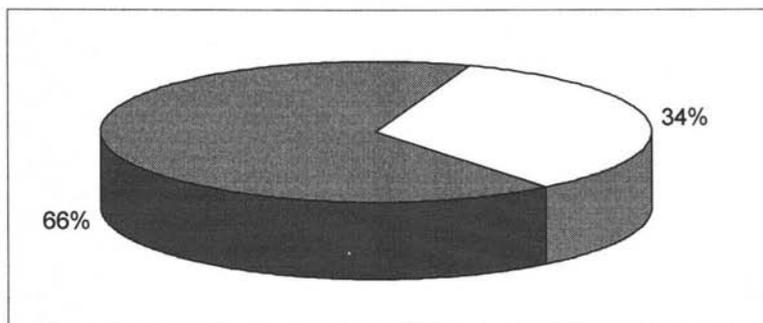
Cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Origen
2	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños Gram +, en forma de pares	pollo Bachoco
9	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños, Gram +, en forma de pares (diplococos)	pollo Bachoco
17	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños, Gram +, en forma de pares (diplococos)	pollo Bachoco
36	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños, Gram +, en forma de pares (diplococos)	pollo Toy
43	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños, Gram +, en forma de pares (diplococos)	pollo Bachoco
50	Forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa, color crema	Cocos pequeños, Gram +, en forma de pares (diplococos)	pollo Toy

Cuadro 3. Características macroscópicas y microscópicas de seis cepas seleccionadas de carne de pollo.

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las 62 cepas obtenidas se sometieron a la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Los antibióticos que se probaron fueron: ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CTX), ceftazidina (CAZ), cefuroxima (CXM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), pefloxacina (PEF), penicilina (PE), tetraciclina (TE), trimetropim-sulfametoxazol (SXT), ceftriaxoma (CRO), netilmicina (NET), enoxacina (ENX) y cloranfenicol (CL).

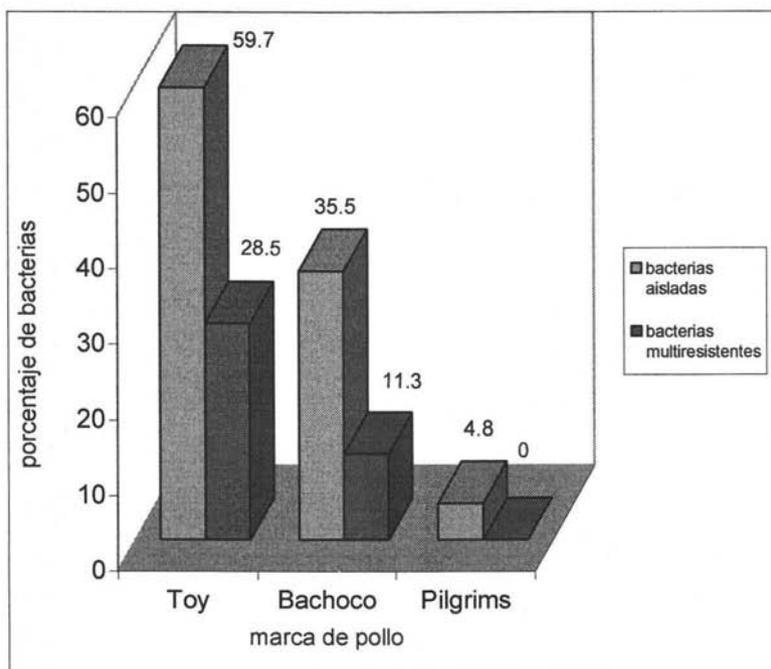
Los resultados obtenidos demuestran que el 34% de las cepas son multiresistentes a 12 antibióticos, del 66% restante de las cepas, el 14.6% son cepas sensibles, es decir que no crecieron en presencia de antibióticos y el 85.4% restante son cepas también multiresistentes pero a 11 o menos antibióticos. (Gráfica 2).



Gráfica 2. Proporción de las cepas multiresistentes a antibióticos aisladas de carne de pollo.

- Proporción de cepas multiresistentes.
- Proporción de cepas sensibles y multiresistentes a 11 antibióticos o menos.

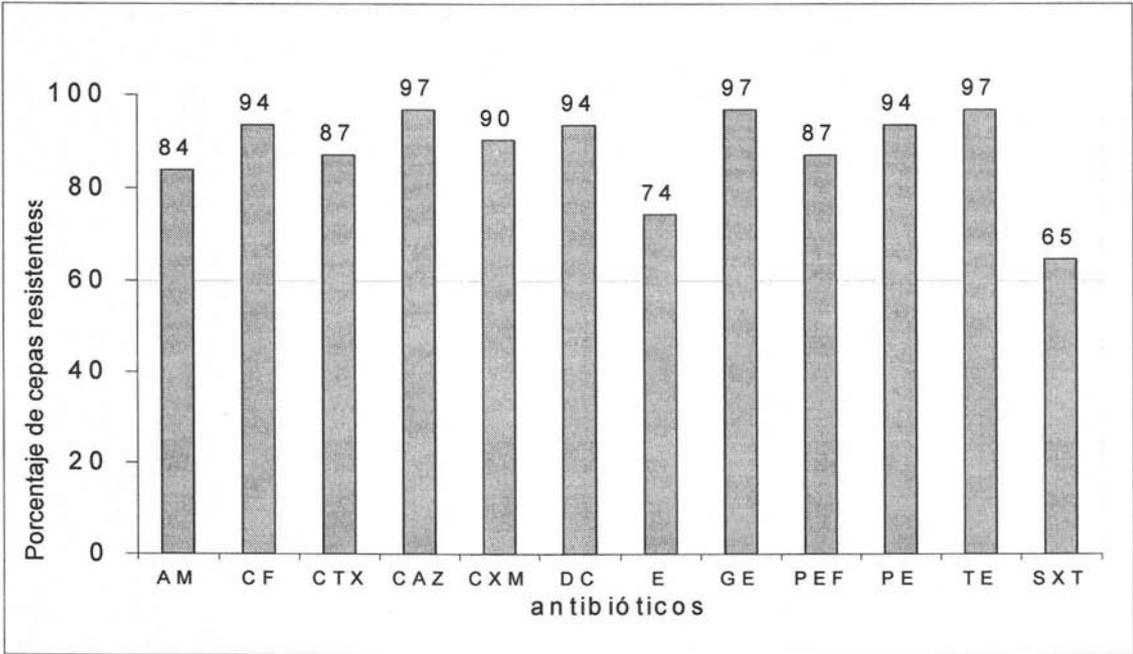
Del total de las cepas aisladas de carne Bachoco, el 11.3% fue multiresistente, de bacterias aisladas de carne Toy, 28.5% fue multiresistente y de las bacterias aisladas de carne de pollo Pilgrim's Pride no hubo bacterias multiresistentes (Gráfica 3).



Gráfica 3. Comparación de las bacterias totales aisladas contra las bacterias multiresistentes, de cada una de las marcas de pollo estudiadas.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó en dos partes: 31 cepas se sometieron a sensidiscos con antibiótico para microorganismos Gram (+) (Gráfica 4) y las 31 restantes se sometieron a la prueba de sensidiscos combinados, es decir, para microorganismos Gram (+) y Gram (-). (Gráfica 5)

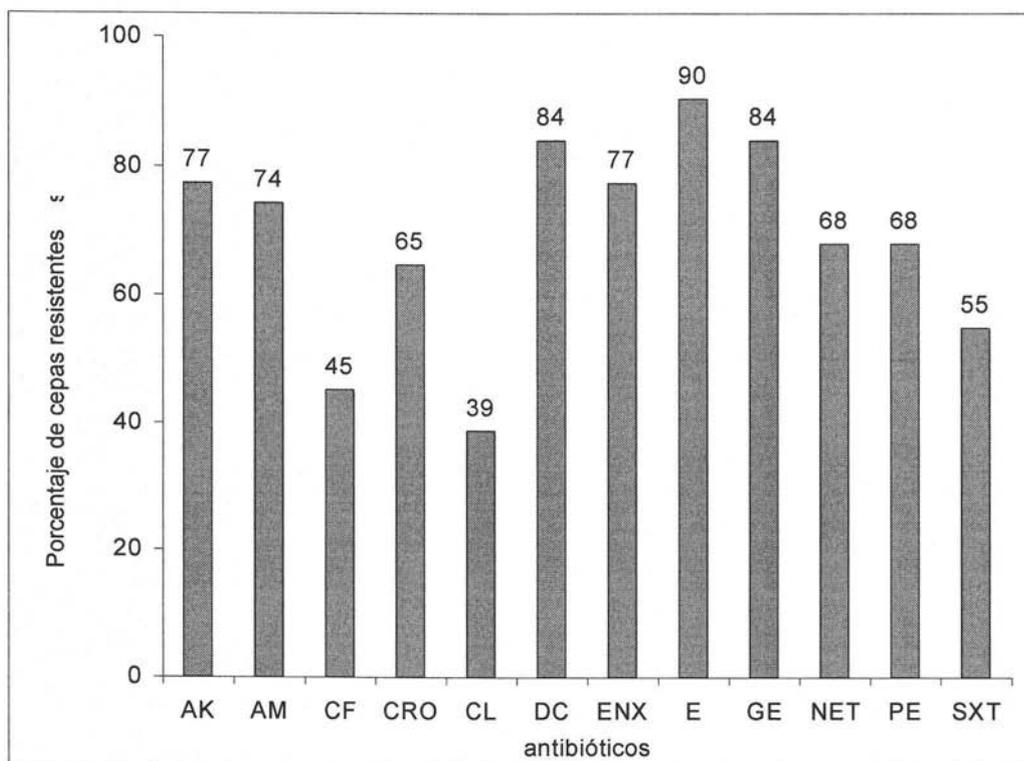
De las 31 cepas que se sometieron a la prueba de sensibilidad para microorganismos Gram (+) hubo tres antibióticos para los que se observó mayor número de cepas resistentes, que fueron: ceftazidina (CAZ), gentamicina (GE) y tetraciclina (TE) donde el 97% de las cepas fueron resistentes para cada uno de estos antibióticos. El antibiótico para el que se encontró menos microorganismos resistentes fue el trimetropim-sulfametoxazol, con 65% de las cepas resistentes.



Gráfica 4. Sensibilidad antimicrobiana con sensibilidad para microorganismos Gram (+) AM ampicilina, CF cefalotina, CTX cefotaxima, CAZ ceftazidina, CXM cefuroxima, DC dicloxacilina, E eritromicina, GE gentamicina, PEF pefloxacina, PE penicilina, TE tetraciclina, SXT trimetropim-sulfametoxazol.

Para el caso de las cepas sometidas a sensidiscos combinados, el antibiótico para el que se observó más resistencia fue eritromicina (E) con 90% de las cepas resistentes.

El antibiótico que mostró menos cepas resistentes fue cloranfenicol (CL) con el 39% de las cepas resistentes



Gráfica 5. Sensibilidad antimicrobiana determinada con sensidiscos combinados. AK amikacina, AM ampicilina, CF cefalotina, CRO ceftriaxoma, CL cloranfenicol, DC dicloxacilina, ENX enoxacina, E eritromicina, GE gentamicina, PE penicilina, SXT trimetropim-sulfametoxazol.

Debido a la gran cantidad de cepas obtenidas se decidió seleccionar a las que mostraron resistencia a más de 10 antibióticos. El resultado fue que 21 cepas eran multiresistentes. De estas cepas se realizó nuevamente pruebas de sensibilidad antimicrobiana para escoger a aquellas sensibles a 12 antibióticos (tabla 3). La mayoría de las cepas fueron multiresistentes, aunque hubo algunas que mostraban patrones diferentes de sensibilidad, por ejemplo, algunas eran sensibles, moderadamente sensibles o intermedias a algunos antibióticos como es el caso de las cepas: 9, 10, 30, 43, 50 y 53. Además, la mayoría de las cepas aisladas fueron de la marca de pollo Toy. Por lo tanto, se decidió tomar a seis cepas, cuatro de la marca Bachoco y dos de la marca Toy para tener una comparación entre estas dos marcas. La cepa 2, proveniente de pollo Bachoco se escogió porque tuvo sensibilidad intermedia a netilmicina; la cepa 9, proveniente de pollo Bachoco, se trabajó porque presentaba sensibilidad intermedia a netilmicina, enoxacina y amikacina; la cepa 17, proveniente de pollo Bachoco, por ser resistente a doce antibióticos; la cepa 36, proveniente de pollo Bachoco, por presentar resistencia intermedia a amikacina; la cepa 43, aislada de pollo Toy, por ser moderadamente sensible a ampicilina y ceftriaxona y además ser intermedia a amikacina y la cepa 50, proveniente de la marca de pollo Toy, por ser sensible a cloranfenicol.

No cepa	Antibióticos												pollo
	CF	E	AM	SXT	CRO	NET	ENX	PE	DC	CL	AK	GE	
2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	B
3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
9	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	I	R	B
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	T
13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	T
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
43	R	R	MS	R	MS	R	R	R	R	R	I	R	B
44	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	T
51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
53	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	T
54	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T

Tabla 3. Resultados de resistencia a 12 antibióticos adheridos a sensidiscos combinados microorganismos Gram (+) y Gram (-). Consultar anexo 5.

Antibióticos: AK amikacina, AM ampicilina, CF cefalotina, CRO ceftriaxoma, CL cloranfenicol, DC dicloxacilina, ENX enoxacina, E eritromicina, GE gentamicina, PE penicilina, SXT trimetropim-sulfametoxazol, NET netilmicina.

Resistencia: R resistente, I intermedio, MS moderadamente sensible, S sensible.

Marcas de pollo: T pollo Toy, B pollo Bachoco.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

La presencia de enterococos en la carne de pollo nos indica que pueden provenir de los intestinos o en algunos casos de las plumas, de la piel y/o de las patas del animal.

Para identificar a las bacterias seleccionadas para el trabajo se realizaron una serie de pruebas presuntivas que posteriormente se confirmaron con pruebas bioquímicas.

	Cepas de trabajo						Bacterias de referencia (1)				
	2	9	17	36	43	50	S. <i>faecalis</i>	S. <i>faecium</i>	S. <i>bovis</i>	S. <i>avium</i>	S. <i>gallinarum</i>
Hemólisis ASC 5%	α	α	α	α	α	α	α β δ	α β δ	α δ	α δ	α δ
Aerobiosis	+	+	+	+	+	+					
Anaerobiosis	+	+	+	+	+	+					
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
45° C	+	+	+	+	+	+					
10° C	+	+	+	+	+	+					
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+ ^a
Lactosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+					
Leche con azul de metileno	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+ ^b
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. Resultados comparativos de pruebas bioquímicas presuntivas de las cepas de trabajo con enterococos citados en la literatura que sirven para la identificación de las cepas.

a. Es positivo solo para el caso de L-arabinosa.

b. Es positivo después de 10 días de incubación.

(1) Referencia obtenida de *Bergey's Manual, 1986*.

Debido a que crecieron en NaCl 6.5%, manitol y temperatura (10° C y 45°C) se presume que son enterococos.

Con los resultados de la hidrólisis de carbohidratos, de acuerdo al Manual de Bergey's, las bacterias de trabajo fueron identificadas como enterococos de la especie *avium*, que es un enterococo que habita en las aves.

Esto se confirma con la utilización de tiras Api 20 Strep en función de los cambios de color y por tanto su escala asignada en el vaciado de los datos en el programa de dichas tiras, resultó ser *Enterococcus avium*, con un 90% de confiabilidad siendo las seis cepas de trabajo del mismo género y especie, pues no se encontró diferencia en los resultados.

Para los pasos siguientes se siguió trabajando con las seis cepas por separado porque de acuerdo a los resultados de sensibilidad antimicrobiana mostraron un patrón de resistencia diferente ante los antibióticos.

EXTRACCION DE ADN E IDENTIFICACION DE PLASMIDO

La extracción de ADN total se realizó con la técnica de Palumbi *et al.* con algunas modificaciones de material.

En la siguiente figura se observa un gel de agarosa al 0.9% que muestra bandas que corresponden al ADN total que incluye ADN cromosómico y ADN plasmidico.

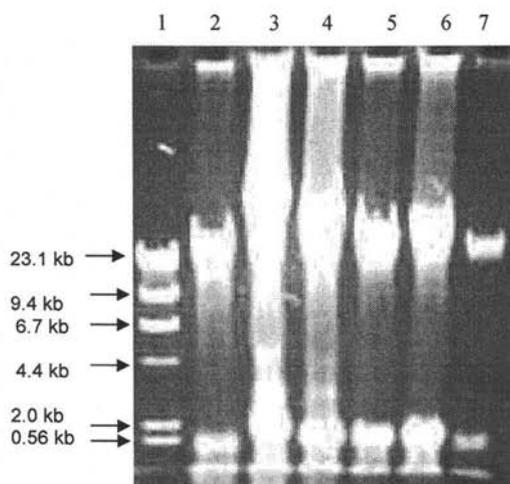


Figura 5. Gel de agarosa al 0.9% teñido con bromuro de etidio, muestra las bandas características de ADN total. Carriles 2,3,4,5,6,7 corresponden a las cepas de trabajo 2,9,17,36,43,50 respectivamente, el carril 1 corresponde al marcador de pesos moleculares.

Con la técnica que se utilizó se obtuvo gran cantidad de este material genético que tiene un peso molecular alrededor de 23-24 kb y de acuerdo a la intensidad que mostraron las bandas en el transluminador de luz UV se estimaron las siguientes concentraciones: para la cepa 9 fue de 2000 ng/μl, para la cepa 17 fue de 1000 ng/μl, para las cepas 2, 36, 43 son de 600 ng/μl y para la cepa 50 fue de 30 ng/μl. En todos los casos se obtuvo un buen rendimiento de la extracción.

Para conocer si las cepas de trabajo portaban plásmido, se extrajo el ADN plasmidico con la técnica de Birnboim y Doly, 1979.

Las figuras 6 y 7 muestran una serie de bandas tenues en la parte superior que nos indican la presencia de plásmidos.

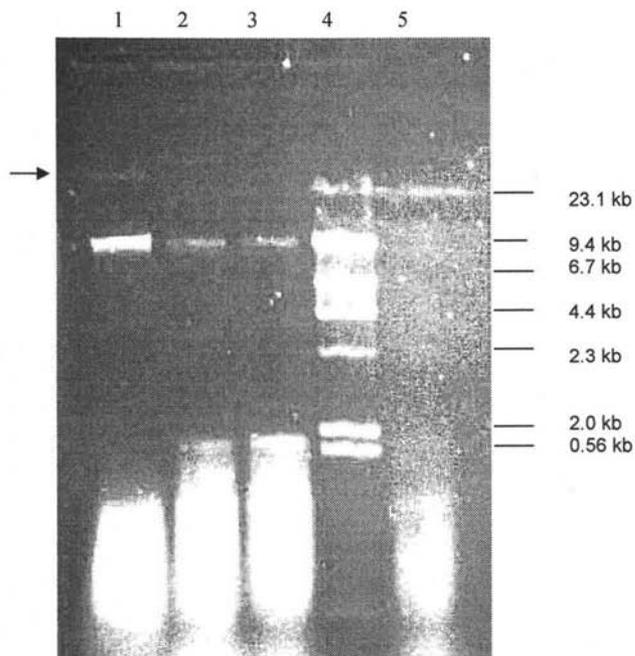


Figura 6. Gel de agarosa al 0.9% teñido con bromuro de etidio, muestra las bandas características del plásmido. Carril 1 el plásmido de *E. coli* cepa 4097 , los carriles 2,3,5 corresponden a las cepas de trabajo 2,9,17 respectivamente, el carril 4 corresponde al marcador de pesos moleculares. La flecha señala las bandas de plásmido.

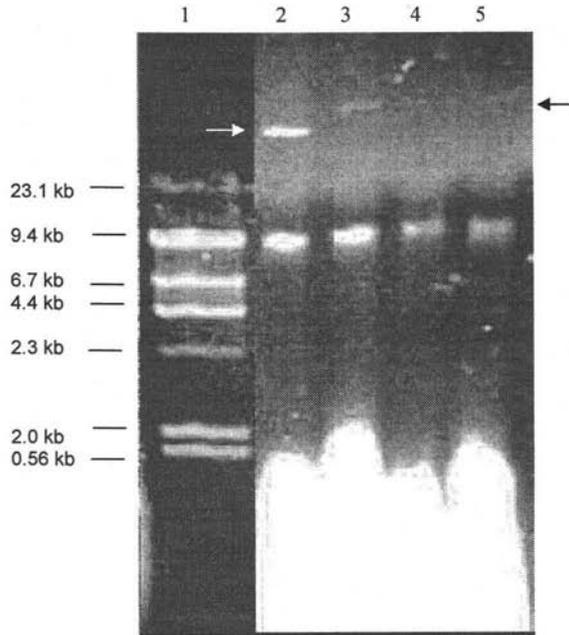


Figura 7. Gel de agarosa al 0.9% teñido con bromuro de etidio, muestra las bandas características del plásmido. Carril 1 es el marcador de pesos moleculares, en el carril 2 es el plásmido de *E. coli* cepa 4097, los carriles 3, 4 y 5 corresponden a las cepas de trabajo 36, 43 y 50 respectivamente. Las flechas señalan las bandas de plásmido.

En los carriles 1 de la figura 6 y carril 2 de la figura 7 se observa claramente una banda que indica la presencia del plásmido de referencia, aislado de *E. coli* cepa 4097. Las cepas de trabajo 2, 9, 17, 36 claramente mostraron que tienen plásmido de alto peso molecular, alrededor de 30-32 kilobases (kb). La cepa 43 tiene una banda muy tenue, casi indistinguible, que corresponde al plásmido. En la cepa 50 no se observa banda.

Se conoce la concentración de acuerdo a la intensidad que presentaron las bandas en el transluminador de UV, teniendo como referencia la intensidad de la

banda del marcador de pesos moleculares ya que se puede decir que es proporcional a la concentración de éste.

Las concentraciones plasmídicas son: la cepa 2 es de 33 ng/μl, para la cepa 9 y 17 es de 16 ng/μl y para las cepas 36 y 50 es de 6 ng/μl. Para la cepa 43 se estima que la concentración del plásmido es de 5 ng/μl.

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL INTEGRON 1

Para la identificación de la presencia de integrón en las bacterias de trabajo se requirió utilizar la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Para esta técnica se utilizaron dos *primers* específicos para el integrón 1, uno denominado sul1-B, posee la secuencia de nucleótidos (20 pares de bases) 5' GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC 3'. El otro *primer* es int-F el cual posee la secuencia de nucleótidos (15 pares de bases) 5'GGC ATC CAA GCA AGC3'.

El PCR se realizó con ADN total y ADN plasmídico y se encontró que en ambos casos hay amplificación.

La figura 8 muestra un gel de agarosa al 0.9% donde se observan las bandas que resultaron de la amplificación de ADN total (amplicones); en el carril 1 no se observa amplificación. En los carriles 2, 3, 5, 6 y 7 sí se observan las bandas que corresponden a la amplificación. Las bandas tienen un peso molecular de 1.2 kb, 1.0 kb y 350 pb aproximadamente. La banda que se observa alrededor de 700 pb es muy tenue y junto con las demás bandas que se observan parece ser artefacto de la misma técnica, lo que se conoce como amplificación inespecífica.

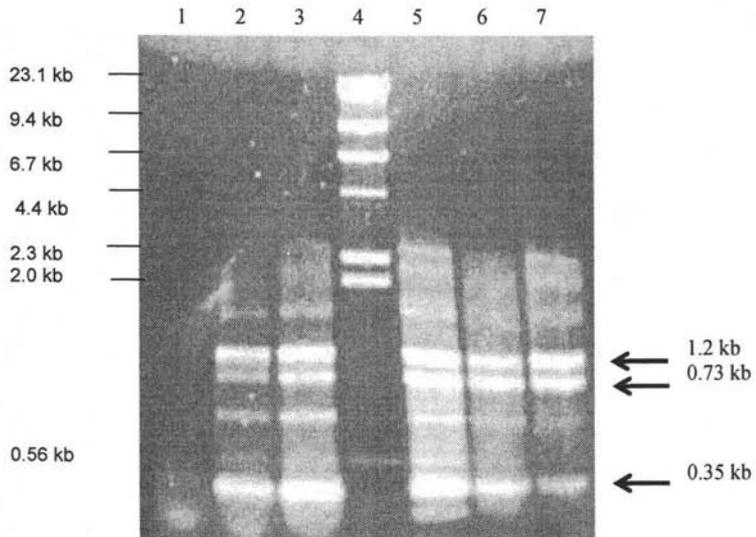


Figura 8. ADN total amplificado mediante la técnica de PCR y visualizado en un gel de agarosa al 0.9%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1 cepa 2, carril 2 cepa 9, carril 3 cepa 17, carril 4 marcador de pesos moleculares, carril 5 cepa 36, carril 6 cepa 43, carril 7 cepa 50. Las flechas indican las bandas amplificadas.

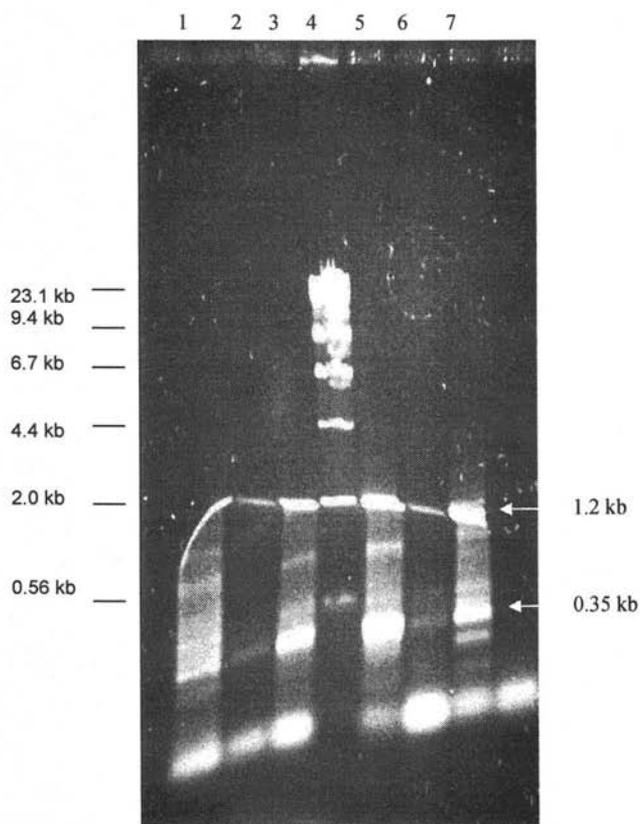


Figura 9. ADN plasmidico amplificado por la técnica de PCR, visualizado en un gel de agarosa al 0.9%, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1,2,3,5,6,7 las cepas 2,9,17,36,43,50, respectivamente, carril 4 marcador de pesos moleculares. Las flechas indican las bandas amplificadas.

Las bandas que se observan en el gel de agarosa al 0.9% de la amplificación de segmentos de ADN plasmidico (fig. 9) son similares en sus pesos moleculares a las bandas observadas en el gel de agarosa de ADN total.

Las bandas que corresponden a la amplificación en el ADN total son tres, cuyo peso molecular es 1.22 kb, 730 pb y 350 pb, aproximadamente.

En el caso de la amplificación de ADN plasmidico se observan dos bandas una de 1.2 kb y otra de 350 pb.

VIII DISCUSION

El utilizar marcas diferentes de pollo fue con el objetivo de comparar tres marcas de pollo, dos que son conocidas nacionalmente y una que es empacada por la tienda de autoservicio siendo de procedencia estadounidense. Las marcas utilizadas son: Bachoco, Pilgrim's Pride y Toy. El pollo Bachoco es mexicano, Pilgrim's Pride es críado en México bajo normas estadounidenses y la última proviene de Estados Unidos. Las tres marcas de pollo fueron compradas en tiendas de autoservicio, cercanas a Ciudad Universitaria.

La obtención total de microorganismos implicó una gran cantidad de ellos que se clasificaron en cocos y bacilos. Los enterococos, como ya se mencionó, forman parte de la flora microbiana de pollos y además provocan gran cantidad de enfermedades adquiridas en los hospitales.³ Por este motivo así como por su velocidad de crecimiento, se decidió aislar este grupo de microorganismos.

La marca de pollo del cual se obtuvieron mayor cantidad de bacterias (cocos, específicamente) fue la marca Toy con más de la mitad de las bacterias aisladas (59.7%), le siguió la marca Bachoco con el 35.5% y el que tuvo menos presencia de bacterias fue Pilgrim's Pride con solo el 4.8%.

Las bacterias se aislaron a partir de músculo y no de la piel, ésto nos sugiere que el control de calidad en la crianza de los animales para las dos primeras marcas es bajo y que probablemente los microorganismos sí provengan de los intestinos de los animales.

Las observaciones microscópicas mostraron que eran cocos Gram (+) y la inspección macroscópica mostró que la forma de las colonias de las cepas aisladas era pequeña, redonda, lo cual es característico de las cepas de los cocos, confirmando con el cambio de color en el medio KF el cual es un indicador que cambia de color café a rojizo con precipitado en la parte central de las colonias (descrito en la metodología) lo que confirma que son enterococos, es decir, bacterias presentes en los intestinos de los pollos y que de alguna manera se transportaron hacia el resto de la canal.

Las 62 cepas obtenidas se sometieron a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, encontrando que el 34% de las cepas son multiresistentes, es decir crecen en presencia de 12 antibióticos. En la literatura no está ampliamente reportado que haya resistencia a más de 10 antibióticos en bacterias Gram (+). Hay enterococos resistentes a vancomicina (del género de los glicopéptidos) que se asocia al uso de ovaparcina como promotor de crecimiento, aislados de animales de granja como son los pollos y cerdos.³¹ El reporte de resistencia para 12 antibióticos está hecho para *Salmonella*, aislada de carne vendida al menudeo (carne de pollo, pavo, res y cerdo), en Estados Unidos. Los antibióticos a los que mostró resistencia dicha *Salmonella* fueron: amoxicilina, ampicilina, ceftrifur, ceftriaxona, cefalotina, cloranfenicol, florfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, sulfametoxazol y tetracilina. Estos antibióticos son semejantes a los que se probaron en este experimento a excepción de ceftrifur, florfenicol y estreptomina.

Esto nos indica que sí puede haber resistencia a más de 10 antibióticos y aunque está reportado en una bacteria Gram (-), en esta investigación se está demostrando que también puede estar presente en bacterias Gram (+).

Una de las fuentes para la aparición de bacterias resistentes a antibióticos es la adición de antibióticos en el alimento de los animales, que se conocen como promotores de crecimiento. En los resultados del antibiograma con sensidiscos para Gram (+), mostrados en la gráfica 4, se observa que el 97% de las cepas fueron resistentes a ceftazidina, gentamicina y tetraciclina. Sin embargo en los resultados del antibiograma (graf. 5) con sensidiscos combinados se observa que el antibiótico al que presentan con mayor frecuencia resistencia las bacterias es eritromicina. Ello podría sugerir que en la alimentación de los pollos probablemente adicionen antibióticos de estas familias para promover su crecimiento, sin descartar otra posible causa que contribuya a la resistencia.

El antibiótico al que presentaron menos frecuentemente resistencia fue cloranfenicol con 39% de las cepas, en el caso de sensidiscos combinados, seguido de cefalotina con 45% y trimetropim sulfametoxazol con 55%. Sin embargo para los microorganismos que se probaron con sensidiscos para Gram (+), con el que menos se observó resistencia fue trimetropim-sulfametoxazol con 65% de las cepas resistentes y eritromicina con 74% de las cepas.

La tabla 3 presenta resultados de las 21 cepas que resultaron ser multiresistentes, las cuales se sometieron una segunda vez a crecimiento en presencia de antibiótico, con sensidiscos combinados. Esto se realizó con el fin de escoger a las cepas con mayor variedad de resistencia o aquellas que presentara alguna diferencia notable.

El resultado fue que 14 cepas mostraron multiresistencia, 3 cepas mostraron resistencia intermedia a amikacina, 1 cepa mostró sensibilidad a cloranfenicol, 1 cepa mostró resistencia intermedia a netilmicina, otra cepa mostró sensibilidad intermedia a netilmicina, enoxacina y amikacina y por ultimo una que fue moderadamente sensible a ampicilina y ceftriaxona e intermedia a amikacina.

Se eligió una cepa de cada uno de estos grupos, quedando solo seis cepas de trabajo para posteriormente hacer la extracción de ADN plasmidico y total.

Las bacterias de trabajo resultaron ser *Enterococcus avium* de acuerdo a las pruebas presuntivas, pero se confirmó este resultado con las tiras Api Strep 20, lo cual es convincente por ser aves, el animal de origen, aunque se esperaba que fueran estreptococos más comunes como *E. faecium* o *E. faecalis*. *Enterococcus avium* está presente en aves en general, pero se llega a encontrar más en los pollos en particular y aún así no deja de estar presente en el ser humano y de provocar infecciones.

La extracción de ADN total, el cual incluye ADN plasmidico y ADN cromosómico, tuvo gran rendimiento a pesar de ser modificada la técnica para adecuarla a las características de nuestros equipos. En las 6 cepas de trabajo se obtuvo casi la misma cantidad de ADN cromosómico (Fig. 5). El ADN total esta alrededor de 24 kb de masa molecular lo que indica que es de relativo alto peso molecular.

En el gel no se observan claramente las bandas, es decir hay barridos de la muestra, hecho que posiblemente se deba a fallas en el buffer de corrida.

Las concentraciones que se obtuvieron inicialmente son demasiado elevadas para realizar la técnica de PCR por lo que se realizó la dilución para que en el volumen final quedara una concentración de 1 ng/ml de ADN bacteriano.

La extracción de ADN plasmidico fue exitosa ya que se encontró plásmido en cinco de las seis cepas de trabajo. Las cepas 2, 9, 17 y 36 muestran claramente las bandas que son características del plásmido, confirmándolo con el peso molecular que esta alrededor de 30-32 kb. La cepa 43 presenta una banda de plásmido muy tenue por lo que su concentración se calculó de manera aproximada, con el fin de poder realizar la amplificación por PCR. Así mismo la cepa 50 no mostró banda plasmídica aunque se estimó también la concentración de ADN cromosómico para el mismo fin.

La dilución de la concentración del ADN plasmidico se realizó con el mismo proposito anterior de trabajar con una concentración final de 1 ng/ml de ADN bacteriano. Esta concentración no fue exacta ya que varió desde 0.8 a 1.1 ng/ml.

Se planeó que la amplificación ocurriera desde la parte central del integrón, donde se localizan los genes estructurales para resistencia a antibióticos hasta los genes de resistencia a sulfamidas. Esto se hizo con el fin de amplificar la mayor zona que se pudiera para observar con más detalle la presencia de genes en el integrón.

La amplificación con muestras de ADN total y de ADN plasmídico muestra que sí esta presente el integrón clase 1 confirmándose por las bandas observadas de 1.2 kb aproximadamente de longitud análogas a las que ya estaban reportadas por Dalsgaard en el 2000, quien realizó una investigación semejante encontrando la presencia de dos bandas, una que presentaba un peso molecular de 1.0 kb y otra en 1.19 kb haciendo uso de los mismos *primers* que en esta investigación.¹⁵

En la amplificación de ADN total (Fig. 8) así como en la de ADN plasmídico (Fig. 9) se observan una serie de bandas que aparentan ser una amplificación, dificultando la interpretación de los resultados. Esta serie de bandas probablemente son ocasionadas por factores no controlados de la técnica de PCR y se conoce como amplificación inespecífica, es decir que la enzima Taq comienza a polimerizar en una zona muy parecida y parcialmente complementaria a los *primers* que se utilizaron. Como consecuencia se observan en el gel de agarosa una serie de bandas muy tenues.

En la amplificación del ADN total hay tres bandas que son sugestivas de que está presente el integrón clase 1. Sus pesos moleculares son de 1.2 kb, 730 pb y 350pb. En la amplificación de ADN plasmídico solo se notan dos bandas que son características del integrón, las cuales tienen un peso molecular de 1.2 kb y 350 pb respectivamente. Esto nos sugiere que podrían estar presentes 3 integrones que posiblemente confieren resistencia a diferentes antibióticos. En el reporte de David White (2001)⁴⁸, por ejemplo, se halló la presencia de integrones clase 1 cuyo peso molecular es de 2.7kb, que confiere resistencia a 12 antibióticos, otro de 1.2kb que confiere resistencia a 9 antibióticos y el más pequeño que se encontró fue de 0.75kb que confiere resistencia a 3 antibióticos. Esto sugiere que probablemente también los integrones hallados en esta investigación confieran resistencia a los 12 antibióticos y que probablemente el integrón con peso molecular de 1.2 kb confiera resistencia a 9 antibióticos, el de 750 pb podría conferir resistencia a 3 antibióticos y el más pequeño de 350 pb confiera resistencia a un solo antibiótico, aunque esto es poco probable ya que por su tamaño solo podría codificar para un péptido de menos de 150 residuos de aminoácidos.

Lo que hace más interesante a esta investigación es que el integrón se localizó en bacterias Gram (+) hecho usualmente poco reportado en la literatura ya que la gran mayoría de los trabajos solo hacen referencia a bacterias Gram (-) como lo es el reporte de A. Dalsgaard (2000), que trabajó con *E. coli* o el de D. White y colaboradores (2001) que trabajaron con 13 serotipos de *Salmonella*. Ambos encontraron bandas de peso molecular semejantes a las que se encontraron en esta investigación a excepción de la que tiene un peso molecular de 0.35 kb.

La evidencia experimental sugiere que los tres integrones clase 1 no están localizados en la misma molécula de ADN es decir que, aparentemente, hay dos integrones clase 1 en el ADN plasmídico y otro en ADN cromosómico. Esto se sugiere por la presencia de las bandas de 1.2 kb y 350 pb que están presentes en las amplificaciones de ADN total así como en la de ADN plasmídico. Sin embargo, la banda de 730 pb no está claramente visible en la amplificación con ADN plasmídico.

Por ello se concluye que parece haber dos integrones clase 1 en ADN plasmídico con peso molecular de 1.2 kb y 350 pb y un integrón clase 1 en ADN cromosómico con un peso molecular de 730 pb.

IX CONCLUSIONES

- ❖ Se aislaron 62 cepas de bacterias a partir de carne de pollo, que por sus características microscópicas se identificaron como cocos Gram (+). De la marca de pollo Toy se aislaron 37 cepas (59.7%), de la marca de pollo Bachoco 22 cepas (35.5%) y de la marca de pollo Pilgrim's Pride fueron 3 cepas (4.8%).
- ❖ El 34% de las cepas totales (21 cepas) fueron resistentes a más de 10 antibióticos de los cuales ceftazidina (CAZ), gentamicina (GE), tetraciclina (TE) y eritromicina (E) son los que tuvieron mayor número de cepas resistentes.
- ❖ La marca de pollo Toy resultó más contaminada y se encontró que el 28.5% de las cepas aisladas de dicha marca fueron multiresistentes a más de 10 antibióticos.
- ❖ Se eligieron seis cepas de trabajo: cuatro de pollo Bachoco y dos de pollo Toy las cuales se identificaron como *Enterococcus avium*.
- ❖ Cinco cepas de trabajo portan un plásmido de alto peso molecular. Además se observó la presencia de tres integrones clase 1, uno situado en el ADN cromosómico con un peso molecular de 730 pb y los dos restantes en el ADN plasmídico con un peso molecular de 1200 pb y 350 pb respectivamente.

X REFERENCIAS

1. Aarestrup F. M., Bager F., Jensen N.E., Madsen M., Meyling A., Wegener H. C., **Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark**, *APMIS*, 106: 606-622, 1998.
2. Bobadilla N., Gamba G., **Biología molecular en medicina**, Reacción en cadena de la polimerasa, *Revista Investigación Clínica* 8(5):401 – 406, 1996.
3. Bourgeois, C. M., **Microbiología alimentaria**, Vol. 1, *Carne de Aves*, España, Ed. Acribia, pp 237-246, 1994.
4. Boyles S., **50% of chicken contaminated with bacteria**, *Consumer Reports*, 2002.
5. Bremner, A. S., **Higiene e Inspección de carne de aves**, Ed. Acribia, España, pp. 1-4,12-13, 1981.
6. Brown A., Rankin S., Platt D., **Detection and characterisation of integrons in *Salmonella enterica* serotype enteritidis**, *FEMS Microbiology Letters*, 191: 145-149, 2000.
7. Calderón, V. **Control de Residuos de Antibióticos. Diez años del Plan Nacional de Residuos**. XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Oviedo, Septiembre 2000.
8. Cancho Grande, B. y colaboradores, **El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual**, *Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia*, 3(1): 39-47, 2000.

9. Castello J. A., Franco F., García E., et al, **Producción de carne de pollo**, Ed. Obra Social, España, 1991, pp 270-273.
10. Chartone de S., Edmar, **Las bacterias resistentes, una guerra casi perdida**, *CienciaHoy*, 9(50):50-55, 1999.
11. Collis, C. M., may, R. M., Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons, *Antimicrobial Agents Chemother*, 39: 155-162, 1995.
12. Comité Editorial, **Ecología microbiana de los alimentos**, vol II, *productos alimenticios*, Ed. Acribia, España, 1985.
13. Cuarón I. J. A., **Anabólicos y Aditivos en la producción Pecuaria**, editado por Ávila E., Shimada A., Llamas G., Editorial Sistema de Educación Continua en producción animal en México, A. C., México, pp. 165-182, 1990.
14. Cuca M., Avila E., **Alimentación de las Aves**, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1990.
15. Dalsgaard A., et al, **Distribution and Content of Class 1 Integrons in Different *Vibrio cholerae* O-Serotype Strain Isolated in Thailand**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(5): 1315-1321, 2000.
16. Dell Helen, **Antibiotics in the environment; not harmful after all?**, *BioMed Net News and Comment*, Julio, vol. 4, 2003, pp 14
17. Dillon B., Thomas L., Mohmand G., Zelynski A., Iredell J., **Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates**, *Journal of Microbiological Methods*, 65(Marzo): 221-232, 2005.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

18. Du X., Shen Z., Wu B., Xia S., Shen J., **Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli***, *FEMS Microbiology Letters*, 245: 295-298, 2005.
19. Facklam R.R., *Manual de procedimientos, Aislamiento e identificación de **Estreptococos***, Centro de Control para Enfermedades, Atlanta, Georgia, 1998.
20. Fraizer W. C., **Microbiología de los Alimentos**, Ed. Acirbia, España, 1993, 4ª edición, capítulo 17, pp. 359-366.
21. G. David, D. PH, Zhao S., Sudler R., **The Isolation of Antibiotic-resistant *Salmonella*, from retail ground meats**, *The New England Journal of Medicine*, 345(16):1147-1153, 2001.
22. García L. María, **Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos**, *Actualidad SEM*, 28: 18-22, 1998.
23. Goossens H., Ferech M., Vander R., Elseviers M., **Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study**, *Lancet*, 365: 579-587, 2005.
24. Hasebe A., Kobashi Y. y Nishio M., **Natural antibiotic resistance of indigenous bacteria in Japanese animal husbandry and farmland**, décimo Congreso Internacional en Microbiología, Cancún, México, Agosto 2004, libro de resúmenes, pág. 217.
25. Hernández E. G., **Se busca proteger al sector avícola**, periódico *El Universal*, 5 de febrero 2003, pag. 5

26. Hsieh Sue-Er, **Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci**, *Journal of Microbiology Immunol Infect*, 33:253-527, 2000.
27. Koneman E., **Diagnostico microbiológico, texto y atlas**, Ed. Medico Panamericana, Argentina, 3ª edición, 1988, pp. 352-365.
28. Lund T. Blom M., Monnet D., Niels F., Lykke R., Espersen F., **Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork**, *New England Journal of Medicine*, 345(16):1161-1166, 2001.
29. **Manual de Prácticas de Microbiología General**, Facultad de Química, UNAM, México, pp. 98-102, 2000.
30. Merck E., **Manual de medios de cultivo**, Alemania, 1990.
31. McDonald, L. Clifford, Rossiter S., M. PH., Mackinson C., M. T., **Quinupristin-Dalfopristine-Resistant *Enterococcus faecium* on chicken and in human stool specimens**, *The New England Journal of Medicine*, 345(16):1145-1160, 2001.
32. McFaddín Jean, **Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clínica**, Ed. Médica Panamericana, México, 2ª reimpresión, 1993.
33. Nagel R., **La resistencia de las bacterias a los antibióticos ¿Un camino sin retorno?**, *CienciaHoy*, 10(59)15-20, 2000.
34. Nicholls H. **Bacteria learn antibiotic resistance in the sludge**, *BioMed Net News and Features*, Sep., vol. 4, pag. 13, 2003.

35. Normarck H. B., **Evolution and spread of antibiotic resistance**, *Journal of Internal Medicine*, 252:91-106, 2002.
36. North M., Bell D., **Manual de Producción avícola**, Ed. Manual Moderno, México 1993, capítulo 36, pp. 697-705.
37. Organización Mundial de la Salud, **Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark**, reporte en Noviembre 2003. www.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CPE_ZFK_2003.1.pdf
38. Rowe D., Moizel D., **Resistance Gene Capture**, *Current Opinion in Microbiology*, 2:483-488, 1989.
39. Scot Bailey, et al, **Diagnostico microbiológico**, Ed. Médica Panamericana, Argentina, 7ª edición, 1989, pp. 421-425.
40. Sherwood Gorbach, M.D., **Antimicrobial use in animal feed**, *New England Journal of Medicine*, 345(16): 1202-1203, 2001.
41. Sneath P., Mair N., Sharpe E., Holt J., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2, section 12: Gram-Positive Cocci, editorial William's and Wilkims, USA, 1986.
42. Stryer, L., **Bioquímica**, España, Edit. Reverté, 4ª edición, pp 128-129, 1975.
43. Stuart W. **Microbiología**, Ed. McGrawHill, México, 1999, pp. 82-84.
44. Teuber M., **Veterinary use and antibiotic resistance**, *Current Opinion in Microbiology*, 4:493-499, 2001.
45. Threlfall E. J., Ward L., Frost J., Willsahw G., **The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria**, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 1-5, 2000.

46. Tucker R., **Cría del pollo parrillero**, Ed. Albatros, Argentina, 1987, pp. 11-12.
47. Rojano, H., **Un mito, la calidad del norte**. periódico *La Jornada*, 18 de Enero 2003, pp. 23
48. White P., McIver C., Rawlinson W., **Integrans and gene cassettes in the Enterobacteriaceae**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9):2658-2661, 2001.
49. Wegener H. **Antibiotics in animal feed and their role in resistance development**, *Current Opinion in Microbiology*, 6:439-445, 2003.
50. Zhao C., Beilei, G.E., et al, **Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork and Beef from the Greater Washington, D.C., Area**, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12):5431-5436, 2001.

PAGINAS WEB

51. www.avicultura.com Asociación de avicultores
52. www.inegi.gob.mx Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
53. <http://members.tripod.com/fotografia7textos/alimentos.htm> *Los antibióticos en la conservación de los alimentos.*
54. www.who.org Organización Mundial de la Salud
55. www.ncbi.nlm.nih.gov (GENBANK) Secuencia del integrón Clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*
56. www.thepoultrysite.com
57. www.nationalchikencouncil.com Consejo Nacional del pollo

ANEXO 1

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA EXTRACCIÓN TOTAL DE MICROORGANISMOS

Preparación de agua peptonada

Peptona de carne 4.3 g, peptona de caseína 4.3 g y NaCl 6.4 g, agua destilada 1000 ml. Mezclar los ingredientes (vaciar a tubos si es necesario) y esterilizar en autoclave a 121°C a 1.5 lb durante 15 min.

Preparación de caldo BHI (Infusión cerebro corazón)

Caldo BHI 37 g (BD BIOXON), agua destilada 1000 ml. Mezclar hasta disolución y esterilizar en autoclave 121°C a 1.5 lb durante 15 min.

Preparación de agar BHI

Agar BHI 52 g (BD BIOXON), agua destilada 1000 ml.

Mezclar y calentar hasta disolver completamente, esterilizar en autoclave 121°C a 1.5 lb durante 15 min. Cuando este a temperatura de 40°C vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar.

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE ENTEROCOCOS

Preparación de agar KF con TTC.

Se disuelven 71.4 g de agar KF (DIFCO) en 1000 ml de agua destilada y se esteriliza en autoclave por 10 minutos a 121° C. Es importante no sobrecalentar el medio. Se deja enfriar hasta 50° C y se incorporan 10 ml de TTC al 1%, se agita y se verte en cajas petri estériles.

TECNICA DE GRAM

La técnica de Gram se basa en una reacción de los colorantes con la pared celular de las bacterias, que determina qué tanto retienen o pierden el colorante.

Los pasos a seguir son:

Hacer un frotis de cada microorganismo por analizar y fijarlo con calor, pasándola tres veces sobre el mechero.

Cubrir la preparación con cristal violeta y dejarlo actuar por 1 minuto.

Al término del tiempo se escurre el exceso y se enjuaga con agua destilada; se agrega lugol, se deja actuar 1 minuto.

Enseguida se lava con agua y se decolora con una solución de alcohol-acetona.

Posteriormente, se cubre con safranina y se deja actuar por 1 minuto. Al final se lava con agua destilada y se deja secar.

Finalmente se observa al microscopio con el objetivo 100x.

ANEXO 2

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS CONFIRMATIVAS

Preparación de Agar Sangre

Extracto de corazón 10 g, triptona 10 g, NaCl 5 g, agar-agar 15 g, sangre de carnero fresca 50 ml

Disolver todos los ingredientes y esterilizar en autoclave, dejar enfriar a 50°C e incorporar la sangre desfibrinada (concentración final 5%) y verter en cajas petri estériles.

Sembrar las placas en la superficie e incubar a 37°C durante 24-48 h.

Preparación de agar nutritivo

Disolver 20 g de agar nutritivo (SiGMA) por litro de agua. Esterilizar en autoclave a 121°C a 15lb durante 15 min. Dejar enfriar a 40°C y verter en cajas petri estériles.

Preparación de agar KF (estreptocócico de Kenner)

Agar KF 76.4 g (DIFCO), agua destilada 1000 ml. Calentar el agua destilada esteril (en condiciones asépticas) y disolver el agar KF completamente, cuidando que no se queme. No esterilizar en autoclave. Dejar que se enfríe a aproximadamente 38°C y verter en cajas petri estériles.

Medio BHI para prueba de NaCl 6.5%

Caldo BHI 25 g (BIOXON), NaCl 60 g, indicador púrpura de bromocresol 1 ml (1.6 g en 100 ml de etanol 95%), agua 1000 ml.

Añadir reactivos hasta completar 1000 ml. Distribuirse en tubos de rosca y esterilizar 15 minutos a 121° C y 15 lb.

Preparación del medio para fermentación de hidratos de carbono

Caldo básico rojo de fenol 15g (BIOXON), agua destilada 1000 ml. Mezclar los ingredientes y esterilizar en autoclave a 120°C, 15 lb, 15 min. dejar enfriar.

Los hidratos de carbono utilizados fueron: lactosa, manitol, arabinosa, sacarosa, sorbitol. Se preparó una solución al 10% de cada uno de ellos y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 lb durante 3 min.

En condiciones estériles, se agregaron alícuotas de las soluciones de hidratos de carbono al caldo base rojo de fenol, de manera que la concentración final de los hidratos de carbono fuera al 1%.

Preparación del medio para la prueba de Voges Proskauer

Disolver 15 g de caldo RMVP (OXOID) en 1000 ml de agua destilada, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras durante 15 minutos.

Preparación de la leche con azul de metileno

Leche descremada 100 g

Agua destilada 1000 ml

Calentar hasta disolución y agregar el indicador azul de metileno en concentración de 1% (10 g/ litro). Colocar 10 ml en tubos de rosca y esterilizar en autoclave a 113-115°C a una presión de 8 a 10 lb/pl² por 20 minutos, refrigerar para su concentración.

Preparación del medio de gelatina

Caldo nutritivo 8 g (BIOXON), gelatina bacteriológica 120 g, agua destilada 1000 ml.

Agregar la gelatina al agua hasta hidratar. Calentar hasta que hierva y agregar el caldo nutritivo en polvo, volver a calentar hasta ebullición. Esterilizar a 121°C, 15 lb/pl² durante 15 minutos.

ANEXO 3

MEDIOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Medio Luria

NaCl 5 g, triptona 10 g, extracto de levadura 5 g. Disolver en 1000 ml de agua destilada, se agita y se esteriliza en autoclave a 121° C, 15 lb/pl² por 15 minutos.

Medio para antibióticos

Agar para antibióticos 30.5 g (BIOXON), agua destilada 1000 ml. Mezcla los ingredientes y calentar suavemente hasta disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb/pl² durante 15 min.