



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE ENTEROCOCOS MULTIRRESISTENTES  
A ANTIBIÓTICOS AISLADOS DE CARNE DE POLLO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**OSWALDO JAVIER PÉREZ ANGUIANO**



**MÉXICO, D.F**

**2006**



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	Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Q.F.B. María del Pilar Granada Macías
Secretaria	Q.F.B Aurora Irma Ortegón Avila
1er suplente	Q.F.B. Ruth Edith Martin Fuentes
2º suplente	Q.F.B Luciano Hernández Gómez

Desarrollado en la Facultad de Química, Edificio A, Departamento de Biología, 1er piso, en el laboratorio 1D anexo. U.N.A.M.

---

Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova  
Asesora del tema

---

Oswaldo Javier Pérez Anguiano  
Sustentante

# DEDICATORIA

***A mis padres y hermano***

*por quienes he sido, soy y llegaré a ser.*

***A Faustino y Guadalupe, q.e.p. d***

*Cerca de mi, lejos de mi olvido.*

***A mi tía Nena***

## **Agradecimientos**

Es probable que alguien conozca con buen entendimiento el significado de las palabras que en breve dejaré escritas sobre esta pulpa de celulosa. La garganta se cierra, los ojos se nublan, mis dedos se vuelven torpes pues los sentimientos de alegría y satisfacción son inmensos. Llegó uno de los momentos esperados por aquel niño que deseaba algún día ser grande y también llegó el tiempo de agradecer a quienes me condujeron a lograr un objetivo.

Gracias a la Univesidad Nacional que me otorgó todo por nada, que me acerco a la ciencia y también al arte y la cultura de mi país. Motivo de orgullo, bien por ser de piel morena y sangre azteca, bien por pertenecer a la mejor Universidad que existe sobre toda América Latina e Iberoamérica. Deuda infinta, como lo es también mi gratitud hacia ella.

Gracias a los amigos que me han acompañado en cada etapa de mi vida y a los que se han quedado en el camino. Gracias por compartir conmigo inmerecidamente su tiempo. Para ustedes todo mi cariño y respeto.

Gracias a la Dra. Biserka Sveshtarova que además de ser mi asesora de tesis, fue un ejemplo de excelencia académica para mi. Gracias por la paciencia, por el apoyo y por su comprensión. Para usted todo mi agradecimiento y cariño por los años compartidos.

Por último, gracias a la vida que me fue otorgada y con ella el don de la sensibilidad que me ha sido brindado. Gracias por los momentos de lucidez que me han llevado a reconocer en mi a la persona que busqué por mucho tiempo y no encontraba. Gracias al amor de la gente que me rodea y que me ha nutrido en tiempos de franca necesidad de ser cuidado, protegido y amado.

# CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	
2.1 El género <i>Enterococcus</i>	14
2.2 Consumo de pollo en México	25
2.3 Resistencia a antibióticos	33
2.4. Promotores de crecimiento	56
2.5 Técnica de PCR	63
3. METODOLOGÍA	
3.1 Diagrama de flujo	68
3.2 Muestreo	69
3.3 Aislamiento de los enterococos	70
3.4 Identificación de los enterococos	71
3.5 Determinación de la resistencia de los enterococos a los antibióticos	78
3.6 Extracción de ADN total	79
3.7 Amplificación del ADN y detección de integrones de clase 1	81
3.8 Conservación de cepas	83
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84

5. CONCLUSIONES	132
6. REFERENCIAS	134
7. ANEXO	142

# 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antibióticos consiste en la capacidad de las poblaciones bacterianas para sobrevivir al efecto de las concentraciones inhibitorias de los agentes antimicrobianos.

Hoy en día, la aparición de bacterias de interés médico resistentes a antibióticos representa una amenaza a la salud pública. Cada vez se reportan más casos de cepas multirresistentes en los hospitales, en donde la diseminación entre pacientes infectados con bacterias resistentes se encuentra, en la mayoría de los casos, fuera de control [Pliego y col., 2004; Schouten y col., 1999; Morfin y col., 1999]. A continuación se presenta una tabla que recopila la información sobre el descubrimiento de los principales agentes antimicrobianos, así como la aparición de la primera cepa resistente a tales antibiótico.

Tabla 1.1 Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos (Errecalde, 2004).

<b>DROGA</b>	<b>DESCUBRIMIENTO</b>	<b>USO CLÍNICO</b>	<b>RESISTENCIA CLÍNICA</b>
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956

Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Los enterococos, bacterias comensales de animales y humanos, pueden causar severas infecciones nosocomiales, al mismo tiempo que pueden presentar alto nivel de resistencia a múltiples antibióticos. Su amplia gama de plásmidos conjugativos permite el intercambio genético entre diversas especies bacterianas Gram positivas y negativas en el intestino animal. En los alimentos, ellos son considerados indicadores de malas condiciones sanitarias por contaminación fecal; a través de ellos, los enterococos pueden colonizar el intestino humano y transferir la resistencia a los antibióticos a los cuales ellos son resistentes pues está demostrada su capacidad de supervivencia al tracto gastrointestinal [Sorensen y col., 2001].

En México, se han publicado trabajos en los que se demuestra el aumento de cepas de enterococos multirresistentes aislados de pacientes, sobre todo de *Enterococcus faecium*. También se ha reportado el incremento en la resistencia a diversos antibióticos, sobre todo a penicilina y ampicilina y, en algunos casos, a glucopéptidos como la vancomicina [Morfin y col., 1999; Esparza y col., 1999]. En 1996, los japoneses reportaron el primer caso de *E. faecium* resistente a vancomicina, aislado de una paciente, enfocando en ese momento la atención a las razones por las cuales se presentó este hallazgo [Fujita y col., 1998]. Más tarde, en EUA, fue aprobada la combinación de quinupristina y dalfopristina para

el tratamiento de enterococos resistentes a vancomicina [Clifford y col., 2001]. Aunque los enterococos son microorganismos de gran interés por su capacidad de convertirse en portadores de genes de resistencia a antibióticos, no son los únicos microorganismos que atañen a la salud pública. Por ejemplo, en EUA y en general en todo el mundo, la emergencia de cepas resistentes a antibióticos de *Salmonella* y *Campylobacter* [Bonten y col., 2001] preocupa a los encargados de salvaguardar la salud pública.

La utilización de antibióticos como promotores de crecimiento en animales para el consumo humano es también objeto de preocupación entre los investigadores de la materia. En Estados Unidos, se estimó en 2001 que el cincuenta por ciento de todos los antibióticos producidos eran administrados a animales, en su mayoría con fines terapéuticos [Editorials en N Eng J Med 2001 No. 345, vol. 16]. La administración de antibióticos a animales tiene como consecuencia la presión selectiva entre las bacterias propias de la microflora animal, promoviendo la aparición de cepas resistentes. En Dinamarca, el uso de glucopéptidos como promotores de crecimiento puede explicar la presencia de enterococos resistentes a vancomicina, antibiótico usado en la terapia humana y el cual es un análogo de la avoparcina, usada en ese país como promotor de crecimiento años atrás y actualmente prohibida. [Wegener y col., 2003; Wheelock y col., 2003]. La aparición de bacterias resistentes a antibióticos repercute en la salud pública debido a su capacidad de transferir a través de conjugación la resistencia a los antibióticos a microorganismos patógenos. La preocupación más reciente es la movilización de integrones entre bacterias de diferentes géneros, los cuales pueden poseer genes

estructurales de resistencia a antibióticos [García, 2004]. Dichos integrones, sobre todos los integrones de clase 1, son frecuentemente encontrados en enterobacterias [Álvarez y col., 2003].

El riesgo de mantener la utilización de antibióticos como aditivos alimentarios de animales es latente. Hace algunos años se demostró que la utilización de antibióticos para uso en animales ejercía una presión de selección en *E. faecium*, el cual es un comensal humano y animal usado incluso en la manufactura de algunos alimentos. En diversos trabajos se han aislado cepas de esta bacteria, tanto de heces de animales y humanos, como de carne de venta al por menor. Este hecho propuso el peligroso papel para el comensal *E. faecium* de diseminar los genes de resistencia dentro y entre especies tanto animales como humanas [Pugh, 2002].

Los enterococos pueden transferir la resistencia a los antibióticos por medio de los alimentos a las bacterias de la microflora normal en humanos, incluyendo a las especies patógenas ya que, además de ser comensales humanos, se encuentran involucrados en procesos de manufactura de salsas fermentadas y quesos, como parte de la microflora que realiza la fermentación. Se han realizado estudios en donde se han aislado cepas de *Enterococcus faecalis* para determinar la presencia de genes que codifiquen resistencia a vancomicina localizados en plásmidos y se han logrado identificar tales elementos móviles en la microflora de fermentación de alimentos [Coconcelli y col., 2003]. Por otro lado, ya se ha detectado que la conjugación ocurre entre bacterias lácticas y enterococos

provenientes tanto de orígenes animal como humano. Al utilizarse cultivos resistentes a antibióticos para producir alimentos, las salsas fermentadas y quesos elaborados con leche bronca resultan altamente contaminados con bacterias multirresistentes a antibióticos [Teuber y col., 1999].

Hace un par de años, el uso de las bacteriocinas para conservar alimentos acaparó la atención de la comunidad de tecnólogos en alimentos, al parecer sustancias con efectos similares a los antibióticos, pero seguras y naturales. Dichas bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias lácticas cuyo blanco principal son cepas patógenas. [Cleveland y col., 2001]. En China, se utilizan micelios crudos de algunos hongos filamentosos como promotores de crecimiento en animales [Witte, 1999].

Dado que la utilización de promotores de crecimiento en México no se encuentra controlada, es posible esperar que los enterococos aislados de pollo alimentado con formulaciones que incluyen promotores de crecimiento análogos a antibióticos usados con fines terapéuticos en humanos, presenten resistencia a dichos antibióticos.

Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca al estudio de enterococos multirresistentes a antibióticos aislados de carne de pollo en la ciudad de México, realizando su aislamiento e identificación, para posteriormente detectar la presencia de integrones clase 1 en el ADN de las cepas multirresistentes, el cual

pueda ser relacionado como el elemento genético móvil que cause multirresistencia a los antibióticos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 EL GÉNERO ENTEROCOCCUS

El género *Enterococcus* fue propuesto por primera vez por Schleifer y Klipper-Bälz en 1984 para acomodar las especies de la serie D de Lancefield de los estreptococos fecales *Streptococcus faecalis* y *S. faecium*, ahora llamados *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*. Estudios quimiotaxonómicos han revelado que otras especies pueden ser asignadas a este nuevo grupo. Hoy en día existen más de 20 especies de enterococos clasificadas mediante estudios de homología de DNA-DNA, secuenciación de la subunidad 16S del rRNA, etc [Gilmore, 2002].

Los enterococos son bacterias Gram positivas que se encuentran en la mayoría de los casos en pares o en cadenas cortas. Pocas especies presentan pigmentación (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*) y otras presentan movilidad (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). El antígeno D no está confinado solamente a los enterococos. Algunas especies de estreptococos poseen este antígeno (*S. alactolyticus*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. suis*).

Tabla 2.1. Especies aceptadas del género *Enterococcus* [Gilmore, 2002].

<b>Especies</b>	Homología DNA-DNA
<i>E. faecalis</i>	Schleifer y Klipper-Bälz, 1984
<i>E. faecium</i>	Schleifer y Klipper-Bälz, 1984
<i>E. hirae</i>	Farrow and Collins, 1985
<i>E. durans</i>	Collins et al., 1984
<i>E. gallinarum</i>	Collins et al., 1984
<i>E. avium</i>	Collins et al., 1984
<i>E. mundtii</i>	Collins et al., 1986
<i>E. casseliflavus</i>	Collins et al., 1984
<i>E. malodoratus</i>	Collins et al., 1984
<i>E. pseudoavium</i>	Collins et al., 1989b
<i>E. solitarius</i>	Collins et al., 1989b
<i>E. raffinosus</i>	Collins et al., 1989b
<i>E. cecorum</i>	Williams et al., 1989
<i>E. columbae</i>	Devriese et al, 1990
<i>E. saccharolyticus</i>	Farrow et al, 1984
<i>E. dispar</i>	--
<i>E. sulfureus</i>	Collins et al, 1986
<i>E. asini</i>	Teixeira et al, 2001
<i>E. villorum</i>	Vancanneyt et al, 2001
<i>E. haemoperoxidus</i>	Svec et al, 2001
<i>E. moraviensis</i>	Svec et al 2001
<i>E. ratti</i>	Teixeira et al, 2001
<i>E. porcinus</i>	Teixeira et al, 2001
<i>E. pallens</i>	--
<i>E. gilvus</i>	--
<i>E. seriolicida</i>	Kasuda et al, 1991 Teixeira et al, 1996
<i>E. flavescens</i>	Pompei et al, 1992 Teixeira et al, 1997

### 2.1.1 Hábitat

Los enterococos forman parte de la microflora en los intestinos de humanos y otros animales como comensales. Existen ciertos microorganismos con hábitat específicos: *E. durans* fue encontrado en humanos y en aves, pero no ha sido encontrado en otras especies de granja; *E. gallinarum* se encuentra en aves pero *E. avium* es a menudo encontrado en mamíferos. Aunque las dos últimas especies fueron inicialmente asociadas con aves, hoy en día parece extraño encontrarlas en aves de corral. *E. faecium* es el enterococo que se encuentra más frecuentemente en pollos sanos y en cerdos [Devriese, 1992].

En humanos, *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más frecuentes. En países como Inglaterra y Estados Unidos, *E. faecalis* tiende a ser la especie predominante en los intestinos humanos, pero en otros países como Japón y Uganda, la incidencia de *E. faecium* es igual o más grande que la de *E. faecalis*. Esto hace pensar que la dieta influye notablemente en la predominancia de ciertas especies.

Los enterococos son los microorganismos más predominantes de la microflora de los intestinos en los primeros 2-3 días de vida en varios animales. Posteriormente disminuye su proporción hasta niveles muy bajos después de dos o más semanas.

Estudios realizados demuestran la asociación de *E. faecalis* y *E. faecium* con plantas, especialmente las especies pigmentadas, las cuales son raras de

encontrar en intestinos de mamíferos. Las cepas relacionadas con plantas e insectos digieren de forma más activa almidón que las cepas de mamíferos. En climas moderados, los enterococos desaparecen de su hábitat durante el invierno debido a las bajas temperaturas y reaparecen en primavera. Los insectos juegan un papel fundamental en la reaparición estacional de los enterococos en plantas. En México, cuyo clima es tropical y en donde los inviernos no son tan crudos como en otros países, es de esperar que las poblaciones de enterococos en plantas nunca desaparezcan.

### **2.1.2 Aislamiento, cultivo y conservación**

Los enterococos son microorganismos quimioorganótrofos y sus complejos requerimientos nutricionales son satisfechos normalmente usando un medio con peptona o productos similares. Pueden ser cultivados para diversos fines en medios ricos como la infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés). La mayoría de las cepas de *E. cecorum* requieren > 3% de CO<sub>2</sub> en la atmósfera para su crecimiento.

La habilidad de los enterococos de crecer bajo condiciones adversas es usada ampliamente como factor de selección y de diferenciación de estas bacterias de los estreptococos. Los enterococos son resistentes o relativamente insensibles a muchos antibióticos activos contra Gram positivos, como las tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfonamidas, varias penicilinas y las lincosamidas.

Hay más de 60 medios selectivos, pero la mayoría permiten el crecimiento de ciertos estreptococos. Los medios selectivos más comúnmente comercializados promueven el crecimiento de enterococos y de *Streptococcus bovis*, lo cual representa de entrada una confusión [Rufo, 1992].

La azida de sodio es el componente más comúnmente utilizado como agente selectivo. También pueden ser usados como agentes selectivos: sales biliares, acetato de talio, etil violeta, cristal violeta, telurito de potasio, tiocianato de potasio, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), kanamicina, ácido nalixídico, ácido oxolónico, polimixina o colistina. Estos agentes son útiles; sin embargo, son menos selectivos que la azida de sodio [Devriese, 1992].

La mayoría de los medios contienen entre 0.2 y 0.5% de azida de sodio; el caldo SJ de Hajna y Perry (1943); BAGG (Buffer de glicerol azida glucosa) de Hajna (1951), caldo EVA (azida etil violeta) de Litsky (1963); caldo KF de Kenner (1961), medio selectivo de Levin (1975) con TTC y cicloheximida para uso con agua de mar y el agar M2 de Rutkowsky y Sjorgen (1987) con TTC y ácido nalixídico para uso en el control de calidad de agua potable.

La resistencia a 20 mcg/mL de kanamicina, un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos, en combinación con azida de sodio, puede ser una combinación útil para el aislamiento. Mossel y col. han descrito un caldo y agar con azida y esculina para ser usados como medios de enriquecimiento y para aislamiento:

### **Caldo kanamicina esculina**

Triptona	20g/L
Extracto de levadura	5g/L
Cloruro de sodio	5g/L
Citrato de sodio	1g/L
Esculina	1g/L
Citrato férrico de amonio	0.5g/L
Azida de sodio	0.15g/L
Sulfato de kanamicina	0.02g/L

Los medios tales como SF y KF, que contienen 0.04 a 0.05% de azida de sodio, inhiben regularmente *S. bovis* mientras permiten el crecimiento de enterococos. El caldo y agar KF se describen en el Anexo I.

Las cepas de enterococos son normalmente conservadas por liofilización. Pueden mantenerse también durante 2 años a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un medio liofilizado, utilizando caldo nutritivo, suero de caballo inactivo y glucosa.

### 2.1.3 Identificación

Con excepción de *E. cecorum*, todas las especies de enterococos poseen el antígeno D de Lancefield, y la reacción del grupo D es, por lo tanto, muy útil como prueba presuntiva. Algunas especies como *E. avium* y *E. raffinosus* dan una reacción débil o negativa. Pero lo que hay que considerar aún con más cuidado es que existen otras especies las cuales son Grupo D positivas, sin ser enterococos [Devriese, 1992].

El crecimiento en presencia de 6.5% de NaCl es una de las mejores pruebas de identificación del género *Enterococcus*, aunque *E. cecorum* y algunas cepas de *E. avium* no crecen a esta concentración. Una reacción positiva con pirrolidoniil arilamidasa es también característica de los enterococos, con excepción de *E. cecorum*, el cual es negativo, junto con la mayoría de los estreptococos. El crecimiento y la hidrólisis de la esculina en presencia de 40% de bilis puede también ser usado. Todos los enterococos son positivos ante esta prueba; no obstante, *S. bovis* y algunas cepas de *S. suis* reaccionan de manera similar. Otras pruebas que generalmente son buenos indicadores para el reconocimiento de enterococos incluyen el crecimiento a 10°C y a pH 9.6 y la supervivencia cuando son calentados a 60°C durante 30 min. Los lactococos pueden ser diferenciados por su antígeno del grupo N de los estreptococos y las bacterias del género *Leuonostoc spp* (estreptococos lácticos), por su resistencia a vancomicina, por la producción de gas a partir de glucosa y por una reacción negativa con pirrolidoniil arilamidasa [Gilmore, 2002].

Por otro lado, Vanderzant recomienda para el aislamiento de enterococos de productos lácteos, un medio más selectivo o una incubación a una mayor temperatura (45°C) son el fin de inhibir el crecimiento de lactobacilos y estreptococos lácticos [Vanderzant, 1992].

Los enterococos normalmente son considerados como microorganismos anaerobios facultativos, teniendo preferencia por condiciones anaerobias. No son capaces de sintetizar porfirinas, por lo tanto no pueden sintetizar citocromos, los cuales participan en el transporte de electrones en la cadena respiratoria de los microorganismos cuyo metabolismo es oxidativo (microorganismos aerobios) [Gilmore, 2002].

#### **2.1.4 Patogenicidad**

Antes del problema de la resistencia a antibióticos, los enterococos eran considerados microorganismos inofensivos. Hoy en día, son comúnmente relacionados con infecciones en pacientes hospitalizados [Kayser, 2003]. Algunas de ellas son:

Infecciones urinarias. Los cultivos urinarios son las fuentes más comunes de aislamiento de enterococos, ya que infectan catéteres. Aunque no son los únicos causantes de infecciones urinarias, si son parte de la microflora que se encuentra presente.

Bacteremias. Después de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, que son los microorganismos predominantes en bacteremias, los enterococos ocupan el 6-7% del total de las bacterias aisladas de sangre. Los enterococos ingresan al torrente sanguíneo a través del tracto urinario, por infecciones intrabdominales, por heridas de piel quemada, a través de heridas en los pies de los diabéticos o catéteres intramusculares.

Infecciones intrabdominales y pélvicas. Los enterococos son parte de la microflora relacionada a infecciones intrabdominales y pélvicas, aunque su papel aún es dudoso. La eliminación de los microorganismos causantes de infección a través de antibióticos no erradica la presencia de los enterococos pues éstos son resistentes a una gran cantidad de antimicrobianos.

Endocarditis. Los enterococos son los responsables en un 5-15% de los casos de endocarditis infectiva. Las fuentes más comunes de contagio son a través del portal genitourinario y biliar.

*E. faecalis* es la especie más común que causa infecciones en humanos. El microorganismo ha sido aislado de varios órganos de los sistemas del hombre, excepto de aquellos del sistema respiratorio.

*E. faecalis* ha sido caracterizada genéticamente. Existe un interés especial en esta especie dado que contiene plásmidos y que, al menos, algunos de ellos pueden ser transferidos por medio de conjugación a otras bacterias.

### **2.1.5 Los enterococos como microorganismos indicadores**

Los enterococos son comúnmente monitoreados como indicadores de contaminación fecal en purificación de agua y en algunos alimentos. Los enterococos sobreviven más que *E. coli* y otras enterobacterias en el agua, lo cual los hace buenos indicadores de posible contaminación fecal en agua e indicadores de malas condiciones sanitarias.

La carne y los productos cárnicos son contaminados principalmente con enterococos en las plantas empacadoras más que en los establecimientos de venta al por menor. *E faecalis* es quien predomina en la carne de res y de cerdo, mientras que *E faecium* y *E. durans* se encuentran con mayor frecuencia en carne procesada.

## 2.2 CONSUMO DE POLLO EN MÉXICO

Desde 1997, el pollo es la carne más consumida por el mexicano y actualmente ocupa el 50% del consumo total de carnes en el país [UNA, 2006]. El consumo *per capita* de pollo en 1994 fue de 16.8kg; para 2006 se observó un incremento del 53% ubicándose el consumo en 25.0kg por persona (figura 2.1) y colocando al mexicano en el sexto lugar mundial en consumo *per capita* de pollo (figura 2.2).

Las razones de este suceso son, entre otras:

- Más puntos de venta
- Mayor confianza en la carne de pollo (frescura)
- Incremento en el número de restaurantes de comida rápida
- Producto de alta calidad a precio accesible. Actualmente, el precio promedio del pollo entero en México es de \$19.75.
- Tendencias en el consumo de carnes bajas en grasa
- Carne con diferentes variedades en su preparación.

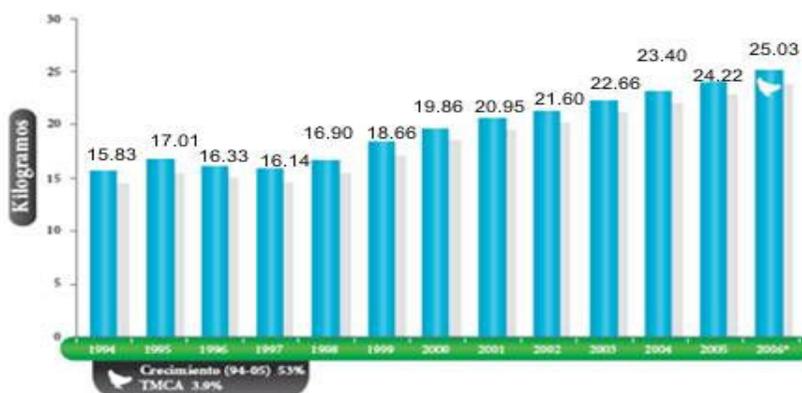
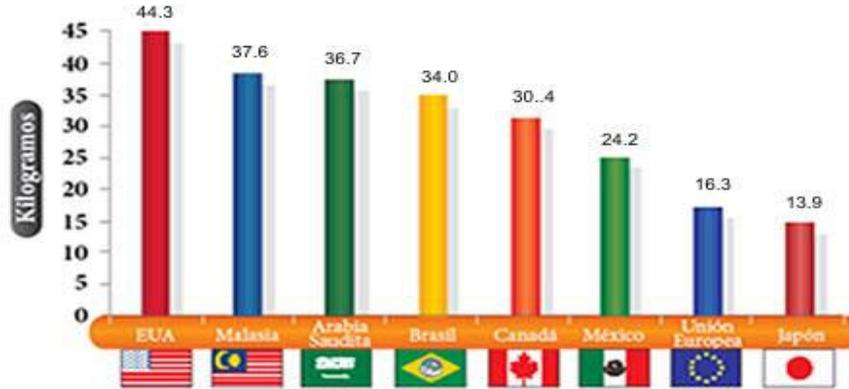


Figura 2.1 Consumo de carne de pollo en México *per capita* en el periodo 1994-2006



**Figura 2.2 Principales consumidores mundiales de carne de pollo**

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en producción de carne de pollo (figura 2.3) [UNA, 2006]. La producción mundial está creciendo 6.0% anualmente debido al crecimiento de algunos mercados específicos, como es el caso de China (10%), Brasil (9%) y México (5.6%). China es el segundo productor de carne de pollo en el mundo pero no se ubica dentro de los principales consumidores. En 2005, se produjeron 2.5 millones de toneladas de carne de pollo en el país [Juárez, 2006].

El sector avícola mexicano participa con el 63.2% de la producción pecuaria; el 33% lo aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo. Se tiene reportado que en 2006 la industria avícola ha dado trabajo a 1,072,000 mexicanos; el 60% de estos empleos los generó la rama avícola del pollo.[Juárez, 2006]

En México existen 130 millones de gallinas ponedoras con las cuales se producen

243 millones de pollos por ciclo, en comparación con los 845 mil pavos por ciclo que se producen en el país [Juárez, 2006].

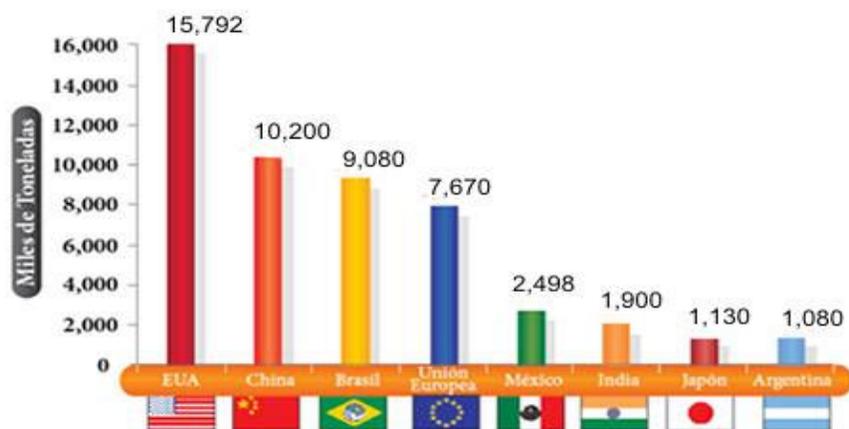


Figura 2.3. Principales productores mundiales de carne de pollo

A lo largo de las últimas dos décadas, la producción de pollo ha aumentado paulatinamente y se tiene pronosticado que seguirá en aumento. En el periodo 1994-2005 la producción ha aumentado 5.5% anualmente. [Gallardo, 2006]

En 2005, el 90% de la producción estaba concentrada en 10 estados de la República Mexicana, sobre todo en estados del centro del país, en donde a su vez están los grandes centros urbanos, en donde se consume en mayor proporción la carne de pollo. En este mismo rubro, 6 estados concentran el 51% de la producción, los cuales son: Veracruz, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco y la comarca lagunera (Durango y Coahuila). La tabla 2.2 contiene la información del

crecimiento medio anual de producción de pollo en el periodo 1980-2002 para los estados con mayor producción en el país.



Figura 2.4 Distribución geográfica de la producción de carne de pollo.

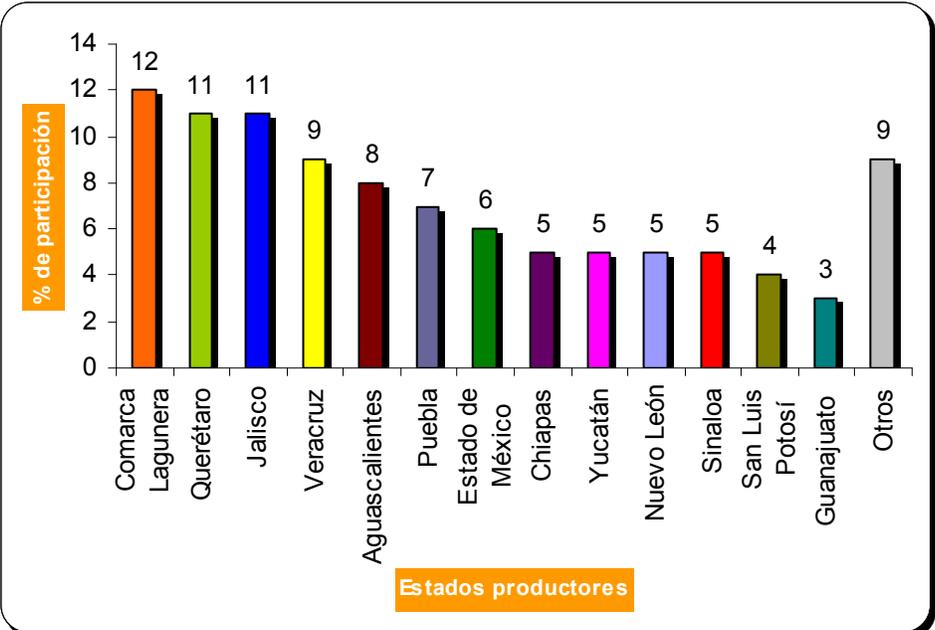


Figura 2.5 Estados de la República Mexicana con la mayor producción de pollo para carne

**Tabla 2.2. Tasa media de crecimiento anual de los Estados más productivos en carne de pollo en México**

<b>Estado de la república</b>	<b>tasa de crecimiento medio anual (tcma,%)</b>
Aguascalientes	17.89
Durango	13.97
Sinaloa	13.11
Coahuila	11.95
Yucatán	11.49
Puebla	9.08
Veracruz	8.90
Querétaro	7.95
Guanajuato	7.81
Jalisco	7.49
Nuevo León	6.92
Estado de México	5.92

La carne de pollo en México se comercializa principalmente como canal. En la tabla 2 se encuentra la información sobre las formas disponibles de la carne de pollo:

**Tabla 2.3 Formas de consumo en México de la carne de pollo**

<b>Forma de comercialización</b>	<b>%</b>
Vivo	28%
Rostizado	26%
Mercados públicos	25%
Supermercados	7%
Partes	10%
Productos de valor agregado	4%

Acerca de las importaciones, México recibe carne de pollo de EUA y de Chile. En 2005, el 93% del pollo importado provino de EUA y el 7% restante de Chile. El principal producto importado es la pierna y muslo. De Chile se importaron cortes de Pechuga congelados [UNA, 2006].

En otro tema relacionado, México es el principal consumidor de huevo en el mundo, con 21.7kg per capita, seguido de China con 21.11kg y Japón con 19.6kg. [UNA, 2006].

En México, existen tres tipos de sistemas de producción de carne de pollo: el tecnificado (70% del aporte de carne de pollo), semitecnificado (20%) y el rural o de traspatio (10% restante). La diferencia entre el sistema tecnificado con respecto a los otros dos consiste en la tecnología de punta que se usa en el primero y de la cual carecen los dos últimos. Los sistemas tecnificados cuentan con la infraestructura para alimentar a sus aves a un costo menor por tener precios

especiales dada la cantidad de insumos que requieren y además de procesar la carne para ofrecer productos que pueden consumirse directamente. Por otro lado, las empresas que cuentan con este tipo de sistemas proveen la mayor parte del pollo para engorda. Los sistemas semitecnificados y de traspatio se enfocan al abastecimiento de micro regiones y no cuentan con alto prestigio en salubridad y productividad. [Juárez, 2006].

En 2001, tres empresas tuvieron el control del 52% de la producción de carne de pollo en el país [Juárez, 2006]:

- Bachoco, con 350 millones de aves
- Pilgrim's pride, con 155 millones de aves
- Tyson Inc., con 85 millones de aves

En ese mismo año, el 34% de la producción se distribuyó en 33 empresas medianas y el 14% restante en 161 empresas pequeñas.

#### Alimentación del pollo

En 2003, el 74% de las materia primas que se usaron para la alimentación del pollo provinieron del campo, mientras que el 26% restante correspondió a otros ingredientes [Gallardo, 2006]. En la siguiente tabla se presentan los principales productos agrícolas que se consumen por la industria de insumos del pollo, así como el lugar y la temporada de cosecha de los mismos.

Tabla 2.4 Productos agrícolas usados como alimento de ganado en México

Producto agrícola	PRINCIPALES estados que producen	temporada de cosecha
Sorgo	Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco, Sinaloa, Michoacán, Morelos, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Nayarit	Junio-Agosto y Octubre-Diciembre
Pasta de soya	Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Chihuahua	Septiembre- Noviembre
Pasta de algodón	Sonora, Durango, Coahuila, Sinaloa, Baja California, Michoacán, Tamaulipas.	Julio-Diciembre
Cártamo	Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Coahuila, Durango, Jalisco y Baja California	Abril-Junio
Ajonjolí	Guerrero, Michoacán, Sonora, Sinaloa	Julio-Octubre

Además de la producción nacional de materias primas para alimento, México importa de Estados Unidos y Canadá formulaciones balanceadas que incluyen a los anteriores cereales y oleaginosas, además de compuestos inorgánicos como fosfato de calcio, carbonato de sodio, algunos aminoácidos esenciales como metionina, grasa animal o vegetal, entre otros ingredientes.

### 2.3 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Las compañías productoras de antibióticos comenzaron a producir penicilina a gran escala en 1943 y su impacto en las enfermedades infecciosas fue dramático. La Segunda Guerra Mundial fue la causante de la necesidad de tales cantidades de penicilina para tratar a los heridos de guerra [Gustafson, 1997]. Desde entonces, la diseminación de resistencia a este antibiótico comenzó. Algunos datos indicaron que en 1998, Inglaterra presentó un 30% de casos de infecciones causados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, comparado con un 2% en 1994 [Ting, 2000].

Los antibióticos han sido ampliamente usados para el tratamiento de infecciones bacterianas. Desde la utilización de la penicilina y durante los inicios de su comercialización, ya se observaba que algunos microorganismos no eran “eliminados” por el antibiótico [Errecalde, 2004].

Los antibióticos no sólo son usados como promotores de crecimiento o con fines terapéuticos, también han sido utilizados para preservar alimentos, como en el pescado, donde se utilizan antibióticos de amplio espectro como las tetraciclinas [Hersom, 2003].

### **2.3.1 Tipos de resistencia**

Los microorganismos pueden presentar resistencia adquirida ó intrínseca a los antibióticos. La resistencia adquirida ocurre cuando surgen cepas resistentes a partir de otras cepas anteriormente sensibles, usualmente después de haber sido expuestas a un antibiótico. El término de resistencia intrínseca se refiere a los mecanismos que la misma célula, como organismo, realiza con el objetivo de prevenir la acción de los antibióticos. La resistencia intrínseca es usualmente expresada por genes cromosomales, mientras que la resistencia adquirida puede resultar en mutaciones en los genes cromosomales, o por adquisición de plásmidos, transposones o integrones; es decir, se trata de una resistencia a antibióticos transferible [Errecalde, 2004]. Por otro lado, la resistencia adquirida resulta esencialmente de la presión selectiva sobre las bacterias durante la administración de antibióticos con fines terapéuticos.

Ambos tipos de resistencia pueden complicar el tratamiento de las infecciones bacterianas. En primera instancia, muchas infecciones oportunistas son causadas por bacterias de resistencia intrínseca. Por otro lado, la emergencia y dispersión de resistencia adquirida entre bacterias de importancia médica ha tenido un profundo impacto en la salud pública en los últimos años.

### **2.3.2 Resistencia adquirida**

La resistencia adquirida puede ser determinada, como bien se mencionó, por los genes que residen en el cromosoma bacteriano o por plásmidos, transposones o integrones, los cuales son elementos genéticos móviles.

### **Resistencia determinada por genes cromosomales**

Es bien conocido que la resistencia a ciertos antibióticos puede ser adquirida por mutaciones cromosomales. Las mutaciones cromosomales pueden ser causadas por microlesiones, en donde sólo se altera el orden de un par de bases o por macrolesiones, en las cuales existen más cambios.

En principio, cada tipo de mutación cromosomal debe directa o indirectamente conferir resistencia a la célula.

No todas las resistencias a antibióticos codificadas por el cromosoma deben a una mutación. De hecho, la resistencia intrínseca de la mayoría de las bacterias Gram – negativas a antibióticos hidrofóbicos es debida a la expresión de genes involucrados en la síntesis y ensamblado de lipopolisacáridos en la membrana externa de la pared celular.

### **Resistencia generada por plásmidos**

Los plásmidos son porciones circulares de ADN bacteriano extracromosómico que usualmente contienen genes que codifican resistencia a antibióticos y que pueden llevar a cabo una replicación autónoma. Cuando codifican resistencias a antibióticos se les denomina plásmidos R. Los plásmidos se autorreplican, independientemente del ADN bacteriano. En general, codifican características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma. También puede pasar de una célula a otra por conjugación.

Los plásmidos circulares fueron descubiertos por primera vez en *Staphylococcus aureus* (Khan, 1997). La mayoría son relativamente pequeños, entre 1 y 10kb, poseen una estructura compacta y en el mayor de los casos sus genes de resistencia se transcriben en una sola dirección.

### **Clasificación de los Plásmidos**

a. Plásmidos Conjugativos. Los plásmidos conjugativos son aquellos que son mediadores del proceso de la conjugación. Estos plásmidos tienen todos los genes necesarios para una replicación autónoma y para la transferencia del DNA hacia una célula receptora (ej. genes para el pilus sexual).

b. Plásmidos no conjugativos. Los plásmidos no conjugativos son aquellos que no pueden mediar el proceso de la conjugación. Estos son plásmidos usualmente más pequeños que los plásmidos conjugativos y carecen de uno o más de los

genes necesarios para la transferencia del DNA. Un plásmido no-conjugativo puede transferirse por conjugación si la célula también alberga a un plásmido conjugativo.

### **Efectos en el fenotipo**

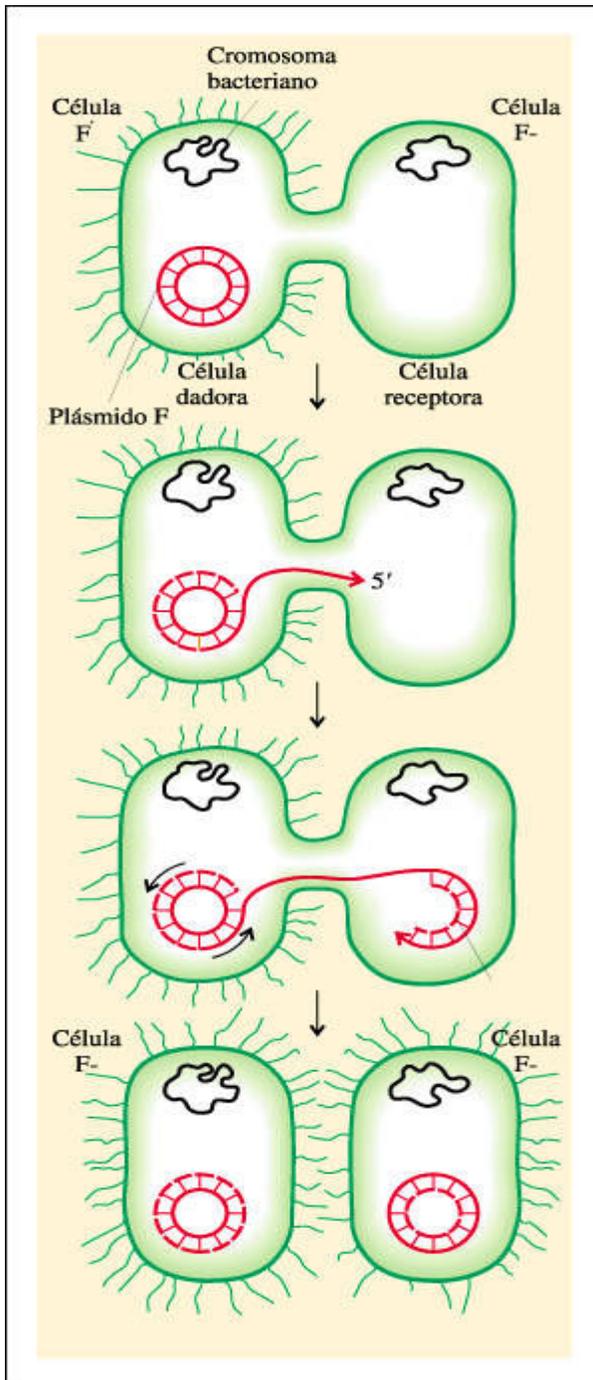
a. Plásmido de Fertilidad (factor F)

b. Plásmidos Bacteriocinogénicos - Estos plásmidos poseen genes que codifican para sustancias que matan a otras bacterias. Dichas sustancias se llaman bacteriocinas o colicinas.

c. Plásmidos de Resistencia (factores R) – Estos plásmidos acarrean genes de resistencia a los antibióticos

El factor F (de fertilidad) es un plásmido presente en las células F<sup>+</sup> donadoras ( y puede ser transferido a las células F<sup>-</sup> receptoras; estas células pueden transformarse en F<sup>+</sup> y transferir, a su vez, el factor F. Cuando el factor F se integra al cromosoma de una célula se convierte en una célula Hfr (de alta frecuencia recombinatoria) parte del cromosoma o, en raras ocasiones, todo el cromosoma puede ser transferido a otra célula por conjugación. La rapidez a la cual los genes bacterianos entran en la célula receptora es constante a una temperatura dada, por lo tanto la separación a intervalos regulares de las células que se

conjugan permite realizar un estudio de la composición genética del cromosoma bacteriano.



**Figura 2.6** Transferencia de un plásmido F de una célula F<sup>+</sup> a una célula F<sup>-</sup>, por medio de la conjugación. Mecanismo mediante el cual una célula F<sup>-</sup> (sin plásmido) adquiere el factor F para convertirse en célula F<sup>+</sup>. (tomado de <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/cha>)

## **Resistencia generada por transposones**

Los transposones son segmentos de DNA , los cuales pueden moverse desde un sitio en una molécula de DNA a otro sitio blanco en la misma cadena o en una diferente. El proceso se denomina transposición y ocurre por un mecanismo independiente de la recombinación generalizada, de esta manera los transposones tienen la capacidad de migrar del cromosoma bacteriano al plásmido, en uno u otro sentido, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos. A diferencia de los plásmidos, los genes del transposón no son autorreplicantes, deben mantenerse dentro de una estructura autorreplicante para hacerlo. Un rasgo central y peligroso de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a varios antibióticos, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite, por transferencia de éste último, la adquisición de multiresistencia por parte de la bacteria receptora (Salyers y col., 1995).

Los transposones contienen en sus secuencias finales, pequeñas regiones que en algunos transposones particulares, son casi idénticas. Estas regiones, o repeticiones, como son llamadas, pueden estar en la misma dirección con respecto a cada extremo del transposón (repeticiones directas) o más comúnmente, en la dirección opuesta (repeticiones invertidas). Las terminaciones repetidas se cree sirven como secuencias de reconocimiento para las enzimas de transposición (transposasas) en su papel de fusionar los extremos de los transposones con el DNA receptor.

La mayoría de los transposones comparten rasgos en común. Todo transposón codifica las funciones necesarias para su transposición, incluyendo una enzima transposasa que interactúa con secuencias específicas en los extremos del transposón. Durante el evento de transposición, una corta secuencia de ADN es duplicada, y el transposón se inserta entre las secuencias repetidas directas. El tamaño de esta corta secuencia es variable y es característica de cada transposón. Algunos transposones pueden insertarse en casi cualquier secuencia blanco, mientras que otros son altamente específicos. (Salyers y col., 1995).

### **Resistencia adquirida por integrones**

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio específica se acumula una combinación de genes estructurales. [García, 2004].

Los genes estructurales presentes en los integrones son, mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales de escindirse en forma de círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente.

Cada día se acumulan más datos que indican que los integrones son ubicuos, sobre todo en plásmidos o cromosomas de bacterias Gram – negativas, pero también se han descrito en Gram –positivos, y quizá el hallazgo más sorprendente

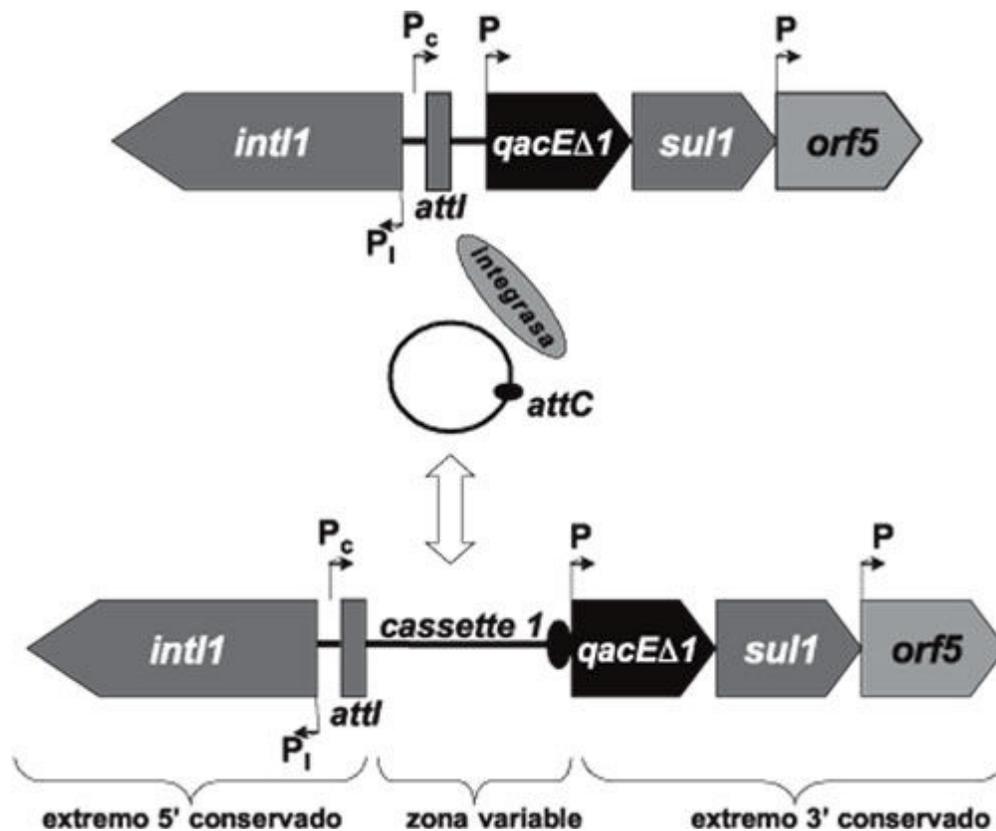
fue hallar un integrón cromosómico en el cromosoma de una cepa de *Mycobacterium fortuitum* (García, 2004).

Para la actividad de los integrones se requiere un gen que codifica una recombinasa sitio específica, la integrasa. Esta enzima cataliza la recombinación sitio específica entre dos secuencias cortas de ADN que pueden ser de dos clases: attI o attC, que son los sitios primarios de reconocimiento de la integrasa.

En la actualidad se habla hasta de cuatro tipos de integrones, que se distinguen por la integrasa que codifican. Sin embargo, puesto que los más comunes son los integrones del tipo I, son los que más importancia tienen en materia de resistencia adquirida a antibióticos.

Estructuralmente puede hablarse de tres regiones en un integrón (figura 2.8): una región constante 5' que contiene básicamente el gen de la integrasa que se transcribe de derecha a izquierda. En el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales situados a la derecha. A continuación se encuentra una región central variable que aloja a los genes estructurales del integrón, casi siempre genes de resistencia a antibióticos, en número variable. Las regiones constante 5' y central variable están separadas por la secuencia attC, uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes constitutivos en la región central están separados unos de otros por secuencias attI. Una de las características de esta

región es su compacidad genética. Las regiones no codificantes suelen ser siempre muy cortas, generalmente menos de 10pb. De este modo es posible la organización de todos los genes en una sola unidad transcripcional controlada por el promotor presente en la región constante 5', aunque las regiones attC intergénicas pueden actuar como terminadores parciales de la transcripción. Dependiendo de los genes presentes en la región central se ha propuesto una nomenclatura para los integrones In0, In1, In2. No obstante, la enorme diversidad hace este sistema poco práctico.



**Figura 2.8 Estructura de un integrón.** Los integrones están constituidos por dos regiones de DNA muy conservadas, situadas a los extremos, llamadas 5'CS y 3'CS. Entre estas dos zonas pueden insertarse uno o más genes de resistencia a antibióticos. La secuencia attI separa la región 5'CS de la región central de genes estructurales. (González, G. Y col., 2004).

Se han asociado a los integrones de la clase 1 con la resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en enterobacterias. Estudios realizados por Alvarez y col con 123 cepas demuestran la presencia de integrones en el 20.3% de ellas. Los integrones formaban parte de plásmidos conjugativos, lo cual es preocupante dada la posible contribución de este hallazgo en la diseminación de resistencia a antimicrobianos entre diferentes poblaciones bacterianas (Alvarez, 2003).

### **2.3.3 Resistencia intrínseca**

Los mecanismos de resistencia a antibióticos son variables. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son:

- Pared celular
- Membrana bacteriana
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos

La resistencia antimicrobiana, en términos bioquímicos, puede deberse [Gale, 1981] a:

1. Modificación del blanco enzimático en la célula, así se vuelve insensible al inhibidor y puede llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales.
2. Reducción de la importancia fisiológica del blanco enzimático
3. Duplicación del blanco enzimático, siendo la segunda versión resistente al antibiótico.
4. Síntesis de enzimas capaces de inactivar al antibiótico.

En la siguiente tabla se presentan a los antibióticos más comunes y sus sitios de acción dentro de las bacterias, así como su clasificación y un resumen de su espectro. Del mismo modo, en la figura 1 se observa una esquematización de los sitios de acción específicos de algunos antibióticos dentro de la estructura celular bacteriana [Errecalde, 2004].

Tabla 2.5. Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, su modo de acción y espectros simplificados.

Grupo	Miembros	Modo de acción	Espectro
Beta lactámicos: Penicilinas	Penicilina G	Inhiben síntesis de pared	Bacterias Gram positivas
	Penicilina V	Inhiben síntesis de pared	Idem
	Ampicilina	Inhiben síntesis de pared	Gram positivas y Gram negativas
	Carbenilicina	Inhiben síntesis de pared	P. aeruginosa

Beta lactámicos: cefalosporinas	Cefloridina	Inhiben síntesis de pared	Gram positivas y Gram negativas
	Cefalexina	Inhiben síntesis de pared	Idem agregando actividad contra estafilococos productores de penicilinas
	Cefuroxima	Inhiben síntesis de pared	Idem pero con menos actividad a Gram + frente a Gram -
	Moxalactam	Inhiben síntesis de pared	Gram + y enterobacterias
	Ceftiofur	Inhiben síntesis de pared	Idem
	Cefoperazona	Inhiben síntesis de pared	P. aeruginosa
	Cefepima	Inhiben síntesis de pared	Estafilococos y enterobacterias
Beta lactámicos: inhibidores de beta lactamasa	Ácido clavulánico	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Germen productores de beta lactamasa
	Sulbactam	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Idem
	Tazobactam	Se une a la beta	Idem

		lactamasa inactivándola	
Beta lactámicos: Carbapenems	Imipenem- cilastina	Inhiben síntesis de pared	Gram + y Gram - aerobios y anaerobios
Beta lactámicos: monobactams	Aztreonam	Inhiben síntesis de pared	Gram - aerobios
Aminoglucósidos	estreptomicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 30S ribosomal	Bacterias Gram -
	Kanamicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 30S ribosomal	Idem
	Neomicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 30S ribosomal	Idem
	Gentamicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 30S ribosomal	Idem
Aminociltoles	Espectinomicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 30S ribosomal	Gram - y micoplasmas
Lincosamidas	Lincomicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 50S ribosomal	Bacterias Gram +, anaerobios y micoplasmas
	Clindamicina	Inhiben síntesis	Idem

		proteica en la porción 50S ribosomal	
	Pirlimicina	Inhiben síntesis proteica en la porción 50S ribosomal	Idem
Rifamicinas	Rifampicina	Inhibe ARN polimerasa	Gram +
Péptidos	Polimixina B	Desorganizan membrana	P. aeruginosa
	Colistín	Desorganizan membrana	Idem
Glucopéptidos	Vamcomicina	Inhiben síntesis de pared	Gram + y Gram -
	Teicoplanina	Inhiben síntesis de pared	Idem
	Avoparcina	Inhiben síntesis de pared	Idem
Estreptograminas	Virginamicina	Inhiben peptidil transferasa	Gram + y aerobias
Macrólidos	Eritromicina	Inhiben síntesis proteica en la región 50S ribosomal	Gram + y Gram -
	Oleandomicina	Inhiben síntesis proteica en la región 50S ribosomal	Idem

	Tilosina	Inhiben síntesis proteica en la región 50S ribosomal	Idem
	Espiramicina	Inhiben síntesis proteica en la región 50S ribosomal	Idem
	Tilmicosina	Inhiben síntesis proteica en la región 50S ribosomal	Idem
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhiben síntesis proteica en la porción 50S ribosomal	Gram + y Gram -, rickettsias y clamidias
	Tianfenicol	Inhiben síntesis proteica en la porción 50S ribosomal	Idem
	Florfenicol	Inhiben síntesis proteica en la porción 50S ribosomal	Idem
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Inhiben síntesis proteica región 30S	Gram + y Gram -, rickettsias y clamidias y algunos protozoarios
	Doxiciclina	Inhiben síntesis proteica región 30S	Idem
	Minociclina	Inhiben síntesis	Idem

		proteica región 30S	
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Interfieren síntesis de ácido fólico	Gram +, Gram - y coccidios
	Sulfadiazina	Inhiben síntesis proteica región 30S	Idem
	Sulfatiazol	Inhiben síntesis proteica región 30S	Idem
	Ftalilsulfatiazol	Inhiben síntesis proteica región 30S	Idem
Diaminopirimidinas	Trimetopima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias Gram + y Gram - aerobias.
	Baquiloprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Idem
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Inhiben ADN girasa	Gram + y Gram -
	Danofloxacina	Inhiben ADN girasa	Idem
	marbofloxacina	Inhiben ADN girasa	Idem
	Sarafloxacina	Inhiben ADN girasa	Idem
Ionóforos	Monensina	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
	Salinomicina	Alteran flujo de membrana	Idem
Nitrofuranos	Nitrofurazona	Previenen traducción	Gram + y Gram -

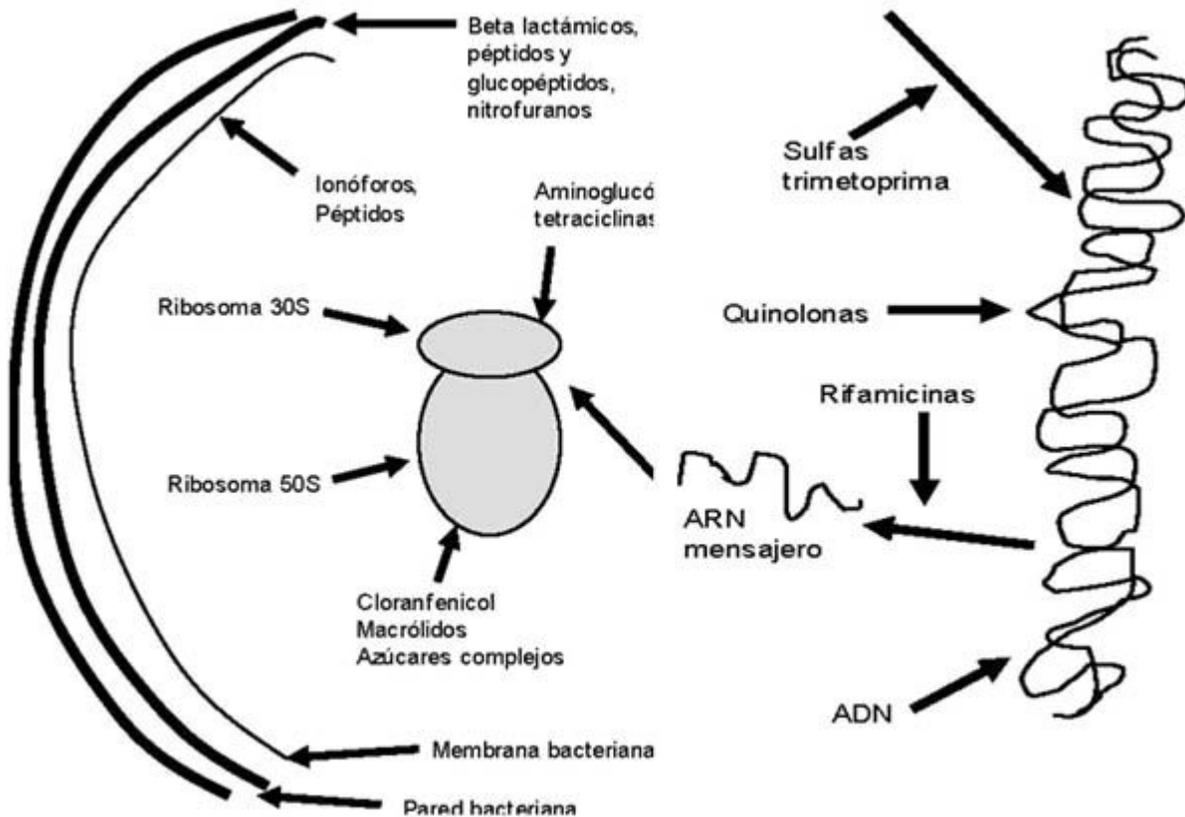
		del ARN mensajero	
	Furazolidona	Previenen traducción del ARN mensajero	Idem
Nitroimidazoles	Metronidazol	Disrupción del ADN	Anaerobios
	Dimetridazol	Disrupción del ADN	Idem

### **2.3.4 La resistencia a antibióticos de los enterococos**

Los enterococos presentan resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos. Dicha resistencia está mediada por genes localizados en el cromosoma. Esto ha limitado siempre la elección de agentes antimicrobianos contra estos microorganismos en ambientes nosocomiales. La prevalencia de los enterococos en el mundo como microorganismos patógenos ha aumentado, por lo tanto se han utilizado con más frecuencia antibióticos en los hospitales para combatirlos. Los mismos agentes antimicrobianos han sido usados ampliamente como promotores de crecimiento en animales de granja. De esta manera los enterococos han adquirido resistencia a través de genes localizados en plásmidos o transposones de otros microorganismos o por mutaciones espontáneas que incrementan el nivel de resistencia a los antibióticos.

Algunos ejemplos de resistencia intrínseca a antibióticos incluye la resistencia a cefalosporinas, beta lactámicos, sulfonamidas y bajos niveles de clindamicina y aminoglucósidos, mientras que ejemplos de resistencia adquirida incluyen la

resistencia a cloranfenicol, eritromicina, altos niveles de clindamicina y aminoglucósidos, tetraciclinas y altos niveles de resistencia a betalactámicos, fluoroquinolonas y glucopéptidos como vancomicina [Franz y col. 2003; Klare y col., 2003] .



**Figura 2.9 Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles. (Errecalde, 2004).**

### Resistencia a antibióticos b-lactámicos

Los enterococos poseen una resistencia natural intrínseca a antibióticos beta lactámicos que es debida a la baja afinidad de sus proteínas de unión a penicilina

(PBP's *penicillin-binding proteins*) para los antibióticos beta lactámicos. Esta resistencia intrínseca difiere entre antibióticos de la misma familia, en donde las penicilinas generalmente tienen la mayor actividad inhibitoria contra enterococos, los carbapenems teniendo una actividad ligeramente menor y las cefalosporinas siendo las que menos efecto tienen sobre ellos.

Entre las penicilinas, la ampicilina es el antibiótico que ejerce mayor efecto contra enterococos *in vitro*. La resistencia intrínseca de los enterococos a las cefalosporinas se encuentra a un nivel tal que es poco efectivo el tratamiento de pacientes infectados con enterococos patógenos con esta clase de antibióticos.

#### Resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos interfieren con la síntesis de proteínas al unirse a la fracción 16S rRNA de la subunidad 20S del ribosoma. Los enterococos poseen un bajo nivel de resistencia intrínseca a estos antibióticos porque la membrana celular limita su transporte hacia el citoplasma. Los aminoglucósidos por si solos no son efectivos contra infecciones de enterococos, pero cuando se emplean en sinergia con antibióticos cuyo blanco es la pared celular, estos incrementan considerablemente su ingreso a la célula. De esta manera, los enterococos pueden evitar este efecto sinérgico adquiriendo genes que codifiquen enzimas que modifiquen los aminoglucósidos. Algunas enzimas de este tipo son las fosfotransferasas, acetiltransferasas o nucleotidiltransferasa.

## Resistencia a glucopéptidos

La vancomicina y la teicoplanina son usadas para tratar infecciones serias debidas a microorganismos Gram positivos. En 1986, se reportaron las primeras cepas de *E.faecium* resistente a vancomicina: algunas en pacientes franceses con leucemia y otras de pacientes ingleses con falla renal (Leclercq y col., 1988; Uttley y col., 1988) Desde entonces la resistencia a glucopéptidos en enterococos se ha diseminado en el mundo.

Los glucopéptidos actúan en Gram positivos inhibiendo la síntesis de la pared celular y son inofensivos hacia Gram negativos debido a la membrana externa que poseen y que bloquea a los glucopéptidos e impide que alcancen su sitio de acción. Los glucopéptidos forman complejos en la superficie exterior de la membrana con el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina que poseen los pentapéptidos precursores de los peptidoglucanos, involucrando la formación de 5 puentes de hidrógeno y el subsecuente bloqueo de pasos tales como la transglucolización y transpeptidización en la biosíntesis de la pared celular.

Los enterococos obtienen la resistencia a estos antibióticos mediante la adquisición de genes que codifican enzimas que modifican el blanco de los glucopéptidos, mediante un cambio en la composición de la porción final D-Ala-D-Ala del pentapéptido precursor en un diferente aminoácido, por ejemplo D-alanina-D-lactato o D-alanina-D-serina (Gilmore, 2002).

## Resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptograminas

El mecanismo de resistencia adquirida más común entre enterococos a los antibióticos macrólidos es la producción de una enzima que metila un residuo de adenina en la porción 23S de la subunidad 50S ribosomal. Esto provoca una unión de baja afinidad con el ribosoma a no solo la eritromicina y a los demás macrólidos, sino también a la lincosamida y a las estreptograminas, inhibiendo la síntesis de proteínas,

## Resistencia a cloranfenicol

La alta prevalencia de enterococos multirresistentes a antibióticos en muchos hospitales ha llevado a la utilización del cloranfenicol como un agente terapéutico alternativo. Sin embargo, algunos enterococos son resistentes al cloranfenicol. En la mayoría de los enterococos, la resistencia al cloranfenicol es debida a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (*CAT Chloranphenicol acetyltransferase*). La enzima CAT acetila un grupo hidroxilo en la molécula del cloranfenicol, dando como resultado un compuesto que no puede enlazarse al ribosoma bacteriano.

## Resistencia a tetraciclina

La resistencia a la tetraciclina está presente en al menos 60 ó 65% de los aislamientos de enterococos en hospitales aún cuando estos antibióticos no son necesariamente usados para combatir infecciones por estas bacterias [Gilmore,

2002]. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas al interferir con el enlace del aminoacil-tRNA al ribosoma. Hay dos tipos de resistencia principales de los enterococos a estos antibióticos: a) el flujo hacia el exterior del antibiótico a través de la membrana bacteriana y b) la protección ribosomal. Los genes tet(K) y tet (L) codifican para proteínas de gran tamaño con 14 regiones transmembranales que causan la resistencia a través de transporte activo de las tetraciclinas hacia fuera del citoplasma. [Bentorcha, F y col.,1991]. El gen tet(L) es el más común en enterococos y puede localizarse en plásmidos conjugativos o en el cromosoma.

#### Resistencia a quinolonas

La primer quinolona ampliamente utilizada en hospitales fue la ciproloxacina, la cual fue desarrollada para el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos Gram negativos. La actividad de este antibiótico contra enterococos es moderada y la resistencia a quinolonas es común entre enterococos.

Las quinolonas inhiben a las bacterias al interactuar con topoisomerasas tipo II de la DNA girasa y con la topoisomerasa IV la cual es esencial para la replicación del DNA.

## 2.4 PROMOTORES DE CRECIMIENTO

En producción animal los antimicrobianos se pueden utilizar con dos finalidades distintas: finalidad terapéutica y como agentes promotores del crecimiento, actividad conocida desde los años cincuenta que se debe a una compleja y no totalmente descrita conjunción de hechos que tienen lugar en el intestino cuando se administran por vía oral pequeñas cantidades de antimicrobianos.

Los antibióticos han sido utilizados como promotores de crecimiento para animales destinados al consumo humano en Estados Unidos y Europa por más de cincuenta años. Entre los antibióticos más usados se encuentran algunos muy relacionados o idénticos a los usados en terapia humana, incluyendo penicilinas, tetraciclinas, cefalosporinas (incluso las de tercera generación), fluoroquinolonas, avoparcina (relacionado a vancomicina) y virginiamicina (una estreptogramina relacionada a quinupristina/dalfopristina).

Durante la década pasada, muchas bacterias causantes de enfermedades en humanos, desarrollaron resistencia a diferentes antibióticos comúnmente utilizados para su tratamiento, entre estas se pueden mencionar las mycobacterias, pneumococos y enterobacterias (Tabla 2.6), por citar a algunos. Entre los microorganismos patógenos más afectados por la diseminación de resistencia a antibióticos se encuentran los siguientes [Witte, 1999]:

Tabla 2.6. Principales microorganismos causantes de enfermedad en hospitales afectados por la adquisición de resistencia a antibióticos.

MICROORGANISMO	ENFERMEDAD QUE CAUSA
Microorganismos de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	Son bacterias entéricas normales en la flora humana, incluyendo a <i>E.coli</i> y patógenos que causan infecciones en el tracto urinario, infecciones en heridas, septicemia, etc. Algunos patógenos relacionados son <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> que causan toxiinfección en alimentos y especies de <i>E.coli</i> que producen enterotoxinas
Mycobacterias	Incluye a las bacterias que causan tuberculosis. Otras bacterias tienen repercusión en pacientes con VIH
Neumococos	La principal causa de adquisición de neumonía
Estafilococos	Ampliamente distribuidos en humanos, Patógenos condicionales en hospitales
Enterococos	Comensales de la flora intestinal Patógenos en pacientes inmunocomprometidos
<i>Camphylobacter coli</i> , <i>Camphylobacter jejuni</i>	Bacterias intestinales de animales, causan infección y diarrea en humanos

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales para consumo humano selecciona cepas resistentes a tales antibióticos y promueve su persistencia en el ambiente [Gorbach, 2001; Christaki y col., 1997]. El mecanismo de acción de los antibióticos sobre el crecimiento de animales de engorda está relacionado a la acción que estos tienen sobre la microflora del intestino de los animales. Algunas teorías afirman que algunos microorganismos causantes de infecciones suaves pero no reconocidas son inhibidos, además se reduce la producción de toxinas por microorganismos indeseables al mismo tiempo que se favorece la producción de vitaminas y otros metabolitos necesarios para el crecimiento; por otro lado, se incrementa la eficiencia de absorción de nutrientes debido a que la pared intestinal se vuelve más delgada a consecuencia de la eliminación de la población bacteriana que reduce la superficie de contacto entre el alimento y las células del intestino [Cheeke, 1999].

En la actualidad, algunos países solamente han normalizado la utilización de antibióticos con fines profilácticos en animales para consumo humano, tal es el caso de Dinamarca [Wheelock, 2003], quien en 1995 prohibió el uso de avoparcina como promotor del crecimiento de cerdos. Las implicaciones que éstos tienen en la adquisición de resistencia a antibióticos por parte de la microflora animal es más que evidente. Han sido reportados ya muchos casos en donde la interrelación en el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y la resistencia a antibióticos es clara [Pugh, 2002; Refsdal, 2000, ; Wegener y col. 1999]. Suecia y Noruega ya prohíben el uso de antibióticos en animales. En

general, los países escandinavos tienen restringido el acceso a antibióticos de uso animal a las farmacias y los veterinarios no tienen permitido vender antibióticos a los granjeros, sino es por causa de enfermedad en los animales [Refsdal, 2000].

El cincuenta por ciento de todos los antibióticos producidos en los EUA son administrados a animales, en su mayoría con fines subterapéuticos [Gorbach, 2001].

El uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento incrementa el peso corporal de los animales en un 4 o 5% en comparación con los controles, hecho ya estudiado por investigadores de la materia [ Chistaki y col., 1997 ]. La vancomicina y la avoparcina tienen el mismo modo de acción, por lo tanto la resistencia a uno pueden conferir resistencia al otro. Además de los hospitales, la producción animal constituye un segundo reservorio de uso intensivo de resistencia transferible a los mismos. Suecia ha prohibido el uso de agentes antibacterianos como promotores de crecimiento desde 1986 y demostró que las modificaciones en el manejo de los animales pueden disminuir el uso de los antibióticos.

Por razones fundamentalmente políticas y sociales, muy especialmente relacionadas con la incorporación a la Comunidad Europea de los países nórdicos, a partir de 1995 se empezaron a establecer fuertes restricciones a esta forma de uso de los antimicrobianos, quedando en la actualidad una exigua relación de

cuatro moléculas (avilamicina, salinomycin, flavofosfolipol y monensina) cuya suspensión está anunciada para 2006.

Desde el punto de vista de la sanidad animal el uso terapéutico de antimicrobianos sigue siendo una herramienta irremplazable para combatir distintas infecciones, tanto en los animales de abasto como en los de compañía, pero, lamentablemente no existe información cuantitativa fidedigna, ni del gobierno ni de la Industria, sobre las cantidades empleadas, no ya por especies animales sino incluso a nivel general.

Puesto que los antimicrobianos autorizados para uso terapéutico en animales pertenecen a las mismas familias que los autorizados para uso humano (aunque bien es verdad que por razones fundamentalmente relacionadas con su costo, son en su mayoría los miembros más antiguos de cada una de ellas) su empleo conlleva un riesgo de selección de resistencias que eventualmente pudieran pasar al ámbito humano.

La precaución fue el principio que condujo a tomar medidas para proteger la salud pública, aún cuando no existían datos científicos que relacionaran directamente los problemas de resistencia a los antimicrobianos en la esfera humana con el uso de antimicrobianos en animales. En la actualidad, ya se tienen tales evidencias. (Wegener, 2003).

En cualquier caso es evidente que existe una responsabilidad social cuando se usan antimicrobianos debido a que junto a su efecto benéfico (curación de individuos enfermos) se deben de considerar los potenciales efectos deletéreos, entre los que se incluyen no sólo los que hemos mencionado, sino también los debidos a toxicidad, hipersensibilidad y efecto general de inhibición de las bacterias comensales del tracto intestinal.

La ruta que enlaza, a través de una larga cadena, el uso de antimicrobianos en animales (ya sea terapéutico o de promoción del crecimiento) con el desenlace fatal (la muerte de una persona debido a una infección por una bacteria que no responde a ningún tratamiento antibiótico) es posible, pero nunca ha sido cuantificada su cuota de responsabilidad, ya que no es ni la única ni la más directa forma de llegar a dicho desenlace. La presión selectiva ejercida con el tratamiento antibiótico en personas, especialmente en los hospitales, es considerablemente mayor y más directa, por lo que cabe atribuirle la mayor parte de la responsabilidad.

El uso de antibióticos en alimentos para animales ha sido ampliamente debatido en numerosos foros internacionales (Ginebra, Copenhague, Berlín, Paris) auspiciados por organizaciones supranacionales (OMS, OIE), en los que siempre se ha llegado a las mismas conclusiones: conocer y vigilar los niveles de

resistencia y de consumo en ambos lados (humano y animal), potenciar la aplicación de los principios de uso prudente (en su sentido de uso responsable) y realizar estudios de análisis de riesgo

La vigilancia global de los niveles de resistencia de las bacterias presentes en los animales la inició Dinamarca en 1995 (programa DANMAP), seguida de España en 1997 (Red VAV) y por Suecia (SVARM 2000). Además también existe una iniciativa en Estados Unidos promovida conjuntamente por FDA/USDA/CDC,

Los antibióticos deben ser usados sólo para tratar animales infectados por patógenos y además deben de ser prescritos por un veterinario. El uso de algunos antibióticos que también son usados en humanos, como las fluoroquinolonas o las cefalosporinas de tercera generación, deben de ser prohibidas en animales. El uso subterapéutico o profiláctico debe prohibirse para así disminuir la incidencia de cepas resistentes a tales antibióticos, proveyendo así menor permanencia en el ambiente y beneficios a la salud, tanto animal como humana.

En la actualidad, ya se estudian alternativas para sustituir el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento, tal es el caso del efecto de extractos herbales de chile, canela y orégano en cerdos como promotores de crecimiento [Romero],

debido a que la tendencia general en el mundo es prohibir el uso de todos los antibióticos en las dietas animales.

## **2.5 TÉCNICA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE INTEGRONES DE CLASE 1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es un proceso por el cual una secuencia específica de ADN se puede seleccionar y amplificar *in vitro* obteniendo así múltiples copias a partir de la original (Palomares y col., 1992).

La PCR es el método más versátil de amplificación de ADN y ha tomado un lugar relevante en los laboratorios de microbiología como un complemento de las pruebas de cultivo y de serología.

El principio de la PCR está basado en la síntesis de ADN por una polimerasa termoestable, comúnmente la *Taq* polimerasa obtenida de la arqueobacteria *Thermus aquaticus*, microorganismos extremadamente termófilo cuyas enzimas son estables a altas temperaturas. Para esta síntesis, la polimerasa requiere de un fragmento de ADN monocatenario que sirva de molde y sobre el cual se colocarán los nuevos desoxinucleótidos. Necesita asimismo un fragmento de ADN bicatenario en uno de los extremos del molde y que sirva como punto de iniciación

de la síntesis. Para amplificar una secuencia concreta, será necesario conocer las secuencias de nucleótidos de ambos extremos. Para ello, se pueden sintetizar dos pequeños fragmentos de ADN monocatenario (oligonucleótidos iniciadores) de alrededor de 20 bases de longitud (Woodford y col., 1998) que son complementarios a cada uno de los extremos y que hibridarán con los fragmentos del ADN molde

Los oligonucleótidos se sintetizan siempre en parejas para que cada uno hibride con la cadena del ADN molde opuesta a la que hibrida el otro y en el extremo contrario (extremos 5' y 3') y que servirá como punto de partida para la síntesis de la cadena complementaria. Por lo tanto, la síntesis consiste en la extensión o elongación del iniciador y ocurre en ambas direcciones 3' y 5' desde un iniciador al otro.

El diseño de los iniciadores (*primers* en inglés) es muy importante y debe de realizarse con cuidado. Los iniciadores necesitan no ser muy extensos para lograr así una amplificación efectiva. Así mismo, los iniciadores deberán ser específicos para evitar su interacción con otros fragmentos del ADN que tengan similitud al fragmento de interés y que pudieran producir amplificaciones inespecíficas. Cuando se conoce alguna secuencia de pares del blanco que deseamos amplificar, la selección de los iniciadores es sencilla y puede realizarse empíricamente o con la ayuda de programas de computadora (Woodford y col., 1998).

Los iniciadores deben de tener aproximadamente representados la misma proporción de las cuatro bases nitrogenadas y no deben contener secuencias complementarias para evitar que entre ellos se hibriden. Comúnmente se recomienda que los oligonucleótidos inicien con un par G-C porque ellos forman tres enlaces de hidrógeno con sus pares complementarias C-G (en la cadena molde de ADN) y esto provoca una estructura más estable que la formada por A-T (que solo posee 2 enlaces de hidrógeno).

La mezcla de reacción para la amplificación consta de los siguientes componentes:

- a) ADN con el fragmento que se desea amplificar
- b) Oligonucleótidos iniciadores
- c) Enzima termorresistente (Taq polimerasa)
- d) Desoxinucleótidos trifosfato
- e) Buffer de amplificación (KCl, Tris, MgCl<sub>2</sub>)

Los iones de magnesio funcionan como cofactores de la enzima.

La reacción es incubada a diferentes temperaturas en un mismo ciclo y es necesario que se realicen varios ciclos para lograr una mayor concentración del fragmento de interés (llamado amplicón). En síntesis, los pasos de la PCR son:

1. Desnaturalización del ADN. Se utiliza una temperatura cercana a 95°C para romper los enlaces de hidrógeno entre bases púricas y pirimídicas de los nucleótidos que componen el ADN bicatenario: de esta manera se obtienen dos hebras de ADN de una sola cadena.
2. Anillamiento: Se utiliza una temperatura de 50 a 62°C para permitir a los oligonucleótidos iniciadores detectar las secuencias complementarias en el ADN que acaba de ser desnaturalizado en el paso anterior.
3. Elongación o extensión: Usualmente se usa una temperatura cercana a los 72°C para permitir que la enzima termoestable sintetice el amplicón; es decir, que enlace uno a uno los desoxirribonucleótidos para complementar la doble cadena de ADN.

La observación del ADN amplificado puede realizarse en gel de electroforesis. Los geles de agarosa se utilizan para amplicones de gran tamaño (0.5 a 40 kilobases). Los geles de acrilamida ofrecen una alta resolución, mejor que la agarosa, por lo tanto se utiliza para análisis de amplicones específicos..

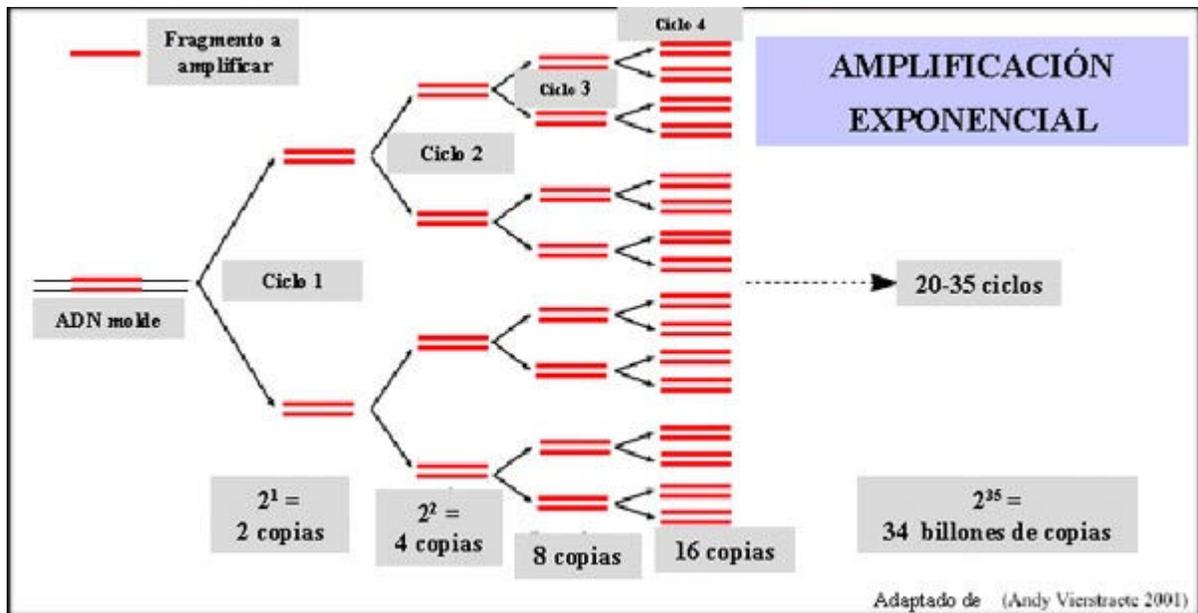


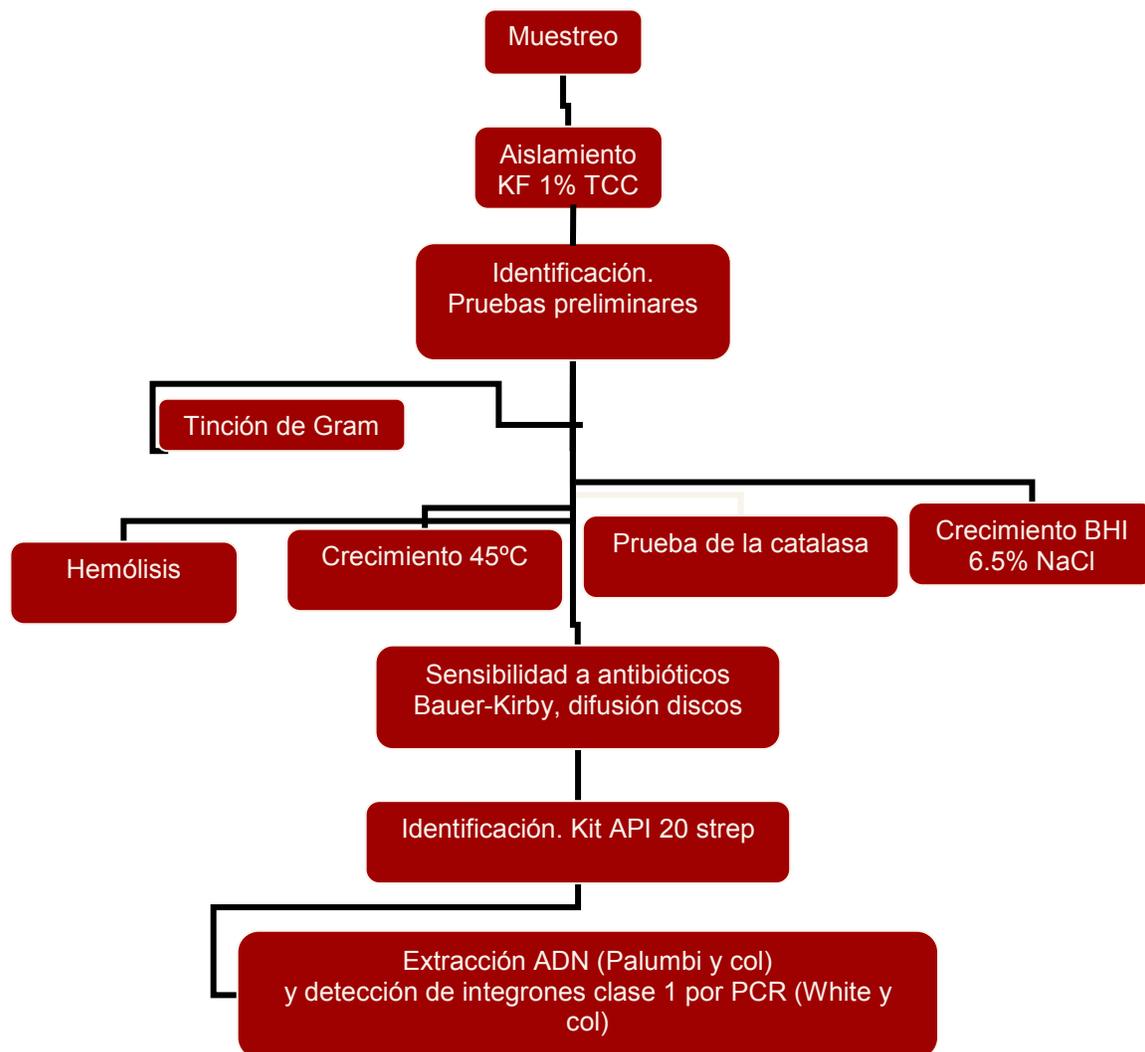
Figura 2.10 La amplificación del ADN deseado es exponencial. Por cada par de nuevo ADN sintetizado se sintetizarán en el siguiente ciclo  $2^n$  fragmentos de ADN nuevos.

El método más adecuado para la confirmación de la identidad del producto de la PCR es la determinación de la secuencia del amplicón; sin embargo, es considerado muy caro y laborioso para justificar su uso en el análisis del producto de la PCR y es utilizado exclusivamente para estudios específicos. Actualmente existen equipos automatizados para realizarlo.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 DIAGRAMA DE FLUJO

A continuación se presenta de manera general el diagrama de flujo de la metodología empleada en este estudio. Posteriormente se detalla el objetivo y sustento de cada una de las etapas de la investigación.



### 3.2 MUESTREO

Con el objetivo de obtener resultados representativos y confiables durante el estudio, las muestras de pollo se obtuvieron de tres diferentes distribuidoras en la ciudad de México, en los cuales el pollo, sacrificado y sin plumas,<sup>1</sup> llegaba directamente de los criaderos para ser distribuido a los establecimientos (supermercados, mercados, mercados sobre ruedas) o para ser vendido directamente a los consumidores, los cuales compran el pollo en el lugar en el cual los camiones descargan.

Las muestras de pollo estudiadas correspondieron a tres diferentes marcas comerciales:

- A. Pilgrim's pride, proveniente de Marqués del Río, Querétaro.
- B. Bachoco, proveniente de Celaya, Guanajuato.
- C. San Antonio, proveniente de Orizaba, Veracruz.

Todos los muestreos se realizaron sin excepción por las mañanas, cuando se descarga la mercancía, para evitar la posible utilización de desinfectantes por los vendedores. Las muestras se tomaron en bolsas estériles y se depositaron en un

---

<sup>1</sup> De acuerdo a las entrevistas realizadas a los conductores de los camiones que transportan el pollo y a los mismos vendedores de los establecimientos, el pollo antes de ser subido al interior de los camiones es lavado para eliminar residuos de material extraño, como tierra, e incluso sangre y plumas propias del pollo sacrificado.

contenedor aislado a temperatura baja para cada muestra para evitar cualquier posibilidad de contacto entre las muestras.

### **3.3 AISLAMIENTO DE LOS ENTEROCOCOS.**

El aislamiento de los enterococos se realizó mediante la técnica de cuenta en placa por vertido, utilizando el medio KF con 1% de cloruro trifeníl tetrazolio (CTT), en el cual las colonias de los enterococos son rojas y pequeñas [Hartman, 1992]. Se realizaron 4 diluciones decimales a partir de la dilución primaria, en donde se homogenizaron 10g de la muestra en 90mL de agua peptonada con la utilización de un digestor mecánico marca Stomacher .

Para determinar la cantidad total de mesófilos aerobios y la presencia de enterococos respectivamente, se inoculó 1mL de cada dilución en cajas Petri que contenían los medios KF y agar cuenta estándar (Fig 2).

Las cajas con el agar KF fueron incubadas a 45°C durante 48h para inhibir el crecimiento lactobacilos y estreptococos lácticos [Hartman, 1992], mientras que las de agar cuenta estándar se incubaron a 35°C por 24h. El conteo de UFC se realizó con la ayuda de un cuenta colonias.

Las colonias de los enterococos fueron extraídas del fondo del agar KF y resembradas en cajas con agar BHI para realizar las pruebas preliminares para la identificación de los enterococos.

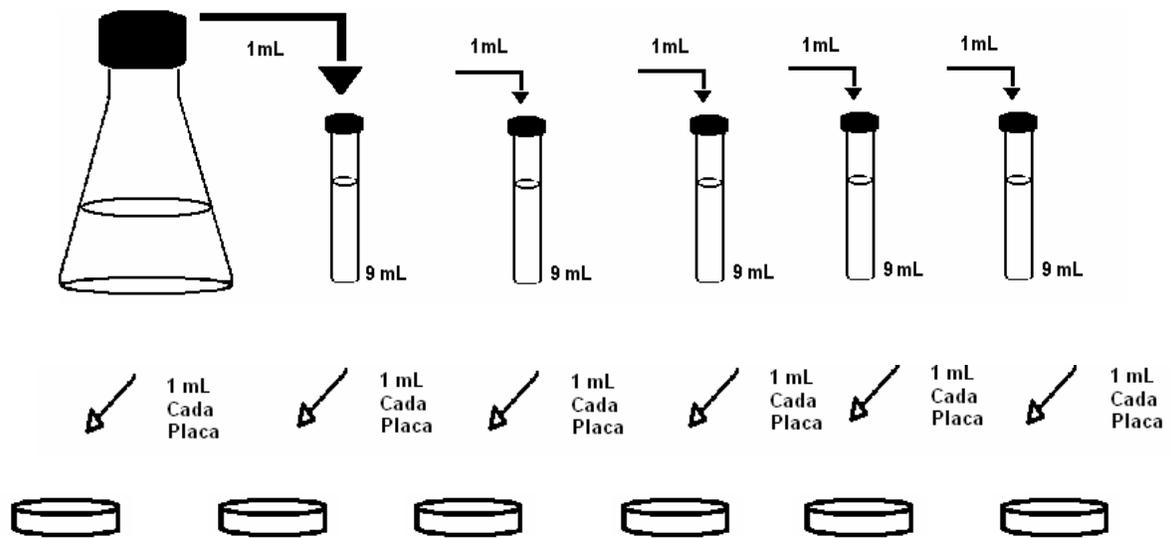


Figura 3.1. Esquema del aislamiento de los enterococos

### 3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS ENTEROCOCOS

La identificación de los enterococos se realizó mediante el uso de las pruebas preliminares y pruebas bioquímicas mediante el uso del kit API 20 strep (Biomèrieux).

Las pruebas preliminares incluyen:

Tinción de Gram

Prueba de la catalasa

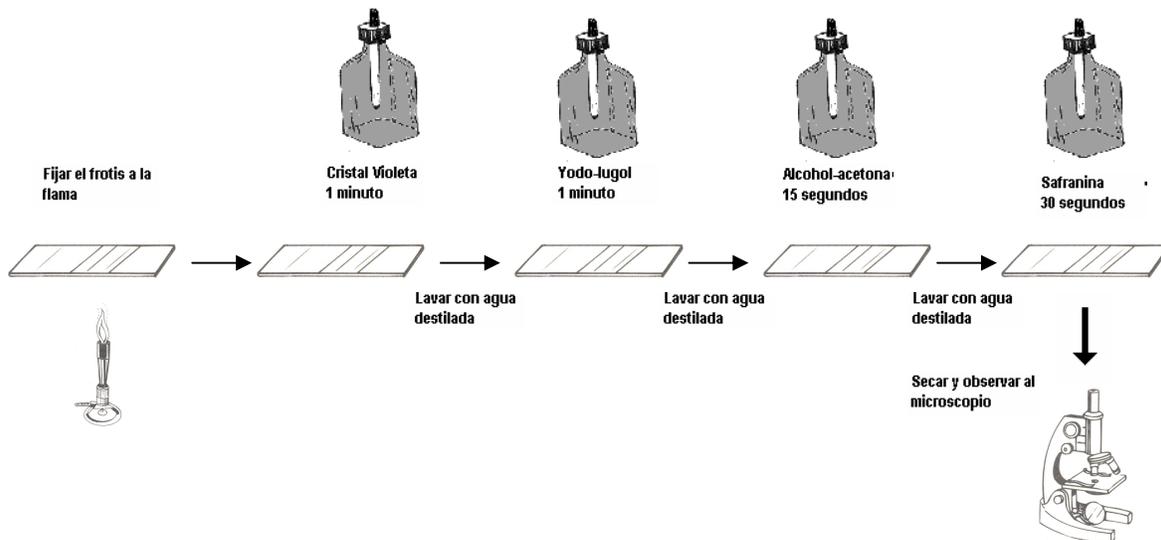
Crecimiento en BHI con 6.5% de NaCl

Prueba de hemólisis

A continuación una descripción de cada una de ellas

## Tinción de Gram

- a) Se realizó un frotis
- b) Se fijó a la flama
- c) Se tiñó con cristal violeta por 1 min
- d) Se lavó con agua destilada
- e) Se agregó lugol y se dejó reposar por un minuto
- f) Se lavó con solución de alcohol acetona y después con agua
- g) Se tiñó con safranina y se dejó reposar por 30 segundos
- h) Se lavó con agua, se dejó secar y se observó al microscopio



**Figura 3.2. Esquemización de la tinción de Gram**

### Crecimiento en caldo BHI con 6.5 % de NaCl

Las cepas a evaluar se inocularon en caldo BHI con 6.5% de NaCl e incubaron a 35°C durante 48h. Un resultado positivo se identificó por la presencia de turbidez y sedimento en el tubo.

### Prueba de la catalasa

Sobre un portaobjetos se colocó una asada de la colonia presuntiva y se añadió una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Los enterococos presentan reacción negativa para la catalasa. La presencia de la catalasa constituye una prueba de diferenciación entre el género *Enterococcus spp* y *Staphylococcus spp*. Las cepas que presentaron reacción negativa fueron conservadas para continuar con la identificación.

### Crecimiento en agar sangre

Los microorganismos seleccionados se inocularon en agar sangre mediante estría recta para detectar el tipo de hemólisis. Los enterococos son microorganismos no hemolíticos, por lo tanto, esta prueba sirvió para discriminar a los microorganismos aislados, eliminando a aquellos que presentaran hemólisis de cualquier tipo.

## **Identificación de los microorganismos seleccionados**

Las cepas que presentaron la mayor resistencia a los antibióticos probados (microorganismos resistentes a 12 y 11 antibióticos) se seleccionaron para ser identificadas mediante el kit API 20 strep de la marca Biomérieux .

La galería API 20 strep es un sistema estandarizado que asocia 20 ensayos bioquímicos de un gran poder discriminativo que permite realizar un diagnóstico de grupo o por especie de la mayoría de los estreptococos y enterococos. Cada galería se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares.

Los microtubos se inocularon con una suspensión densa (superior al tubo #4 de la escala de McFarland) realizada a partir de un cultivo puro. Las reacciones que se producen durante la incubación de las galerías a 35°C son observadas a través de cambios de color, espontáneo o revelado a través de la adición de reactivos.

### **Procedimiento**

1. Inocular los microorganismos en agar sangre.
2. Los microorganismos seleccionados se inocularon en agar BHi durante 24h a 35°C por agotamiento.

3. Con hisopo estéril se recuperó el crecimiento de cada caja y se resuspendió en 2mL de agua destilada estéril hasta obtener densidad equivalente al #4 de la escala de MCFarland.
4. Se distribuyeron uniformemente 5mL de agua destilada sin aditivos sobre los pocillos de la base de la cámara de incubación. Se rotularon las cámaras con la clave de identificación de la cepa.
5. Se Inoculó la primera mitad de la galería (desde el ensayo VP hasta el ADH) con la suspensión anterior (100 $\mu$ L aproximadamente).
6. Se transfirió el sobrante de la suspensión a una ampolleta de medio API GP médium y se homogeneizó bien. Se repartió esta nueva suspensión en los microtubos restantes de la galería (segunda mitad de los ensayos).
7. Se llenaron las cúpulas subrayadas de la galería con aceite de parafina estéril provocando un menisco convexo
8. Se cerró la cámara y se incubó a 35°C por 4 y 24h
9. Después de 4h de incubación, se añadieron los siguientes reactivos:
  - ensayo VP: 1gota de VP1 y otra de VP2
  - ensayo HIP: 2 gotas de NIN
  - ensayo PYRA,  $\alpha$ GAL,  $\beta$ GUR,  $\beta$ GAL, PAL y LAP : una gota de ZYM A y otra de ZYM B
10. Se realizaron dos lecturas. La primer lectura se realizó después de 10min de haber agregado los reactivos. La segunda, fue realizada a las 24h. Para ello, se debió remitir a la tabla de identificación provista por el kit, la cual se presenta a continuación:

**Tabla 3.1 Tabla de interpretación API 20STREP**

PRUEBA	Comp. Act	Reac/Enz	RESULTADOS			
			Negativo		Positivo	
VP	Piruvato sódico	Producción de acetona	VP1 + VP2 10min Incoloro		VP1 + VP2 10min Rosa-rojizo	
HIP	Ácido hipúrico	Hidrólisis ácido hipúrico	NIN 10 min Incoloro/Azul pálido		NIN 10 min Azúl violeta intenso/Violeta	
ESC	Esculina Citrato de hierro	Hidrólisis β- glucosidasa (esculina)	4h	24h	4h	24h
			Incoloro /Amarillo pálido	Incoloro /Amarillo pálido/ Gris claro	Negro gris	Negro
PYRA	Ácido piroglutámico -β-naftilamida	Pirolidonil Arlamidasa	ZIM A + ZIM B 10min (del PYRA al LAP)			
			Incoloro o naranja muy pálido		Naranja	
αGAL	6-bromo-2-naftil-αD- galactopiranosida	α-galactosidasa	Incoloro		Violeta	
βGUR	Ácido naftol-ASBI- glucorónico	βglucuronidasa	Incoloro		Azul	
βGAL	2-naftil-βD- galactopiranosida	β-galactosidasa	Incoloro o violeta muy pálido		Violeta	
PAL	2-naftil-fosfato	Fosfatasa	Incoloro o violeta		Violeta	

		alcalina	muy pálido			
LAP	L-leucina- βnaftilamida	Leucina aminopeptidasa	Incoloro		Naranja	
ADH	L-arginina	Arginina dihidrolasa	Amarillo		Rojo	
RIB	D-ribosa	Acidificación	4h	24h	4h	24h
			Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
ARA	L-arabinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
MAN	D-manitol	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
SOR	D-sorbitol	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
LAC	D-lactosa(bovina)	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
TRE	D-trehalosa	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
INU	Inulina	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
RAF	D-rafinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
AMD	Almidón	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo
GLYG	Glucógeno	Acidificación	Rojo	Naranja/ rojo	Naranja/ amarillo	Amarillo

11. De acuerdo al resultado obtenido por cada ensayo, se asignó el número correspondiente y se sumaron las cantidades de acuerdo a lo establecido por el fabricante. El número de indentificación obtenido así se introdujo en el software API para obtener el resultado de la identificación.

### **3.5 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS ENTEROCOCOS A LOS ANTIBIÓTICOS**

La resistencia de los enterococos a los antibióticos se determinó mediante la técnica de Bauer-Kirby utilizando multidiscos para Gram positivos marca BIO-RAD en placas de agar Müeller-Hinton. Cada multidisco constó de 12 pequeños discos impregnados con antibióticos de uso en terapia humana contra microorganismos Gram positivos.

Las cepas seleccionadas para realizar el antibiograma fueron aquellas que presentaron las características bioquímicas típicas de los enterococos. Debido a que, en su mayoría, las cepas aisladas mostraron reacciones positivas para enterococos, sólo algunas de ellas fueron seleccionadas aleatoriamente para probar su resistencia a los antibióticos.

Preparación del inóculo y realización del antibiograma

Previamente a la preparación del inóculo, todas las colonias de enterococos fueron inoculadas en caldo BHI e incubadas durante 24h a 35°C. Por otro lado, se prepararon placas con Agar Müeller-Hinton en las cuales se inocularon 100µL del caldo BHI con crecimiento de 24h de cada uno de los microorganismos seleccionados. El inóculo fue distribuido uniformemente sobre la superficie con movimientos suaves en forma circular, ascendente y descendente. Se incubó a 35° durante 48h.

Se colocaron con ayuda de pinzas estériles los multidiscos a cada una de las cajas y se dejaron en refrigeración de manera invertida por 15min. Posteriormente se incubaron durante 24h a 35°C para una primer lectura, la cual se confirmó a las 48h mediante una segunda lectura.

### **3.6 EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL.**

La extracción del ADN total se realizó mediante la técnica de Palumbi (Palumbi, 1991) que consiste en lisar las células mediante fuerza mecánica y el uso de buffer de lisis para posteriormente ser extraído el material no nucleico con el uso de diferentes disolventes.

La técnica empleada se describe a continuación:

1. Se crecieron las bacterias en caldo BHI con tres antibióticos: tetraciclina, trimetropim-sulfametoxazol y gentamicina e incubaron durante 48h en agitación.
2. Se centrifugaron 30mL de medio del medio anterior durante 5min a 4000rpm.
3. A la pastilla obtenida se adicionaron 2mL de buffer de lisis y 1g de perlas de vidrio estériles ( o arena de mar estéril) por tubo.
4. Se colocaron los tubos en vortex durante 8min con la finalidad de romper las células.
5. Se transfirió el sobrenadante a microtubos Eppendorf de 2mL y se centrifugó durante 10min a 4°C.
6. Se recuperó el sobrenadante y se extrajo suavemente con un volumen igual de fenol equilibrado
7. Se separaron las fases centrifugando a 10000 rpm durante 10min a 4°C.
8. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo. Se mezcló suavemente
9. Se separó la fase acuosa (superior) y se agregó un volumen igual de cloroformo. Se mezcló suavemente.
10. Se centrifugó a 1000rpm durante 10min a 4°C.
11. Se recuperó la fase acuosa midiendo el volumen
12. Se agregaron 0.1volúmenes de acetato de sodio 3M o bien 0.5volúmenes de acetato de amonio 7.5M
13. Se agregaron 0.5volúmenes de isopropanol o bien 1.5volúmenes de etanol. Se mezclaron.

14. Se dejó reposar 15min a T ambiente
15. Se centrifugó a 10000rpm durante 10min a T ambiente
16. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó durante 10min a 10000rpm a T ambiente
17. Se desechó el sobrenadante con cuidado y se secó la pastilla. Se resuspendió el ADN en 30 $\mu$ L de agua destilada estéril.
18. Se realizó gel de agarosa al 0.9% y se corrieron las muestras de ADN con una diferencia de potencial de 120V durante 35min para observar su integridad.
19. Se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 $\mu$ g/mL durante 8min. Se enjuagó en un recipiente con agua destilada por 10 min.
20. Se colocó el gel en un transluminador de luz ultravioleta de onda media (302nm) a corta (298nm) marca T1202 sigma para detectar el ADN

### **3.7 Amplificación del ADN y detección de integrones de clase 1**

#### Material

Tubos Eppendorf de 1mL nuevos estériles

Puntas para micropipeta nuevas estériles

Agua destilada desionizada estéril

Estuche de reactivos PCR

Iniciadores

5'-CS(5'GGCATCCAAGCACAAGC3')  
3'-CS(5'AAGCAGACTTGACTGAT3')

Técnica ( Birboim y Doly, 1979)

La mezcla de reacción contiene

1. 45µL de buffer PCR supermix (Invitrogen cat. 10572-CIH)
2. Se agregaron 1 µL de cada una de las soluciones de los iniciadores (se recomienda tener una concentración de 200nM de cada uno)
3. Se adicionaron 1 µL de ADN bacteriano (se recomienda una concentración de 1-3ng)
4. Se adicionaron 2 µL de agua desionizada estéril para obtener un volumen total de 50 µL.
5. Se taparon y se mezclaron perfectamente el contenido de los tubos
6. Se colocaron los tubos en el termociclador (CGene AMP 2400, Perkin Elmer). Se comenzó el programa de PCR el cual constó de:
  - a) Arranque de 3min a 96°C
  - b) Desnaturalización 15s a 96°C
  - c) Hibridación 30s a 55°C
  - d) Elongación 90s a 75°C
  - e) Etapa final 10min a 72°C
7. Se realizó un gel de agarosa al 0.9% y se corrieron las muestras junto con el marcador de pesos moleculares, un control positivo y uno negativo. Se

corrió el gel a 120V durante 35min. El marcador de pesos moleculares es el DNA del bacteriófago  $\lambda$  digerido con Hind III

Pesos moleculares : 0.125, 0.56, 2.0, 2.3, 4.4, 6.7, 9.4, 23.1 kb HIND III

8. Para observar las bandas de amplificación, se utilizó la misma técnica descrita en el protocolo de extracción de ADN. Para ello, se prepararon diluciones stock de 100  $\mu$ L a una concentración de DNA de 3ng cada una.

### **3.8 Conservación de cepas**

Los microorganismos seleccionados fueron conservados mediante congelación. Para ello, se inocularon tubos de ensayo con caldo BHI al 20% de glicerol. Adicionalmente, se añadieron al medio los antibióticos siguientes: tetraciclina, trimetropim-sulfametoxazol y gentamicina. Los tubos fueron incubados a 35°C durante 24h.

Posteriormente, el medio fue centrifugado a 4000rpm durante 5min. La pastilla fue resuspendida en caldo BHI al 20% de glicerol con los tres antibióticos anteriores contenidos en tubos Eppendorf y se mantuvieron en congelación para posteriores estudios.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO

Los resultados del aislamiento de enterococos del primer y segundo muestreo se presentan en las tablas 1 y 2. En ellas, se indica el porcentaje de enterococos encontrados por muestra con respecto al total de microorganismos mesófilos aerobios que se obtiene al considerar la cuenta total como 100%.

**Tabla 4.1. Primer muestreo . Conteo de microorganismos en agar cuenta estandar y agar KF**

Muestra	Dilución	Mesófilos aerobios en agar cuenta estándar (UFC)	Enterococos en agar KF con CTT (UFC)	% de enterococos con respecto al total de mesófilos
A	$10^{-1}$	Incontables	Incontables	4.69
	$10^{-2}$	Incontables	53	
	$10^{-3}$	113	--	
	$10^{-4}$	4	--	
	$10^{-5}$	--	--	
B	$10^{-1}$	Incontables	Incontables	4.51
	$10^{-2}$	Incontables	86	
	$10^{-3}$	195	9	
	$10^{-4}$	22	--	
	$10^{-5}$	3	--	
C	$10^{-1}$	Incontables	Incontables	6.26
	$10^{-2}$	Incontables	92	
	$10^{-3}$	147	5	
	$10^{-4}$	18	--	
	$10^{-5}$	2	--	

**Tabla 4.2. Segundo muestreo . Conteo de microorganismos en agar cuenta estándar y agar KF**

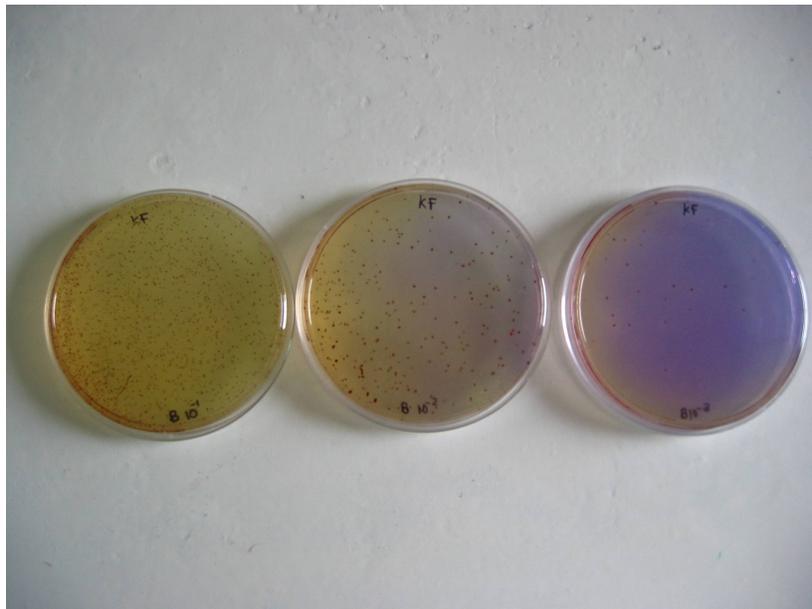
Muestra	Dilución	Mesófilos aerobios en agar cuenta estándar (UFC)	Enterococos en agar KF con CTT (UFC)	% de enterococos con respecto al total de mesófilos
A	10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	2.14
	10 <sup>-2</sup>	Incontables	326	
	10 <sup>-3</sup>	Incontables	42	
	10 <sup>-4</sup>	196	--	
	10 <sup>-5</sup>	17	--	
B	10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	1.05
	10 <sup>-2</sup>	Incontables	248	
	10 <sup>-3</sup>	Incontables	26	
	10 <sup>-4</sup>	248	--	
	10 <sup>-5</sup>	22	--	
C	10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	2.14
	10 <sup>-2</sup>	Incontables	138	
	10 <sup>-3</sup>	Incontables	12	
	10 <sup>-4</sup>	56	--	
	10 <sup>-5</sup>	7	--	

El estudio realizado demuestra que los enterococos forman parte de la flora presente en la carne de pollo en una proporción menor al 7% con respecto al total de los microorganismos mesófilos aerobios presentes. No se detecta diferencia significativa en la cuenta total entre muestras.

Por otro lado, se observa mayor densidad microbiana en todas las muestras del segundo muestreo (tabla 2), en comparación con la cantidad de microorganismos determinada en el primer muestreo; sin embargo, la proporción de enterococos presentes en las muestras disminuyó con respecto al primer muestreo, siendo la muestra C nuevamente quien presentó la mayor proporción de enterococos. En este segundo muestreo, la cantidad de enterococos aislados de las muestras A y C fue

equivalente y por segunda ocasión la muestra B presentó la menor proporción de enterococos.

La figura 4.1 ejemplifica la diferencia entre cajas con agar KF y con distinto crecimiento bacteriano.



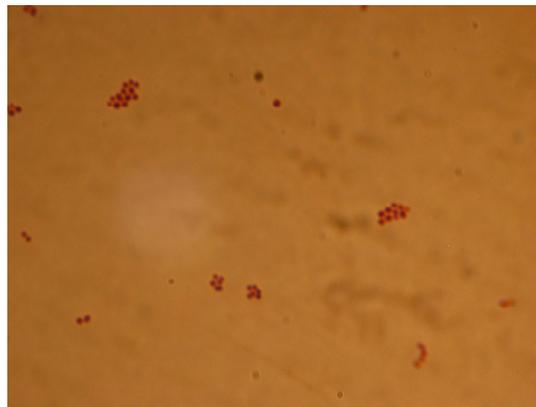
**Figura 4.1.** Aislamiento de enterococos en agar KF con 1% de cloruro de trifeniltetrazolio. Se observa de der. a izq. el incremento del vire del indicador (púrpura de bromocresol) por la fermentación de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo (maltosa y lactosa) conforme aumenta la dilución del inóculo y la pigmentación roja de las colonias de los enterococos

## IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.

En las tablas 4.3 y 4.4 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación preliminar de las cepas aisladas seleccionadas al azar, así como los diámetros de inhibición determinados para las pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas seleccionadas de cada muestreo.



**Figura 4.2.**  
Imagen al microscopio óptico 100x de enterococos  
(tinción de Gram)



**Figura 4.3**  
Imagen al microscopio óptico a 100x de enterococos (tinción de Gram). Se observan células aisladas y algunas agrupadas en pares.

De las pruebas bioquímicas de identificación preliminar para los enterococos (tablas 4.33 y 4.4) se observó que la gran mayoría de los microorganismos aislados en agar KF con 1% de TTC en ambos muestreos presentaron las características bioquímicas típicas para enterococos. Los microorganismos aislados fueron Gram positivos, agrupados en pares o cadenas cortas, presentaron crecimiento en caldo BHI con 6.5% de NaCl, la prueba de la catalasa fue negativa; es decir, son microorganismos que al respirar no utilizan oxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria (no son aerobios), además de no ser hemolíticos [Gilmore, 2002].

En las tablas 4.5 y 4.6 se encuentran contenidos los resultados de la interpretación de los antibiogramas para cada muestreo. El criterio para la interpretación fue consultado directamente del instructivo anexo en el kit de Bio Rad donde se muestran los diámetros de halo de inhibición relacionados a su clasificación.

De ambos muestreos, se aislaron microorganismos multirresistentes a antibióticos (tablas 4.5-4.11). Según Pliego y col. el término "cepa multirresistente" se define como aquella que presenta resistencia a más del 50% de los antibióticos probados. En este trabajo se determinó la sensibilidad de los microorganismos aislados a 12 antibióticos; se tomó la decisión de llamar cepa multirresistente a aquella que presentara resistencia a más de 6 antibióticos (más del 50% del total de los antibióticos utilizados). Una vez considerado lo anterior, se tiene que el 95.3

% de las cepas aisladas del primer muestreo fueron multirresistentes comparados con 98.3% del segundo muestreo.

Los resultados de la prueba de resistencia a los antibióticos se muestran en las tablas 4.7 a la 4.12. En ellas se presentan los resultados obtenidos para las cepas probadas, de acuerdo al número de antibióticos a los cuales fueron resistentes. Se presentan también los porcentajes de resistencia a antibióticos entre muestras y con respecto al total de las cepas aisladas.

Tabla 4.7. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos (por número de antibióticos a los que se presentó resistencia) para el primer muestreo

No. de Antibióticos	# de cepas resistentes (% de resistencia)											
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<b>A</b> 20 cepas	1 (5)	6 (30)	9 (45)	4 (20)	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>B</b> 32 cepas	2 (6.2)	2 (6.2)	7 (21.9)	10 (31.2)	5 (15.6)	4 (12.5)	1 (3.1)	0	0	1 (3.1)	0	0
<b>C</b> 34 cepas	0	0	10 (29.4)	13 (38.2)	7 (20.6)	2 (5.9)	0	2 (5.9)	0	0	0	0
<b>TOTAL</b> 86 cepas	3 (3.5)	8 (9.3)	26 (30.2)	27 (31.4)	12 (13.9)	6 (7.0)	1 (1.2)	2 (2.3)	0	1 (1.2)	0	0

Tabla 4.8. % de multirresistencia del primer muestreo

Muestra	No. de cepas	No. de cepas resistentes a más de 6 antibióticos	% de multirresistencia
A Pilgrim`s pride	20	20	100
B Bachoco	32	30	93.7

C San Antonio	34	32	94.1
<b>TOTAL</b>	<b>86</b>	<b>82</b>	<b>95.3</b>

Tabla 4.9. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos (por número de antibióticos a los que se presentó resistencia ) para el segundo muestreo.

No de Antibióticos	# de cepas resistentes (% de resistencia)											
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<b>A</b> 20 cepas	3 (15)	5 (25)	6 (30)	2 (10)	3 (15)	1 (5)	0	0	0	0	0	0
<b>B</b> 20 cepas	4 (20)	2 (10)	6 (30)	6 (30)	1 (5)	1 (5)	0	0	0	0	0	0
<b>C</b> 20 cepas	0	1 (5)	5 (25)	9 (45)	1 (5)	3 (15)	0	0	1 (5)	0	0	0
<b>TOTAL</b> 60 cepas	7 (11.6)	8 (13.3)	17 (28.3)	17 (28.3)	5 (8.3)	5 (8.3)	0	0	1 (1.6)	0	0	0

Tabla 4.10. % de multirresistencia del segundo muestreo

Muestra	No. de cepas	No. de cepas resistentes a más de 6 antibióticos	% de multirresistencia
A	20	20	100
B	20	20	100
C	20	19	95
<b>TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>59</b>	<b>98.3</b>

Tabla 4.11. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos . Resistencia de los microorganismos aislados de acuerdo al número de antibióticos a los que fueron resistentes para ambos muestreos

No. de Antibióticos	# de cepas resistentes (% de resistencia)											
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<b>A</b>	4	11	15	6	3	1	0	0	0	0	0	0

40 cepas	(10)	(27.5)	(37.5)	(15)	(7.5)	(2.5)						
B 52 cepas	6 (11.5)	4 (7.7)	13 (25.0)	16 (30.8)	6 (11.5)	5 (9.6)	1 (1.9)	0	0	1 (1.9)	0	0
C 54 cepas	0	1 (1.8)	15 (27.8)	22 (40.7)	8 (14.8)	5 (9.2)	0	2 (3.7)	1 (1.8)	0	0	0
<b>TOTAL Cepas</b>	<b>10 (6.8)</b>	<b>16 (10.9)</b>	<b>43 (29.4)</b>	<b>44 (30.1)</b>	<b>17 (11.6)</b>	<b>11 (7.5)</b>	<b>1 (0.7)</b>	<b>2 (1.4)</b>	<b>1 (0.7)</b>	<b>1 (0.7)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tabla 4.12. Porcentaje de multirresistencia de los microorganismos estudiados

Muestra	No. de cepas aisladas	No. de cepas resistentes a más de 6 antibióticos	% de multirresistencia
A Pilgrim`s pride	40	40	100
B Bachoco	52	50	96.1
C San Antonio	54	51	94.4
<b>TOTAL</b>	<b>146</b>	<b>141</b>	<b>96.6</b>

El 100% de los microorganismos aislados de la muestra A fueron multirresistentes, seguido de un 96.1 y 94.4% para las cepas aisladas de las muestras B y C (tablas 4.8 y 4.10). En un estudio realizado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Ciudad de México, pero en el cual las cepas de enterococos fueron aisladas de pacientes del Hospital de Oncología, se encontró que el 34% de las cepas multirresistentes a antibióticos identificadas en el estudio correspondieron a especies del género *Enterococcus spp*, seguidas de cepas de *Staphylococcus spp* y de *Pseudomonas spp*. De los enterococos multirresistentes, se identificaron tres especies: *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. avium*. [Pliego y col] .De acuerdo a Quednau y col. en su estudio sobre resistencia a antibióticos de enterococos aislados de carne de pollo, las muestras de pollo de origen sueco mostraron un 73% de resistencia a 1 o más antibióticos de los nueve probados mientras que las

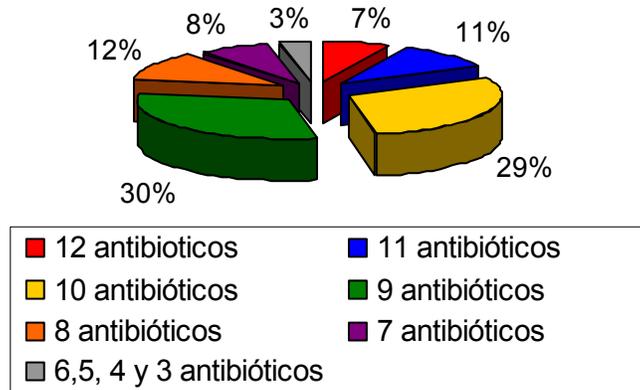
muestras de pollo originarias de Dinamarca mostraron un 55% de resistencia a uno o más antibióticos. Esto, en comparación con lo encontrado en carne de pollo en México, muestra una resistencia a mayor cantidad de antibióticos pues de las 146 cepas aisladas de carne de pollo durante el estudio, 141 de ellas (96.6%) fueron resistentes, al menos, a 7 de los 12 antibióticos probados y 113 (77.4%) son resistentes, al menos, a 9 antibióticos.

Al comparar las tablas 4.7 y 4.9 , se observa un incremento en el porcentaje de cepas resistentes a 12 y 11 antibióticos en el segundo muestreo con respecto al primero. Se observa, en ambos muestreos, que la mayor densidad de resistencia a antibióticos se distribuye en el intervalo de 7 a 12 antibióticos, en donde el mayor porcentaje de bacterias multirresistentes se ubica entre las cepas resistentes a 9 y 10 antibióticos. Del mismo modo, se observan pocas cepas resistentes a menos de 7 antibióticos. Es notorio observar la existencia, en ambos muestreos, de enterococos multirresistentes a los doce antibióticos contenidos en los multidiscos utilizados.

En contraparte a lo encontrado en este trabajo, en otro estudio se encontró que los enterococos aislados de alimentos de origen animal tales como jamón, salsas, carne molida y queso originarios de Alemania no presentaban riesgo a la salud por no poseer microorganismos multirresistentes, aislando sólo una cepa resistente a tetraciclina [Peters y col., 2003], lo cual muestra que el problema de resistencia a antibióticos en enterococos provenientes de fuentes animales es nuestro país es alarmante.

En el gráfico 4.4 se observa la distribución de resistencia a antimicrobianos en función del número de antibióticos al cual los microorganismos aislados fueron resistentes. Se aprecia que las cepas multirresistentes a 10 y 9 antibióticos constituyen el 60% de las cepas aisladas. Las cepas resistentes a 12,11 y 10 antibióticos representan casi el 50% de las cepas estudiadas. Si se consideran también las cepas resistentes a 9 antibióticos, se tiene que el 77% de las cepas aisladas de la carne de pollo de ambos muestreos son resistentes, al menos, a 9 antibióticos. Se observa que el 97 % de las cepas presentan resistencia , al menos, a 7 antibióticos.

**Figura 4.4.** Porcentaje de multirresistencia (por número de antibióticos) de las cepas aisladas de ambos muestreos.



En las tablas 4.13 -4.15 se encuentra la información obtenida para la resistencia de los microorganismos aislados, en función del antibiótico al cual fueron resistentes.

Se presentan, de igual manera, los porcentajes de resistencia por antibiótico entre muestras y con respecto al total de las muestras probadas.

Tabla 4.13. Resistencia por antibiótico de las cepas aisladas del primer muestreo

Muestra	# (%) de cepas que presentan resistencia a los antibióticos señalados											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT
<b>A</b> 20 cepas	6 (30)	20 (100)	20 (100)	19 (95)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	17 (85)	20 (100)	16 (80)	20 (100)	8 (40)
<b>B</b> 32 cepas	7 (21.9)	31 (96.9)	28 (87.5)	30 (93.7)	31 (96.9)	31 (96.9)	25 (78.1)	13 (40.6)	30 (93.7)	29 (90.6)	25 (78.1)	5 (15.6)
<b>C</b> 34 cepas	3 (8.8)	32 (94.1)	24 (70.6)	31 (91.2)	32 (94.1)	32 (94.1)	33 (97.0)	15 (44.1)	30 (88.2)	33 (97.0)	30 (88.2)	0
<b>TOTAL</b> 86 cepas	<b>16</b> <b>(18.6)</b>	<b>83</b> <b>(96.5)</b>	<b>72</b> <b>(83.7)</b>	<b>80</b> <b>(93.0)</b>	<b>83</b> <b>(96.5)</b>	<b>83</b> <b>(96.5)</b>	<b>78</b> <b>(90.7)</b>	<b>45</b> <b>(52.3)</b>	<b>80</b> <b>(93.0)</b>	<b>78</b> <b>(90.7)</b>	<b>75</b> <b>(87.2)</b>	<b>13</b> <b>(15.1)</b>

Tabla 4.14. Resistencia por antibiótico de las cepas aisladas del segundo muestreo

Muestra	# (%) de cepas que presentan resistencia a los antibióticos señalados											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT
<b>A</b> 20 cepas	7 (35)	18 (90)	19 (95)	19 (95)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	16 (80)	19 (95)	15 (75)	19 (95)	8 (40)
<b>B</b> 20 cepas	8 (40)	17 (85)	19 (95)	19 (95)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	19 (95)	20 (100)	12 (60)	19 (95)	7 (35)
<b>C</b> 20 cepas	3 (15)	17 (85)	17 (85)	19 (95)	19 (95)	19 (95)	14 (70)	13 (65)	19 (95)	14 (70)	20 (100)	1 (5)
<b>TOTAL</b> 60 cepas	<b>18</b> <b>(30)</b>	<b>52</b> <b>(86.7)</b>	<b>55</b> <b>(91.7)</b>	<b>57</b> <b>(95.0)</b>	<b>59</b> <b>(98.3)</b>	<b>59</b> <b>(98.3)</b>	<b>54</b> <b>(90.0)</b>	<b>48</b> <b>(80.0)</b>	<b>58</b> <b>(96.7)</b>	<b>41</b> <b>(68.3)</b>	<b>58</b> <b>(96.7)</b>	<b>16</b> <b>(26.7)</b>

AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

Tabla 4.15. Resistencia de los microorganismos aislados de acuerdo al antibiótico al que fueron resistentes para ambos muestreos

Muestra	# (%) de cepas que presentan resistencia a los antibióticos señalados											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT
<b>A</b> <b>40</b> <b>cepas</b>	13 (32.5)	38 (95)	39 (97.5)	38 (95)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	33 (82.5)	39 (97.5)	31 (77.5)	39 (97.5)	16 (40)
<b>B</b> <b>52</b> <b>cepas</b>	15 (28.8)	48 (92.3)	47 (90.4)	49 (94.2)	51 (98.1)	51 (98.1)	45 (86.5)	32 (61.5)	50 (96.1)	41 (78.8)	44 (84.6)	12 (23.1)
<b>C</b> <b>54</b> <b>cepas</b>	6 (11.1)	49 (90.7)	41 (75.9)	50 (92.6)	51 (94.4)	51 (94.4)	47 (87)	28 (51.8)	49 (90.7)	47 (87)	50 (92.6)	1 (1.8)
<b>TOTAL</b> <b>146</b> <b>cepas</b>	<b>34</b> <b>(23.3)</b>	<b>135</b> <b>(92.5)</b>	<b>127</b> <b>(87)</b>	<b>137</b> <b>(93.8)</b>	<b>142</b> <b>(97.3)</b>	<b>142</b> <b>(97.3)</b>	<b>132</b> <b>(90.4)</b>	<b>93</b> <b>(63.7)</b>	<b>138</b> <b>(94.5)</b>	<b>119</b> <b>(81.5)</b>	<b>133</b> <b>(91.1)</b>	<b>29</b> <b>(19.9)</b>

AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

De acuerdo a las tablas 4.13, 4.14 y 4.15, se puede comentar que existe un elevado porcentaje de resistencia a los antibióticos probados con excepción de tres de ellos, los cuales mostraron el menor porcentaje de resistencia; se trata de la ampicilina, gentamicina y la mezcla sinérgica de trimetoprim-sulfametoxazol.

En el primer muestreo se observó un porcentaje de resistencia muy alto para los antibióticos de la familia de las cefalosporinas : cefalotina (CF), cefotaxima (CTX), ceftazidima ( CAZ) y cefuroxima (CXM). Los microorganismos aislados de la muestra A presentaron resistencia de 95 a 100% para cefalosporinas, mientras que los microorganismos de la muestra B presentaron un porcentaje menor de resistencia (87 a 97%), al igual que los microorganismos de la muestra C (70 a 94%). Los microorganismos aislados de la muestra C del primer muestreo mostraron mayor susceptibilidad a cefotaxima con un 70.6 % de resistencia. La

cefotaxima es una cefalosporina de tercera generación, lo cual puede inferir que para algunas cepas de los enterococos aislados de esta muestra, este antibiótico aún tiene efecto sobre ellos; sin embargo, cabe hacer notar que se trata de un 70% de resistencia, el cual sigue siendo indiscutiblemente alto. Los enterococos son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas; sin embargo, la situación se agrava cuando algún microorganismo patógeno para el hombre adquiere la resistencia a esta familia de antimicrobianos a través de conjugación con los enterococos multirresistentes; en la clínica, las cefalosporinas aún son opciones terapéuticas para pacientes enfermos de meningitis causada por *Streptococcus pneumoniae* y para pacientes infectados con *Neisseria spp* (Gómez-Barreto y col., 1999; Belda y col., 2002).

También en el primer muestreo, se observa un doble porcentaje de resistencia (85%) a gentamicina en las cepas de la muestra A con respecto a las cepas de las muestras B y C (40.6 y 44.1%, respectivamente). De este modo, la muestra A presentó la mayor resistencia a los antibióticos *discriminativos*, por tratarse de aquellos antibióticos que marcaron la diferencia al dividir a las cepas probadas en dos grupos: aquellas resistentes a más de 9 antibióticos (77.4% del total de las cepas) de las resistentes a menos de 9 (el 22.6% restante). De este modo se observa que el mayor porcentaje de enterococos resistentes a ampicilina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol correspondieron a los aislados de la muestra A de la marca Pilgrim's pride. En el caso de la penicilina, la muestra B fue quien presentó el mayor porcentaje de resistencia (90.6 contra un 80% de las cepas de la muestra A). La muestra B presentó, a su vez, el menor porcentaje de

resistencia al macrólido eritromicina y a la tetraciclina (78.1%, en ambos casos) con respecto a las otras muestras. En el primer muestreo, las cepas probadas presentaron una mayor susceptibilidad a la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol, con porcentajes de resistencia menores al 20%, seguido de la gentamicina con un 52.3%.

En el segundo muestreo, se observa la misma tendencia en el caso de las cefalosporinas, las cuales muestran un alto porcentaje de resistencia. Las cepas de la muestra B presentan el mayor porcentaje de resistencia a Gentamicina (95%) en comparación con la muestra A (80%) y la muestra C (65%). La ampicilina y el trimetoprim-sufametoxazol continúan siendo los dos antibióticos a los cuales las cepas probadas tuvieron la menor resistencia, aunque esta se incrementó en comparación con el primer muestreo, por ejemplo, la muestra B presentó un incremento considerable en la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol con respecto al primer muestreo (de 15.1 a 26.7% de resistencia). De la misma manera, esto se ve directamente relacionado con el aislamiento de más cepas resistentes a los 12 antibióticos del estudio (3 cepas del primer muestreo contra 7 cepas del segundo).

De manera global, se observa un alto porcentaje de resistencia a la mayoría de los antibióticos empleados; sin embargo, en ambos muestreos es notable la disminución de cepas resistentes a ampicilina y a trimetoprim-sulfametoxazol, siendo los antibióticos con mayor poder inhibitorio sobre los enterococos aislados.

De acuerdo al estudio realizado por Hayes y col., 2003. en donde aislaron enterococos de establecimientos de venta al por menor en EUA, se observó que de 1537 cepas aisladas de 981 muestras de carne, el 20% presentó resistencia a eritromicina, 23% a penicilina y 43% a tetraciclina, constituyendo todos porcentajes de resistencia menores a los determinados en el presente estudio. Por su parte, Butaye y col., 2000 encontraron que, de las cepas aisladas de enterococos a partir de muestras de pollo, sólo el 6% fue resistente a ampicilina, el 92% a tetraciclina y el 3% a gentamicina, siendo éste último resultado distinto al encontrado en este estudio, en donde la resistencia a gentamicina es mucho mayor (63.7%). En su investigación, Butaye y col. determinaron que el mayor porcentaje de resistencia a ampicilina fue encontrado en los animales de engorda. Descubrieron una relación entre la resistencia a antibióticos usados en terapia humana con respecto a los usados como promotores de crecimiento, al observar que la resistencia a tilosina, un antibiótico de uso veterinario y para fines profilácticos de ganado, mostraba un mayor porcentaje en los animales de engorda y mascotas mamíferas con respecto al de los aislamientos de pájaros y rumiantes. Del mismo modo, encontraron relación entre la resistencia a virginiamicina (promotor de crecimiento), con respecto a dalfopristina/quinupristina (antibióticos análogos a virginiamicina, de uso en humanos), todos agrupados en la familia de las estreptograminas.

En una investigación proveniente de Bostwana [Chingwaru y col., 2003] se determinó la sensibilidad a antibióticos de cepas provenientes de leche, carne de res y carne de pollo. La especie más comúnmente aislada fue *E. faecalis*, en un

46.1% mientras que la segunda más encontrada fue *E. faecium* con 29.8%. Es de llamar la atención la información relacionada con la resistencia a ampicilina, en donde el 96% y 97% de las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* provenientes de pollo fueron resistentes a ampicilina; del mismo modo y sólo para *E. faecium* se encontró un 30.7% de resistencia a vancomicina en las cepas provenientes de carne de pollo y un 32.8% en los provenientes de leche, lo cual indica malas condiciones higiénicas en la ordeña por contaminación fecal de la vaca, cuya alimentación seguramente está suplementada con promotores de crecimiento.

En Europa, se usó por mucho tiempo la avoparcina como antibiótico promotor de crecimiento. Se piensa que su utilización generó la aparición de bacterias resistentes a la vancomicina, otro glucopéptido similar a la avoparcina, pero de uso en terapia humana para el tratamiento de cocos resistentes a la ampicilina; Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Reino Unido, Holanda y Noruega son países que detectaron presencia de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en sus ganaderías después de usar avoparcina [Wegener, 1999]. Los japoneses permitían el uso de avoparcina hasta que en 1997 se prohibió su uso al detectar la presencia de enterococos resistentes a los glucopéptidos (ERG) en granjas en donde sabían se administraba este promotor al ganado [Yoshimura. 1998]. En Estados Unidos no se detectó el problema de la resistencia a glucopéptidos en cepas aisladas de fuentes animales ya que no se utiliza la avoparcina; sin embargo, al menos 17 clases de agentes microbianos están aprobados como promotores de crecimiento, incluyendo tetraciclinas, penicilinas, macrólidos, lincomicina y virginiamicina, lo cual provoca resistencia a

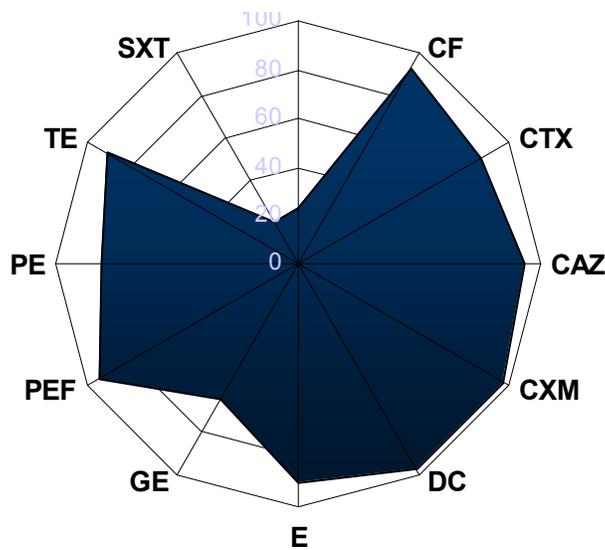
otros antibióticos análogos a los de terapia en humanos; es decir, el problema persiste [Anderson, 2003].

Existen muchos estudios que relacionan la resistencia de los enterococos a la vancomicina con la resistencia a otros antibióticos análogos. En uno de ellos [Robredo y col., 2000] se analizaron muestras de pollo de supermercado de venta en España, en donde las cepas fueron obtenidas de diferentes partes de pollo, encontrándose la presencia de ERV, especialmente de las muestras obtenidas de la canal, intestinos y carne molida. *E. faecium* fue la especie que predominó, concordando con los resultados aquí obtenidos. Además, todas las cepas de *E. faecium* presentaron, además de resistencia a vancomicina, alta resistencia a la teicoplanina y la avoparcina, todos glucopéptidos. Por otro lado, se encontró que las cepas con alta resistencia a glucopéptidos (ARG) presentaron alta resistencia a macrólidos (eritromicina y tilosina) y a aminoglucósidos (kanamicina, estreptomicina y gentamicina). En el presente estudio no se abarcó a la familia de los glucopéptidos; sin embargo, se observó una alta resistencia a aminoglucósidos (gentamicina) y a macrólidos (eritromicina), lo cual podría estar relacionado con la resistencia a glucopéptidos tal cual lo observaron Robredo y col. En su estudio, la resistencia a la ampicilina fue variable y la resistencia a la ciprofloxacina fue muy baja (MIC de 0.5-2mg/mL).

El perfil de resistencia a los antibióticos en este estudio se presenta en el gráfico 4.5. En él, cada arista del polígono corresponde a un antibiótico distinto. El polígono en verde representa el 100% de resistencia para cada antibiótico. Se

aprecia claramente un alto porcentaje de resistencia para la mayoría de los antibióticos estudiados por parte de las cepas estudiadas. Sólo existen dos antibióticos por debajo del 60% de resistencia antimicrobiana, los cuales son ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol. Se observa que nueve de los doce antibióticos utilizados se ubican en el gráfico con un porcentaje superior al 80% de resistencia para las cepas probadas (ampicilina, gentamicina y trimetropim-sulfametoxazol son los antibióticos que presentan un porcentaje de resistencia menor).

Figura 4.5. Perfil de resistencia antimicrobiana de los microorganismos aislados en ambos muestreos.



AM: ampicilina; CF: cefalosporina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

En la tabla 4.16 se agrupan los antibióticos utilizados durante la prueba de sensibilidad de acuerdo a la familia antimicrobiana a la cual pertenecen. En la tabla 4.17 se presentan los porcentajes de resistencia presentados por muestra para cada familia antimicrobiana y para ambos muestreos. Para el caso de los betalactámicos, cuyas familias fueron evaluadas con más de un antibiótico representativo de cada grupo, se seleccionaron a aquellos antibióticos con mayor poder inhibitorio sobre los microorganismos aislados para obtenerse así el porcentaje de resistencia correspondiente a cada familia; de este modo, se tiene la ampicilina (penicilina) y la cefotaxima (cefalosporina) fueron los antibióticos con mayor poder inhibitorio; sus porcentajes de resistencia fueron considerados los representativos para sus familias respectivas.

Tabla 4.16. Agrupamiento de los antibióticos utilizados en la prueba de sensibilidad antimicrobiana por familias.

GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICO
BETALACTÁMICOS	
-Penicilinas	Penicilina
	Ampicilina
	Dicloxacilina
-Cefalosporinas	Cefalotina (1ª generación)
	Cefuroxima (2ª generación)
	Cefotaxima (3ª generación)
	Ceftazidima (3ª generación)
AMINOGLUCÓSIDOS	Gentamicina
MACRÓLIDOS	Eritromicina
QUINOLONAS	Pefloxacina
TETRACICLINAS	Tetraciclina
SULFAS	Trimetopim-Sulfametoxazol

Tabla 4.17. Resultados de la resistencia de los microorganismos aislados de acuerdo a la familia antimicrobiana a la cual fueron resistentes.

Muestra	# (%) de cepas que presentan resistenciencia por familia de antibióticos						
	PENICIL	CEFAL	AMINOOG	QUINOL	TETRAC	TRI-SUL	MACROL
A 40 cepas	13(32.5)	39 (97.5)	33 (82.5)	39(97.5)	39(97.5)	16(40.0)	40(100)
B 52 cepas	15(28.8)	47(90.4)	32(61.5)	50(96.1)	44(84.6)	12(23.1)	45(86.5)
C 54 cepas	6(11.1)	41(75.9)	28(51.8)	49(90.7)	50(92.6)	1(1.8)	47(87)
<b>TOTAL 146 cepas</b>	<b>34(23.3)</b>	<b>127(87.0)</b>	<b>93(63.7)</b>	<b>138(94.5)</b>	<b>138(94.5)</b>	<b>29(19.9)</b>	<b>132(90.4)</b>

PENICIL: penicilinas; CEFAL: cefalosporinas; AMINOOG: aminoglucósidos; QUINOL: quinolonas; TETRAC: tetraciclinas; TRI-SUL: trimetoprim-sulfametoxazol; MACROL: macrólidos.

En la tabla 4.17, se observa que los microorganismos aislados presentaron mayor susceptibilidad al trimetopim-sulfametoxazol y a las penicilinas (19.9 y 23.3% de resistencia, respectivamente). De la misma forma, se observa que los

microorganismos aislados presentaron la mayor resistencia a quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y penicilinas, con porcentajes de resistencia mayores al 85%. En un caso aparte, se observa un porcentaje de resistencia intermedio a aminoglucósidos (63.7%). Hayes y col., 2004 encontraron un porcentaje de resistencia menor en sus aislamientos de enterococos en Estados Unidos, en el cual reportaron que de 541 cepas aisladas de 82 granjas muestreadas, el 68% de los enterococos fueron resistentes a tetraciclinas, 54.3% a macrólidos y 26.7% a penicilinas. Sólo el porcentaje de resistencia a penicilinas supera por poco al encontrado en este estudio. Otro resultado interesante del trabajo informado por Hayes y col. revela que ningún microorganismo aislado presentó resistencia a las cinco familias de antimicrobianos que analizaron (lincosamidas, estreptograminas, tetraciclinas, macrólidos y penicilinas). En este estudio, se lograron aislar microorganismos resistentes a seis familias antimicrobianas y a la mezcla de trimetoprim-sulfametoxazol.

Comparando los resultados obtenidos de las diferentes muestras, las cepas aisladas de la muestra A presenta el mayor porcentaje de resistencia a antibióticos para todas las familias, observándose un 100% de resistencia a macrólidos y un 97.5% de resistencia a quinolonas, tetraciclinas y cefalosporinas. En contraparte, la muestra C presentó el menor porcentaje de resistencia de las tres muestras estudiadas y se observó sólo un 1% de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol.

En el gráfico 4.6 se recopilan los resultados de resistencia a antibióticos por familias antimicrobianas. Los microorganismos aislados fueron altamente

sensibles a penicilinas (ampicilina) y a trimetropim-sulfametoxazol, mientras que fueron sumamente resistentes a tetraciclinas, quinolonas, cefalosporinas, macrólidos y aminoglucósidos.

Se ha demostrado que la modificación en la legislación de un país en materia de producción animal (utilización de antibióticos como promotores de crecimiento) repercute eficazmente en la incidencia de microorganismos resistentes a antibióticos. Tal es el caso de Dinamarca, quien en 1995 prohibió el uso de avoparcina en animales. A finales de 1994, del líquido de descongelación de esqueletos de aves de corral se aisló *E. faecalis* resistente a glucopéptidos (EFRG). Para finales de 1997, el porcentaje de EFRG se encontraba en números comparativamente bajos en sólo 25% de las muestras analizadas; de la misma manera se encontró disminución del porcentaje de ERG en heces de humanos de la comunidad de donde se obtuvieron las muestras de las aves ; 12% para finales de 1994 y 3.3% para finales de 1997. Con esto se comprobó el papel fundamental en la diseminación de resistencia a glucopéptidos de animales a humanos y de

cómo el cese de utilización de avoparcina en los animales de engorda disminuyó la presencia de EFRG tanto en animales como en humanos [Witte, 1999]. Por otro lado, otros trabajos europeos como el de Biwater y col., 2005 han relacionado la prohibición de antibióticos como promotores de crecimiento con la disminución de bacterias resistentes a tales compuestos. Dinamarca es un país pionero en materia de reacción ante la problemática de multirresistencia a antibióticos por lo que en 1995 establecieron el DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Reseca Programme) para reducir o incluso erradicar el problema. Un reporte de resultados del Instituto de Veterinaria Danés en 2003 indicó que, sobre el impacto de la prohibición de los antibióticos como promotores de crecimiento (APC), se tuvieron los siguientes datos [Wheelock, 2003]:

- Se redujo drásticamente la resistencia a los antibióticos entre las bacterias de origen animal.
- El uso total de antibióticos fue reducido a menos de la mitad en el periodo de 1998 a 2001, tanto en animales como en humanos.
- La proporción de crecimiento de cerdos ha continuado incrementándose y la eficiencia no ha cambiado.
- El costo teórico para los productores por no utilizar promotores de crecimiento es de 0.7 euros por cerdo.

De lo anterior se concluye que Dinamarca puede ser visto como un modelo a seguir por los demás países [Wheelock, 2003] en este tema.

A su vez, la OMS ya ha establecido una serie de recomendaciones para contener la resistencia a los antibióticos la cual consiste en el uso inteligente de los antibióticos, el establecimiento por los gobiernos nacionales de normatividad en cuanto a la prescripción y uso de ellos y al monitoreo constante de la resistencia generada por su utilización [OMS, 2001].

## IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TIRAS API

### PARA LAS CEPAS SELECCIONADAS

Los resultados de las tiras API 20 STREP ( Biomèrieux) a las 4 y 24h de incubación se muestran en las tablas 4.18 a 4.27.

**Tabla 4.18. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II B51**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	7			3			1			7			5			5			0	
Número de identificación: 7317550																				

**Tabla 4.19. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II A24**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	7			3			0			7			5			5			0	
Número de identificación: 7307550																				

**Tabla 4.20. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa IB11**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	7			3			1			7			5			5			0	
Número de identificación: 7317550																				

**Tabla 4.21. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II C118**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	7			3			1			7			5			5			0	
Número de identificación: 7317550																				

**Tabla 4.22. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II A48**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	7			2			0			7			5			5			0	
Número de identificación: 7207550																				

**Tabla 4.23. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II B59**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	7			3			1			7			5			5			0	
Número de identificación: 7217450																				

**Tabla 4.24. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa I C79**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	?	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	7			2			0			7			4			5			0	
Número de identificación: 7207450																				

**Tabla 4.25. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa IC132**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
24h	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	?	-	+	+	-	?	?	-
	7			2			0			7			4			1			0	
Número de identificación: 7207410																				

**Tabla 4.26. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II B87**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
24h	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	?	-
	7			3			5			7			5			5			0	
Número de identificación: 7357550																				

**Tabla 4.27. Resultados de la lectura de la prueba API 20 STREP para la cepa II A36**

L E C T	ENSAYOS BIOQUÍMICOS																			
	V P	H I P	E S C	P Y R A	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G
4h	+	+	+	?	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
24h	+	+	+	?	+	-	+	-	-	+	+	+	?	-	+	+	-	+	?	-
	7			2			1			7			4			5			0	
Número de identificación: 7217450																				

Los resultados de las cepas identificadas mediante el software API se muestran en la tabla 4.28 .

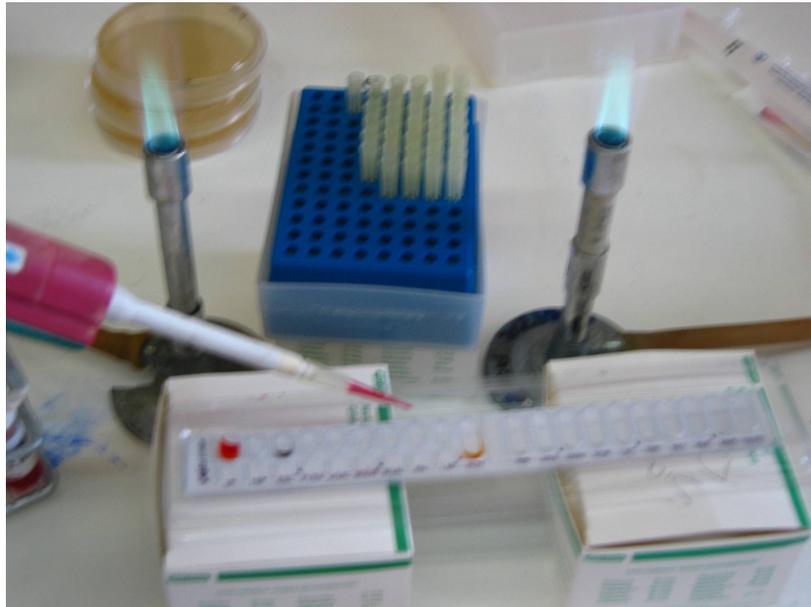
Tabla 4.28 . Interpretación bioquímica mediante el software API para la identificación de cepas multiresistentes a antibióticos

INFORMACIÓN DE LA CEPA				RESULTADO	
# de Muestreo	Origen	# de cepa	# de antibióticos a los que es resistente	Microorganismo Identificado	% de concordancia
I	B	11	12	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i>	50.8 48.8
I	C	79	10	<i>Enterococcus faecium</i>	*
I	C	132	9	<i>Enterococcus faecium</i>	*
II	A	24	12	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i>	78.0 12.4
II	A	36	12	<i>Enterococcus faecium</i>	97.2
II	A	48	12	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i>	78.0 12.4
II	B	51	12	<i>Enterococcus faecium</i>	89.6
II	B	59	12	<i>Enterococcus faecium</i>	89.6
II	B	87	12	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus faecium</i>	77.4 22.4
II	C	118	10	<i>Enterococcus faecium</i>	89.6

\* El software mostró el mensaje: perfil no aceptable, sin mostrar porcentaje de concordancia

De las 10 cepas seleccionadas por su alta multiresistencia para ser identificadas mediante las tiras API, 6 fueron identificadas como *Enterococcus faecalis* en un intervalo de concordancia del 78 al 97 %, otra como *Enterococcus gallinarum* con un 74% de concordancia , una más mostró 50% de concordancia para las especie

*Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus faecium* y las dos cepas restantes no mostraron alta concordancia con ninguna especie pero si fueron identificadas como cepas de *Enterococcus spp.*



**Figura 4. 7.** Inoculación de una galería API para la identificación de una cepa de enterococos.

Los datos acerca de la predominancia de una u otra especie en la flora del pollo varía dependiendo del país en donde se realice el estudio, lo cual pone de manifiesto la selectividad de las condiciones tanto de aislamiento como del ambiente para favorecer el desarrollo de una especie o más especies por encima de las otras. Devriese encontró que los enterococos predominantes en aves son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans*. Tejedor-Junco y col., 2005 reportan también la presencia de *E. mundtii* y *E. casseliflavus* en aves y confirman lo visto por Devriese al encontrar a *E. faecalis* como la especie predominante en cepas

aisladas de heces de aves de corral. Por su parte, Quednau y col., 1998 encontraron que, para el pollo de Suecia, *E. faecium* fue la especie más predominante con un 61% del total de enterococos mientras que para el pollo de Dinamarca lo fue con un 29%. En este mismo trabajo se menciona la predominancia de *E. faecalis* en carne de cerdo.

La presencia de enterococos multirresistentes a antibióticos en carne de pollo, que se consume en la ciudad de México, es alarmante. Su aislamiento de la carne de pollo que se comercializa en 3 de las más grandes distribuidoras de la ciudad de México implica riesgos a la salud de los trabajadores que manipulan la carne y de los consumidores quienes ignoran los alcances de estas evidencias aquí mostradas.

## EXTRACCIÓN DE DNA Y DETECCIÓN DE INTEGRONES CLASE 1

Se seleccionaron algunas de las cepas multirresistentes de manera aleatoria pero incluyendo ambos muestreos para realizar la racción de PCR. El criterio de selección fue al azar. A continuación se presentan las características de cada una de ellas:

Tabla . 4.29 Cepas seleccionadas para realizar la reacción de PCR

<b>Muestreo</b>	<b>Identificación</b>	<b>No. de resistencias a antibióticos</b>	<b>Antibióticos</b>
2	A 36	12	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol
1	B 59	12	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol
1	B 11	12	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol
2	A 24	12	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol

2	B 51	12	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol
2	A 4	11	Ampicilina; cefalosporina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, pefloxacina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol

La figura 4.8 muestra la fotografía del gel de agarosa en el cual se observó el resultado de las extracciones de DNA realizadas. La fotografía fue tomada con una apertura del lente de F4.5, usando 7s de disparo en una cámara fotográfica Polaroid DS34 y utilizando una película ASA 100.

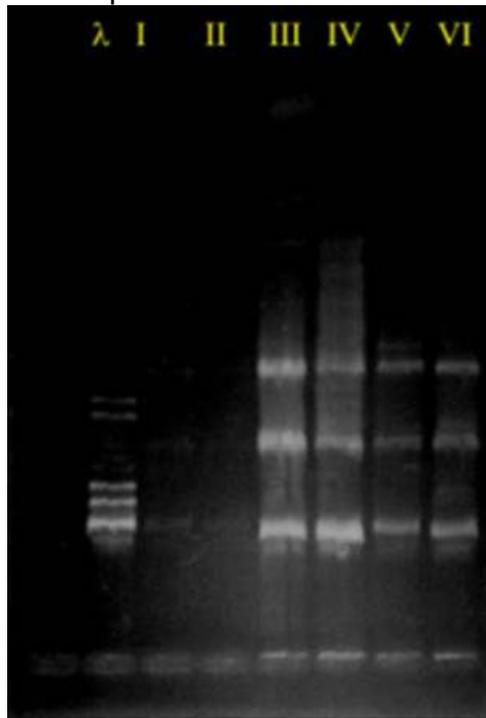


Figura 4.8 Fotografía de gel de agarosa para observar los resultados de la extracción de ADN.

El primer carril corresponde a una muestra blanco, el segundo consta del marcador de pesos moleculares y los seis carriles restantes muestran las extracciones de DNA realizadas a seis muestras distintas, 4 de las cuales mostraron una concentración de DNA tal que permitieron observarlas en el gel. Como se observa en la fotografía, para las últimas 4 extracciones existen tres bandas de DNA claras que corresponden de menor a mayor tamaño al DNA ribosomal, plasmídico y cromosomal. Las bandas no presentaron estela al ser sometidas al voltaje establecido en el protocolo, por lo cual se confirmó su integridad. El DNA se observó íntegro en el gel de agarosa realizado para su observación visual.

En la tabla siguiente se presentan las concentraciones de DNA extraídas de las cepas seleccionadas.

Tabla 4.30. Concentración de DNA de las extracciones realizadas

Número	Muestreo	Identificación	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ )
I	1	A 36	--
II	1	B 59	--
III	1	B 11	0.4
IV	2	A 24	0.4
V	2	B 51	0.4
VI	2	A 4	0.4

La imagen 4.9 muestra la fotografía de las muestras de DNA amplificadas. Se observa que sólo el control positivo fue amplificado y que las muestras no presentaron bandas de amplificación. De acuerdo a la figura 4.8 donde se mostró que la calidad del DNA era íntegro, se concluyó que el DNA extraído no poseía la presencia de integrones de clase 1. Para confirmar esta aseveración, se realizó el procedimiento de la PCR dos veces más y se confirmó la amplificación exclusiva del control positivo, por lo tanto, el DNA de las cepas seleccionadas no poseyó integrones clase 1.

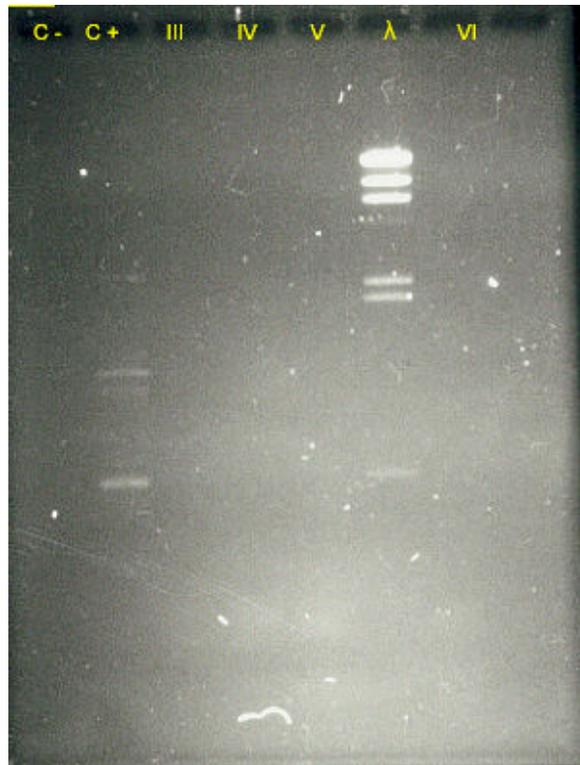


Figura 4.9 Fotografía de gel de agarosa para observar los resultados de la PCR. en donde se muestra la amplificación exclusiva del control positivo.

La detección de integrones clase 1 ya ha sido reportada en bacterias diferentes a enterococos en otros estudios, incluso en cepas con resistencia a un menor número de antibióticos a las estudiadas en este trabajo. Agerso y col. 2005, detectaron la presencia de integrones de clase 1 en 32% del total de aislamientos de bacterias obtenidas de ambientes de granja, entre las cuales se identificaron algunas como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Arthrobacter spp*, *Alcaligenes spp.*, *Pseudomonas spp.* and *Corynebacterium spp*. Todas las cepas que contenían integrones de clase 1 fueron probadas para detectar su sensibilidad a antibióticos. Sus resultados mostraron resistencia de 3 a 9 antibióticos para las cepas aisladas. Además, todas las cepas contenían los genes *tet* de resistencia a tetraciclina, lo cual sirvió como evidencia para afirmar que el uso de tetraciclinas en animales de granja promovía la selección de bacterias resistentes a estos antibióticos y además generaba la aparición de cepas multirresistentes por la diseminación de integrones de clase 1 entre ellas.

En el estudio de White y col., 1999 se determinó la presencia de integrones clase 1 en cuatro diferentes serotipos de *Samonella* que presentaron resistencia de 3 a 9 antibióticos. Todas las cepas con integrón clase 1 presentaban resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol lo cual es importante resaltar pues los integrones clase 1 poseen el gen de resistencia a sulfas dentro de la secuencia conservada 3'CS. Los tamaños de los integrones secuenciados fueron variados dependiendo del número de genes de resistencia que contenían y del tipo de cada uno de éstos y

oscilaron entre 1.0 y 2.0 kb de longitud. De la misma manera, White y col. aseveraron que el uso de promotores de crecimiento en animales de consumo humano provoca la emergencia de bacterias multirresistentes.

La asociación de la multirresistencia a antibióticos y la presencia de integrones clase 1 fue estudiada en otro trabajo efectuado por Álvarez y col. 2003 en el cual se encontró que el 20.3% de enterobacterias aisladas de pacientes de hospital poseían integrones de clase 1 y que este hallazgo se encontraba relacionado con la resistencia a antibióticos como amoxicilina-ácido clavulónico, quinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol. Fue importante su observación acerca de la presencia de integrones como parte de plásmidos conjugativos y no integrando parte del cromosoma, por lo cual la diseminación de integrones clase 1 es altamente probable entre bacterias por conjugación.

Los integrones clase 1 ya han sido reportados también en *E. coli*. De acuerdo al estudio de Zhao y col. 2001, el 19% de aislamientos de *E. coli* presentes en carne de res, heces de humanos y animales presentaron integrones clase 1. Dentro de las cepas estudiadas se encontraba el microorganismo patógeno *E. coli* O157:H7. El tamaño de los amplicones también osciló entre 1.0 a 2.0kb y se comprobó la transferencia del integrón a cepas de *E. coli* O157:H7 no portadoras de este elemento. Por su parte, Roe y col. 2003 detectaron la presencia de integrones clase 1 en *E. coli* aislada de las aguas de riego obtenidas del río Bravo, la frontera natural entre México y Estados Unidos, lo cual representa un peligro

potencial para los habitantes de esa zona y las personas que consumen los productos que se riegan con esas aguas contaminadas.

En este trabajo no se detectó presencia de integrones clase 1 en enterococos; sin embargo, en un estudio llevado a la par a este trabajo se determinó la presencia de ellos en 4 cepas aisladas de hígado y carne molida de pollo obtenidas en la ciudad de México, razón por la cual es relevante continuar con estudios posteriores que permitan consolidar más información acerca de la presencia de estos elementos genéticos en bacterias provenientes de animales de consumo en el país y evidenciar de esta manera las consecuencias del uso de antibióticos como práctica común en los criaderos nacionales.

## 5. CONCLUSIONES

Los enterococos aislados de las muestras de carne de pollo estudiadas se encontraron presentes en una cantidad menor al 7% con respecto al total de microorganismos mesófilos aerobios. De la muestra de pollo de la marca San Antonio se aisló la mayor proporción de enterococos .

Se encontró una amplia distribución de enterococos multirresistentes en las muestras de pollo analizada. De las 146 cepas aisladas, 141(96.6%) fueron resistentes a más de 6 antibióticos (cepas multirresistentes) y 113(77.4%) lo fueron a más de 9 antibióticos.

De acuerdo a la prueba de sensibilidad a antibióticos, se observó una alta resistencia a los antibióticos probados. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de resistencia: 34% para penicilinas (ampicilina), 87% para cefalosporinas (cefotaxima), 63% para aminoglucósidos (gentamicina), 94.5% para quinolonas (pefloxacina), 94% para tetraciclinas (tetraciclina), 19.9% para trimetropim-sulfametoxazol y 90.4% para macrólidos (eritromicina). Los microorganismos aislados presentaron la mayor susceptibilidad a trimetropim-sulfametoxazol y a ampicilina.

Las cepas multirresistentes identificadas correspondieron a *Enterococcus faecium* (6), *Enterococcus gallinarum* (1) y a *Enterococcus spp* (3).

No se detectó la presencia de integrones clase 1 en enterococos multirresistentes a antibióticos.

## 6. REFERENCIAS

AGERSO, Y.; Sandvang, D. Class 1 Integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter* and *Pseudomonas spp.* Isolated from pigsties and manured soil. *App and Env Microb* 2005 71(12): 7941-7947.

ALVAREZ, F.; Rodríguez, T.; Brey, E.; López, C. y Piñeiro, L. Asociación entre integrones de la clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. *Revista española de quimioterapia* 2003; 16(4): 394-7

ANDERSON, A.; McClellan, J.; Rossiter, S. y Angulo, F. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance*, Volume 9, Number 4, 2003

BELDA, W.; De Góes, L.F. Menta, M; Fagundes, L. Activity of five antimicrobial agents invitro against *Neisseria gonorrhoeae*. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro. 2002. 77(6): 661-667.

BENTORCHA, F. De Cespédès, G. Horaud, T. 1991. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:808-812.

BIWATER, R. McConville, M.; Phillips, I.; Shyrock, T. The susceptibility to growth promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005 56(3):538-543

BONTEN, M.; Willems, R. y Weinstein, R. Vancomycin resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. The lancet. Infectious diseases. 2001 Vol. 1

BUTAYE, P.; Van Damme, K.; Devriese, L.; Van Damme, L.; Baele, M.; Lauwers, S. y Haesebrouck, F. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics . International Journal of Food Microbiology 54(2000) 181-187.

CHEEKE, P. Applied animal nutrition. Feed and feeding. Prentice Hall, 2<sup>a</sup> ed. EUA, 1999. pp. 245-248

CHINGWARU, W.; Mpuchane S.F. y Gashe B.A. Journal of Food Protection, Volume 66, Number 6, 1 June 2003, pp. 931-936(6)

CHRISTAKI, E.; Babidis. V.; Florou-Paneri,P.; Kufidis, D y Spais, A. Effect of the dietary inclusion of the growth promoter avoparcin on the performance and carcass characteristics of growing quail. Animal Feed Science Technology 65 (1997) 287-292

CLEVELAND, J.; Montville, T.; Nes, I. y Chikindas, M. Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology 71 (2001) 1-20

CLIFFORED, L. Quinupristin-dalfopristin resistant *E. faecium* on chicken and in human stool specimens. N. Engl J. Med. 2001 345(16): 1155-59

COCCONCELLI, P. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *E. faecalis* during cheese and sausage fermentations. International Journal of Food Microbiology. 88. 2003 315-326

DEVRIESE, M. The genus *Enterococcus* en *The Prokaryotes*. 2n ed Vol II. USA 1992

ERRECALDE, F. Uso de antimicrobianos en animals de consumo. *Producción y sanidad animal* 162. FAO, 2004

ESPARZA, S.; Morfin, R. y Rodríguez. E. Resistencia de los enterococos a los antimicrobianos: implicaciones clínicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 1999;19(5):227-35

FRANZ, C.; Stiles, M.; Schleifer, K y Holzapfel, W. *Enterococci in foods: a conundrum for food safety*. Article in Press 2003. *International Journal of Food Microbiology*.

FUJITA, N. Et al. Letters to editor. First report of the isolation of High-level vancomycin resistance *Enterococcus faecium* from a Patient in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Aug. 1998 p, 2150

GALE, E. *The molecular basis of antibiotics action*. 2n ed. John Wiley and sons. UK 1981. p 548-590

GALLARDO, J. situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 2004. SAGARPA , documento consultado vía Internet en :

[www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitpollo04.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitpollo04.pdf) 14 de mayo de 2006, 16:29pm

GARCIA, j. Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos. *Actualidad. SEM*. 2004; 28: 18-22

GILMORE, M. *The enterococci. Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*. ASM press USA 2002

GOMEZ-BARRETO, D.; Calderón, E.; Rodríguez, R.; Espinosa, L.; Juárez, M. Características clínico-biológicas de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. Salud Pública de México 1999. 41(5): 397-404

GONZÁLEZ, G.; Mella, S.; Zemelman, R.; Bello, H.; Domínguez, M. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Rev Med Chile 2004; 132: 619-626.

GORBACH, S. Antimicrobial use in animal fed. Time to stop. N Eng J Med. 345(16) 2001

GUSTAFSON, R. y Bowen, R. Antibiotic use in animal agriculture. Journal of Applied Microbiology 83 (1997) : 531-541

HARTMAN, P.; Deibel, R. y Sieverding, L. Enterococci en Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3<sup>rd</sup> ed. APHA USA 1992

HAYES, J.; English, L.; Carr, L.; Wagner, D. y Joseph, S. Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. Appl Environ Microbiol. 2004 October; 70(10): 6005–6011

HAYES, J.; English, L.; Carter, P.; Proescholdt, T; Lee, K; Wagner, D y White, D. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. Appl Environ Microbiol. 2003 December; 69(12): 7153–7160.

HERSOM, A. Conservas alimenticias. Acribia. España, 1995. p 68-72 Vol. 4 2003.

JUÁREZ, A. Producción de pollo para carne en México (1980-2002). Estudio descriptivo y análisis de la cadena productiva. Departamento de zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo , documento consultado vía Internet en:

[http://www.cnog.com.mx/Estudios/Estudios/Produccion%20de%20pollo%20para%20carne%20en%20Mexico%20\(1980-2002\).pdf](http://www.cnog.com.mx/Estudios/Estudios/Produccion%20de%20pollo%20para%20carne%20en%20Mexico%20(1980-2002).pdf) 14 mayo de 2006. 17:45 pm

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* 88(2003) 255-262

KHAN, S. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microb and Mol Biol.* 1997, 61(4): 442-455

KLARE, I. Konstabel, C.; Badstübner, D.; Werner, G. y Witte, W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *E. faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. Article in press, 2003.

LECLERCQ,R; Derlot, E.; Duval, J. ; Courvalin, P. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. 1988. *N. Eng.J. Med.* 319:157-161

MORFIN, R.; Esparza, S.; Atilano, G.; Pinto, D.; Heredia, J.; Rodríguez, J. y Rodríguez, E. Tendencias de resistencia en enterococos: 1991- 1999. *Enfermedades infecciosas y microbiología.* 1999; 19(5) 222-226

OMS. Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos 2001 en <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf> (14 abril de 2006).

PALOMARES, J.C.; Torres, J.M. Reacción en cadena de la polimerasa termorresistente. 1992. Universidad de Sevilla, España.

PALUMBI, S. Et al. The simple fool's guide to PCR. University of Honolulu, Hawaii. 1991

PETERS, J.; Mac, K.; Wichmann-Shauer, H.; Klein, G. y Ellerbroek, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 88 (2003) 311-314

PLIEGO, A.; Yáñez, J.; López, T. Bacterias multirresistentes más comunes en un hospital oncológico. *Rev Med IMSS*. 2004; 42(3): 217-226

PUGH, M. The EU precautionary bans of animal feed additive antibiotics. *Toxicology letters* 2002 128: 35-44

QUEDNAU, M.; Ahrné, S., Peterson, A.C.; Molin, G. Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *J of appl. Microb.* 1998 (84): 1163-1170.

REFSDAL, A. To treat or no to treat: a proper use of hormones and antibiotics. *Animal Reproduction Science* 60 61 (2000) 109-119

ROBREDO, B.; Singh, K.; Baquero, F.; Murray, B. Y Torres, C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology* 54 (2000) 197-204

ROE, M.; Vega, E.; Suresh, P. Antimicrobial resistance markers of Class 1 and Class 2 Integron bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerging infectious diseases*. (2003) 9(7):822-826

ROMERO, L. Primeros lugares a dos alumnas de veterinaria. *Gaceta UNAM*.

RUFO, K. The genus *Streptococcus* en *The Prokaryotes Vol. II USA* 1992

SALYERS, A.; Shoemaker, N.; Stevens, A.; Li, L-Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological reviews*. 1995 59(4): 579-590.

SCHOUTEN, M.A.; Voss, A. y Hoogkamp-Korstanje, J.A. Antimicrobial susceptibility patterns of Enterococci causing infections in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999 43;10 p.2542-2546

SORENSEN, T.; Blom, M.; Monnet, D.; Frimodt-Møller, N.; Poulsen, R. Y Espersen, F. Transient Intestinal Carriage after Ingestion of Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecium* from Chicken and Pork. *The New England Journal of Medicine* 345 (2001) : 1161-1166.

TEJEDOR-JUNCO, M.T Afonso-Rodriguez O, Martin-Barrasa JL, Gonzalez-Martin M. Antimicrobial susceptibility of Enterococcus strains isolated from poultry faeces. *Research I Veterinary Science* 78(2005) 33-38

TEUBER, M., L. Meile, and F. Schwarz. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek Int J* 1999, 76:115-137

TING, Y Et al. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular medicine today*. 2000. Vol 6. 309-14

UNIÓN NACIONAL DE AVICULTORES (UNA). <http://www.una.org.mx>

UTTLEY, A.H.; Collins, C.H.; Naidoo, J.; Cocito.; George, C. Vancomycin-resistant enterococci (letter) *Lancet* 1988 1:57-58

VANDERZANT, C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3<sup>rd</sup> ed. APHA USA 1992.

WEGENER, H. Antibiotics in animal feed and their role in resistant development. *Current opinion in Microbiology* 2003, 6: 439-445

WEGENER, H.; Aarestrup, F.; Jensen, L.; Hammerum, A. y Bager, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and E. faecium resistance to

therapeutic antimicrobials drugs in Europe. Emerg Infect Dis. 1999 May-Jun;5(3):329-35.

WHEELOCK, V. Danish bacon. Microbiologist. June 2003.

WITTE, W. Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de las resistencias en las infecciones humanas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1999; 19(2):83-86

WOODFORD, N.; Johnson, A. 1998. Molecular bacteriology, Human Press, USA

YOSHIMURA, H.; Ishimaru, M.; Endoh, Y.; Suginaka, M. y Yamatani, S. Isolation of Glycopeptide-Resistant enterococci from chickens in Japan. Antimicrobial agents and chemotherapy 14; 12(1998) p. 3333

ZHAO, S.; White,D.; Ge, B.; Ayers,S.; Friedman,S.; English, L.; Wagner,D.; Gaines, S.; Meng, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolates. Appl. and Env. Microb. 2001 67(4): 1558-1564

## 7. ANEXO

### MEDIOS DE CULTIVO

#### **Agar para cuenta en placa (OXOID)**

Fórmula	g/L
Extracto de levadura	2.5
Digerido pancreático de caseína	5.0
Glucosa	1.0
Agar	15.0
pH 7.0 ± 0.2	

Suspender 23.5g del polvo en 1L de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### **Agar KF estreptococos(DIFCO)**

Fórmula	g/L
Peptona de proteasa No. 3	10.0
Extracto de levadura	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glicerofosfato de sodio	10.0
Maltosa	20.0
Lactosa	1.0

Azida de sodio	0.4
Púrpura de bromocresol	0.015
Agar	20

pH 7.2 ± 0.2

Hervir por un minuto para disolver el polvo. Caliente 5min adicionales. No lo autoclave. Agregar asépticamente 10mL de una solución de CTT al 1% al medio enfriado a 50°C aproximadamente. Mezclar bien.

### **Infusión de cerebro corazón BHI (BACTO)**

Fórmula	g/L
Cerebro de ternero, infusión 200g	7.7
Corazón de buey, infusión 250g	9.8
Peptona de proteosa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5

pH 7.4 ± 0.2

Suspender 37 g del polvo en 1L de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación constante y hervir por un minuto para completar la disolución del polvo. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### **Agar Mueller-Hinton (DIFCO)**

Fórmula	g/L
Polvo de extracto de carne	2.0
Digerido ácido de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0
pH 7.3 ± 0.1	

Suspender 38g de polvo en 1L de agua purificada. Mezclar bien, calentar con agitación constante y hervir por un minuto hasta disolver perfectamente el polvo. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### **Base para agar Sangre (DIFCO)**

Fórmula	g/L
Peptona de proteosa	15.0
Digerido de hígado	2.5
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	12.0
pH	

Esterilizar a 121 durante 15 minutos. Después de esto, enfriar a 45°C y añadir 5-10% de sangre desfibrinada estéril.





	34	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	--	--	14	9	20	
	35	Pos	++	Neg	Neg												
	36	Pos	++	Neg	Neg	19	--	--	--	--	--	12	--	12	15	24	
	37	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	--	--	--	28	
	38	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	18	--	10	--	30	
	39	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	--	17	--	--	--	20	
	40	Pos	++	Neg	Neg	28	--	--	--	--	19	12	15	14	--	30	
	41	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	17	9	--	--	20	
	42	Pos	++	Neg													
	43	Pos	++	Neg	Neg	32	24	--	17	--	--	13	13	26	--	20	
	44	Pos	++	Neg	Neg												
	45	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	19	--	--	22	32	
	46	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	26	13	--	--	10	32	
	47	Pos	++	Neg	Neg												
	48	Pos	++	Neg	Neg												
	49	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	20	
	50	Pos	++	Neg	Neg	28	28	20	22	26	15	--	13	9	31	9	20
	51	Pos	++	Neg	Neg												
	52	Pos	+	Neg	Neg												
	53	Pos	++	Neg	Neg												
	54	Pos	++	Neg	Neg												
	55	Pos	++	Neg	Neg												
	56	Pos	++	Neg	Neg												
	57	Pos	++	Neg	Neg	17	--	--	--	--	--	14	13	--	25	32	
	58	Pos	++	Neg	Neg												
	59	Neg	--														
	60	Pos	++	Neg	Neg	17	--	--	--	--	27	17	--	13	26	30	
	61	Pos	++	Neg	Neg												
	62	Pos	++	Neg	Neg												
	63	Pos	++	Neg	Neg												
	64	Pos	++	Neg	Neg												
	65	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	25	21	--	--	22	30	
	66	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	--	15	--	--	--	32	
	67	Pos	--	Neg													
	68	Pos	++	Neg	Neg												
	69	Pos	++	Neg	Neg												
	70	Neg	--														
	71	Pos	++	Neg	Neg												
C	72	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	14	18	--	--	--	30	
	73	Pos	++	Neg	Neg												
	74	Pos	++	Neg	Neg												
	75	Pos	++	Neg	Neg	18	--	22	--	--	--	17	--	--	--	20	
	76	Pos	++	Neg	Neg												
	77	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	17	14	--	10	--	42	

	78	Pos	++	Neg	Neg	24	--	--	--	--	--	--	13	--	--	--	20
	79	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	20
	80	Pos	++	Neg	Neg	24	--	24	--	--	--	12	16	8	--	--	20
	81	Pos	++	Neg	Neg												
	82	Pos	++	Neg	Neg												
	83	Pos	++	Neg	Neg												
	84	Pos	++	Neg	Neg	24	--	--	--	--	--	--	19	--	11	10	30
	85	Pos	++	Neg	Neg	19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	30
	86	Pos	++	Neg	Neg												
	87	Pos	++	Neg	Neg												
	88	Pos	++	Neg	Neg	30	--	26	19	34	17	--	--	14	32	--	30
	89	Pos	++	Neg	Neg												
	90	Pos	++	Neg	Neg												
	91	Pos	++	Neg	Neg												
	92	Pos	++	Neg	Neg	34	26	22	17	30	18	8	--	--	--	--	32
	93	Pos	++	Neg	Neg	26	--	18	--	--	--	--	--	9	--	--	32
	94	Pos	++	Neg	Neg												
	95	Pos	++	Neg	Neg	19	--	--	--	--	--	--	14	8	9	--	26
	96	Pos	++	Neg	Neg	18	--	20	--	--	--	--	17	14	--	--	24
	97	Pos	++	Neg	Neg												
	98	Pos	++	Neg	Neg												
	119	Pos	--	Neg	Neg												
	120	Pos	++	Neg	Neg												
	121	Pos	++	Neg	Neg												
	122	Pos	++	Neg	Neg												
	123	Pos	++	Neg	Neg												
	124	Pos	++	Neg	Neg												
	125	Pos	++	Neg	Neg												
	126	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	--	16	--	--	30
	127	Pos	++	Neg	Neg												
	128	Pos	++	Neg	Neg	20	--	18	--	--	--	--	--	18	--	--	20
	129	Pos	++	Neg	Neg												
	130	Pos	++	Neg	Neg												
	131	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	--	15	--	--	--	34
	132	Pos	++	Neg	Neg	13	--	--	--	--	--	--	12	10	--	--	23
	133	Pos	++	Neg	Neg												
	134	Pos	++	Neg	Neg	26	--	22	--	--	--	--	19	--	--	--	18
	135	Pos	++	Neg	Neg												
	136	Pos	++	Neg	Neg	19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	30
	137	Pos	++	Neg	Neg												
	138	Pos	--	Neg	Neg	17	--	--	--	--	--	--	16	12	--	--	30
	139	Pos	++	Neg	Neg	24	--	24	--	--	--	--	18	18	--	--	26
	140	Pos	++	Neg	Neg												
	141	Pos	++	Neg	Neg	26	--	22	--	--	--	--	18	11	--	--	24

	142	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	--	--	12	12	--	--	34
	143	Pos	++	Neg	Neg												
	144	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	--	15	--	--	--	35
	145	Pos	++	Neg	Neg												
	146	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	--	17	9	--	--	34
	147	Pos	++	Neg	Neg												
	148	Pos	++	Neg	Neg	20	--	22	--	--	--	--	16	16	--	--	35
	149	Pos	++	Neg	Neg												
	150	Pos	++	Neg	Neg												
	151	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	--	--	--	13	--	--	35
	152	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	--	19	--	--	--	34
	153	Pos	++	Neg	Neg												
	154	Pos	++	Neg	Neg												
	155	Pos	++	Neg	Neg												
	156	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	--	17	10	12	--	35
	157	Pos	++	Neg	Neg												

GRAM: Tinción de Gram; POS: prueba positiva; BHI 6.5% NaCl: Crecimiento en caldo BHI con 6.5% de NaCl; HEM: hemólisis; CAT: prueba de la catalasa; AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

## ANEXO III

### SEGUNDO MUESTREO

Tabla 4.4. Resultados de las pruebas confirmativas y de sensibilidad a antibióticos de las cepas del segundo muestreo

IDENTIFICACIÓN		PRUEBAS CONFIRMATIVAS				SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS (HALO DE INHIBICION EN mm )											
Muestra	# de cepa	GRAM	BHI 6.5% NaCl	HEM	CAT	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT
A	1	Pos	--														
	2	Pos	++	Neg	Neg												
	3	Pos	++	Neg	Neg	19	12	--	--	--	--	--	--	--	14	--	--
	4	Pos	++	Neg	Neg												
	5	Pos	++	Neg	Neg	19	11	--	--	--	--	--	8	--	14	--	--
	6	Pos	++	Neg	Neg												
	7	Pos	++	Neg	Neg												
	8	Pos	++	Neg	Neg	21	12	--	--	--	--	--	--	10	13	--	22
	9	Pos	++	Neg	Neg												
	10	Pos	++	Neg	Neg	13	--	--	--	--	--	--	12	--	--	--	25
	11	Pos	++	Neg	Neg												
	12	Pos	++	Neg	Neg	20	10	--	--	--	--	--	--	--	11	--	24
	13	Pos	++	Neg	Neg												
	14	Pos	++	Neg	Neg												
	15	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	14	11	--	10	24
	16	Pos	++	Neg	Neg												
	17	Pos	++	Neg	Neg	30	--	--	--	--	--	15	18	14	--	24	24
	18	Pos	++	Neg	Neg												
	19	Pos	++	Neg	Neg												
	20	Pos	++	Neg	Neg	13	--	--	--	--	--	--	12	12	8	--	19
	21	Pos	++	Neg	Neg												
	22	Pos	++	Neg	Neg	21	14	--	--	--	--	--	8	--	15	7	20
	23	Pos	++	Neg	Neg												
	24	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	11	--	--	--	--
	25	Pos	++	Neg	Neg												
	26	Pos	++	Neg	Neg												
	27	Pos	++	Neg	Neg	24	14	--	--	--	--	--	--	11	14	--	20
	28	Pos	++	Neg	Neg												
	29	Pos	++	Neg	Neg	23	13	--	--	--	--	--	--	13	16	9	19
	30	Pos	++	Neg	Neg												
	31	Pos	++	Neg	Neg												
	32	Pos	++	Neg	Neg	30	20	16	--	--	--	--	14	--	16	--	25

	33	Pos	++	Neg	Neg												
	34	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	13	--	--	--	--	
	35	Pos	++	Neg	Neg												
	36	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	12	8	--	--	28	
	37	Pos	++	Neg	Neg												
	38	Pos	++	Neg	Neg												
	39	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	14	--	--	8	--	
	40	Pos	++	Neg	Neg												
	41	Pos	++	Neg	Neg	22	16	--	--	--	--	9	12	15	9	26	
	42	Pos	++	Neg	Neg												
	43	Pos	++	Neg	Neg												
	44	Pos	++	Neg	Neg	22	14	--	--	--	--	11	15	16	10	24	
	45	Pos	++	Neg	Neg												
	46	Pos	++	Neg	Neg	24	14	--	---	--	--	--	--	17	10	--	
	47	Pos	++	Neg	Neg												
	48	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	
	49	Pos	++	Neg	Neg												
	50	Pos	--														
B	51	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	7	--	10	--	
	52	Pos	++	Neg	Neg												
	53	Pos	++	Neg	Neg												
	54	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	23	11	--	--	25	
	55	Pos	++	Neg	Neg												
	56	Pos	--														
	57	Pos	++	Neg	Neg	26	14	--	--	--	--	8	11	16	11	--	
	58	Pos	++	Neg	Neg												
	59	Pos	++	Neg	Neg	12	--	--	--	--	--	10	--	--	--	--	
	60	Pos	++	Neg	Neg												
	61	Pos	++	Neg	Neg	19	13	--	--	--	--	--	11	15	--	12	
	62	Pos	++	Neg	Neg												
	63	Pos	++	Neg	Neg	20	12	--	--	--	--	--	12	12	--	20	
	64	Pos	++	Neg	Neg												
	65	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	12	--	--	--	28	
	66	Pos	++	Neg	Neg												
	67	Pos	++	Neg	Neg	23	14	--	--	--	--	--	13	17	--	--	
	68	Pos	++	Neg	Neg												
	69	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	18	--	--	--	--	
	70	Pos	++	Neg	Neg												
	71	Pos	++	Neg	Neg	23	12	--	--	--	--	8	10	15	--	26	
	72	Pos	++	Neg	Neg												
	73	Pos	++	Neg	Neg	12	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	
	74	Pos	++	Neg	Neg												
	75	Pos	--														
	76	Pos	++	Neg	Neg	25	15	--	--	--	--	8	11	15	9	21	

	77	Pos	++	Neg	Neg												
	78	Pos	++	Neg	Neg												
	79	Pos	++	Neg	Neg	20	15	--	--	--	--	--	10	12	14	9	25
	80	Pos	++	Neg	Neg												
	81	Pos	++	Alfa	Neg	25	14	--	--	--	--	--	10	15	9	19	
	82	Pos	++	Alfa	Neg												
	83	Pos	--														
	84	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	--	12	--	--	--	24
	85	Pos	++	Neg	Neg												
	86	Pos	++	Neg	Neg												
	87	Pos	++	Neg	Neg	15	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
	88	Pos	++	Neg	Neg												
	89	Pos	--														
	90	Pos	--														
	91	Pos	++	Neg	Neg	25	14	--	--	--	--	--	12	11	18	10	21
	92	Pos	++	Neg	Neg												
	93	Pos	++	Neg	Neg	25	18	24	--	--	--	16	11	--	13	--	26
	94	Pos	++	Neg	Neg												
	95	Pos	++	Neg	Neg	13	--	--	--	--	--	--	12	--	--	9	30
	96	Pos	++	Neg	Neg												
	97	Pos	++	Neg	Neg												
	98	Pos	++	Neg	Neg												
	99	Pos	+	Neg	Neg												
	100	Pos	++	Neg	Neg	23	13	--	--	--	--	--	10	18	10	24	
C	101	Pos	++	Neg	Neg												
	102	Pos	++	Neg	Neg	20	--	--	--	--	--	9	14	--	--	12	26
	103	Pos	++	Neg	Neg												
	104	Pos	++	Neg	Neg	32	24	24	--	--	--	--	10	21	-	20	
	105	Pos	++	Neg	Neg												
	106	Pos	--														
	107	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	--	13	13	--	--	22
	108	Pos	++	Neg	Neg												
	109	Pos	++	Alfa	Neg	17	--	--	--	--	--	--	13	14	--	--	24
	110	Pos	++	Neg	Neg												
	111	Pos	++	Neg	Neg	22	14	--	--	--	--	19	8	12	15	8	19
	112	Pos	++	Neg	Neg												
	113	Pos	++	Neg	Neg	24	14	--	--	--	--	18	11	12	12	--	18
	114	Pos	--														
	115	Pos	++	Neg	Neg	17	--	26	--	--	--	26	14	12	--	--	30
	116	Pos	++	Neg	Neg												
	117	Pos	--														
	118	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	26
	119	Pos	++	Neg	Neg												
	120	Pos	++	Neg	Neg	26	16	--	--	--	--	22	--	11	15	--	25

	121	Pos	++	Neg	Neg												
	122	Pos	++	Neg	Neg	24	--	--	--	--	--	22	12	--	13	40	
	123	Pos	++	Neg	Neg												
	124	Pos	++	Neg	Neg												
	125	Pos	++	Neg	Neg												
	126	Pos	++	Neg	Neg	24	13	--	--	--	--	11	14	15	--	26	
	127	Pos	++	Neg	Neg												
	128	Pos	++	Neg	Neg												
	129	Pos	++	Neg	Neg	22	--	--	--	--	--	13	11	--	--	32	
	130	Pos	++	Neg	Neg												
	131	Pos	++	Neg	Neg	17	--	--	--	--	--	27	12	10	--	29	
	132	Pos	++	Neg	Neg												
	133	Pos	++	Neg	Neg												
	134	Pos	++	Neg	Neg												
	135	Pos	++	Neg	Neg	14	--	--	--	--	--	13	--	--	--	28	
	136	Pos	++	Neg	Neg												
	137	Pos	++	Neg	Neg	22	14	--	--	--	--	9	12	15	12	25	
	138	Pos	++	Neg	Neg												
	139	Pos	++	Neg	Neg												
	140	Pos	++	Neg	Neg	26	22	24	15	26	14	--	--	15	28	--	
	141	Pos	++	Neg	Neg												
	142	Pos	++	Neg	Neg	18	--	--	--	--	--	12	12	12	--	24	
	143	Pos	++	Neg	Neg												
	144	Pos	++	Neg	Neg	24	14	--	--	--	--	19	9	11	12	8	
	145	Pos	++	Neg	Neg												
	146	Neg	--														
	147	Pos	++	Neg	Neg	21	13	--	--	--	--	12	12	13	13	12	
	148	Pos	++	Neg	Neg												
	149	Pos	++	Neg	Neg												
	150	Pos	++	Neg	Neg	16	--	--	--	--	--	12	12	--	--	25	

GRAM: Tinción de Gram; POS: prueba positiva; BHI 6.5% NaCl: Crecimiento en caldo BHI con 6.5% de NaCl; HEM: hemólisis; CAT: prueba de la catalasa; AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

# ANEXO IV

## ANTIBIOGRAMAS

Tabla 4.5. Resultados de la interpretación del antibiograma de las cepas del primer muestreo.

IDENTIFICACIÓN		INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS														
Muestra	# cepa	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	STX	TOT		
A	A2	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10		
	A4	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	11		
	A6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11		
	A9	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	A11	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	10	
	A14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	
	A16	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	A18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	A21	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	10	
	A23	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	A26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	
	A28	MS	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	10	
	A30	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	
	A33	MS	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	9	
	A35	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	A38	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	A40	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
A42	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	10		
A45	MS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	9		
A47	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11		
B	7	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	9	
	8	MS	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	R	S	7	
	9	MS	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	
	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	12	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	10	
	14	MS	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	8	
	16	MS	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	10	
	17	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	10	
	20	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	9	
	22	MS	R	MS	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	8	
	24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	25	MS	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	
	27	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	10
	29	MS	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	6	
	30	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	
	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11
	36	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	9
37	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
38	MS	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	9	

	39	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	40	MS	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	8
	41	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	43	MS	R	R	I	R	R	R	I	R	MS	R	S	7
	45	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	8
	46	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	9
	49	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	50	MS	S	S	S	S	S	R	I	R	MS	R	S	3
	57	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	8
	60	MS	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	7
	65	MS	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	7
	66	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	72	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	9
	75	MS	R	MS	R	R	R	R	S	R	R	R	S	8
	78	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9
	79	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	80	MS	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	8
	84	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	85	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	88	MS	R	S	S	S	S	R	R	R	MS	R	S	5
	92	MS	S	MS	I	S	S	R	R	R	R	R	S	5
	93	MS	MS	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	S	9
	95	MS	R	MS	R	R	R	R	I	R	R	R	S	8
	96	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9
C	119	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	120	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	122	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	124	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	125	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	126	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	10
	128	MS	R	MS	R	R	R	R	R	I	R	R	S	8
	131	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	132	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9
	134	MS	R	MS	R	R	R	R	S	R	R	R	S	8
	136	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	138	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	139	MS	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	7
	141	MS	R	MS	R	R	R	R	S	R	R	R	S	8
	142	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9
	144	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	146	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	148	MS	R	MS	R	R	R	R	S	I	R	R	S	7
	151	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	152	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	156	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9

R: Resistente; S: Sensible; MS: Medianamente Sensible; I: Intermedio; AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

**Tabla 4.6. Resultados de la interpretación del antibiograma de las cepas del segundo muestreo**

IDENTIFICACIÓN		INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS														
Muestra	# cepa	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	STX	TOT		
A	3	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11		
	5	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11		
	8	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10		
	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	
	12	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	15	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	10	
	17	MS	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	7	
	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11
	22	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	27	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	29	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	32	MS	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	8
	34	MS	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	10	
	36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	39	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	11	
	41	MS	I	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	8	
	44	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	I	MS	R	S	8	
46	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	10		
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12		
B	51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12		
	54	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	9		
	57	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	10		
	59	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12		
	61	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	I	9		
	63	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
	65	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	
	67	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	10	
	69	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	10	
	71	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	73	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	76	MS	I	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	8	
	79	MS	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	9	
	81	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	84	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11
	87	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	
	91	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9	
	93	MS	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	7	
95	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	10		
100	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10	
C	102	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9		
	104	MS	S	S	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	7		
	107	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	10	
	109	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	9	
	111	MS	R	R	R	R	R	S	R	R	MS	R	S	8		
	113	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	9	
	115	MS	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	7	
	118	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
120	MS	I	R	R	R	R	R	S	R	R	MS	R	S	7		

	122	MS	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9
	126	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9
	129	MS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	9
	131	MS	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	9
	135	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	10
	137	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	9
	140	MS	S	S	I	S	S	R	R	I	MS	R	R	4
	142	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	144	MS	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	9
	147	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	10
	150	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11

R: Resistente; S: Sensible; MS: Medianamente Sensible; I: Intermedio; AM: ampicilina; CF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; DC: dicloxacilina; E: eritromicina; GE: gentamicina; PEF: pefloxacina; PE: penicilina; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol