

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO COMPARATIVO DE BACTERIAS MULTIRESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS  
PRESENTES EN LA CARNE DE POLLO DE GRANJA Y POLLO DE  
CRIADERO”

TESIS QUE

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA  
SARA CECILIA JIMÉNEZ MELGAR

MÉXICO, D. F

2007



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: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Vocal: Q.F.B Eduardo Bonilla Espinosa

Secretario: Profa. Beatriz De Guadalupe Serrano López

1er Suplente: Q.F.B Alejandro Camacho Cruz

2do suplente: Dr. Maria Elena Ibarra Rubio

Anexo laboratorio 1-A Microbiología Molecular. Edificio A

Cd. Universitaria, Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema: Dr. Jesus Fernando Montiel

Aguirre\_\_\_\_\_

Supervisor Técnico: M. en C. Raquel Ortega

Muñoz\_\_\_\_\_

Sustentante: Sara Cecilia Jiménez

Melgar\_\_\_\_\_

*Mamá*

*Gracias por haberme regalado un poco de ti, juntas logramos que se cumpliera el sueño de empezar a crecer, esto es un pequeño regalo que te mereces por todo lo que me has dado.*

*Mamá Sarita, Pepita*

*Gracias por todo el apoyo y las enseñanzas que me han dado día a día, las vivencias y experiencias que hacen que sean inolvidables.*

*Alma*

*Gracias por crecer a mi lado, enseñarme tantas cosas y apoyarme como mi hermana.*

*Dios*

*Gracias por mantenerme viva, darme la capacidad y la oportunidad de dar un paso más en mi vida.*

*Las amo!!!!*



## 1. Contenido

1. Contenido.....	3
2. Resumen.....	6
3. Introducción .....	8
3.1 Problemas de la industria alimentaria.....	10
3.2 ¿Qué son los antibióticos?.....	12
3.2.1 ¿Cómo actúan los antibióticos?.....	12
3.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos.....	13
3.2.3 Clasificación de los antibióticos .....	13
3.3 Antibióticos como promotores del crecimiento.....	18
3.3.1 Principios generales de uso como aditivos para promover el crecimiento.....	19
3.3.2 ¿Cómo funcionan los antibióticos como promotores del crecimiento?.....	19
3.3.3 Factores determinantes para el uso de antibióticos como promotores del crecimiento.....	20
3.3.4 Posibles mecanismos de acción como promotores del crecimiento.....	22
3.3.5 Efectos de los antibióticos como promotores del crecimiento.....	23
3.4 Resistencia a los antibióticos.....	24
3.4.1 Tipos de resistencia.....	26
3.4.2 Bases bioquímicas de la resistencia.....	28
3.4.3 Resistencia a los diferentes tipos de antibióticos.....	29
3.5 Material genético involucrado en resistencia a antibióticos.....	31
3.5.1 Elementos genéticos.....	31
3.5.2 Estructura y clasificación de los integrones.....	32
3.5.3 Asociación integrón-cassettes genéticos de resistencia.....	35
3.7 Justificación.....	36
4. Hipótesis.....	37
5. Objetivos .....	37
5.1 Objetivos generales.....	37
5.2 Objetivos particulares.....	37



6. Metodología.....	38
6.1 Toma de muestras.....	38
6.2 Extracción de bacterias a partir de carne de muslo de pollo.....	40
6.3 Determinación de la morfología macro y microscópica de las diferentes colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos.....	42
6.4 Prueba de sensibilidad microbiana.....	43
6.5 Extracción de ADN a partir de cepas aisladas de carne de pollo de los diferentes muestreos.....	44
6.6 Identificación de secuencias por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	46
6.7 Identificación bacteriana.....	48
7. Resultados.....	49
7.1 Primer aislamiento de bacterias de muslo de pollo de criadero.....	49
7.1.1 Características macro- y microscópicas.....	51
7.1.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	53
7.1.3 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero (primer muestreo).....	58
7.2 Segundo aislamiento de carne de pollo de criadero.....	60
7.2.1 Aislamiento de bacterias de muslo de pollo de criadero.....	60
7.2.2 Características macro- y microscópicas.....	62
7.2.3 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	64
7.2.4 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero (segundo muestreo).....	66
7.3 Aislamiento de microorganismos de carne de pollo de granja.....	67
7.3.1 Características macro- y microscópicas.....	68
7.3.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	70
7.3.3 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de granja (primer muestreo).....	71
7.4 Segundo aislamiento de bacterias de muslo de pollo de granja.....	72
7.4.1 Características macro- y microscópicas.....	74
7.4.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	76
7.4.3 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de granja (segundo muestreo).....	78



7.5	Identificación de secuencias específicas de ADN por PCR.....	79
7.6	Identificación bacteriana.....	81
8.	Discusión.....	83
9.	Conclusiones.....	91
10.	Anexos.....	92
	Anexo I. Medios selectivos para aislamiento de Enterobacterias.....	92
	Anexo II. Preparación del medio de cultivo adicionado con antibióticos.....	94
	Anexo III. Sensidiscos Bio-Rad.....	96
	Anexo IV. Protocolo general para extracción de ADN total (Palumbi, et al. 1991).....	97
	Anexo V. Cálculos para la determinación de los pesos moleculares.....	100
	Anexo VI. Pruebas bioquímicas.....	103
	Prueba de citrato.....	103
	Prueba de catalasa.....	105
	Prueba descarboxilasa (lisina-ornitina-arginina).....	106
	Prueba del ácido sulfhídrico.....	108
	Prueba del indol.....	111
	Prueba de agar hierro de Kligler/azúcar triple y hierro.....	112
	Prueba de malonato.....	118
	Prueba rojo de metilo.....	119
	Prueba de movilidad.....	120
	Prueba ureasa.....	120
	Prueba Voges-Proskauer.....	122
11.	Referencias.....	123







## 2. Resumen

La dieta del ser humano se completa con el consumo de productos animales, adquiriendo de éstos diversos nutrientes. Debido a lo importante que son estos alimentos, se han realizado investigaciones que arrojan información tanto nutrimental, funcional, microbiológica y, como sería en este caso, sobre microorganismos patógenos resistentes a agentes antimicrobianos.

Los animales de producción alimentaria son portadores de microorganismos que pueden desarrollar enfermedades en el ser humano y no necesariamente afectar sólo a dichos animales. Estas bacterias pueden desarrollar resistencia si son expuestas a drogas antimicrobianas administradas al animal. Desde hace más de 50 años, los antimicrobianos se han utilizado en el alimento de los animales destinados para el consumo humano, teniendo un propósito no terapéutico con el fin de promover el crecimiento e incrementar los beneficios nutricionales de la alimentación animal.

En este estudio se trabajó con dos tipos de muestras de carne de pollo: de granja y de criadero. Se investigó si la carne de pollo de criadero tiene una mayor cantidad de bacterias resistentes a antibióticos ya que se presume que en su alimentación se emplean antibióticos como promotores del crecimiento; en cambio, en la carne de pollo de granja se esperaría una menor proporción de bacterias multiresistentes ya que es menos factible que en su alimentación se le suministren antibióticos. Sin embargo, por



el proceso de alimentación y por una contaminación de suelos en donde éstos animales se desarrollan continúa existiendo la posibilidad de encontrar bacterias multiresistentes, tal y como ocurrió en este caso.

Se estudió la resistencia de las bacterias aisladas con una serie de antimicrobianos que se emplean en humanos y animales seguido de pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias y finalmente se realizó un estudio de tipo biológico molecular para poder determinar algunas de las posibles causas por las cuales se adquiere la resistencia al antimicrobiano.



### 3. Introducción.

La dieta del ser humano se basa considerablemente en el consumo de animales, adquiriendo de éstos diversos nutrientes. Debido a lo importante que son estos alimentos, se han realizado investigaciones que aportan una información muy importante tanto nutrimental, funcional, microbiológica y, como sería este caso en particular, la presencia de microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos.

Es importante mencionar que se han realizado diversos estudios sobre la microbiología de carnes (pescado, res, cerdo, pollo, etc.), es decir, el aislamiento e identificación de microorganismos provenientes del producto ya que al tener dichos microorganismos contacto con el ser humano pueden ocasionar resultados adversos a la salud. Los animales de producción alimentaria son portadores de microorganismos que pueden desarrollar enfermedades en el ser humano y no necesariamente afectar sólo a dichos animales, como es el caso de *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* H7:O157. Estas bacterias pueden desarrollar resistencia si son expuestas a sustancias antimicrobianas administradas al animal. Los antimicrobianos se han utilizado en el alimento de los animales destinados para el consumo humano, teniendo un propósito no terapéutico con el fin de promover el crecimiento e incrementar los beneficios nutricionales de la alimentación animal.

Para esta investigación, la resistencia a antimicrobianos en patógenos presentes en alimentos es un asunto sanitario muy importante, ya que se está obteniendo información mediante la investigación de los cambios en la resistencia de las bacterias frente a los antimicrobianos usados en tratamientos animales y humanos.



En este estudio se trabajó con dos tipos de muestras de carne de pollo: de granja y de criadero. Se investigó si la carne de criadero tiene una mayor cantidad de bacterias multiresistentes ya que se presume que en la alimentación de los animales de criadero se emplean antibióticos como promotores del crecimiento; en cambio, en la carne de pollo de granja se esperaría una menor proporción de bacterias multiresistentes ya que es menos factible que en su alimentación se le suministren antibióticos. Sin embargo, por el proceso de alimentación y por una contaminación de suelos en donde éstos animales crecen, existe la posibilidad de encontrar bacterias multiresistentes.

Se estudió la resistencia de las bacterias aisladas con una serie de antimicrobianos que se emplean en humanos y animales, seguido de pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias y, finalmente, se hizo un estudio de tipo biológico molecular para poder determinar algunas de las posibles causas por las cuales se adquiere la resistencia al antimicrobiano.



### **3.1 Problemas de la industria alimentaria**

En los últimos tiempos las enfermedades de transmisión alimentaria constituyen uno de los problemas de salud pública por lo general más difundidos y se reconoce cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud y la economía. Estas enfermedades son atribuidas a una amplia gama de agentes. De hecho, sólo una pequeña proporción de las enfermedades transmitidas por los alimentos se notifica a los servicios de salud, y se llevan a cabo investigaciones sobre un número aún inferior. Se estima que la incidencia notificada de estas enfermedades en países desarrollados representa menos del 10 por ciento (en algunos casos tal vez menos del 1 por ciento) de la incidencia real. Hay motivos que llevan a pensar que en los países en desarrollo se notifica a las autoridades sanitarias una proporción de casos aún inferior, debido principalmente a la pobreza y la escasez de recursos a disposición de los servicios de gestión de la inocuidad alimentaria y de inspección de alimentos.<sup>1</sup>

Por lo general se considera que los nuevos problemas planteados por los alimentos, o los problemas de este tipo de reciente reaparición, son aquéllos que:

- Han aparecido recientemente en una población.
- Se han extendido a nuevos vehículos de transmisión.
- Ya existían en el pasado pero por varios motivos, por ejemplo, factores ambientales, demográficos o de producción alimenticia su incidencia o alcance geográfico aumentan rápidamente.



- Están generalizados desde hace muchos años pero se han identificado sólo recientemente gracias a los nuevos o mayores conocimientos o métodos de identificación y análisis de los agentes etiológicos.<sup>2-3</sup>

En este estudio tomamos en cuenta los siguientes factores que desempeñan una función importante en la epidemiología de los nuevos problemas relacionados con los alimentos:

*Cambios en los propios patógenos.* La adaptación microbiana a través de la selección natural es un proceso clave para la aparición de los patógenos y el uso terapéutico de un agente antimicrobiano en las poblaciones ya sea humanas o animales, crea una presión selectiva que favorece la supervivencia de cepas bacterianas resistentes a aquel agente.<sup>2, 4</sup>

*Medicamentos veterinarios.* Últimamente, sin embargo, se ha manifestado una creciente preocupación acerca del desarrollo de resistencia a los medicamentos antimicrobianos. Algunos factores importantes que han contribuido al desarrollo de esta resistencia son el uso generalizado de medicamentos veterinarios, su utilización indebida y su administración en bajas dosis a los animales por vía alimentaria, con objeto de promover aumentos de peso y de mejorar la eficacia de los piensos. Algunos de estos microorganismos resistentes pueden penetrar en el ser humano cuando éste consume alimentos derivados de animales que los hospedaban. Además, el desarrollo de la resistencia puede llevar igualmente a la administración de dosis terapéuticas cada vez mayores a los animales que producen alimentos.<sup>1, 28</sup>



*Límite máximo residual (LMR) de un antibiótico.* Los antibióticos suministrados pueden originar la presencia de residuos en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano. El tejido muscular, grasa, hígado y riñón son órganos en donde se depositan mayoritariamente los residuos de antibióticos; la toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad hasta la ocurrencia de consecuencias clínicas.

El LMR es la concentración aceptable de una sustancia en los tejidos comestibles de un animal y que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para la salud.<sup>3</sup>

### **3.2 ¿Qué son los antibióticos?**

Un antibiótico es una sustancia dotada de actividad antibacteriana, originada de seres vivos (microorganismos, hongos, etc.) aunque en la actualidad se obtienen de manera sintética.<sup>20</sup>

#### **3.2.1 ¿Cómo actúan los antibióticos?**

El efecto del antibiótico se expresa de dos formas:

- a) Lisis o muerte del microbio
- b) Inhibición de su crecimiento y reproducción

En el primer caso, la lisis o muerte se denomina efecto bacteriolítico o bactericida, mientras que la inhibición (inmovilización vital), actúa como efecto bacteriostático.

De ahí los dos grandes grupos de antibióticos: bactericidas y bacteriostáticos.<sup>50</sup>



### **3.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos**

Las bacterias son microorganismos que se caracterizan por su sencillez estructural: no poseen membrana nuclear, mitocondrias, sistema retículo endoplásmico, ni aparato de Golgi; por esta razón se les denomina células procarióticas.<sup>21</sup>

Los componentes estructurales básicos de una bacteria se pueden dividir de la siguiente forma: material genético, citoplasma, membrana citoplásmica, envoltura externa.

Los mecanismos de acción de los diferentes antimicrobianos sobre diferentes estructuras bacterianas son los siguientes<sup>20</sup>

1. Síntesis de la pared celular
2. Funcionamiento de la membrana citoplásmica
3. Síntesis de proteínas
4. Funcionamiento de los ácidos nucleicos

### **3.2.3 Clasificación de antibióticos.**

Los antibióticos se clasifican según su mecanismo de acción.

- Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana (penicilina, ampicilina, cefalosporinas, bacitracina, vancomicina).

La estructura de la pared celular (mucopéptidos) lo constituye la unión tridimensional de péptidos, acetilglucosamina y acetilmurámico. Los microorganismos gram positivos contienen 40-90% de muramilpéptido, los gram negativos sólo 4-10%.<sup>50</sup>





Las penicilinas y las cefalosporinas poseen como característica común en su estructura química, un anillo tiazolidínico para penicilinas y un anillo dihidrotiazina para cefalosporinas unidos a un anillo betalactámico, a los que se unen cadenas laterales, que son responsables de las propiedades farmacológicas y antimicrobianas.<sup>21</sup> Impide la unión química de las diversas estructuras del mucopéptido, el sostén de la pared bacteriana, por lo que, bajo estas circunstancias, la célula bacteriana no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla. Por esta razón, son antibióticos bactericidas y los microorganismos grampositivos son lo más susceptibles porque tienen un alto contenido de muramilpéptidos.<sup>55</sup>

El punto de acción de los beta-lactámicos es la capa de peptidoglicanos que componen la pared celular de las bacterias. Todos los derivados beta-lactámicos tienen su acción en la fase final de la polimerización de la estructura de la pared, ya que se unen a las enzimas implicadas en la fase final de formación de la pared celular. A estas enzimas se les conoce como proteínas enlazadoras de penicilina o PBPs.<sup>59</sup>

- Antibióticos que actúan sobre la membrana celular (polimixina, colistina, anfotericina, nistatina)

Éste grupo de antibióticos son más tóxicos, como las polimixinas que se unen a la superficie externa de la membrana citoplásmica, alterando su estructura y propiedades osmóticas por desplazamiento del magnesio y del calcio, desarreglando los componentes fosfolípidicos y lipopólisacáridos. Los polienos, que actúan inhibiendo el crecimiento de organismos cuyas membranas contienen esteroides.<sup>21</sup>



Los antibióticos pueden alterar la permeabilidad actuando como detergentes catiónicos y provocando la salida de sustancias del interior de la célula; su afinidad por los radicales fosfatos de la membrana altera la osmolaridad celular.<sup>50</sup>

- Antibióticos que interfieren en la síntesis proteica (cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, rifamicina, amikacina, aminoglicosídicos)

Este grupo de antibióticos inhibe por diversos mecanismos la síntesis de las cadenas polipeptídicas; los aminoglicosídicos producen específicamente anomalías en la lectura del código genético, originando proteínas erróneas.<sup>53</sup>

Los ribosomas constituyen el sitio sobre el que se efectúa la síntesis de proteínas; los ribosomas bacterianos pueden disociarse en las subunidades 30S y 50S. La eritromicina, los nuevos macrólidos, azalidos, lincocinamidas y clornafenicol se unen a la subunidad 50S. La tetraciclina, los aminociclitoles (aminoglúcidos) como la estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, isepamicina y netilmicina se unen a la subunidad 30S.<sup>57</sup>

- Antibióticos que impiden la síntesis de ácidos nucleicos (novobiocina, griseofulvina, ácido nalidíxico, rifampicina)

La replicación del ADN es necesaria para transmitir los caracteres hereditarios y se efectúa por intermedio de una ADN polimerasa, mientras que la transcripción se efectúa por la ARN polimerasa. Este grupo de antibióticos bloquea la síntesis de ADN e interfieren en la síntesis de ARN bloqueando la transcripción del mensaje genético.<sup>55</sup>



La mitomicina, cuando actúa sobre células susceptibles y a través de un mecanismo enzimático, se transforma en una hidroquinona altamente reactiva que funciona como un agente alquilante, esto conduce a entrecruzamientos covalentes entre las cadenas complementarias.<sup>21</sup>

Por otro lado, se ha tenido un gran desarrollo de los derivados del ácido quinolincarboxílico. La girasa del ADN es una enzima que tiene la capacidad de introducir un superenrollamiento negativo en el ADN bacteriano, siendo asimismo, responsable del “empacamiento” de ADN circular en un espacio mínimo en el interior de la célula. Algunas de las múltiples funciones de la ADN girasa son afectadas como resultado de la acción intracelular de los fármacos quinolónicos incluyendo la inhibición de la replicación del ADN.<sup>30</sup>

En los gram negativos, las quinolonas se comportan como agentes quelantes para los cationes divalentes de la membrana externa, desorganizando la capa de lipopolisacárido y probablemente a las porinas.<sup>62</sup>

- Antibióticos que actúan por antagonismo

Las enzimas microbianas pueden ser inhibidas por sustancias que posean una estructura similar a la del sustrato natural, combinándose de tal manera que se impida la reacción catalítica normal. Los inhibidores de éste tipo pueden ser análogos a diversos factores de crecimiento como vitaminas y aminoácidos, como son las sulfonamidas, trimetoprim e isoniacida.<sup>5,6</sup>



ACTIVIDAD DE LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS \*

<b>Bactericidas</b>	<b>Bactericida-bacteriostático</b>	<b>Bacteriostáticos</b>
<b>Actúan sobre pared celular</b> Penicilinas Vancomicinas cicloserina	Cefalosporinas Fosfomicina bacitracina	Quinolonas Rifamicinas Griseofulvina
<b>Actúan sobre membrana celular</b> Anfotericina Nistatina	Polimixinas Quinolonas	<b>Actúan sobre ribosomas</b> Macrólidos Tetraciclinas Cloranfenicol Lincocinamidas
<b>Actúan sobre ribosomas</b> Aminoglucósidos Macrólidos		<b>Actúan sobre folatos</b> Sulfonamidas Isoniazida Nitrofuranos
<b>Actúan sobre ADN</b> Quinolonas	Rifamicinas	

\* Ernesto Calderón Jaimes. “**Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos**”

Décima edición, 2004. Méndez Editores, México.



### **3.3 Antibióticos como promotores del crecimiento.**

Los antibióticos son añadidos comúnmente a niveles no terapéuticos o a dosis bajas en el alimento de los animales de crianza, teniendo como efecto aumentar la productividad animal fundamentalmente al promover el crecimiento, aunque existen otros efectos, como son el aumentar la eficiencia alimenticia y reducir la mortalidad y morbilidad debidas a infecciones clínicas y subclínicas. También son añadidos a las aguas en acuicultura. Una estimación sugiere que el 50% de los antimicrobianos producidos en Estados Unidos son administrados a animales, generalmente para usos subterapéuticos.<sup>47</sup> Cada año, los animales que consumimos reciben unos 11 millones de Kg de antibióticos.<sup>48</sup>

Se reconoce que los antibióticos y compuestos afines capaces de mejorar la productividad animal tienen en común la supresión o disminución del crecimiento de ciertos microorganismos.<sup>4</sup>

Los agentes antimicrobianos tienen capacidad de alterar el metabolismo del animal, es decir, que al provocar problemas con la flora microbiana del animal, pueden eliminar microorganismos que son benéficos para la digestión del alimento y para obtener nutrientes que ayuden a su crecimiento.



### **3.3.1 Principios generales de uso como aditivos para promover el crecimiento**

Para seleccionar el antibiótico adecuado como aditivo se toma en cuenta lo siguiente:

1. La forma en como los antibióticos ejercen su acción sobre el crecimiento y la conversión alimenticia.
2. Las condiciones de salud de los animales a los cuales se van a suministrar estos antibióticos.
3. Las características de los procedimientos establecidos para el manejo de la higiene de la granja.<sup>18</sup>

El compendio de Aditivos Nutricionales de 1987 enlista 11 antibióticos recomendados como promotores de crecimiento para la ganancia diaria de peso y mejoradores de la conversión alimenticia, así como de la producción.

Los antibióticos recomendados son: bacitracina, mutilen disalicilato de bacitracina, bacitracina zinc, ciortetraciclina, oxitetraciclina, penicilina, tylosina, vliginamicina, bambermicina, lincomicina, monensina.<sup>19</sup>

### **3.3.2 ¿Como funcionan los antibióticos como promotores del crecimiento?**

No se ha demostrado como es que funcionan los antibióticos como promotores del crecimiento. Existen diferentes hipótesis de su funcionamiento, que se sustentan en los efectos que los antibióticos producen sobre los microorganismos alojados en el tubo gastro-intestinal de los animales modificando los procesos de la digestión y absorción



de los diversos nutrientes y, como consecuencia, retardo en el crecimiento y una deficiente conversión alimenticia.<sup>23</sup>

### **3.3.3 Factores determinantes en el efecto del uso de antibióticos como promotores del crecimiento**

Se deben tomar en cuenta algunos factores que han sido reportados como determinantes en el uso de antibióticos como aditivos nutricionales y que influyen directamente sobre la respuesta del animal.

- a) La edad del animal. Los animales jóvenes manifiestan una mejor respuesta a las raciones alimenticias adicionadas con antibióticos, especialmente durante las etapas después del nacimiento y de la lactancia. Conforme el animal se va desarrollando, los efectos de los antibióticos disminuyen, observándose este efecto en pollos, lechones y pavipollos.<sup>24</sup>
- b) El tipo y calidad de la ración suministrada. Se ha reportado que los animales manifiestan una respuesta más favorable a los antibióticos cuando éstos son adicionados a dietas de baja calidad, no siendo así las óptimamente balanceadas.<sup>24</sup>
- c) Los estados de tensión (estrés). Se ha observado que animales con bajo estrés han mejorado su eficiencia cuando han sido alimentados con dietas adicionadas de antibióticos.<sup>18</sup>



- d) Tiempo de suministro del antibiótico. Existen reportes en aves, acerca de que el uso continuo de antibióticos en el alimento ocasionó disminución en la respuesta del animal hacia el crecimiento, llegando finalmente a cero.<sup>25</sup>
- e) El microbismo ambiental. Tanto las aves como el ganado no manifiestan respuesta alguna al suministro de alimentos asociados a antibióticos cuando se encuentran alojados en edificios e instalaciones nuevas o convenientemente desinfectadas.<sup>23</sup> El grado de contaminación puede ser un indicador importante respecto a la respuesta a los antibióticos, especialmente en aquellos casos en que se conoce el tipo de microorganismos existentes tanto en el área de influencia de la explotación como en el medio ambiente interno de la misma.
- f) Los procedimientos de higiene y sanidad. Se ha demostrado que la respuesta al uso de antibióticos es altamente notoria en instalaciones contaminadas, en tanto que en instalaciones desinfectadas la respuesta es de un 50% inferior a menor; tampoco estos resultados pueden sugerir que la asociación de antibióticos a las dietas de los animales sustituyen los procedimientos de higiene y sanidad<sup>25</sup> y otros relacionados con el manejo de los animales que sean considerados de importancia en relación al uso de algún antibiótico en particular.<sup>19</sup>





### 3.3.4 Posibles mecanismos de acción como promotores del crecimiento

1. Los antibióticos actuarían indirectamente sobre los microorganismos del intestino: teoría entérica (Brueggemann).
  - a) Por eliminación de toxinas producidas por bacterias;
  - b) Por eliminación de la competencia entre microorganismos;
  - c) Favoreciendo la producción de vitaminas por parte de los microorganismos;
  - d) Por cambios beneficiosos en el metabolismo de los microorganismos.<sup>19</sup>
2. Los antibióticos tendrían un “efecto directo de vitamina” sobre los animales. Ésta es una hipótesis parenteral (sistémica) (Brueggemann).

La posibilidad de que los antibióticos tengan efecto directo, tal como el de las vitaminas, es difícil, dado que poseen constitución química diferente a los factores de crecimiento. Por otra parte las vitaminas, a determinadas concentraciones, poseen actividad antimicrobiana.<sup>18</sup>

Romoser y colaboradores (1952), deducen que la acción promotora del crecimiento por acción de los antibióticos podría ser el resultado de:

1. Eliminación de organismos que compiten con el huésped por nutrientes conocidos o desconocidos.
2. Estimulación de otros organismos, los cuales benefician al huésped a través de la síntesis *in vivo*, de uno o más factores de crecimiento.<sup>19</sup>



### **3.3.5 Efectos de los antibióticos como promotores de crecimiento.**

Efecto de pared. La acción de los antibióticos se manifiesta en los pollos adelgazando las paredes intestinales y aumentando la circulación capilar, lo cual también se produce en los pollos que crecen libres de gérmenes, aun sin suministro de antibióticos.<sup>19</sup>

Efecto de estimulación de flora normal. Existen hipótesis de que los antibióticos pueden considerarse como ahorradores de elementos nutricionales, ya que al actuar como factores estimulantes del crecimiento y reproducción de microorganismos gastro-intestinales considerados como flora normal, se incrementa la síntesis y asimilación de vitaminas y aminoácidos esenciales.<sup>18</sup>

Los antibióticos actuarían sobre la microflora del intestino, ya que los efectos de estas sustancias son más evidentes cuando los animales se encuentran en condiciones sanitarias deficientes, ya que no actúan o poseen efecto escaso sobre el desarrollo de animales libres de gérmenes.

Efecto de ahorro. La adición de antibióticos al alimento ejerce un efecto ahorrador protéico, ya que al inhibir a las bacterias gastro-intestinales que realizan la destrucción protéica de los nutrientes, impiden que la molécula amínica sea eliminada del proceso de asimilación<sup>26</sup>.



### 3.4 Resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos en las bacterias presentes en nuestros alimentos se ha convertido en una preocupación a nivel de salud debido a los usos de estos fármacos.<sup>6</sup>

Las bacterias resistentes a los antibióticos tales como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Enterococcus* han aumentado en los casos clínicos, a medida que aumenta el uso de antibióticos en los animales. También es posible que nuestra microbiota entérica normal esté ganando resistencia a los antibióticos debido a la exposición a alimentos provenientes de animales tratados. Una teoría extendida es que las variedades de la bacteria *Enterococcus* (causante de infecciones post-quirúrgicas) resistentes a la vancomicina (VRE) han aumentado en Europa debido al uso del antibiótico avoparcina como un promotor del crecimiento en animales. Sin embargo, por lo menos un estudio ha demostrado que el VRE ocurre raramente en la carne molida de res y de cerdo.<sup>7</sup>

La resistencia a antibióticos puede darse por varios motivos. La forma más simple es la resistencia natural, es decir, que el antibiótico no pueda llegar a la estructura donde ejerce su acción. Otra causa es la permeabilidad del organismo al antibiótico, en este caso el antibiótico no puede penetrar en la célula, debido a la falta de canales de transporte hacia el interior de la célula. El pH también es un factor importante para la penetración del antibiótico al interior de la célula. Otra caso es que el organismo sea capaz de alterar el antibiótico, por mecanismos enzimáticos. Un mecanismo importante de resistencia es la modificación del sitio blanco del antibiótico en la bacteria; en algunos casos hay una reducción de la afinidad del receptor por la molécula de



antimicrobiano; una mutación de la girasa de ADN, puede dar lugar a una menor afinidad de las quinolonas por la citada enzima. También el organismo puede ser capaz de bombear hacia afuera el antibiótico que entra en la célula.<sup>5,6,8</sup>

En México no se ha reportado ninguna investigación sobre este tema; sin embargo, hay reportes de bacterias resistentes a antibióticos que se encontraron en hospitales, en casos de infecciones que no fueron atendidas correctamente, es decir, por el mal uso clínico de los antibióticos.

Por esta razón, a nosotros nos interesa esta investigación, ya que en México el consumo de carne creció en los últimos 40 años hasta 458%, mientras que el promedio mundial fue de 124%, es decir, que en nuestro país se cuadruplicaron las ventas de cárnicos respecto a otras naciones.<sup>10</sup>



### 3.4.1 Tipos de resistencia.

- Resistencia natural.

Es la ofrecida por las bacterias de una misma especie o cepa frente a determinado antibiótico. Ésta resistencia se denomina también como primaria y definida como una insensibilidad de todas las bacterias aisladas de una especie.<sup>58</sup>

- Resistencia adquirida

La resistencia de la bacteria a uno o varios antibióticos puede lograrse en el transcurso del tiempo por dos mecanismos básicos: por mutación de las características de su cromosoma o por la adquisición de material genético con ubicación extracromosómica.

La resistencia adquirida se diferencia de la resistencia natural o primaria porque se alcanza de un modo parcial por pocos o muchos integrantes de una misma especie o cepa pero no por la totalidad.<sup>50</sup>

- Resistencia cromosómica

Se origina por una mutación espontánea aleatoria, y afecta a un gen cualquiera con frecuencias dentro del rango de  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$  por célula y división.<sup>49</sup> La velocidad de multiplicación explica la presencia de una mutante resistente y si la especie está sometida a una droga, se van deteriorando las bacterias y sólo sobreviven aquellas con resistencia cromosómica propia.

En una primera etapa aparecen pocas bacterias resistentes, pero en la medida en que el antibiótico actúa como selector favorece el desarrollo de células resistentes hasta transformarse en cultivo puro antibiótico-resistente. Éste modo de adquirir resistencia se califica como espontáneo y discontinuo.<sup>59</sup>



La mutación espontánea puede acelerarse por acción de sustancias químicas o agentes físicos mutágenos.

- Resistencia extracromosómica

La resistencia adquirida extracromosómica se obtiene por incorporación de material genético que se sitúa por fuera del cromosoma. Se denomina también resistencia transferida o resistencia medida por plásmidos.<sup>58</sup>

- Conjugación

Es la transferencia de genes entre bacterias sexualmente diferentes. Requiere contacto de célula a célula a través de pelos sexuales para transmitir el factor R, gen extracromosómico de la resistencia. Hay un puente citoplasmático de conjugación entre bacterias de distinta especie como *E. coli*, *Proteus*, *Kliebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*.

La resistencia así obtenida, se extiende con rapidez porque cada célula recién infectada se transforma en donante de genes de la resistencia.<sup>56,59</sup>

- Transducción

Otro intercambio genético, es la transferencia del ADN celular de una célula huésped a otra por medio de virus; ocurre cuando un bacteriófago no atenuado infecta a una célula bacteriana. El ADN viral entra a la bacteria, el ADN de la célula hospedadora se rompe y algunos fragmentos se incorporan a nuevas partículas virales formadas.

Cuando se libera la partícula viral que contiene ADN bacteriano puede infectar a otra bacteria.<sup>56,59</sup>



- Transformación

Se produce entre bacterias homólogas. Al sobrevenir la lisis de una bacteria resistente una porción de su ADN penetra la pared celular de una bacteria susceptible y se combina con el ADN de ésta.<sup>55</sup>

- Transposición

Permite el intercambio entre plásmidos o de un plásmido hacia un cromosoma o a un fago sin necesidad de homología entre el donador y el receptor. Los elementos así actuantes se denominan transposones, capaces de decidir su propio sitio de inserción. Los transposones son segmentos de ADN que pueden pasar de la posición de un genoma a otra posición en el mismo genoma o hacia un lugar diferente.<sup>55,56</sup>

### **3.4.2 Bases bioquímicas de la resistencia**

Las bacterias disponen, crean o logran la resistencia mediante diversos recursos biológicos que explican la rapidez de su adaptación a un ambiente desfavorable. Entre estos recursos se destacan como más importantes:<sup>20</sup>

- a) Disminución de la permeabilidad bacteriana para impedir el acceso del fármaco.
- b) Reducción de la afinidad a la enzima blanco de la droga
- c) Modificación de la enzima blanco del antibiótico
- d) Segregación de enzimas inactivadas del quimioterápico



### 3.4.3 Resistencia a los diferentes tipos de antibióticos

- Penicilinas y cefalosporinas

La resistencia a fármacos betalactámicos puede darse por la ruptura del anillo betalactámico o por alteraciones en los sitios blanco (proteínas fijadoras de penicilina), sobre los que actúan estos antibióticos.<sup>21</sup>

La principal causa de resistencia a la penicilina y otros fármacos beta-lactámicos son diversas enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico, transformando a la penicilina en ácido peniciloico. Estas enzimas se encuentran tanto en bacterias gram positivas, como en gram negativas. Las beta-lactamasas de los gram negativos se producen en poca cantidad, son constitutivas y tienen menor afinidad por su sustrato.<sup>58,59</sup>

- Aminoglicosídicos

La resistencia a los aminoglicosídicos puede ser de tipo cromosómico o plasmídico.

La estreptomycin se fija a un ribosoma provocando desórdenes en la síntesis de proteínas, pero toda mutación que suprima o modifique este lugar de fijación dará origen a cepas resistentes.

Los aminoglicosídicos pueden ser inactivados por enzimas que acetilan los grupos amino o por fosforilación o adenilación de grupos hidroxilo.<sup>59</sup>

La gentamicina, la mitomicina y la tobramicina posee en común cuatro puntos diferentes de inactivación, mientras que la amikacina tiene un grupo amino modificado, con lo cual se bloquean 3 lugares de agresión enzimática.<sup>57</sup>





- Cloranfenicol

Las bacterias resistentes al cloranfenicol poseen factor R, éste puede ser transmitido por *E. coli* del intestino a *Salmonella*, *Shigella* y hasta a *Vibrio cholera*.<sup>57</sup>

- Eritromicina

La resistencia a la eritromicina se realiza por una alteración del punto de ataque al ribosoma o por destrucción enzimática. Una eritromicina esterasa elaborada por *E.coli* que la bacteria adquiere por intervención de un plásmido,<sup>60</sup> eleva considerablemente la resistencia.<sup>58</sup>

- Tetraciclinas

No se conocen los mecanismos creados por las bacterias para conseguir la resistencia por intermedio de los plásmidos. Se supone que interviene una modificación de la permeabilidad de la célula bacteriana. Esta resistencia puede organizarse por transposición.<sup>57</sup>

- Sulfamidas-trimetoprima

Las bacterias con resistencia, codificada por plásmidos, elaboran enzimas evasivas que eluden al bloqueo metabólico efectuado por sulfamidas o trimetoprima mediante pasos secuenciales distintos.<sup>55</sup>

- Quinolonas

Las bacterias gramnegativas resisten a las quinolonas por medio de la alteración de la ADN girasa o por alteración de los componentes de la pared externa bacteriana.<sup>61-62</sup>



### 3.5 Material genético involucrado en resistencia a antibióticos

Los mecanismos de resistencia bacteriana muestran una elevada sofisticación bioquímica y genética, limitando la utilidad de los antibióticos<sup>1,2</sup>. En efecto, los genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos, en bacterias filogenéticamente no relacionadas, demuestran ser muy parecidos o incluso idénticos<sup>6</sup>, aún en bacterias Gram positivas y Gram negativas.<sup>27,28</sup>

#### 3.5.1 Elementos genéticos.

Se han encontrado diferentes elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de los cuales los más conocidos son los plásmidos auto transferibles o movilizables<sup>5</sup>. También se incluyen los transposones conjugativos y no conjugativos<sup>29</sup>, el ADN de bacteriófagos y, más recientemente, los integrones y *cassettes* genéticos de resistencia<sup>30</sup>. La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación, transformación o transducción,<sup>20</sup> procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias.

El término integrón o elemento de integración fue propuesto por Stokes y Hall en 1989,<sup>30</sup> aunque la definición actual fue introducida en 1995 por Hall y Collis:<sup>31</sup> los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos.



### 3.5.2 Estructura y clasificación de los integrones

Los integrones han sido detectados principalmente en bacilos Gram negativos fermentadores, de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*<sup>32,33</sup>.

En la estructura básica del integrón se encuentra el gen *intl* que codifica para una proteína con actividad de recombinasa específica de sitio (*IntI*), la integrasa, que forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago  $\lambda$ ,<sup>34</sup> actualmente denominadas tirosina-recombinasas.<sup>35</sup> Adyacente a *intl* se encuentra el sitio de recombinación específica de sitio, *attI*, en el que se integra el *cassette* genético de resistencia.<sup>36</sup> Entre *intl* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes,  $P_I$  para la expresión de *intl* y  $P_{int}$ , para la expresión de los *cassettes* genéticos insertados a la derecha de  $P_{int}$ , puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor.<sup>37</sup> La enzima *IntI* permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* o elemento de 59 pb de los *cassettes* genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del *cassette* de resistencia en la zona variable del integrón (figura 1).

En la actualidad, los integrones se clasifican en nueve clases según la secuencia de la resistencia que portan: las clases In1 a In3 contienen casetes génicos de resistencia a antibióticos; las clases In4 a In7 contienen *cassettes* que no codifican resistencia a antibióticos, la clase In8 carece de *cassette* génico y la clase In9 contiene un *cassette* de resistencia a antibióticos y otros *cassettes* génicos de función desconocida.<sup>42</sup>



Sin embargo los integrones se clasifican en cuatro clases de integrones definidos en función del tipo de integrasa,<sup>43</sup> pero su estructura es similar. De las cuatro clases conocidas, la familia de la clase 1 es la más frecuente, posee secuencias flanqueantes conservadas en 5' (que codifican para una integrasa) y en 3' con distintas secuencias de lectura abierta (ORF), incluyendo *qacΔI* y *sulΔI*.<sup>44</sup>

La inserción de material genético en estos elementos es el resultado de 2 zonas de alta eficiencia de recombinación y de la enzima integrasa<sup>43, 45, 46</sup>

Se han encontrado integrones de las clases 1 y 2 en plásmidos y transposones, en tanto que aquellos de clase 3 sólo han sido observados en plásmidos.<sup>38</sup> Por último, los integrones de clase 4 o "superintegrones" se han identificado principalmente en el cromosoma de *Vibrio cholerae*.<sup>39</sup>

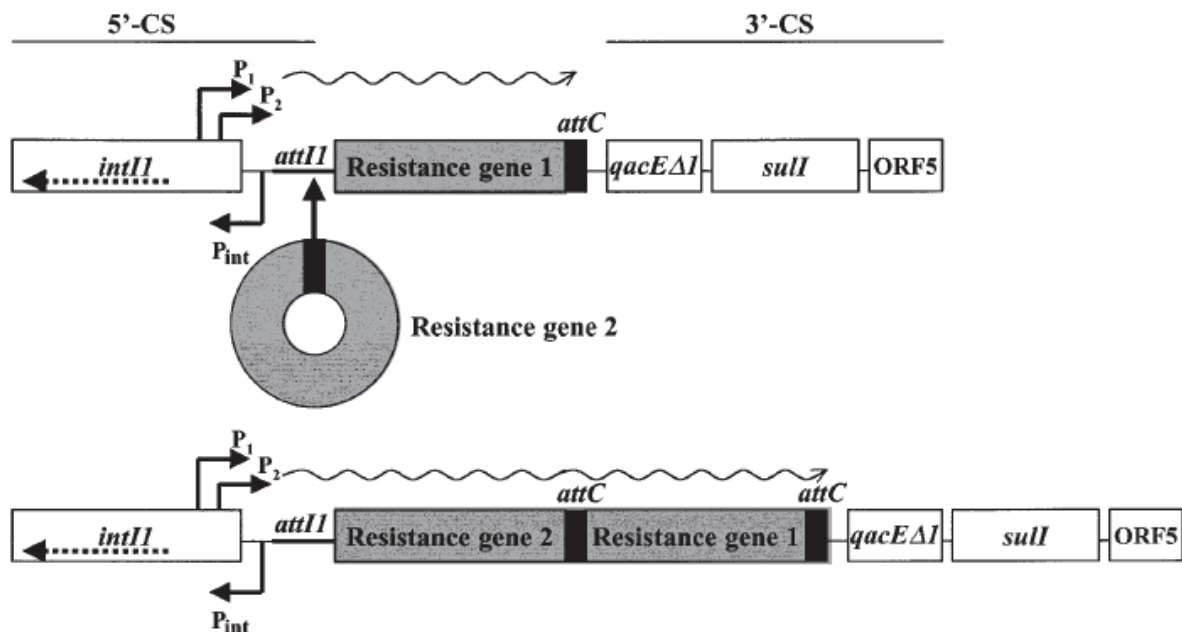


Figura 1. Representación esquemática de la estructura básica del integrón clase 1 y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. Proceso mediante el cual el *cassette* genético (gene de resistencia 2) es insertado al sitio *attI* en el integrón clase 1 el cual contiene el *cassette* de la resistencia (gene de resistencia 1). Genes y secuencias de lectura abierta (ORF) en 5'- y 3'-CS del esquema del integrón están indicados por rectángulos. Los *cassettes* de genes de resistencia insertados con el integrón están indicados en los cuadros grises verticales, las barras negras representan *attC*, sitios de recombinación. P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son promotores asociados al integrón; P<sub>int</sub> es el promotor de la integrasa (*intI1*). Los genes *qacED1* y *sull* en el 3'-CS confieren resistencia para compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas, respectivamente.<sup>22</sup> 5'-CS es la región 5' conservada y 3'-CS es la región 3' conservada.



### 3.5.3 Asociación integrón-cassette genético de resistencia

Los *cassettes* genéticos codifican resistencia para una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y, según informaciones recientes, a quinolonas.<sup>22</sup>

Los integrones clase 1 contienen genes que podrían ser remanentes de *cassettes* genéticos como parte de su estructura conservada 3' y que codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacED1*) y sulfonamidas (*sul1*).<sup>40</sup>

Los mecanismos de resistencia relacionados con genes de integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las EMA,<sup>21</sup> cloranfenicol acetil transferasas (CAT), modificantes de rifampicina,  $\beta$ -lactamasas, carbapenemasas, dihidrofolato reductasas,<sup>22</sup> etc.

Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial<sup>37</sup>. De igual forma estas estructuras, con sus respectivos *cassettes* de resistencia, han sido detectadas en bacterias aisladas de ambientes acuáticos y de animales domésticos y de crianza,<sup>46</sup> lo cual refleja su amplia disseminación en la naturaleza. Algunas clases de integrones han sido detectadas exclusivamente en cepas ambientales (*Treponema denticola*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*).<sup>22</sup> Más aún, se ha demostrado la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes



géneros, corroborando que estas estructuras son antiguas y que han evolucionado conjuntamente con el genoma bacteriano<sup>41</sup>.

### **3.6 Justificación**

Debido a que México es el cuarto productor de pollo a nivel mundial y gran consumidor de este alimento, como se reporta en el año 2006, en los hogares mexicanos se gastó un promedio mensual de mil 383 millones de pesos<sup>63</sup>. Debido a esta situación, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento es un factor sumamente importante para la industria avícola mexicana.

Por otro lado, es importante conocer los riesgos reales que se pueden generar en México ya que por lo anteriormente mencionado, el utilizar antimicrobianos como promotores de crecimiento promueve la resistencia a antibióticos de la flora bacteriana del animal que en su mayoría pueden ser patógenos para el consumidor. Esto es un problema de salud pública y lo ideal es disminuir el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, ya que se corre el riesgo de alguna infección con éste tipo de bacterias, si es que no se somete a un buen tratamiento térmico o, en su defecto, la carne se consuma cruda.

Asimismo, en México no se han realizado investigaciones sobre la multiresistencia bacteriana en carne de pollo. Por lo tanto, se decidió hacer este trabajo comparativo con dos clases de pollo; de granja y de criadero ya que, como se indicó anteriormente, todo parece indicar que los antibióticos sólo se usan como promotores de crecimiento en pollos producidos en criadero y no en aquellos animales crecidos en granja.



#### **4. Hipótesis.**

- Es más frecuente la presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pollo de criadero que en carne de pollo de granja por la mayor exposición a antibióticos del animal de criadero.





## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivos generales

- Determinar la posible presencia de bacterias resistentes a diferentes antibióticos a partir de muestras de carne de pollo de granja y carne de pollo de criadero.

### 5.2 Objetivos particulares

- Aislar bacterias a partir de carne de pollo.
- Hacer un estudio comparativo microbiológico de la carne de pollo de granja y de carne de pollo de criadero.
- Seleccionar e identificar microorganismos resistentes a antibióticos, probándolos con diferentes tipos de antibióticos.
- Elegir cepas multiresistentes e identificarlas con pruebas bioquímicas.
- Identificar secuencias específicas de ADN bacteriano por PCR.



## **6. Metodología**

### **6.1 Toma de Muestras**

Se realizaron dos muestreos: uno con pollo de venta al menudeo de dos tiendas de autoservicio (Copilco y Cd. Universitaria); y otro se realizó a partir de pollo de granja venta al menudeo (expendio) en los alrededores de la zona de Tulyehualco. De acuerdo con la norma Norma Oficial Mexicana NOM -109-SSA1-1994, Bienes y servicios. “Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”,<sup>11</sup> la toma de las muestras se realizó evitando toda contaminación externa, tanto ambiental como humana, para asegurar la integridad de la misma.

Se seleccionaron piezas pequeñas (muslos), que no estuviesen congeladas, con una buena apariencia física es decir, que las piezas estuvieran frescas, con características sensoriales aceptables, olor característico a pollo, textura firme, color amarillo claro, sin sangrado.

Para la toma de las muestras y manejo se siguieron los pasos establecidos en la norma anteriormente mencionada. Se utilizaron los siguientes materiales:

- Recipiente de boca ancha de vidrio con tapa de rosca previamente esterilizado, y de tamaño acorde con la cantidad de cada una de las muestras.
- Bolsas de polietileno estériles de varias medidas.
- Hielera de poliestireno o de otro material aislante.
- Papel estraza.
- Etiquetas autoadheribles.



- Marcadores indelebles.
- Algodón.
- Cerillos o encendedor
- Instrumentos para toma de muestra: cuchillos y pinzas estériles.
- Mechero
- Hielo o bolsas refrigerantes.
- Bata, cubre boca, cofia y guantes estériles.
- Autoclave equipada con termómetro de mercurio calibrada a  $121 \pm 1$  °C.

Todo el material e instrumentos de muestreo que se utilizó para la toma, manejo y transporte de muestras, previamente se limpió, esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se aseguró que estuviese libre de sustancias que pudieran afectar la viabilidad de los microorganismos.

- Procedimiento.

Los alimentos expuestos al aire libre como el caso del pollo de Tulyehualco, no requieren precauciones estrictamente asépticas. Cuando se recolectaron las muestras se utilizaron siempre guantes estériles desechables.

La toma de las muestras se hizo con rapidez. El recipiente se abrió únicamente al momento de introducir la muestra y se cerró de inmediato. Posteriormente, los frascos se colocaron dentro de la hielera para su transporte.



- Conservación y transporte

El manejo y transporte de las muestras se efectuó de manera que se impidiera su ruptura, alteración o contaminación, evitando su exposición a la luz solar directa. Se transportó bajo condiciones de temperatura de 2 a 8°C (con hielo o bolsas congeladas) y se mantuvieron a esa temperatura hasta el momento de utilizarse.

## **6.2 Extracción de bacterias a partir de carne de muslo de pollo.**

La metodología que se siguió para la extracción de las bacterias presentes en la carne de muslo de pollo se basó en la Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual<sup>14,15</sup> y en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”<sup>12</sup>, ya que esta norma está orientada a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos. La preparación de diluciones decimales adicionales fueron necesarias ya que tienen como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.



## Materiales

- Pipetas graduadas de 10 y 1 mL con tapón de algodón.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Cuchillos, pinzas, espátulas, previamente esterilizado en autoclave.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio se esterilizó en autoclave, durante 15 minutos a  $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$ .
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

## Procedimiento.

- Preparación de la dilución primaria.

Se pesaron 10g de carne de pollo cortados de manera estéril y se homogenizó en 90mL de agua peptonada durante 1 minuto a velocidad media en el Stomacher.

- Preenriquecimiento y preparación de las diluciones decimales adicionales.

De la mezcla homogenizada se tomó 1mL de la dilución primaria en un volumen de 9mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, ver anexo I), una dilución 1:10 mezclando cuidadosamente cada tubo.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y posteriormente se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas, con su respectivo control de esterilidad.



- Aislamiento de enterobacterias

Para el aislamiento de las enterobacterias presentes en las muestras de carne de pollo de acuerdo al Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual<sup>14,15</sup> y a la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994 “Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos”<sup>13</sup> y la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”<sup>12</sup>, se siguió la siguiente metodología:

Al término de la incubación (24 horas) del preenriquecimiento, se utilizaron las últimas 3 diluciones ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ ) para tomar un inóculo de 50 $\mu$ L de cada uno. Se inoculó por extendido incubándose a 37°C durante 24 horas en los siguientes medios selectivos para enterobacterias: Agar EMB (Eosina-azul de metileno-lactosa-sacarosa), Agar McConkey, Agar Hecktoen, Agar SS (*Salmonella*- *Shigella*), Agar BPLS (Agar verde brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa), Agar TSA (Agar de soya tripticasa) y Agar CPS2 (ver anexo I)

### **6.3 Determinación de la morfología macro y microscópica de las diferentes colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos.**

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos 24 horas después, determinando: forma, textura, tamaño, bordes etc. A las células de las colonias mejor aisladas y que presentaron mejor crecimiento se les realizó la tinción de Gram. Posteriormente se realizaron las



observaciones microscópicas para determinar agrupación, forma y tamaño. Las colonias aisladas se mantuvieron en medio BHI para su posterior uso.

#### 6.4 Pruebas de sensibilidad microbiana

- Se seleccionaron las colonias mejor aisladas de cada medio y con mayor crecimiento sembrándose por cuadrantes en agar nutritivo (ver anexo I).
- Se preparó medio BHI adicionado con tres diferentes antibióticos: ampicilina, amikacina y penicilina utilizando las concentraciones (ampicilina 10mcg, amikacina 30 mcg y penicilina 10 U) recomendadas en Virulence and antimicrobial-resistance gene Profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from sample of animal origin.<sup>66</sup>
- Las colonias aisladas previamente se sembraron, en agar nutritivo con antibiótico incubándose a 37° C durante 24 hrs. (ver anexo II)

A las colonias obtenidas anteriormente se les realizó una segunda prueba de sensibilidad a otros antibióticos con el sistema de sensidiscos Bio-Rad para determinar la posible multiresistencia de los microorganismos aislados (ver anexo III).

- Cada una de las colonias aisladas se inocularon de dos a tres asadas en caldo soya tripticasa (3mL de caldo) (ver anexo I) y se incubaron a 35°C durante 24h.
- Posteriormente, se inoculó 100µL del cultivo anterior en agar Müeller-Hinton por expansión con una varilla de vidrio y se dejaron las cajas de 3 a 5 minutos para que se absorbiera la muestra. Se colocaron los discos en condiciones asépticas



y transcurridos 15 minutos se invirtieron las cajas de Petri y se incubaron a 35°C durante 18 h ya que es el tiempo necesario en el cual las bacterias se adaptan a las condiciones ambientales para su crecimiento y la fase exponencial en la cual se consumen los nutrientes evolucionando las células antes de entrar a la fase estacionaria.

Ver anexo III donde se describen las características de los multidiscos Bio Rad.

**6.5 Extracción de ADN a partir de cepas aisladas de carne de pollo de los diferentes muestreos.** Protocolo general para extracción de ADN total (Palumbi S. 1991).<sup>64</sup>

1. Se crecieron las células en 100mL de medio BHI con antibióticos.
2. Se incubaron durante 24h a 30° C con agitación.
3. Se colocaron 20mL de cultivo en tubos para centrífuga, se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm.
4. Una vez obtenido el pellet se le adicionó 2 mL de buffer de lisis con 1g de perlas de vidrio previamente esterilizadas, por tubo.
5. Con la ayuda de un vortex se rompieron las células durante 8 minutos.
6. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a 4°C; (en una micro centrifuga refrigerada Eppendorf).
7. Se recuperó el sobrenadante y se extrajo suavemente con un volumen igual de fenol equilibrado con agua.
8. Se separaron las fases centrifugando a 10,000 rpm por 10 min. a 4°C.





9. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se agregó un volumen igual de fenol / cloroformo (1:1), mezclando suavemente.
10. Se separaron las fases centrifugando a 10,000 rpm por 10 min. a 4°C.
11. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se agregó un volumen igual de cloroformo, mezclando suavemente.
12. Se separaron las fases centrifugando a 10,000 rpm por 10 min. a 4°C. Se recuperó la fase acuosa midiendo su volumen.
13. Se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M o bien 0.5 vol. de acetato de amonio 7.5M.
14. Se agregaron 0.5 volúmenes de isopropanol o bien 1.5 vol de etanol, mezclando.
15. Se dejó durante 15 min. en reposo a temperatura ambiente.
16. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente.
17. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%.
18. Se centrifugó igual que en el punto numero 15.
19. Finalmente, se decantó cuidadosamente y se secó el pellet; resuspendiendo en agua (aproximadamente 30µL), dependiendo de la cantidad del pellet.

Ver Anexo IV donde se describe la preparación de cada solución utilizada.



Posteriormente, se preparó un gel de agarosa al 1% para determinar la cantidad de ADN extraído, cargando cada pozo con 1 $\mu$ L de buffer de carga, 3 $\mu$ L de muestra de ADN y 6 $\mu$ L de agua; colocando el gel en una cámara de corrida con solución Tris-borato 0.5x con una diferencia de potencial de 85V durante 45 minutos aproximadamente.

Para visualizar a las bandas de ADN en el gel, se sumergió cuidadosamente en una solución de bromuro de etidio (3 $\mu$ L en 100ml de agua) por 5 minutos. El exceso de bromuro de etidio se eliminó del gel enjuagando en un recipiente con agua destilada por 10 min. El gel teñido se colocó sobre un trasluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298 nm). (Marca SIGMA T 1202).

### **6.6 Identificación de secuencias por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)**

Para la realización de la técnica se necesitó de lo siguiente:

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), utilizado como sustrato para generar nuevo ADN. Dos cebadores (primers), oligonucleótidos; cada uno complementario a una de las dos hebras del ADN que se usan para iniciar la reacción. Iones de magnesio (Mg<sup>2+</sup> como cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)). Una solución tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Taq polimerasa. ADN extraído anteriormente para amplificar. Se amplificó por 30 ciclos.

En microtubos eppendorf se agregaron los siguientes componentes en el orden descrito:

- a) 40 $\mu$ L de agua
- b) 5.75 $\mu$ L de buffer con Mg<sup>2+</sup>



- c) 1  $\mu$ L de supermix INVITROGEN dNTPmix
- d) 1  $\mu$ L de cada una de las soluciones de los primers SUL 1B e INT F (se recomienda una concentración final de 200 nM de cada uno).
- e) 1  $\mu$ L de ADN bacteriano (se recomienda tener una concentración final de 3 ng/ $\mu$ L).
- f) 0.25  $\mu$ L de enzima ADN polimerasa.

Se taparon, mezclaron y se colocaron los tubos en el termociclador.

El programa de PCR inició de la siguiente manera:

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

Finalmente se realizó un gel de agarosa al 1% para correr las muestras junto con el marcador de pesos moleculares, con una diferencia de potencial de 85 V durante 35 minutos.

Para observar las bandas de amplificación, se utilizó la misma técnica descrita en el protocolo de ADN.



## **6.7 Identificación bacteriana**

Como las colonias aisladas previamente provienen de medios selectivos para enterobacterias se decidió realizar las siguientes pruebas bioquímicas para su posible identificación. Glucosa (TSI o KIA), Lisina descarboxilasa (LIA), Ureasa, Caldo de lisina descarboxilasa, Caldo KCN, Caldo malonato, Prueba del indol, Prueba Voges-Proskawer, Prueba rojo de metilo, Catalasa, Prueba de anaerobiosis, SIM, y Citrato de Simmons. <sup>14</sup> Ver el anexo V, donde se describen cada una de las pruebas bioquímicas utilizadas.



## 7. Resultados

Como se detalló en la metodología, se trabajó con dos muestras de muslo de pollo de tipo comercial (Bachoco), adquirida en la tienda de Copilco y en la tienda de Cd. Universitaria. Por otro lado, para este estudio comparativo se utilizó una muestra de muslo de pollo de granja adquirido en un expendio que vende pollo en los alrededores de la zona de Tulyehualco.

### 7.1 Primer aislamiento de bacterias de muslo de pollo de criadero.

A partir de la extracción realizada a las dos muestras de carne de pollo de criadero (tienda Copilco y Cd. Universitaria) se obtuvieron un total de 114 colonias aisladas en MacConkey, Hecktoen, TSA y CPS2.

Como se muestra en la tabla 1, de los dos muestreos de pollo de criadero, de la tienda Copilco (MPW) se obtuvieron mayor número de colonias aisladas en los cuatro medios empleados para su aislamiento, en contraste con la muestra de carne de pollo de la tienda de Cd. Universitaria (MPU), en la cual hubo poca presencia de colonias aisladas en los medios McConkey y TSA.

Muestra	Medio	No. Colonias aisladas
MPU	MCK	17
MPU	TSA	15
MPW	HECKTOEN	13
MPW	MCK	23
MPW	CPS2	22
MPW	TSA	24

TOTAL:	114	100%
--------	-----	------

Tabla 1. Colonias aisladas de muslo de pollo de criadero en diferentes medios selectivos



De lo reportado anteriormente, se detallan los resultados obtenidos del aislamiento de bacterias presentes en la carne de pollo de criadero de los dos muestreos (MPW y MPU) en el gráfico 1. De manera porcentual, observamos que hubo un mayor aislamiento de bacterias de la muestra de MPW tanto del medio TSA, donde se favorece el crecimiento de cualquier tipo de microorganismos y en el medio MacConkey que es un medio donde se aíslan bacterias como *Salmonella*, coliformes, entre otras que pueden estar presentes en la carne de pollo. Con un porcentaje menor se obtuvieron colonias aisladas de la muestra MPW de los medios Hecktoen y CPS2 respectivamente con un porcentaje menor a los anteriormente mencionados. La muestra MPU, presentó un bajo porcentaje de colonias aisladas y de sólo dos medios, TSA y MacConkey.

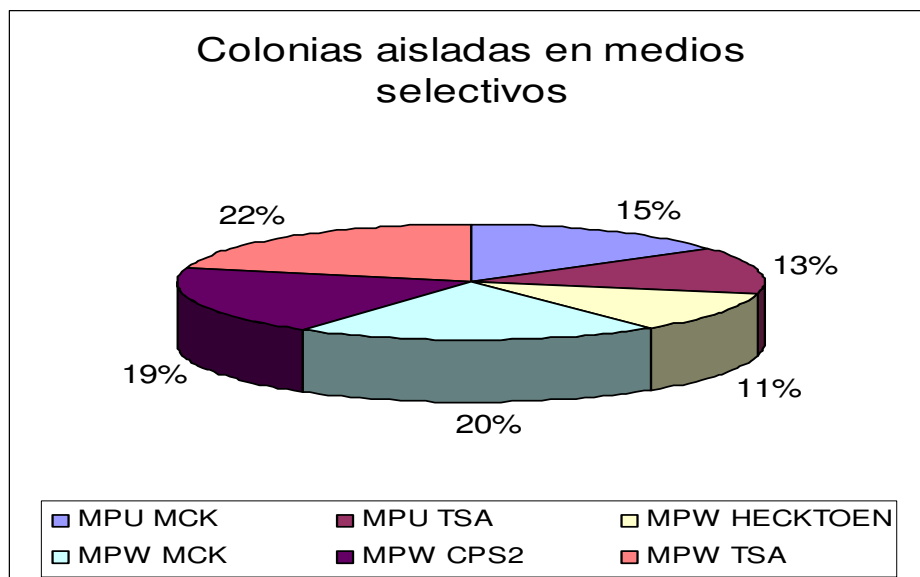


Grafico 1. Porcentajes de bacterias aisladas de carne de pollo de criadero.



### **7.1.1 Características macro- y microscópicas.**

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño, agrupación, etc. De las colonias que presentaron mejor crecimiento y aisladas, se realizó una tinción de Gram,

Los microorganismos aislados en su mayoría presentaron características macro- y microscópicas semejantes. Macroscópicamente colonias pequeñas, circulares, borde liso, cremosas; otras eran grandes, lisas, circulares, presentando pigmentación de acuerdo al medio en el cual fueron aisladas, como algunas colonias color salmón del medio Hecktoen. En la observación microscópica, al realizar la tinción de Gram resultaron ser bacilos cortos Gram (-).

En la tabla 2 se describen las características macro- y microscópicas, el medio en el que se realizó el aislamiento, la muestra, el tipo de colonias que se observaron y sus respectivas observaciones.



Tabla 2. Características morfológicas de colonias aisladas en los diferentes medios selectivos.

Medio	Muestra y dilución	Colonias	Observaciones
Hecktoen	MPU 10 <sup>-7</sup>	Verdes-húmedas, planas transparentes. Verdes-azules sin centro negro.	El medio viró de verde a color azul oscuro.
	MPU 10 <sup>-8</sup>	Verde-azul sin centro negro muy pequeñas Verdes- húmedas, planas transparentes.	El medio viró de verde a color azul oscuro.
	MPW 10 <sup>-8</sup>	Colonias de color salmón con halo de precipitación. Verdes-azules sin centro	El medio viró de color verde oscuro a verde claro.
	MPW 10 <sup>-9</sup>	Colonias de color salmón con halo de precipitación. Verdes-azules sin centro	El medio viró de color verde oscuro a verde claro.
MacConkey	MPU 10 <sup>-7</sup>	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, transparentes	El medio viró del color rosado a un color café
	MPU10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, transparentes	El medio viró del color rosado a un color café
	MPW10 <sup>-8</sup>	Colinas grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa	El medio viró del color rosado a un color café
	MPW10 <sup>-9</sup>	Colinas grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa	El medio viró del color rosado a un color café
TSA	MPU10 <sup>-7</sup>	Colonias pequeñas, circulares, elevadas blancas.	*
	MPU10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas, circulares, elevadas blancas.	*
	MPW10 <sup>-8</sup>	No se observan colonias bien definidas, color blanco, borde liso, circulares.	*
	MPW10 <sup>-9</sup>	Colonias pequeñas, circulares, blancas.	*
CPS2	MPU 10 <sup>-7</sup>	Colonias rojas y ámbar. Circulares y lisas	*
	MPW10 <sup>-8</sup>	Colonias azules, verdes y ámbar. Lisas y circulares	*
	MPW10 <sup>-9</sup>	Colonias verdes, azules y ámbar. Lisas y circulares	*

\* No hubo observaciones importantes.





### 7.1.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.

De las colonias aisladas anteriormente, 68 fueron sometidas a la prueba de antibiosis, inicialmente con tres antibióticos: penicilina, ampicilina y amikacina.

En la tabla 3, se reporta el porcentaje de colonias resistentes a tres antibióticos, de los cuales la penicilina y ampicilina pertenecen a la misma clasificación (betalactámicos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana). La amikacina es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, que interfieren con la síntesis proteica.

Muestra	Medio	Número relativo de colonias resistentes a tres antibióticos %
MPU	MCK	23
MPU	TSA	15
MPW	HECKTOEN	19
MPW	MCK	13
MPW	CPS2	24
MPW	TSA	6
TOTAL:		100%

Tabla 3. Porcentajes de cepas resistentes a 3 antibióticos aisladas de carne de pollo de criadero.

En el gráfico 2, se detalla el porcentaje de resistencia a por lo menos tres antibióticos. Se observa que las colonias con mayor porcentaje de resistencia fueron las aisladas de la muestra MPW con el medio CPS2 con un 24% de resistencia a los tres antibióticos. Le siguen las colonias de MPU del medio MacConkey. El menor porcentaje de resistencia se obtuvo de las colonias aisladas de la muestra de MPW con un 13 y 6% de resistencia.

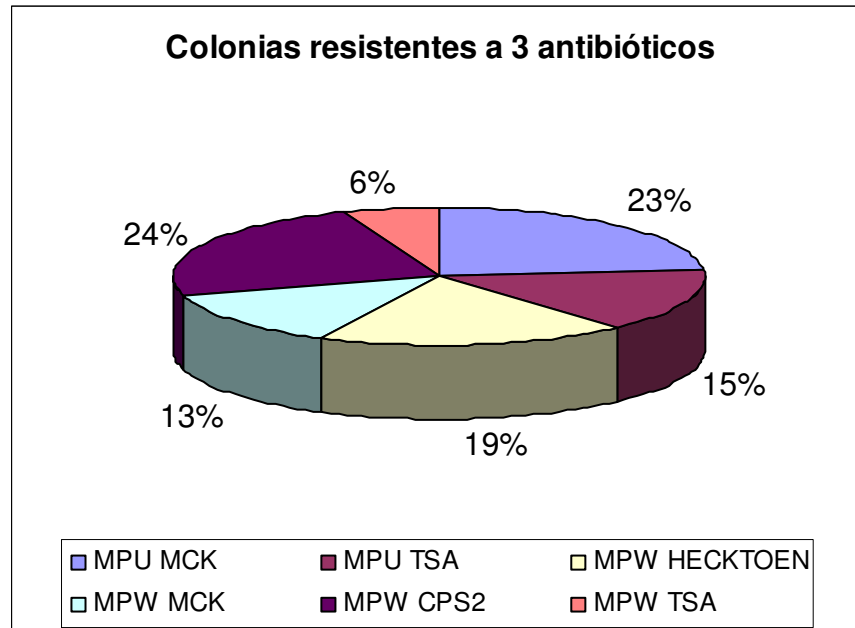


Grafico 2. Porcentajes de colonias resistentes a 3 antibióticos.

Para corroborar la resistencia a los antibióticos anteriores y probar si las colonias aisladas presentaban resistencia a otros antibióticos, se utilizaron los sensidiscos Bio-Rad obteniéndose los siguientes resultados.

En este caso solamente se probaron 5 antibióticos más en 36 cepas y se utilizaron los siguientes sensidiscos (tabla 4).

Antibiótico	Concentración
Cefoperazona (CFP)	30µg
Aztreonam (ATM)	30µg
Tiosulfa (TS)	300mcg
Cloranfenicol (CL)	30mcg
Cloxacilina (CX)	1mcg

Tabla 4. Antibióticos utilizados en el antibiograma



Con la prueba anterior, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 5), donde se observa un mayor porcentaje de colonias resistentes a cloxacilina (CX), y como se observó anteriormente, existe un porcentaje alto de resistencia a los betalactámicos. Por otro lado, se observó la resistencia al antibiótico tiosulfa (TS) en un 72.2% de las colonias.

Antibiótico	Número de colonias resistentes	% de colonias resistentes
CFP	4	11.1
ATM	6	16.6
TS	26	72.2
CL	4	11.1
CX	31	86.1

Tabla 5. Porcentaje de colonias resistentes a 5 antibióticos de cepas de carne de pollo de criadero.

En el siguiente gráfico (3), se detalla el porcentaje de resistencia de microorganismos presentes en la carne de pollo. Como estos microorganismos se desarrollaron en un medio con antibiótico, ello sugiere que posiblemente éstos animales tuvieron en su dieta antibióticos como promotores del crecimiento.

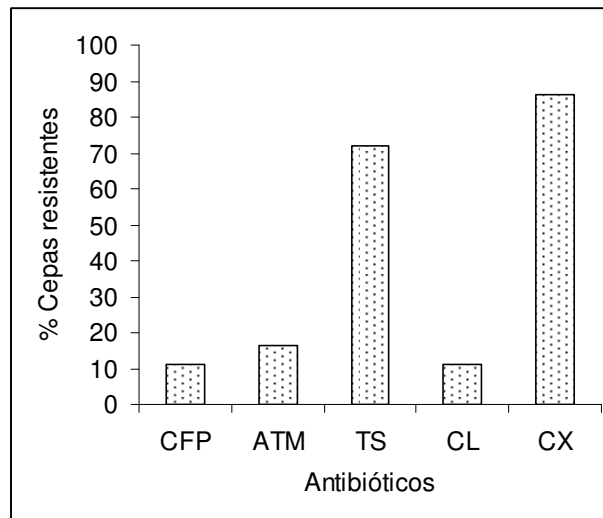


Gráfico 3. Porcentaje de cepas resistentes a cinco diferentes antibióticos, de las cepas probadas anteriormente con tres antibióticos.

Se seleccionó un lote de cepas para realizar la prueba de sensibilidad con sensidiscos Bio-Rad, para determinar la posible multiresistencia a antibióticos de las cepas aisladas de carne de pollo de criadero (tabla 6 y gráfico 4).

Nombre	% resistencia	Nombre	% resistencia
Amikacina	3	Enoxacina	0
Ampicilina	35	Eritromicina	25
Cefalotina	45	Gentamicina	22
Ceftriaxona	22	Netilmicina	0
Cloranfenicol	3	Penicilina	32
Dicloxacilina	32	Timetoprim-sulfametoxazol	13

Tabla 6. Porcentajes de cepas resistentes a antibióticos de bacterias aisladas de carne de pollo de criadero.



En la tabla 6, se reporta el porcentaje de colonias resistentes a alguno de doce antibióticos diferentes. Se observa que todas las colonias aisladas son sensibles sólo a dos antibióticos: enoxacina y netilmicina; por otro lado, presentan un alto porcentaje de resistencia a ampicilina, dicloxacilina y penicilina, que pertenecen al mismo grupo de betalactámicos. El antibiótico que presenta mayor porcentaje de resistencia es cefalotina, que es del grupo de las cefalosporinas y que también es un derivado de los betalactámicos.

En menor porcentaje de resistencia, están la ceftriaxona (cefalosporina), gentamicina (aminoglucosídicos) y eritromicina (aminoglucosído). En este caso la gentamicina y eritromicina actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30S, y los porcentajes de resistencia son similares.

Por otro lado se observa, en menor porcentaje, un 3% de resistencia a amikacina (aminoglucosídico) y a cloranfenicol (aminoglucosído), antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas.

Pero en este caso como observamos en el gráfico 4, el porcentaje de resistencia bacteriana a los antibióticos del tipo betalactámicos (penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina y ceftriaxona) es relativamente alto, con respecto a los antibióticos de tipo aminoglucosídico (amikacina, cloranfenicol, eritromicina y gentamicina), a pesar de que estos antibióticos son del mismo grupo. La amikacina y el cloranfenicol presentaron un mínimo porcentaje de resistencia. De igual modo, se observó un 13% de resistencia a timetoprim-sulfametoxazol, antibiótico que pertenece al grupo de las sulfonamidas y trimetoprim.

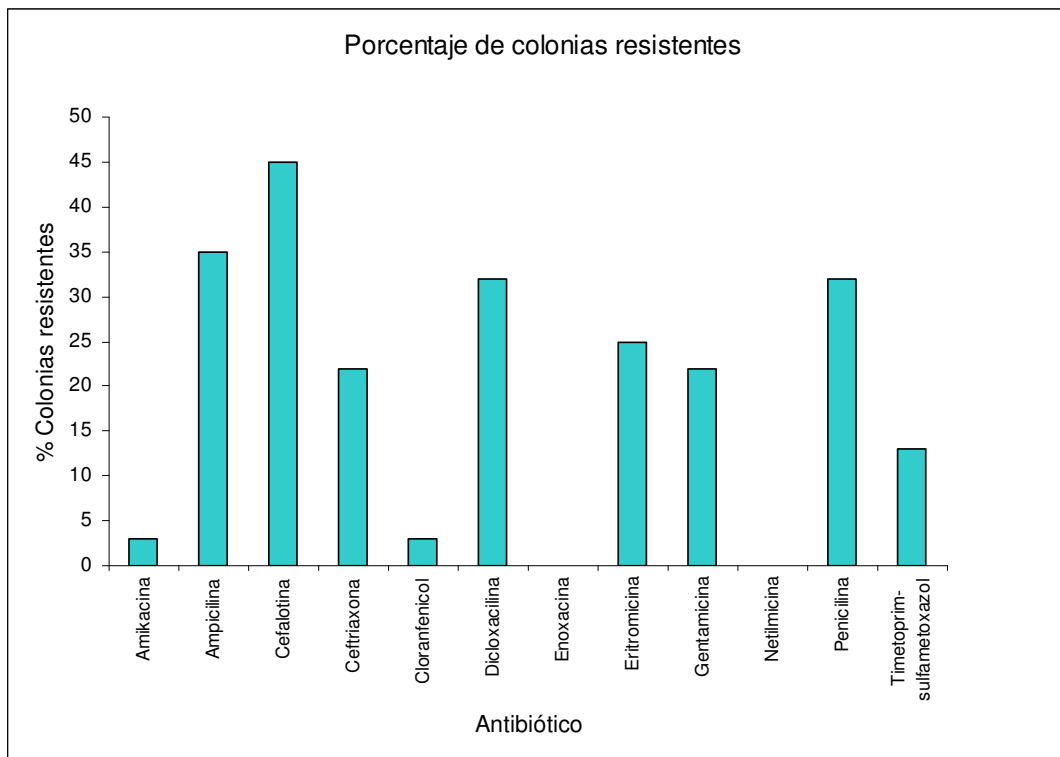


Gráfico 4. Porcentaje de colonias resistentes de carne de pollo de criadero.

### 7.1.3. Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero (primer muestreo)

Del aislamiento anterior se obtuvo la siguiente relación de colonias multiresistentes. Se consideró como multiresistencia cuando una bacteria presentó resistencia a cinco o más antibióticos. En la tabla 7 se describen las colonias multiresistentes del primer aislamiento de carne de pollo de criadero.

De los resultados obtenidos destaca la presencia de una bacteria multiresistente a 13 antibióticos, los cuales pertenecen a diferentes grupos, como es el caso de los aminoglucosídicos (AK, E, TE), betalactámicos (PE, AM, DC, CX), cefalosporinas (CF, CAZ, CXM), quinolonas (PEF) y sulfas (SXT, TS).



Posiblemente esta bacteria presenta multiresistencia de forma natural, que los antibióticos no puedan llegar a la estructura donde se ejerce la acción de éste; otro mecanismo posible sea por la modificación del sitio blanco del antibiótico; otro por la resistencia a antibióticos del tipo de las quinolonas sea por la mutación de la girasa de ADN, dando una menor afinidad de las quinolonas.

Por otro lado, se observa la presencia de bacterias multiresistentes a 11, 9, 8, 6 y 5 antibióticos. Cabe destacar que dos colonias aisladas del muestreo adquirido de tienda de Ciudad Universitaria son multiresistentes una a 11 y la otra a 6, el resto proviene del muestreo de la carne de tienda de Copilco, y fueron aisladas en medio Hecktoen que favorece el desarrollo de bacterias intestinales patógenas; esto es de suma importancia, ya que presuntivamente se trata de bacterias patógenas que presentan multiresistencia.

<b>Colonia</b>	<b>Resistencia a:</b>
<b>MPW Hecktoen 6</b>	<b>CX, TS, AM, AK, PE, SXT, E, CAZ, CF, DC, PEF, CXM, TE (13)</b>
<b>MPW CPS2 17</b>	<b>AMP, AK, PE, CL, CX, TS, CFP, ATM (8)</b>
<b>MPW Hecktoen 9</b>	<b>CL, CFP, ATM, TS, CX, AM, AK, PE (8)</b>
<b>MPW Hecktoen 15</b>	<b>CI, ATM, TS, CX, CFP, AM, AK, PE, CF (9)</b>
<b>MPU MacConkey 18</b>	<b>CFP, ATM, TS, CL, CX, PE, DC, CF, CAZ, E, AM (11)</b>
<b>MPW TSA 19</b>	<b>PE, CF, E, AM, DC (5)</b>
<b>MPW TSA 24</b>	<b>AM, E, CF, PE, DC, CXM (6)</b>
<b>MPW Hecktoen 13</b>	<b>PE, CF, DC, E, AM (5)</b>
<b>MPU MacConkey 9</b>	<b>AM, E, CF, PE, DC, CXM (6)</b>

Tabla 7. Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero

## 7.2 Segundo aislamiento carne de pollo de criadero.



Para confirmar los resultados del primer aislamiento de microorganismos resistentes a antibióticos de carne de pollo comercial, se realizó un segundo muestreo a partir de pollo de criadero (muslo) de las mismas tiendas Copilco y Ciudad Universitaria, bajo las mismas características experimentales con las que se trabajó el primero.

### 7.2.1 Aislamiento de bacterias de muslo de pollo de criadero

Del segundo muestreo realizado de carne de pollo de criadero (Tienda de Copilco y Ciudad Universitaria) se obtuvieron un total de 257 colonias de la carne de pollo de criadero, aisladas en los medios selectivos MacConkey, Hecktoen, EMB y SS como se muestra a continuación (tabla 8 y gráfico 5).

Medio Selectivo	Número de Colonias	%
Hecktoen	47	18.28
MacConkey	50	19.45
EMB	75	29.18
SS	80	31.12
TOTAL	257	100

Tabla 8. Colonias aisladas del segundo muestreo de muslo de pollo de criadero en diferentes medios selectivos

Los resultados obtenidos del segundo aislamiento de bacterias presentes en la carne de pollo de criadero de los dos muestreos (MPW y MPU) se muestran en el gráfico 5 de manera porcentual. Observamos que hubo un mayor aislamiento de bacterias en el medio *Salmonella-Shigella* (SS), donde se favorece el crecimiento de la flora bacteriana





del tipo de *Salmonella* presente en la carne de pollo. Del medio MacConkey que es un medio donde también se aíslan bacterias como *Salmonella* y coliformes, entre otras, se obtuvo un menor porcentaje de colonias aisladas. Con un porcentaje menor se obtuvieron colonias aisladas del medio Hecktoen. Para este segundo aislamiento del muestreo de carne de pollo de criadero se decidió utilizar un medio selectivo para el desarrollo de enterobacterias patógenas, agar eosina-azul de metileno (EMB) obteniéndose un porcentaje alto de colonias aisladas.

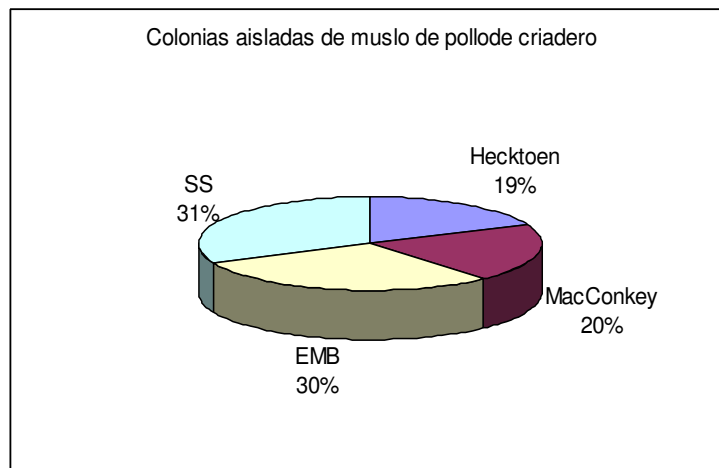


Gráfico 5. Porcentaje de bacterias aisladas en medios selectivos del segundo muestreo de carne de pollo de criadero



### **7.2.2 Características macro- y microscópicas.**

Se seleccionaron las colonias mejor aisladas y con mayor crecimiento; a cada una de ellas se le realizaron las observaciones macroscópicas: forma, textura, tamaño y agrupación y se realizó tinción de Gram.

Los microorganismos aislados en su mayoría presentaron entre sí características macro- y microscópicas semejantes dependiendo de cada medio en el cual fueron aisladas. Macroscópicamente colonias pequeñas, circulares, borde liso, cremosas; otro tipo de colonias eran grandes, lisas, circulares, presentando pigmentación de acuerdo al medio en el cual fueron aisladas, como algunas colonias de color salmón en el medio Hecktoen. En la observación microscópica, la tinción de Gram mostró que se trata de bacilos cortos Gram (-).

La descripción de las características macroscópicas de las colonias aisladas de las diferentes muestras se presentan en la tabla 9.



Tabla 9 . Características morfológicas de colonias del segundo aislamiento de carne de pollo de criadero en los diferentes medios selectivos.

Medio	Muestra y dilución	Colonias	Observaciones
Hecktoen	10 <sup>-7</sup>	Verdes-húmedas, planas transparentes. Verdes-azules sin centro negro.	El medio viró de verde a color azul oscuro.
	10 <sup>-8</sup>	Verde-azul sin centro negro muy pequeñas Verdes- húmedas, planas transparentes.	El medio viró de verde a color azul oscuro.
	10 <sup>-8</sup>	Colonias de color salmón con halo de precipitación. Verdes-azules sin centro	El medio viró de color verde oscuro a verde claro.
	10 <sup>-9</sup>	Colonias de color salmón con halo de precipitación. Verdes-azules sin centro	El medio viró de color verde oscuro a verde claro.
MacConkey	10 <sup>-7</sup>	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, transparentes	El medio viró del color rosado a un color café
	10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, transparentes	El medio viró del color rosado a un color café
	10 <sup>-8</sup>	Colinas grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa	El medio viró del color rosado a un color café
	10 <sup>-9</sup>	Colinas grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa	El medio viró del color rosado a un color café
EMB	10 <sup>-7</sup>	Colonias moradas, pequeñas, elevadas, bordes lisos	*
	10 <sup>-8</sup>	Colonias grandes, bordes lisos y elevadas.	*
	10 <sup>-8</sup>	Colonias cremosas, grandes, bordes lisos	*
	10 <sup>-9</sup>	Colonias grandes, bordes lisos, cremosas.	*
SS	10 <sup>-7</sup>	Pocas colonias aisladas, pequeñas, incoloras, circulares.	*
	10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas, circulares, transparentes	*
	10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas circulares, color café, poco aisladas.	*
	10 <sup>-9</sup>	Colonias pequeñas circulares, de color café oscuro.	*



\* No hubo observaciones importantes.

### 7.2.3 Determinación de la resistencia a antibióticos.

Las colonias aisladas anteriormente fueron sometidas a la prueba de antibiosis, inicialmente con tres antibióticos: penicilina, ampicilina y amikacina presentando un 100% de resistencia a penicilina y ampicilina.

Posteriormente estas cepas se sometieron a la prueba de sensibilidad con sensidiscos Bio-Rad, para determinar la posible resistencia a otros antibióticos (tabla 10 y gráfico 6).

Nombre	% Resistencia	Nombre	% Resistencia
Amikacina	0	Enoxacina	0
Ampicilina	100	Eritromicina	100
Cefalotina	87.5	Gentamicina	0
Ceftriaxona	20	Netilmicina	0
Cloranfenicol	10	Penicilina	100
Dicloxacilina	87.5	Timetoprim-sulfametoxazol	0

Tabla 10 . Porcentajes de colonias resistentes a diferentes antibióticos.

Como se observa en la tabla 10, las colonias presentaron resistencia a sólo 7 antibióticos; 4 de ellos del grupo de los betalactámicos (AM, PE, CF, DC y CRO), las colonias presentaron un 100% de resistencia a AM y PE, mientras que a CF y DC sólo el 87.5% de las colonias fueron resistentes. En un 20% de las colonias aisladas se observó resistencia a éste ceftriaxona.



En el caso de la eritromicina (E) y cloranfenicol (CL), antibióticos que pertenecen al grupo de los aminoglucosídicos, el 100% de las colonias fueron resistentes a eritromicina mientras que un 10% fue resistente a cloranfenicol.

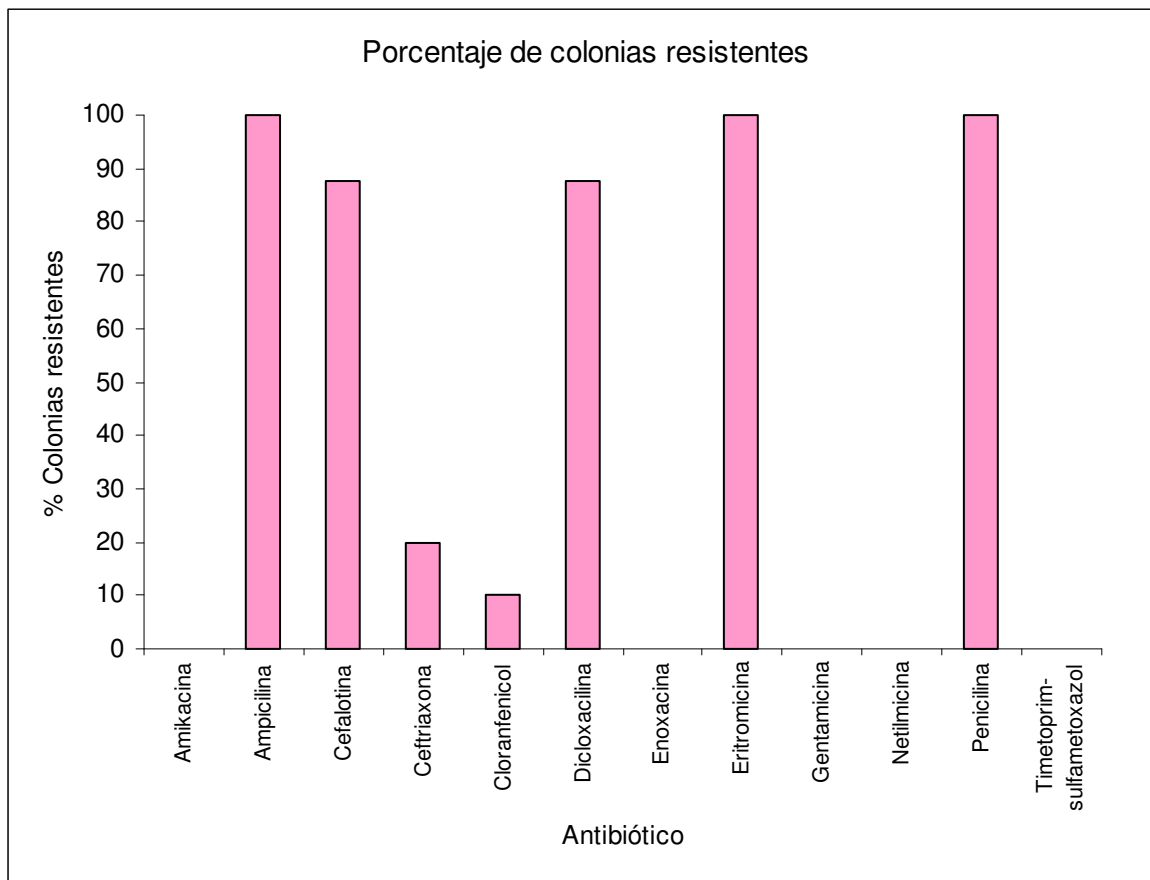


Gráfico 6. Porcentaje de colonias resistentes a diferentes antibióticos del segundo aislamiento de carne de pollo de criadero.

Como se observa en la tabla 10, en este muestreo de carne de pollo de criadero se presentó mayor porcentaje de resistencia a 7 antibióticos. El gráfico 6 muestra que



existe un alto porcentaje de colonias resistentes a 5 antibióticos, de los cuales 4 pertenecen al mismo grupo de antibióticos (AM, PE, CF, DC).

#### **7.2.4 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero (segundo muestreo)**

Del aislamiento anterior se obtuvo la siguiente relación de colonias multiresistentes. Como se mencionó anteriormente se consideró multiresistencia a la resistencia simultánea a 5 o más antibióticos. En la tabla 11 se describen las colonias multiresistentes del segundo aislamiento de carne de pollo de criadero.

<b>Colonia</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>MPW SS 24</b>	<b>AM, PE, E, CF, DC, CRO (6)</b>
<b>MPU Hecktoen 7</b>	<b>AM, PE, DC, CF, CL, E, CRO (7)</b>
<b>MPW MacConkey 5</b>	<b>PE, CF, E, AM, DC (5)</b>

Tabla 11. Colonias multiresistentes aisladas del segundo aislamiento de carne de pollo de criadero

En este caso se obtuvieron menos colonias que presentaban multiresistencia a más de cinco antibióticos aunque otras 13 colonias presentaban la misma multiresistencia a 5 antibióticos (AM, PE, E, CF y DC), lo que sugiere que podría tratarse del mismo microorganismo.

Solo una colonia presentó multiresistencia a 7 antibióticos, seis de ellos pertenecen al grupo de betalactámicos que interfieren con la síntesis de la pared celular.



### 7.3 Aislamiento de microorganismos de carne de pollo de granja.

A partir de la extracción realizada a la muestra de carne de pollo de granja (Tulyehualco) se obtuvieron un total de 356 colonias en los medios selectivos MacConkey, Hecktoen, EMB, SS y BPLS2 como se muestra en la tabla 12 y gráfico 7. En la tabla 11 se detallan los resultados obtenidos del aislamiento de bacterias presentes en la carne de pollo de granja, reportándose el número y porcentaje de colonias aisladas en los distintos medios

Medio Selectivo	Número de Colonias	%
Hecktoen	57	16
MacConkey	60	16.85
EMB	88	24.10
SS	97	27.24
BPLS	54	15.16
TOTAL	356	100

Tabla 12. Porcentaje de colonias aisladas de carne de pollo de granja.

En el gráfico 7, observamos que hubo un mayor aislamiento de bacterias en el medio *Salmonella-Shigella* (SS) y en agar eosina azul de metileno (EMB), donde se favorece el crecimiento de *Salmonella*, que puede estar presente en la carne de pollo. Con un porcentaje menor se obtuvieron colonias aisladas en BPLS, a pesar de que en este medio se favorece el crecimiento de *Salmonella*; en menor porcentaje se aislaron colonias de los medios Hecktoen y MacConkey.

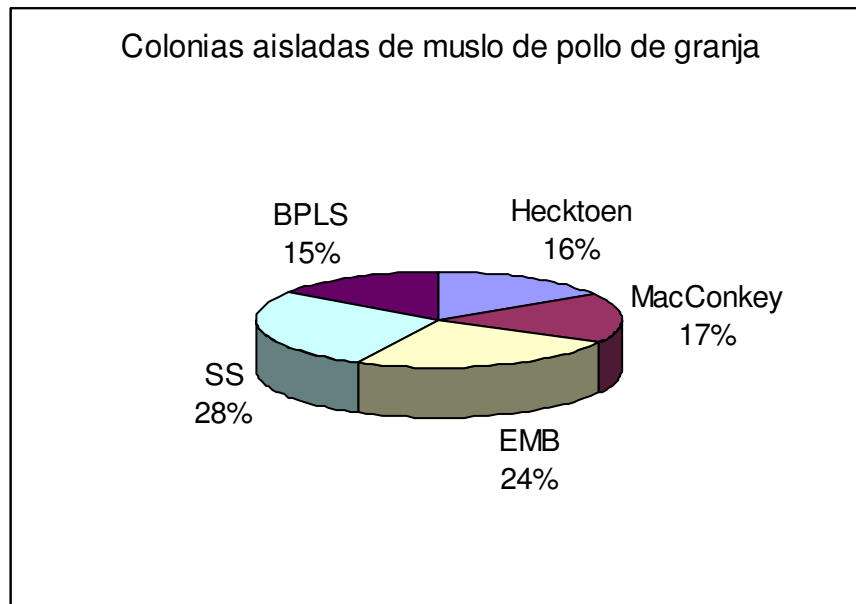


Gráfico 7. Porcentaje de microorganismos aislados de carne de pollo de granja.

### 7.3.1 Características macro- y microscópicas.

Se seleccionaron las colonias mejor aisladas y con mayor crecimiento, a cada una de ellas se le realizaron las observaciones macroscópicas de las que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño y agrupación y, posteriormente, tinción de Gram.

Los microorganismos aislados en su mayoría presentaron características macro- y microscópicas semejantes. Macroscópicamente colonias pequeñas, circulares, borde liso, cremosas, húmedas, de color naranja, otras eran grandes, lisas, circulares y textura viscosa. En la parte microscópica al realizar la tinción de Gram resultaron ser bacilos cortos Gram (-).





En la tabla 13 se describe el medio en el que se realizó el aislamiento, la muestra, el tipo de colonias que se observaron y sus respectivas observaciones

Tabla 13 . Características morfocoloniales de colonias del primer aislamiento de carne de pollo de granja en los diferentes medios selectivos.

Medio	Muestra y dilución	Colonias	Observaciones
Hecktoen	$10^{-6}$	Húmedas, planas transparentes. Colonias pequeñas naranjas, cremosas, borde liso	El medio viró de verde a naranja "salmón"
	$10^{-7}$	Húmedas, planas transparentes. Colonias pequeñas naranjas, cremosas, borde liso	El medio viró de verde a naranja "salmón"
	$10^{-8}$	Colonias de color salmón con halo de precipitación, bordes lisos.	El medio viró de verde a naranja "salmón"
	$10^{-9}$	Colonias de color salmón con halo de precipitación, bordes lisos.	El medio viró de verde a naranja "salmón"
MacConkey	$10^{-6}$	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, cremosas, bordes lisos.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-7}$	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, cremosas, bordes lisos.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-8}$	Colonias grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-9}$	Colonias grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
BPLS	$10^{-6}$	Colonias pequeñas y grandes, bordes lisos, cremosas.	El medio viró de color rojo a verde-amarillo
	$10^{-7}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
	$10^{-8}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
	$10^{-9}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
EMB	$10^{-6}$	Colonias pequeñas, moradas, elevadas, bordes lisos.	*
	$10^{-7}$	Colonias grandes, bordes lisos y elevadas.	*
	$10^{-8}$	Colonias cremosas, grandes, bordes lisos	*
	$10^{-9}$	Colonias grandes, bordes lisos, cremosas.	*
SS	$10^{-6}$	Pocas colonias aisladas, pequeñas, incoloras, circulares, bordes lisos, cremosas.	El medio viró de color rojo a amarillo
	$10^{-7}$	Colonias pequeñas, circulares, transparentes, bordes lisos, cremosas.	*



	10 <sup>-8</sup>	Colonias pequeñas circulares, bordes lisos, cremosas, brillosas.	*
	10 <sup>-9</sup>	Colonias pequeñas circulares, bordes lisos, cremosas, brillosas.	*

\* No hubo observaciones importantes.

### 7.3.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.

De las colonias anteriores se seleccionaron 10 colonias que fueron probadas inicialmente con penicilina, amikacina y ampicilina, presentando un 100% de resistencia a penicilina y ampicilina. Posteriormente, se realizó la prueba de sensibilidad con sensibilizadores Bio-Rad, para determinar la posible resistencia a otros antibióticos.

En la tabla 14 se reporta el porcentaje de colonias resistentes a alguno de doce antibióticos.

Nombre	%	Nombre	%
Amikacina	0	Enoxacina	0
Ampicilina	100	Eritromicina	0
Cefalotina	40	Gentamicina	0
Ceftriaxona	0	Netilmicina	0
Cloranfenicol	0	Penicilina	100
Dicloxacilina	100	Timetoprim-sulfametoxazol	0

Tabla 14. Porcentajes de cepas resistentes a antibióticos de bacterias aisladas de carne de pollo de granja.

Se observa que las colonias aisladas son sensibles a 8 antibióticos; por otro lado presentan un 100% de resistencia a ampicilina, dicloxacilina y penicilina, que pertenecen al grupo de betalactámicos y en menor porcentaje hay colonias resistentes a cefalotina. Observando el gráfico 9, el porcentaje de resistencia bacteriana a los antibióticos del tipo betalactámicos (penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina) es



significativo ya que la cefalotina pertenece al mismo grupo de antibióticos. Podría esperarse que hubiera mayor número de bacterias resistentes a este antibiótico.

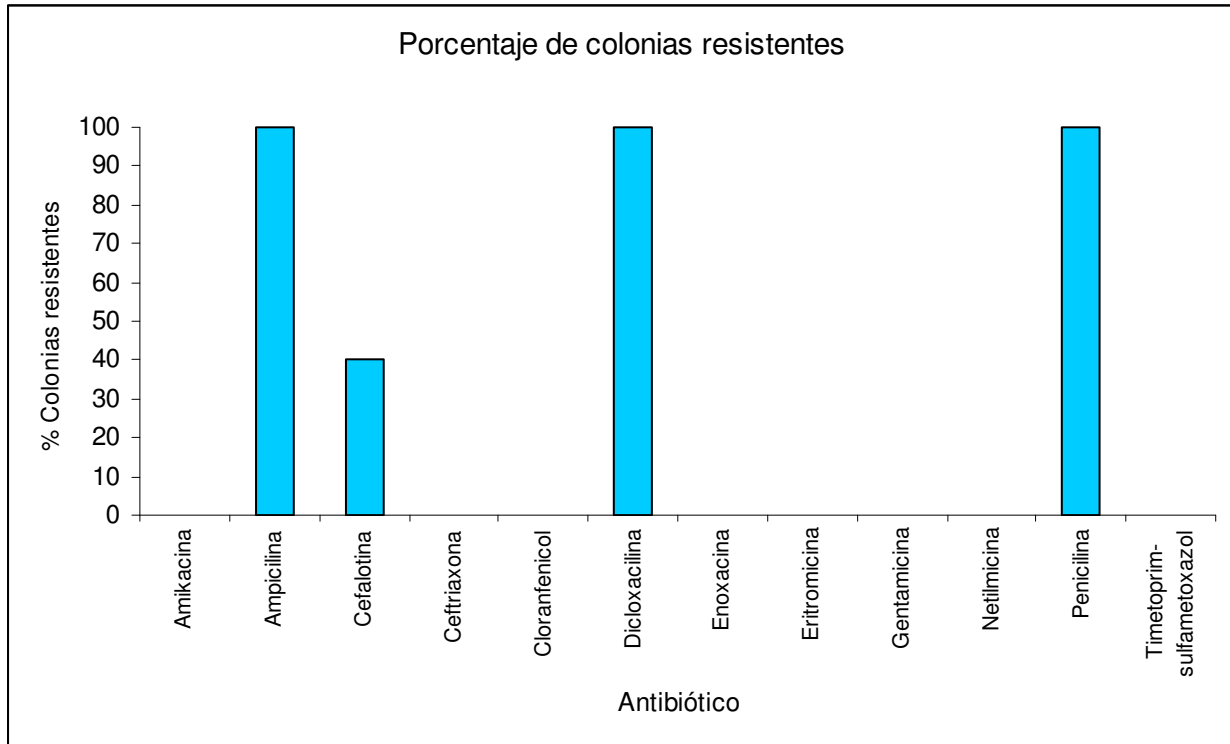


Gráfico 9. Porcentaje de colonias resistentes a diferentes antibióticos.

### 7.3.3 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de granja (primer muestreo).

Del aislamiento anterior se obtuvo la siguiente relación de colonias multiresistentes. En este caso, se consideró como multiresistencia la resistencia simultánea a partir de tres antibióticos ya que aunque el porcentaje de resistencia a antibióticos fue elevado, sólo se observó resistencia simultánea a cuatro antibióticos. En la tabla 15 se describen las colonias multiresistentes del primer muestreo de carne de pollo de granja.



De los resultados obtenidos, los antibióticos a los cuales son multiresistentes las bacterias aisladas de este muestreo pertenecen al grupo de betalactámicos (PE, AM y DC) y cefalosporinas (CF).

Colonia	Antibióticos
G EMB 3	AM, CF, PE, DC (4)
G BPLS 8	AM, CF, PE, DC (4)
G SS 1	AM, CF, PE, DC (4)
G MacConkey 1	AM, CF, PE, DC (4)
G Hecktoen 12	AM, CF, PE, DC (4)

Tabla 15. Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero

#### 7.4 Segundo aislamiento de bacterias de muslo de pollo de granja.

Para confirmar los resultados del primer aislamiento de microorganismos multiresistentes a antibióticos de carne de pollo de granja, se realizó un segundo aislamiento, bajo las mismas características con las que se trabajó el primer muestreo.

De esta segunda extracción realizada con carne de pollo de granja se obtuvieron un total de 112 colonias aisladas en los medios selectivos MacConkey, Hecktoen, EMB, BPLS y SS.

En la tabla 16 y gráfico 10, se reporta el número relativo de colonias aisladas de cada medio utilizado.

Medio Selectivo	Número de Colonias	%
Hecktoen	18	16.07
MacConkey	31	27.67
EMB	29	25.89
BPLS	19	16.96



SS	15	13.39
Total	112	100

Tabla 16. Colonias aisladas del segundo muestreo de carne de pollo de granja

En este aislamiento se obtuvo un menor porcentaje de colonias aisladas con respecto al primer muestreo de carne de pollo de granja. Se obtuvo un alto porcentaje de colonias aisladas en los medios MacConkey y EMB; en este último caso posiblemente se aislaron enterobacterias. Como se muestra en el gráfico 10, menos colonias fueron aisladas en los medios *Salmonella-Shigella* (SS), Hecktoen y BPLS.

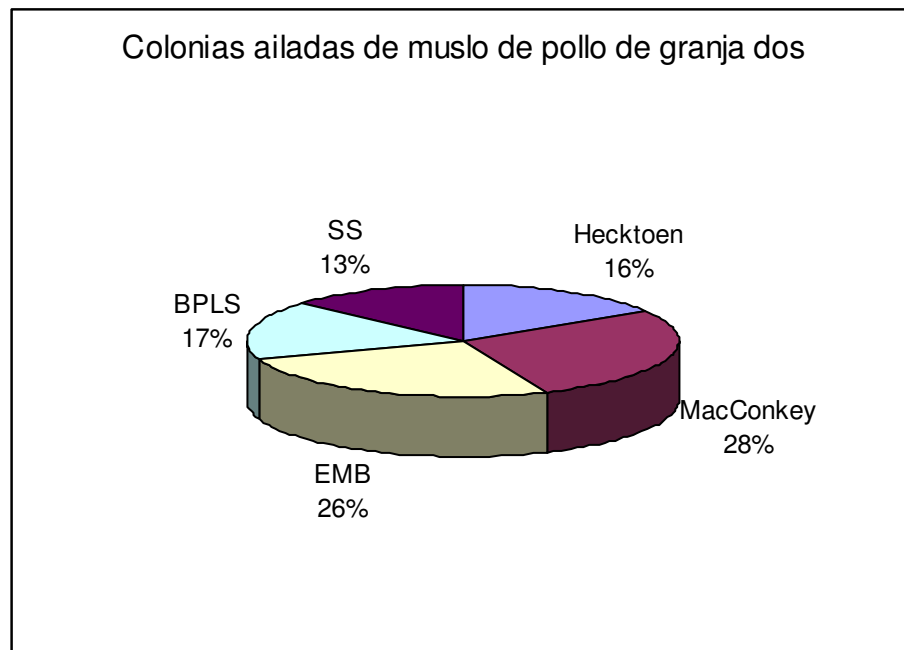


Gráfico 10. Porcentaje de colonias aisladas de carne de pollo de segundo aislamiento granja.



#### **7.4.1 Características macro- y microscópicas.**

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño, agrupación, etc. Presentaban características similares, colonias pequeñas, húmedas, borde liso, textura viscosa. Otras características dependieron del medio en el cual fueron aisladas como en el caso del medio MacConkey en el que algunas colonias presentaban características particulares como: colonias grandes, borde ondulado, color rosado y textura viscosa.

Microscópicamente, resultaron ser bacilos cortos Gram (-).

En la tabla 17 se describe el medio en el que se realizó el aislamiento, la muestra, el tipo de colonias que se observaron, posible microorganismo y sus respectivas observaciones.



Tabla 17. Características morfológicas de colonias aisladas de carne de pollo de granja en los diferentes medios selectivos

Medio	Muestra y dilución	Colonias	Observaciones
Hecktoen	$10^{-6}$	Húmedas, planas transparentes. Colonias pequeñas naranjas, cremosas, borde liso	El medio viró de verde a rosa-rojizo
	$10^{-7}$	Húmedas, planas transparentes. Colonias pequeñas naranjas, cremosas, borde liso	El medio viró de verde a naranja "salmón"
	$10^{-8}$	Colonias de color salmón con halo de precipitación, bordes lisos.	El medio viró de verde a naranja "salmón"
	$10^{-9}$	Colonias de color salmón con halo de precipitación, bordes lisos.	El medio viró de verde a naranja "salmón"
MacConkey	$10^{-6}$	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, cremosas, bordes lisos.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-7}$	Colonias pequeñas no bien definidas, incoloras, cremosas, bordes lisos.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-8}$	Colonias grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
	$10^{-9}$	Colonias grandes, borde ondulado, color rosado, textura viscosa.	El medio viró del color rosado a un color café-claro
BPLS	$10^{-6}$	Colonias pequeñas y grandes, bordes lisos, cremosas.	El medio viró de color rojo a verde-amarillo
	$10^{-7}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
	$10^{-8}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
	$10^{-9}$	Colonias grandes, cremosas, lisas, bordes lisos.	El medio viró de color rojo a verde
EMB	$10^{-6}$	Colonias pequeñas, elevadas, bordes lisos.	No hay cambio de color
	$10^{-7}$	Colonias grandes, bordes lisos y elevadas.	No hay cambio de color
	$10^{-8}$	Colonias cremosas, grandes, bordes lisos	No hay cambio de color
	$10^{-9}$	Colonias grandes, bordes lisos, cremosas.	No hay cambio de color
SS	$10^{-6}$	Pocas colonias aisladas, pequeñas, incoloras, circulares, bordes lisos, cremosas.	El medio viró de color rojo a amarillo
	$10^{-7}$	Colonias pequeñas, circulares, transparentes, bordes lisos, cremosas.	Colonias de color ámbar.
	$10^{-8}$	Colonias pequeñas circulares, bordes lisos, cremosas, brillosas.	Colonias de color ámbar.
	$10^{-9}$	Colonias pequeñas circulares, bordes lisos, cremosas, brillosas.	Colonias de color ámbar.



### 7.4.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.

Las colonias anteriores se sometieron a la prueba de antibiosis. Se tomó una muestra de 10 colonias que fueron probadas inicialmente con penicilina, amikacina y ampicilina, presentando un 100% de resistencia a penicilina y ampicilina. Se utilizaron sensidiscos Bio-RAD para probar la resistencia a otros antibióticos y en la tabla 18 se muestra el porcentaje de resistencia a cada antibiótico.

Nombre	% Resistencia	Nombre	% Resistencia
Amikacina	0	Enoxacina	0
Ampicilina	100	Eritromicina	20
Cefalotina	70	Gentamicina	0
Ceftriaxona	0	Netilmicina	0
Cloranfenicol	40	Penicilina	100
Dicloxacilina	100	Timetoprim-sulfametoxazol	0

Tabla 18. Resistencia a antibióticos con sensidiscos combinados

En este caso se repite la observación de la resistencia del 100% de bacterias a ampicilina, dicloxacilina y penicilina como en el primer muestreo. Asimismo se observó un incremento en el número de colonias resistentes a cefalotina con respecto al primer muestreo ya que en éste caso se obtuvo un 70% de colonias resistentes contra un 40% de colonias resistentes obtenidas en el primer muestreo. Llama la atención también el aislamiento de un 40% de colonias resistentes a cloranfenicol no habiéndose aislado ninguna colonia resistente en el primer muestreo así como también la presencia de un 20% de colonias resistentes a eritromicina, mientras que en el primer muestreo no se detectó ninguna colonia resistente a éste antibiótico.





Como se observa en el gráfico 11, en este segundo muestreo de carne de pollo de granja aparecieron bacterias resistentes a un mayor número de antibióticos con respecto al primer muestreo. Por otro lado, en este muestreo se presenta un menor porcentaje de colonias resistentes a cloranfenicol y eritromicina con respecto a aquellas resistentes a ampicilina, penicilina y dicloxacilina.

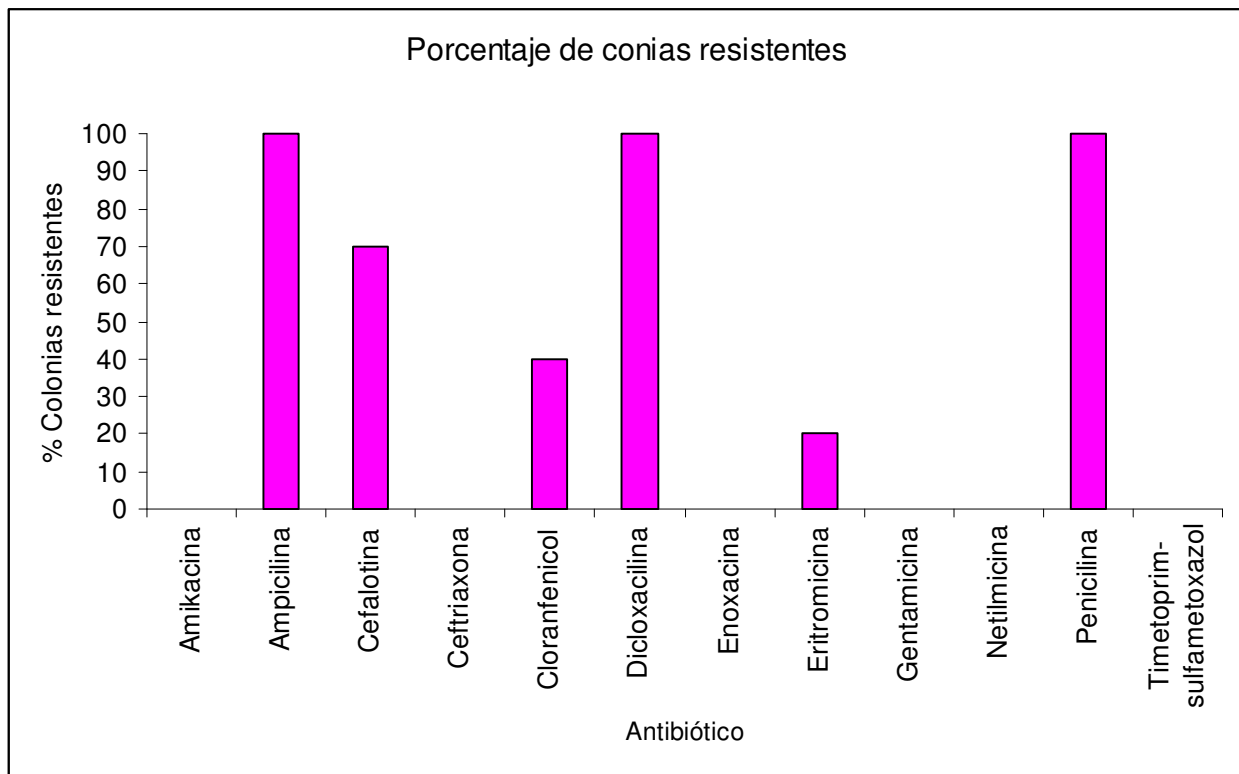


Gráfico 11. Porcentaje de colonias resistentes a antibióticos del segundo aislamiento de carne de pollo de granja.



### 7.4.3 Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de granja (segundo muestreo)

Del aislamiento anterior se obtuvo la siguiente relación de colonias multiresistentes, en este caso se consideró una multiresistencia a partir de 5 antibióticos. En la tabla 19 se describen las colonias multiresistentes del segundo muestreo de carne de pollo de granja. De los resultados obtenidos de antibióticos a los cuales son multiresistentes las bacterias aisladas de este muestreo se infiere que dichos fármacos pertenecen al grupo de betalactámicos (PE, AM y DC), cefalosporinas (CF) y aminoglucósidos (CL y E).

<b>Colonia</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>G2 EMB 12</b>	<b>AM, CF, PE, DC, CL (5)</b>
<b>G2 BPLS 7</b>	<b>AM, CF, PE, DC, CL, E (6)</b>
<b>G2 MacConkey 28</b>	<b>AM, CF, PE, DC, CL, E (6)</b>

Tabla 19. Colonias multiresistentes aisladas de carne de pollo de criadero



### 7.5 Identificación de secuencias específicas de ADN por PCR

Se realizó la extracción de ADN total de las cepas que presentaron resistencia a 5, 7 y 8 antibióticos y de 1 cepa con resistencia a amikacina para determinar la posible presencia del integrón tipo I por medio de PCR. Los productos obtenidos de esta técnica se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa dando como resultado la presencia de las siguientes bandas (Figura 2).

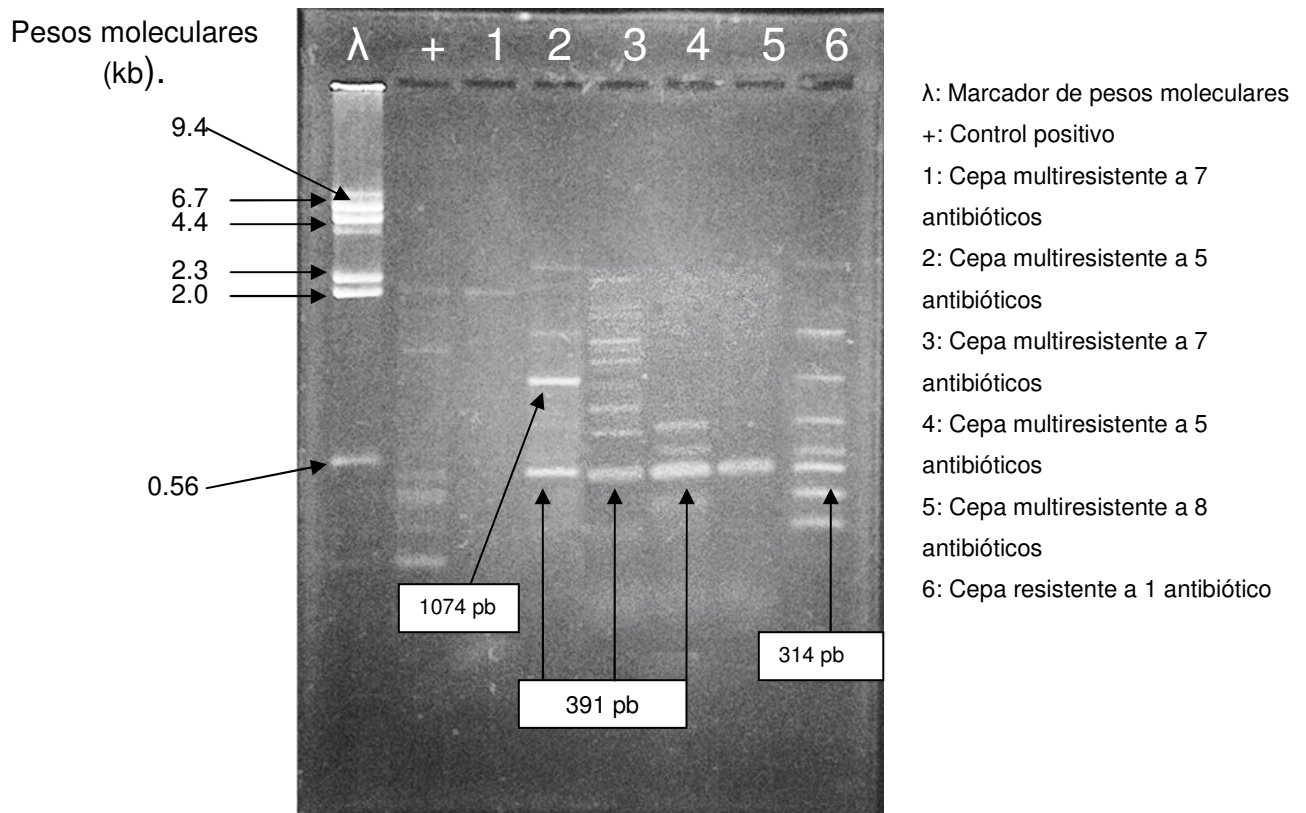


Figura 2. Productos (amplicones) obtenidos por la técnica de

Ver Anexo V donde se muestran los cálculos para la determinación de los pesos moleculares de las bandas obtenidas



Como se observa en el gel anterior, el integrón tipo I está presente en cinco de las cepas estudiadas ya que se presentó amplificación de fragmentos discretos de ADN. La cepa 2, multiresistente a por lo menos 5 antibióticos, presenta dos bandas de 1074 pb y 391 pb respectivamente. Esto nos indica que como cada triplete codifica para un aminoácido en este caso podría codificarse para dos posibles proteínas de 358 aminoácidos y 130 aminoácidos, las cuales podrían participar en la resistencia a antibióticos.

Por otro lado la cepa 3 que presentó una multiresistencia a 7 antibióticos, expresó una banda de 391 pb que nos indica que podría codificar para un polipéptido de unos 130 aminoácidos al igual que la cepa 4 que presentó multiresistencia a 5 antibióticos.

En el caso de la cepa 6 ésta presentó varias bandas pero sólo presentó resistencia a amikacina. Se observó una banda que está por debajo del último peso molecular del marcador de pesos moleculares. Observamos que es una banda de 314 pb indicándonos que podría codificar para un polipéptido de unos 104 aminoácidos de longitud.

La importancia de éste gel, es que demuestra la presencia del integrón tipo I.



## 7.6 Identificación bacteriana

Características generales de la familia *Enterobacteriaceae*

- Bacilos gram negativos rectos.
- No formadores de esporas.
- Anaerobios facultativos.
- Catalasa variables, por lo común positivos.
- Cápsula variable.
- Movilidad variable; si es positiva, flagelos peritricos; excepto *Tatumella*, flagelos laterales
- Oxidasa negativos.
- O/F de la glucosa: F (fermentativos) o F y O (oxidativos).
- Temperatura óptima de crecimiento: 37° C
- Reducción de nitratos: variable, por lo común positiva.
- Crecimiento en MacConkey.

Posterior a la determinación de la posible presencia del integrón I, las colonias estudiadas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas. En la tabla 20 se desglosan los resultados de las pruebas bioquímicas.

Prueba BQ	1	2	3	4	5	6
LIA	+	+	+	+	+	+
KIA	Alc/A	Alc/A	A/A	A/A	A/A	A/A
SIM	S-, M+	S-, M+	S- M+	S- M+	S- M+	S- M+
Ureasa	+	+	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	+	+
KCN	+	+	+	+	+	+
Malonato	-	-	+	+	-	+
Indol	+	+	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
RM	-	-	+	+	+	+
Citrato	-	-	+	+	-	+
Catalasa	+	+	+	+	-	+
Anaerobiosis	-	-	+	+	+	+

Tabla 19. Pruebas bioquímicas. Alc/A: alcalino/ ácido A/A: ácido/ácido S:  
Producción de H<sub>2</sub>S M: Movilidad I: Indol



De acuerdo a los resultados anteriores y a la literatura, los microorganismos aislados de la carne de pollo de criadero con un 80% de confiabilidad en las pruebas presuntivamente corresponde a cepas número 1 y 2, *Serratia sp.*, la cepas número 3, 4 y 6 son *Pseudomonas sp.* y la cepa número 5 es *Salmonella sp.*<sup>16</sup>

Además de los resultados de las pruebas bioquímicas, en los medios en que se hicieron los aislamientos de microorganismos, se describen ciertas características morfológicas de cada medio. Por ejemplo en el caso de la presencia de *Salmonella sp.*, el medio SS es selectivo favoreciendo el desarrollo de *Salmonella, Shigella*. Esto ayudó a determinar las pruebas bioquímicas que se efectuaron, ya que se realizaron pruebas específicas para la determinación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.



## 8. Discusión

En este estudio inicialmente se confirmaron los resultados, tanto de carga microbiana como de la multiresistencia a antibióticos presentes en la carne de pollo tanto de criadero como de granja.

La carga microbiana de los muestreos de carne de criadero (Bachoco) indica que se obtuvieron un total de 371 colonias de los dos aislamientos del muslo de pollo de criadero en los diferentes medios selectivos para enterobacterias. En cambio, se obtuvieron un total de 468 colonias de los dos aislamientos del muslo de pollo de granja de los medios selectivos para enterobacterias. Posiblemente la carga microbiana presente en la carne de pollo de criadero es relativamente baja con respecto a la carne de granja, ya que el pollo de criadero se adquirió de una tienda de auto servicio, que previamente antes de su venta pasa por un proceso de higiene y limpieza. Otro factor importante a mencionar es que estos pollos de criadero se mantienen en congelación y en refrigeración, manteniendo en mejores condiciones el producto y disminuyendo la carga microbiana. Algunos microorganismos se encuentran en un estado de latencia y al hacer la extracción con el enriquecimiento se favorece el crecimiento de esos microorganismos.

El aislamiento en medios selectivos para enterobacterias, facilita la identificación de los microorganismos, que por sus características morfológicas, nos da una idea del posible microorganismo que se aisló, como es el caso de los medios SS *Salmonella*-



*Shigella*, MacConkey, Hecktoen que nos brindan información sobre ciertos microorganismos en específico.

Los resultados de la prueba de antibiosis sugieren que el pollo de criadero presenta mayor resistencia a antibióticos posiblemente por la utilización de éstos como promotores del crecimiento. En la primera parte de la prueba de antibiosis las colonias aisladas de la carne de pollo presentan una resistencia del 100% a penicilina y ampicilina y por el contrario una mínima resistencia a amikacina (3%), sin embargo se presentó un alto número de resistencia a antibióticos, pero con un bajo porcentaje de colonias resistentes a éstos como se observa en el gráfico 4; comparando con los resultados del segundo aislamiento de microorganismos de carne de pollo de criadero en el grafico 6 con respecto a la resistencia se tiene menor número de resistencia a antibióticos, pero mayor porcentaje de colonias resistentes a ellos.

De los resultados obtenidos de los muestreos de carne de pollo de criadero, se comparan en el siguiente grafico 11 los resultados obtenidos de los microorganismos resistentes a 12 antibióticos. Los microorganismos presentes en el primer aislamiento presentaron resistencia a mayor número de antibióticos pero con un menor porcentaje de colonias; en segundo muestreo, la presencia de microorganismos resistentes fue mayor a menor numero de antibióticos en comparación con el primero.



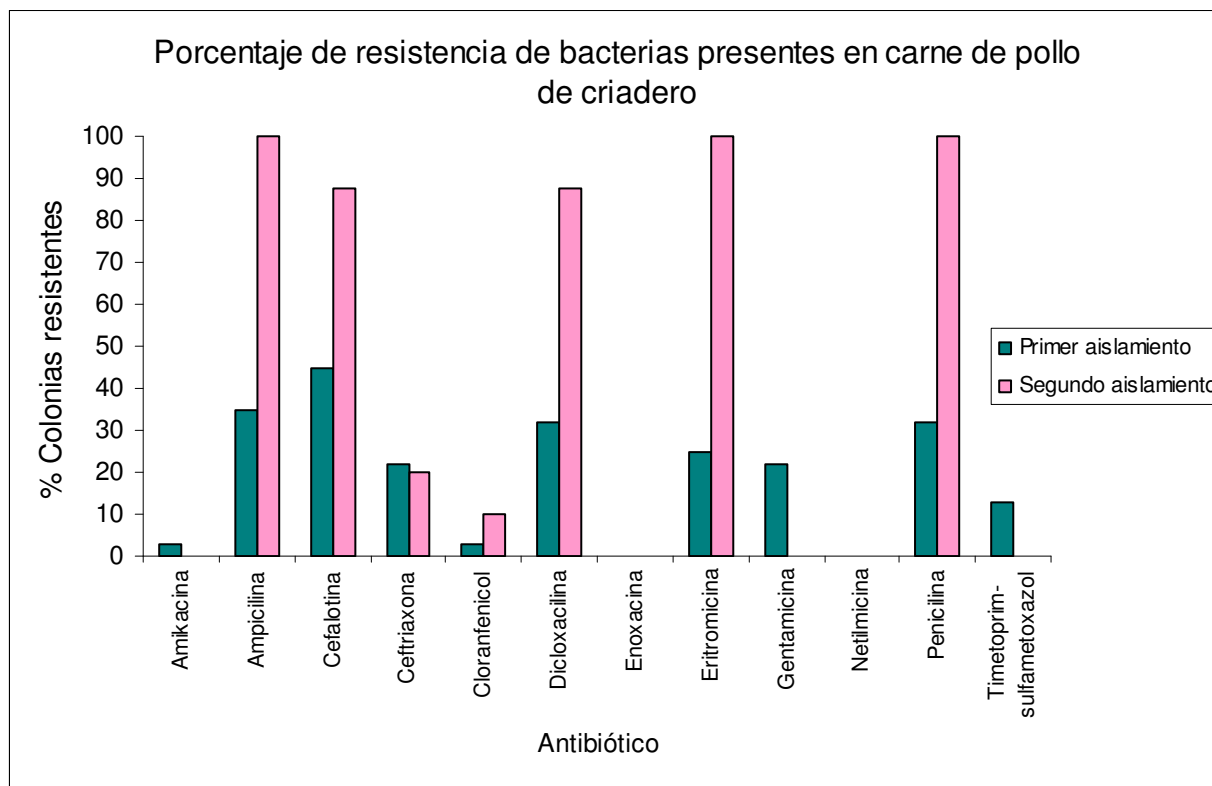


Gráfico 11 . Resistencia de bacterias aisladas de carne de pollo de criadero.

Tal vez esto indica que los antibióticos que frecuentemente son utilizados como promotores de crecimiento pertenecen a la familia de los betalactámicos como la penicilina, ampicilina, dicloxacilina y cefalotina que son los antibióticos que presentaron mayor porcentaje de colonias resistentes a ellos, a pesar de que en la literatura se encuentra reportado que, de estos antibióticos solo la penicilina está recomendada como aditivo promotor del crecimiento además de bacitracina, mutilen disalicilato de bacitracina, bacitracina zinc, ciortetraciclina, oxitetraciclina, tylosina, vliginamicina, bambermicina, lincomicina y monensina.<sup>19</sup>

Finalmente del muestreo de carne de pollo de criadero, efectivamente se encontraron bacterias multiresistentes de 5 hasta 13 antibióticos (tabla 7 y 10) que pudo generarse



por varios motivos; por resistencia natural, que el antibiótico no pueda llegar a la estructura donde actúa; otra sería por la permeabilidad del organismo al antibiótico; otro caso sería que el microorganismo sea capaz de alterar el antibiótico, por mecanismos enzimáticos; por resistencia adquirida, cromosómica, extracromosómica, conjugación, transducción y transposición.

Además que éstos microorganismos fueron aislados de muestras de carne de pollo al cual se le adicionan antibióticos al alimento como promotores de crecimiento, generando y modificando microorganismos multiresistentes a los antibióticos suministrados o derivados de ellos.

Los resultados obtenidos del aislamiento de microorganismos presentes en el pollo de granja son llamativos ya que se suponía que probablemente no existiría resistencia a antibióticos ya que éstos animales provienen de una granja donde la alimentación no contiene antibióticos como promotores de crecimiento.

Se reporta una resistencia del 100% de las colonias aisladas a ampicilina, penicilina y dicloxacilina en ambos aislamientos de la carne de pollo de granja como se observa en los gráficos 8 y 10. Además de éstos tres antibióticos se obtuvo un porcentaje bajo de colonias resistentes a cefalotina en el primer aislamiento y en el segundo aislamiento un 70% de colonias resistentes a cefalotina y un 20% de resistencia a eritromicina. Esta resistencia podría explicarse a que en la zona en la cual fueron criados éstos animales puede existir la presencia de antibióticos en el subsuelo, agua o por el contacto con personas que han consumido antibióticos y no existe una higiene



adecuada; también pudiera ocurrir que estos animales se hayan contaminado con bacterias resistentes presentes en el ambiente.

De los resultados obtenidos de los muestreos de carne de pollo de granja, se comparan en el siguiente grafico 12 los resultados obtenidos de los microorganismos resistentes a 12 antibióticos. Los microorganismos presentes en el primer aislamiento presentaron resistencia a menor número de antibióticos pero con un menor porcentaje de colonias; en segundo muestreo, la presencia de microorganismos resistentes fue del 100% igual al primer aislamiento a penicilina, dicloxacilina y ampicilina pero con resistencia a tres antibióticos mas con menor porcentaje.

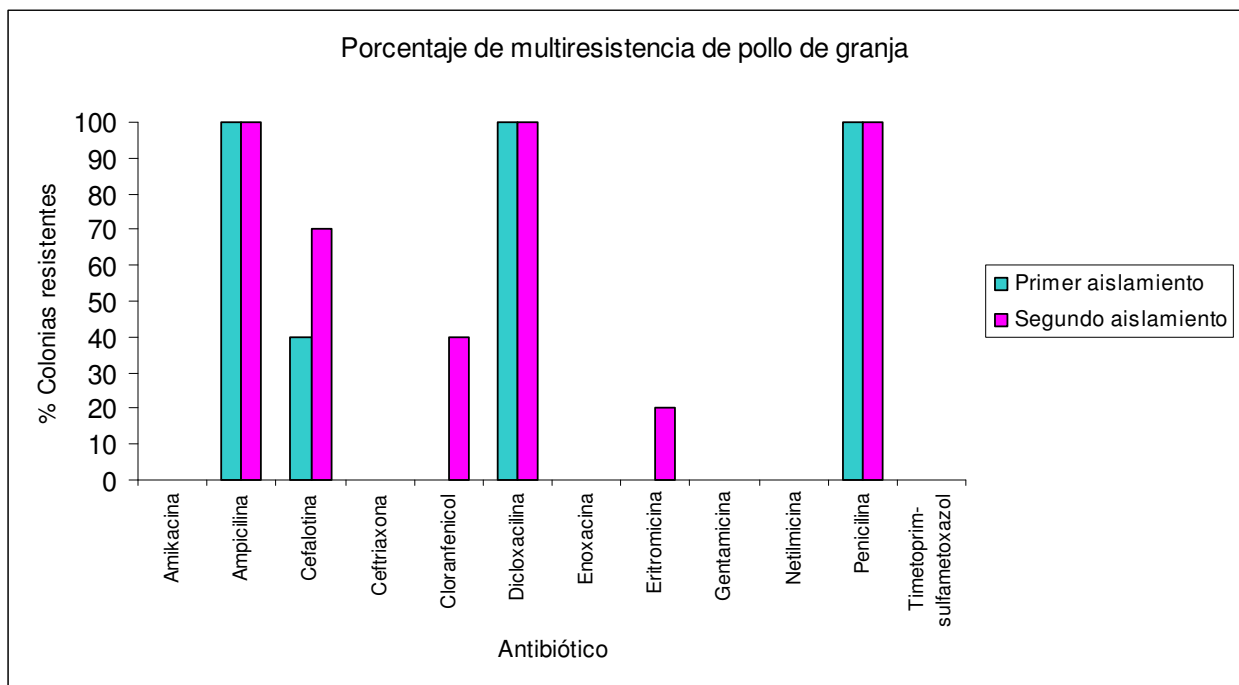


Gráfico 12. Resistencia a antibióticos de microorganismos aislados de carne de pollo de granja.



En el muestreo de carne de pollo de granja, se encontraron pocas bacterias multiresistentes a antibióticos (tabla 14 y 18) que pudo generarse por varios motivos; por resistencia natural, que le antibiótico no pueda llegar a la estructura donde actúa, en este caso se presume que sería la forma por la cual estos microorganismo son multiresistentes a antibióticos, ya que se presume que no han tenido contacto anteriormente con antibióticos de forma directa como aditivos en alimento para el animal. Otra causa sería por resistencia adquirida: por mutación o por la adquisición de material genético extracromosomal. Otra manera sería por transducción, intercambio genético, que transfiere ADN celular de una célula a otra por medio de virus.

En el siguiente gráfico se muestra un análisis comparativo del número de antibióticos y la resistencia presente en los dos muestreos realizados, de carne de pollo de criadero (Bachoco) y de granja (Tulyehualco). Se observa que los microorganismos aislados de la carne de pollo de criadero presentan mayor porcentaje de resistencia a antibióticos. Por otro lado en la carne de pollo de granja, se observa menor porcentaje de resistencia a antibióticos, sin embargo presenta un 100% de resistencia a tres antibióticos de uso común y que actúan sobre la pared celular (gráfico 13).

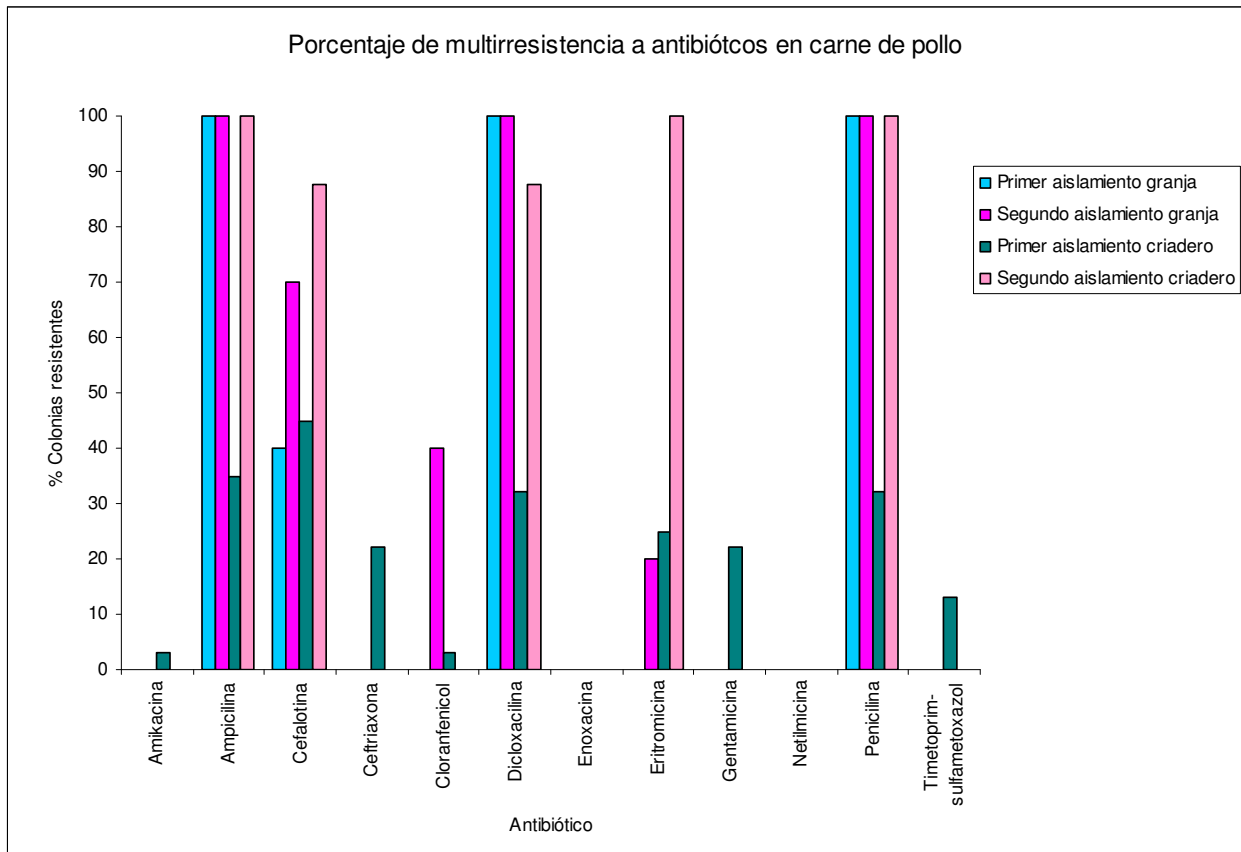


Gráfico 13. Porcentaje de colonias resistentes a diferentes antibióticos en bacterias aisladas de carne de pollo de criadero (Bachoco) y de granja (Tulyehualco)



A las cepas de carne de pollo de criadero se les hizo una extracción de ADN para poder estudiarlo y determinar si existía la presencia del integrón I que puede portar genes estructurales de resistencia a antibióticos. Este elemento genético se encontró en 4 cepas. Los pesos moleculares que se obtuvieron fueron los siguientes: de la cepa numero 2 multiresistente a 5 antibióticos se obtuvieron fragmentos con pesos equivalentes a 1074pb y 391pb; de igual manera en las cepas 4 y 5 se observó una banda de 391pb y, finalmente, la cepa numero 6 mostró una banda con un peso de 314pb. Esto nos indica efectivamente la presencia de un integrón que han sido identificados en bacilos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae*. Esto es importante, ya que las bacterias que fueron estudiadas, presentan las características anteriormente mencionadas. La presencia de bandas con pesos moleculares que nos indican la presencia de proteínas de 358, 130 y 104 aminoácidos que posiblemente participe en la estructura básica del integrón y genere una resistencia a por lo menos 5 antibióticos, teniendo un microorganismo multiresistente.

Presuntivamente, los microorganismos aislados de estos muestreos que presentan multiresistencia a antibióticos son principalmente *Salmonella sp.*, *Serratia sp.* y *Pseudomona sp.*



## 9. Conclusiones

- ✓ El porcentaje de enterobacterias aisladas en el pollo de granja es mayor que en el pollo de criadero.
- ✓ El pollo de granja presenta menor número de bacterias resistentes a antibióticos por lo que podemos suponer que a los pollos de granja no se les suministran de manera rutinaria antibióticos como promotores de crecimiento.
- ✓ El pollo de criadero presentó mayor porcentaje de organismos multiresistentes.
- ✓ Los antibióticos con mayor porcentaje de colonias multiresistentes son de las familias betalactámicos y derivados.
- ✓ La presencia del integrón I, elemento genético involucrado en fenómenos de resistencia, se observó sólo en bacterias aisladas de pollos de criadero ya que en las muestras de pollo de granja no hubo amplicones. Esto podría sugerir que algunas de las características de resistencia observadas en éstos animales podría estar determinadas por dicho elemento cuya selección sería favorecida por el empleo de los antibióticos promotores del crecimiento.



## 10. Anexos

- **Anexo I. Medios selectivos para aislamiento de Enterobacterias**

**Agar Hecktoen.** Agar selectivo para demostración y aislamiento de bacterias intestinales patógenas, como *Shigella* a partir de los más diversos materiales, heces, alimentos, etc. (Según King y Metzger, 1968).<sup>16</sup>

Tabla 1. Descripción las características coloniales de bacterias que pueden ser aisladas con éste medio.

Colonias verdes, húmedas, planas, transparentes	<i>Shigella, Providencia</i>
Colonias verdes azuladas con o sin el centro negro	<i>Salmonella, Proteus, Paracolobactrum</i>
Colonias verdes hasta azuladas, planas borde irregular	<i>Pseudomonas</i>
Colonias de color salmón con halo de precipitado	Coliformes

**Agar MacConkey.** Agar para aislamiento de *Salmonella, Shigellas* y bacterias coliformes, a partir de orina, heces, alimentos, aguas residuales, etc.

Tabla 2. Descripción las características coloniales de bacterias que pueden ser aislados con éste medio.

Colonias incoloras, transparentes	<i>Salmonella, Shigella</i> y otros.
Colonias grandes, rojas, con un halo turbio	<i>Escherichia coli.</i>
Colonias grandes, rosadas, mucosas	Enterobacter, Klebsiella
Colonias diminutas, de crecimiento aislado y opaco.	<i>Enterococos, Staphilococcus</i> y otros.





**Agar EMB** (agar eosina-azul de metileno-lactosa-sacarosa). Agar selectivo para la demostración y aislamiento de enterobacterias patógenas.

Tabla3. Descripción las características coloniales de bacterias que pueden ser aislados con éste medio.

Colonias transparentes de color ambarino	<i>Salmonella, Shigella</i>
Colonias verdosas con brillo metálico a la luz reflejada con centro negro-azulado a la luz transmitida	<i>Escherichia coli.</i>
Colonias más grandes que las de <i>E. coli</i> , mucosas confluentes, centro pardo grisáceo a la luz transmitida	<i>Enterobacter, Klebsiella</i> y otros.

**Agar SS** (Agar para *Salmonella* y *Shigella*). Para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos y otros.

Tabla 4. Descripción de las características coloniales de bacterias que pueden ser aislados con éste medio.

Colonias incoloras, transparentes	<i>Shigellas</i> y la mayoría de las salmonelas.
Colonias transparentes con centro negro	<i>Proteus</i> y algunas salmonelas.
Colonias rosadas hasta rojas	<i>Escherichia coli.</i>
Mayores que <i>Escherichia coli</i> , rosadas hasta de color cremosos, blanquecinas, opacas mucosas	<i>Enterobacter aerogenes.</i>

**Agar BPLS** (bilis verde brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa USP). Medio de cultivo selectivo para aislamiento de *Salmonella*, excepto *S. thyphi* y *Shigella*, a partir de materiales patógenos, heces, orina, alimentos, etc.



Tabla 5. Descripción de las características coloniales de bacterias que pueden ser aislados con éste medio.

Colonias	Microorganismos
Rojo-rosadas con halo rojo	Lactosa-negativos y sacarosa-negativos: <i>Salmonella</i> y otros.
Verde-amarillentas con halo verde-amarillento	Lactosa-positivo o sacarosa-positivos: <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella</i> y otros.

- **Anexo II. Preparación del medio de cultivo adicionado con antibióticos**

Se prepara la cantidad necesaria que se requiera de medio. Por ejemplo, para 18 cajas de medio nutritivo sólido se requiere de 20mL de medio por caja, finalmente se preparan aproximadamente 360mL de medio.

Después de haberse esterilizado, se deja enfriar a unos 40 °C, posteriormente se le adicionan los tres antibióticos, previamente realizados los cálculos para obtener la concentración recomendada de Virulence and antimicrobial-resistance gene Profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from simple of animal origin.<sup>66</sup>

Tabla 6. Cálculos para obtener las concentraciones recomendadas

Antibiótico	Cantidades recomendadas	Cantidad del stock (360mL de medio)
Amikacina	300 µg/mL	43.2 µL
Ampicilina	100 µg/mL	180 µL
Penicilina	10 U/mL	18 µL



- Amikacina (solución inyectable 500mg/2mL)

$$\left(\frac{500mg}{2mL}\right) = 250 \frac{mg}{mL} \longrightarrow 0.250 \frac{mg}{mL} \longrightarrow 250 \frac{\mu g}{\mu L}$$

Concentración recomendada: 300µg/mL

Para 360mL= 1080 µg finalmente se tomaron 43.2µL para la solución stock.

- Ampicilina (1.0g /5mL)

$$\left(\frac{1000mg}{5mL}\right) = 0.2 \frac{mg}{mL} \longrightarrow 200 \frac{\mu g}{mL}$$

Concentración recomendada: 100µg/mL Para 360mL,  $\left(\frac{360mL * 100\mu l}{200 \frac{\mu g}{mL}}\right) = 180\mu L$  Se

tomaron 180µL para la solución stock.

- Penicilina (Bencilpenicilina, procaínica con bencilpenicilina cristalina suspensión inyectable 400,000U).

$$\left(\frac{400000U}{2mL}\right) = 200 \frac{U}{\mu L}$$

Concentración recomendada: 10 U/mL Para 360mL,  $\left(\frac{360mL * 10U / mL}{200 \frac{\mu g}{mL}}\right) = 18\mu L$

Se tomaron 18µL para la solución stock.



Para las pruebas de sensibilidad se utilizaron multidiscos Bio-Rad para Gram positivos y Gram negativos según correspondiera.

- **Anexo III. Sensidiscos Bio-Rad.**

Tabla 7. Antibióticos para Gram positivos.

Nombre	Abv.	Conc.	Nombre	Abv.	Conc.
Ampicilina	AM	10 mcg	Eritromicina	E	15 mcg
Cefalotina	CF	30 mcg	Gentamicina	GE	10 mcg
Cefotaxima	CTX	30 mcg	Pefloxacina	PEF	5 mcg
Ceftazidima	CAZ	30 mcg	Penicilina	PE	10 U
Cefuroxima	CXM	30 mcg	Tetraciclina	TE	30 mcg
Dicloxacilina	DC	1 mcg	Timetoprim-sulfametoxazol	SXT	25 mcg

Tabla 8. Antibióticos para Gram negativos.

Nombre	Abv.	Conc.	Nombre	Abv.	Conc.
Amikacina	AK	30 mcg	Cloranfenicol	CL	30 mcg
Ampicilina	AM	10 mcg	Gentamicina	GE	10 mcg
Carbenicilina	CF	100 mcg	Netilmicina	NET	30 mcg
Cefalotina	CF	30 mcg	Nitrofurantoina	NF	300 mcg
Cefotaxima	CTX	30 mcg	Pefloxacina	PEF	5 mcg
Ceftriaxona	CRO	30 mcg	Timetoprim-sulfametoxazol	SXT	25 mcg

Tabla 9. Antibióticos sensidiscos combinados.

Nombre	Abv.	Conc.	Nombre	Abv.	Conc.
Amikacina	AK	30 mcg	Enoxacina	ENX	10 mcg
Ampicilina	AM	10 mcg	Eritromicina	E	15 mcg
Cefalotina	CF	30 mcg	Gentamicina	GE	10 mcg
Ceftriaxona	CRO	30 mcg	Netilmicina	NET	30 mcg
Cloranfenicol	CL	30 mcg	Penicilina	PE	10 U
Dicloxacilina	DC	1 mcg	Timetoprim-sulfametoxazol	SXT	25 mcg

Nombre	Abreviatura	Concentración
--------	-------------	---------------



Cefoperazona	CFP	30 mcg
Aztreonam	ATM	30 mcg
Tiosulfa	TS	25 mcg
Cloranfenicol	CL	30 mcg
Cloxacilina	CX	1 mcg

- **Anexo IV. Protocolo general para extracción de ADN total (Palumbi, et al. 1991).**

Preparación de Soluciones:

Buffer de lisis

EDTA.....100 mM

Tris pH 7.5.....10mM

SDS.....1%

Cálculos:

\*EDTA 100mM = 0.1M se preparó 100mL

PM: 372.252  $\frac{g}{mol}$

$$\left(\frac{0.1M}{1L}\right) \times \left(\frac{372.252g}{1mol}\right) \times 0.100L = 3.722g \text{ de EDTA}$$

\*SDS 1% en 100 mL, por lo tanto es 1g en 100mL

\*Tris pH 7.5 10mM = 0.01 M se preparó 100mL

PM: 121.14  $\frac{g}{mol}$

$$\left(\frac{0.01MOL}{1L}\right) \times \left(\frac{121.14G}{1MOL}\right) \times 0.100L = 0.12G \text{ de Tris}$$

Para ajustar el pH, se hizo con un potenciómetro y se ajustó con HCl.

El EDTA se calienta hasta disolverse, posteriormente se adiciona el Tris base y finalmente el SDS ya que como es un detergente se produce espuma. Esterilizar en autoclave a 121.1 ° C durante 20 min.



-Fenol

Se tomó un volumen de fenol o una cantidad de cristales de fenol, se satura agregando agua, aproximadamente 2 volúmenes o más de agua, se agita vigorosamente (con precaución), se espera a que se separen las fases, se recomiendan de 2 a 3 maniobras de hidratación.

Fenol equilibrado.

Posteriormente se le adicionó una solución de Tris a un pH 8 0.1M, se agitó y monitoreo hasta obtener un pH de 7. Se eliminó el Tris y adicionó agua.

Para determinar el valor del pH, como se tienen las dos fases, se introdujo una pipeta con cuidado de no revolver las fases, se burbujeo para evitar que el agua o el Tris se mezclen, se tomó la muestra de fenol y se colocó en papel pH.

Se almacena a 4° C y en frasco ámbar cubierto con aluminio.

El fenol líquido tiene un tiempo de vida útil muy corto.

Cálculo de Tris pH 8 0.1M; se preparó 250 mL

PM: 121.14  $\frac{g}{mol}$

$$\left(\frac{0.1mol}{1L}\right) \times \left(\frac{121.14g}{1mol}\right) \times 0.205L = 3.028g \text{ de Tris}$$

Acetato de sodio 3M (CH<sub>3</sub>COONa) PM: 82.03 g/mol

Cálculos: Para 25mL

$$\left(\frac{3mol}{1L}\right) \times \left(\frac{82.03g}{1mol}\right) \times 0.025L = 6.15g$$



Ya que se tiene la solución, se esteriliza a 121.1 °C durante 20 min.

Ya que se realizó la extracción del ADN se prepara el gel de agarosa al 1%, para calcular de ADN que se extrae.

-Gel de agarosa al 1%  
20mL de buffer tris boratos 0.5x  
2mL de buffer tris boratos 5x  
18mL de agua

En 20mL de buffer Tris boratos 0.5x se disuelven 0.2g de agarosa.

Se corren las muestras junto con el marcador de pesos moleculares, con una diferencia de potencial de 12 V durante 35 minutos.



- **Anexo V. Cálculos para la determinación de los pesos moleculares.**

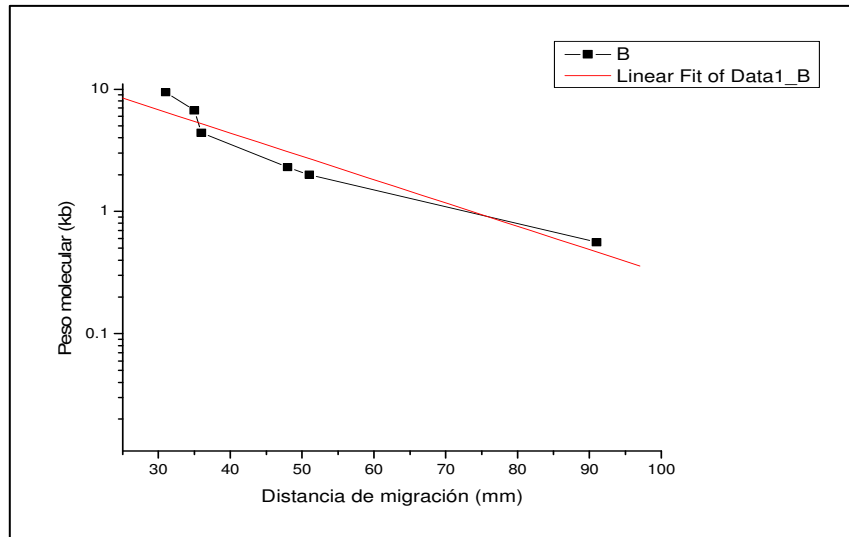
<b>Peso molecular <math>\lambda</math></b>	<b>Distancia recorrida por las bandas (mm)</b>
9.4	31
6.7	35
4.4	36
2.3	48
2.0	51
0.56	91

Distancia recorrida por el colorante 125 mm

Graficando estos datos con ayuda del programa Origin 7.5 se obtiene el siguiente grafico.

**Gráfica. Peso molecular vs. Distancia de migración**





Con ayuda de una curva lineal, que se describe con la fórmula  $y = mx + b$ , en donde  $y$  es el **log del peso molecular (PM)**, y  $x$  es el  $R_f$ , se calculan los pesos moleculares de las bandas presentes en las muestras.

El programa usado arroja los siguientes valores:

```
[27/06/2007 09:25 "/Graph1" (2454278)]
[06/07/2007 15:41 "/Graph2" (2454287)]
Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
yscale(Y) = A + B * xscale(X)
where scale() is the current axis scale function.
```

Parameter Value Error

```
-----
A      1.40307    0.14907
B     -0.01906    0.00283
-----
```



R	SD	N	P
-0.95866	0.1402	6	0.00253

Con estos resultados, la ecuación queda de la siguiente manera:

$$y = -0.01906x + 1.40307$$

Como Y es el log del PM, el cálculo para determinar el PM de las bandas de la muestra quedaría:

$$PM = 10^{(-0.01906x + 1.40307)}$$

Los pesos moleculares de cada una de las bandas presentes en el gel se presentan en la siguiente tabla.

Distancia de migración (mm)	Peso molecular de la banda (pb)
100	314
95	391
72	1074

Por lo tanto, con los resultados obtenidos se tiene la siguiente distribución del gel :

Carril	Distancia de migración (mm)	Peso molecular (pb)
2	72	1074
	95	391



3	95	391
4	95	391
5	95	391
6	10	314

- **Anexo VI. Pruebas Bioquímicas**

**Prueba de citrato**

Principio. Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante.

El citrato es parte del grupo de pruebas indol-rojo de metilo-Voges-Poskauer-citrato (INViC) para la identificación de la familia Enterobacteriaceae, de microorganismos gram negativos relacionados y de bacterias no fermentadoras.



Bioquímica. La energía se puede proporcionar a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico, por la utilización de citrato como única fuente de carbono. El metabolismo del citrato involucra una condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para ingresar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido por la vía del ácido tricarboxílico o por la vía de la fermentación del citrato.

En las bacterias, el desdoblamiento del citrato involucra un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, la citratasa (citrato oxalacetato liasa). La citratasa requiere de un catión divalente para su actividad, magnesio o manganeso<sup>5</sup>. Antes se consideraba que la degradación inicial del citrato producía oxalacetato (sal del ácido oxalacético) y acetato (sal del ácido acético), ahora conocidos por ser los intermediarios en el metabolismo del citrato.



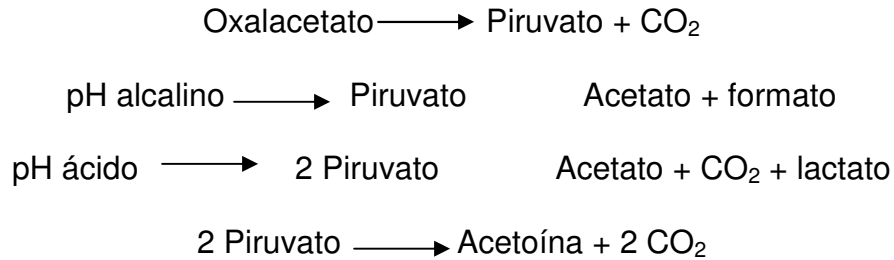
Los productos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio. A un pH alcalino, no se produce más acetato y formato y disminuye la producción de lactato y CO<sub>2</sub>.

A un pH por encima de 7.0 no existe producción de lactato y los productos son.



La degradación del piruvato depende entonces del pH del medio





El medio para la fermentación del citrato también contiene sales inorgánicas de amonio.

Un microorganismo que puede utilizar el citrato como única fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno.

Las sales de amonio, por ejemplo fosfato de amonio, son degradadas a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), aumentando la alcalinidad. Las bacterias extraen el nitrógeno de las sales de amonio con producción de amoníaco ( $\text{NH}_3^+$ ), lo que conduce a la alcalinización del medio y a la conversión de ( $\text{NH}_3^{2+}$ ) a hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

La utilización de ácidos orgánicos y sus sales como una fuente de carbono produce carbonatos y bicarbonatos alcalinos con la posterior degradación.

Interpretación.

Medio de citrato de Simmons

Positivo (+): crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.

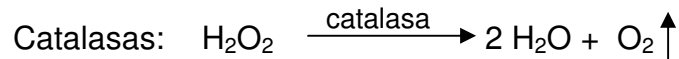
Negativo (-): ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color (verde).

### Prueba de catalasa



Principio: Probar la presencia de la enzima catalasa.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. La catalasa elimina en forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno.



La catalasa esta presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos; las excepciones principales son las especies de *Streptococcus*, que carecen de catalasa.

La catalasa es considerada como hidropoxidasa. Las catalasas (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), están presentes en los animales y vegetales. El centro activo de la catalasa es una clase de proteína hemo denominada citocromo.

Reacción catalítica.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , si se acumula, es tóxico para las bacterias y produce su muerte. Se descompone por medio de la acción de dos enzimas: a) catalasa (peróxido de

hidrógeno oxidoreductasa) y b) cualquier peroxidasa, NADH, fosfato de nicotinamida adenina di nucleótido reducido (NADPH), fotocromo o glutatión.

La descomposición catalítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  involucra la reducción del hierro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y la reoxidación de este último por el oxígeno.

Interpretación.

1. Positivo (+): burbujeo inmediato, observando con facilidad; formación de  $\text{O}_2$ .

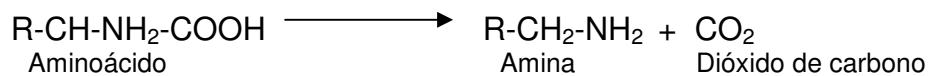


2. Negativo (-): ausencia de burbujas; ausencia de O<sub>2</sub>.

### Pruebas de descarboxilasa (lisina-ornitina-arginina)

Principio. Determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad.

Bioquímica. La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan a los aminoácidos en su carboxilo terminal (COOH) para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono.



La descarboxilación está restringida a aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo distinto de una amina (NH<sub>2</sub>) o un grupo carboxilo (COOH) y la degradación de los aminoácidos ocurren en anaerobiosis. La descarboxilación es irreversible, no oxidativa y por lo general requiere una coenzima común, fosfato de piridoxal, que refuerza más la actividad de descarboxilasa.

El aminoácido L-lisina es descarboxilado para formar cadaverina (una diamina) y dióxido de carbono por acción de la enzima específica lisina descarboxilasa. La cadaverina es estable cuando se produce en condiciones anaerobias.

Interpretación.

- a) positivo (+): color púrpura turbio a amarillo-púrpura apagado (el microorganismo produjo cadaverina).



- b) Negativo (-): Color amarillo brillante, claro (el microorganismo sólo fermentó la glucosa).

Agar con lisina y hierro (LIA).

a. Descarboxilación de la lisina.

- 1) Positivo (+): pico de flauta púrpura/extremo inferior púrpura (alcalino), con SH<sub>2</sub> o sin él.
  - a) Pico de flauta púrpura (alcalino) debido a la desaminación aeróbica de la peptona.
  - b) La reacción en el extremo inferior puede enmascarse por el color negro del H<sub>2</sub>S, sólo se produce en un medio alcalino (púrpura). La reacción tiene lugar en anaerobiosis en el extremo inferior del tubo.
- 2) Negativo (-): pico de flauta púrpura/extremo inferior amarillo (ácido); sólo fermentación de la glucosa.

b. Desaminación de la lisina.

- 1) Pico de flauta rojo/extremo inferior amarillo
  - a) La reacción en el pico de flauta es característica de las especies de *Proteus* y *Providencia*
  - b) La reacción en el extremo inferior se debe a la fermentación de la glucosa.
- 2) Las especies de *Proteus* productoras de SH<sub>2</sub> no ennegrecen este medio





- 3) La reacción en el pico de flauta con *M. morganii* del biogrupo 2 puede ser variable después de una incubación de 24h.

### **Prueba del ácido sulfhídrico**

Principio. Determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra, en presencia de un sistema indicador de  $H_2S$ .

Bioquímica. La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos individuales; ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente al azufre de los diversos aminoácidos azufrados (-SH), produciendo  $H_2S$  gaseoso. Peptona, cisteína, metionina y tiosulfuro son fuentes de azufre, pero diferentes especies usan diferentes compuestos o aminoácidos azufrados para producir  $H_2S$ . Las enzimas responsables de esta actividad son la cisteína desulfhidrasa.

Un microorganismo productor de  $H_2S$  cultivado en un medio orgánico como la peptona reduce el azufre por hidrogenación, produciendo  $H_2S$  gaseoso.

El tiosulfato es un intermediario en la reducción de sulfato a  $H_2S$  por las bacterias reductoras de sulfatos. La bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio en una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. Debe haber un pH ácido y una fuente de iones  $H^+$  en el agar Kligler (KIA) para que tenga lugar la reducción del tiosulfato. Hay

dos hidratos de carbono presentes para proporcionar la acidez y el exceso de iones  $H^+$ . Éste es un proceso de respiración anaerobia en el cual el átomo de azufre sirve como aceptor de electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos. El tiosulfato  $S_2O_3^{2-}$



reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es la fuente de azufre del microorganismo.

El  $H_2S$  es un gas incoloro; por consiguiente, es necesario un segundo indicador para visualizar la producción de  $H_2S$ .

El gas incoloro  $H_2S$  reacciona con una sal fuerte de hierro, el citrato de amonio férrico, para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico. Se recomienda el uso de citrato de amonio férrico en lugar de citrato férrico porque es más soluble.

La producción de  $H_2S$  se detecta cuando el gas entra en contacto con ciertos metales, como plomo, hierro o bismuto, y forma sulfuros de estos metales.

Sulfuro de hidrógeno gaseoso + iones férricos  $\longrightarrow$  Sulfuro ferroso (precipitado negro)

La capacidad de un microorganismo para producir  $H_2S$  es una característica consistente, y un productor de  $H_2S$  normalmente produce gas ( $CO_2 + H_2$ ) en los medios de cultivo con hidratos de carbono. Al determinar la producción de  $H_2S$  se debe tener en cuenta cuatro factores: el tipo y la disponibilidad de la fuente de azufre, la sensibilidad de la prueba para la detección de  $H_2S$ , el desarrollo del microorganismo en un medio basal y la presencia del sistema enzimático productor de  $H_2S$  en el microorganismo a probar.

Interpretación.

Medios de cultivo con aminoácidos azufrados.

1. Medios de cultivo en tubo: KIA, TSI, BEA, LIA, sulfuro-citrato, SIM, PIA



a) Positivo (+): cualquier ennegrecimiento del medio.

- 1) A lo largo de la línea de siembra. El ennegrecimiento se ve primero donde la fermentación ácida es máxima, a lo largo de la línea de siembra.
- 2) En todo el fondo.

b) Negativo (-): ausencia de ennegrecimiento.

2. Medios de cultivo en placa: Hecktoen, BSA, agar desoxicolato, SS, TCBS, XLD

a) Positivo (+): colonias negras rodeadas por una zona negra pardusca en el medio.

- 1) El diámetro del halo puede ser de varias veces el tamaño de la colonia.
- 2) La superficie del halo puede exhibir un brillo metálico.

b) Negativo (-): ningún ennegrecimiento y ningún brillo metálico.

### **Prueba del indol.**

Principio. Determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir del triptófano.



Bioquímica. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético (IAA, indolacetato). El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico, a partir del cual puede formarse indol por desaminación y escatol por descarboxilación del IAA.

La desaminación y la hidrólisis tienen lugar con el agregado de una molécula de agua en presencia de la triptofanasa y de la coenzima fosfato de piridoxal. En la desaminación, la porción amina ( $\text{NH}_2$ ) del aminoácido es eliminada, con liberación de una molécula de amoníaco. Existen dos tipos de desaminación: oxidativa y reductiva. La desaminación oxidativa separa el grupo  $\text{NH}_2$  de un aminoácido y agrega un enlace doble al producto desaminado (un compuesto no saturado) y de  $\text{NH}_3$  y energía.

El triptófano es un aminoácido que al ser transformado da origen a amoníaco, ácido pirúvico y tres metabolitos indólicos. El sistema enzimático que catalizan estas transformaciones, recibe el nombre de triptofanasa. Para demostrar la actividad de esta enzima, se emplea un medio rico en triptófano, se inocula e incuba. El cultivo obtenido se somete a un ensayo químico (adición de reactivo de Kovacs o de Ehrlich), que permite identificar el indol acumulado. Cuando existe indol éste se combina con el grupo aldehído del aminobenzaldehído que se encuentra tanto en el reactivo de Kovacs como

en el de Ehrlich, formando un complejo rojo violáceo en la interfase del cultivo y del reactivo.



La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía.

Interpretación.

A. Positivo (+): en segundos, aparece un anillo rojo (fucsia brillante) en la interfase del medio con la porción inferior de la fase alcohólica, sobre el medio.

B. Negativo (-): no hay ningún desarrollo de color en la capa de alcohol o aparece un anillo turbio; toma el color del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (amarillo).

C. Variable ( $\pm$ ): un color anaranjado en la superficie del medio, debido al escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol.

### **Pruebas en agar con hierro de Kligler/azúcar triple y hierro**

Principio. Determinar la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con o sin producción de gas, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ).

Bioquímica. El agar Kligler (KIA) y el agar con azúcar triple y hierro (TSI) son medios de cultivo diferenciales en tubo que cumplen un doble propósito: la determinación de fermentaciones de hidratos de carbono y la determinación de la producción de  $H_2S$ .



El KIA contiene dos hidratos de carbono: 1% de lactosa y 0.1% de glucosa. El TSI puede sustituir el KIA; la diferencia primaria es el agregado de un tercer hidrato de carbono, la sacarosa, a una concentración del 1%.

En el KIA, algunos microorganismos pueden fermentar ambos hidratos de carbono, otros fermentan sólo la glucosa; incluso otros no pueden fermentar ni la lactosa ni la glucosa. La fermentación de los hidratos de carbono pueden ocurrir con producción de gas o sin ella.

La fermentación tiene lugar tanto en aerobiosis (en le pico de flauta) como en anaerobiosis (en el fondo).

En el fondo del KIA (en profundidad) existen condiciones anaerobias, de forma que la glucosa se metaboliza por la via Embden-Meyerhof-Parnas a ATP y ácido pirúvico, que luego se convierten en los diversos productos finales estables: ácido láctico y /u otros ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y energía.

Las reacciones del KIA se usan principalmente para identificar a los miembros de la familia Enterobacteriaceae (entéricos), que por definición son bacilos gram negativos catalasa positivos, todos los cuales fermentan la glucosa con producción de ácido.

Se observan tres patrones de fermentación básicos en el medio KIA: fermentación sólo de la glucosa, fermentación de la glucosa y de la lactosa y ausencia de fermentación de glucosa o la lactosa.

Todos los tubos de KIA deben interpretarse en lo que respecta a la fermentación de los hidratos de carbono después de 18-24 h de incubación.



Fermentación sólo de la glucosa (alcalino/ácido).

El primer patrón del KIA después de las 18-24 h de incubación es un pico de flauta alcalino y un fondo ácido (alcalino/ácido). Esta reacción se observa con los microorganismos capaces de fermentar sólo la glucosa; son los no fermentadores de la lactosa.

El pico de flauta es alcalino (rojo), lo cual indica la degradación aerobia de la glucosa. Después de 18-24h de incubación, la concentración baja de la glucosa (0,1%) se agota y el microorganismo empieza a usar las peptonas del medio como nutrientes de desarrollo. El catabolismo de la peptona libera amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) que alcaliniza el pH con el rojo fenol, el indicador de pH incorporado en el medio. Sin embargo, el fondo de KIA tiene un color amarillo debido a la degradación anaerobia de la glucosa.

Fermentación de lactosa y de glucosa (ácido/ácido)

Algunos microorganismos pueden fermentar la lactosa y la glucosa para obtener sus nutrientes y producen una reacción en el KIA con un pico de flauta ácido y un fondo ácido (ácido/ácido) después de 18-24h de incubación. La concentración de la lactosa (1%) es 10 veces la de la glucosa. En 18-24 horas, la lactosa (presente en mayor cantidad) no se ha agotado y todavía existe un medio ácido. Si el mismo tubo de KIA se leyera después de 48h o más, el pico de flauta se pondría finalmente alcalino debido al agotamiento de la lactosa y al uso de las peptonas.



Ausencia de la fermentación de lactosa y de glucosa (alcalino/alcalino; alcalino/sin cambios).

Los bacilos gram negativos no entéricos, no pueden fermentar ni la glucosa ni la lactosa. Estas bacterias no pueden obtener sus nutrientes a partir de los hidratos de carbono, dependen de la peptona del medio. Estos microorganismos no entéricos pueden usar la peptona de manera aeróbica o anaeróbica y producen dos reacciones posibles en el KIA. Un microorganismo que produce un KIA con un pico de flauta alcalino y el fondo alcalino degrada la peptona aeróbica y anaeróbicamente. Un pico de flauta alcalino y ningún cambio en el fondo es un microorganismo que puede catabolizar la peptona sólo aeróbicamente.

Una reacción en KIA puede interpretarse de cuatro maneras, según las bacterias a probar:

Alcalino/ácido: sólo la glucosa es degradada.

Ácido/ácido: glucosa y lactosa degradadas.

Alcalino/alcalino: ni la glucosa ni la lactosa son degradadas; uso de las peptonas

Alcalino/sin cambios: ni la glucosa ni la lactosa son degradadas; uso de las peptonas.





Interpretación.

A. Utilización de los hidratos de carbono

1. La sólo fermentación de la glucosa

a. Pico de flauta

1) Reacción alcalina

2) Color rojo

b. Fondo

1) Reacción ácida

2) Color amarillo.

a) Si también se produce  $H_2S$  gaseoso, el precipitado negro puede enmascarar la acidez.

b) Existe una condición ácida en el fondo y se registra como tal.

2. Fermentación de la glucosa y la lactosa

a. Pico de flauta

1) Reacción ácida

2) Color amarillo

b. Fondo

1) Reacción ácida

2) Color amarillo



3. No hay fermentación ni de la glucosa ni de la lactosa (no entéricos)
  - a. Pico de flauta
    - 1) Reacción alcalina
    - 2) Color rojo
  
  - b. Fondo
    - 1) Microorganismo aerobio
      - a) Ningún desarrollo
      - b) Ningún cambio de color
    - 2) Microorganismo facultativo
      - a) Reacción alcalina
      - b) Color rojo
  
4. No hay fermentación ni de la glucosa ni de la lactosa; bastante común
  - a. Pico de flauta
    - 1) Desarrollo solamente
    - 2) Ningún cambio de color; igual al tubo no inoculado (color naranja rojizo)



### **Prueba de malonato**

Principio. Determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono.

Bioquímica. El malonato es un inhibidor enzimático, inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva. La succinato deshidrogenada transfiere hidrógeno a un aceptor apropiado en la conversión de ácido succínico a ácido fumárico, pero esta reacción puede ser inhibida por un compuesto orgánico similar desde el punto de vista estructural al sustrato natural, al ácido succínico. El ácido malónico presenta una estructura similar al ácido succínico y compite por los sitios en la enzima.

Interpretación.

A. Malonato

1. Positivo

a. Reacción alcalina.

b. Color azul pálido a color azul Prusia oscuro en todo el medio.

2. Negativo: Sin cambios de color (verde) o amarillo (sólo fermentación de la glucosa).

En el medio de malonato diseñado por Leifson, el malonato de sodio es la única fuente de carbono disponible. Si un microorganismo utiliza malonato de sodio como su fuente de carbono en el mismo momento que utiliza el sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno, la alcalinidad aumenta debido a la formación de hidróxido de sodio (NaOH) y bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). Dado que todos los miembros de la familia



*Enterobacteriaceae* fermentan la glucosa, aquellos que no pueden utilizar el malonato acidifican el medio; el azul de bromotimol vira al color amarillo.

### **Prueba de rojo de metilo**

Principio. Probar la capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y para vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

Ésta es una prueba cuantitativa para la producción de ácido (determinación de pH); algunos microorganismos producen más ácidos que otros.

Interpretación.

A. MR positivo (+): el cultivo es suficientemente ácido para permitir que el reactivo de metilo permanezca con un color distinto rojo brillante, estable, en la superficie del medio. Los microorganismos MR-positivos producen más ácidos con un pH final bajo.

Ellos vencen el sistema buffer fosfato y mantienen una acidez en el medio.

B. MR negativo (-): color amarillo en la superficie del medio.

C. Reacción tardía ( $\pm$ ): el color naranja rojizo indica que el microorganismo produce menos ácido a partir del sustrato de prueba.

### **Prueba de movilidad**



Principio. Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias son móviles por medio de flagelos. Los flagelos aparecen sobre todo entre los bacilos, sin embargo, unas pocas formas cocoides son móviles. Las bacterias móviles pueden contener un único flagelo o muchos flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones del cultivo.

Interpretación.

Resultado positivo (móvil): microorganismos móviles que migran desde la línea de siembra y difunden en el medio, lo que produce turbidez. Pueden mostrar estrías de crecimiento vellosos.

Resultado negativo (inmóvil): crecimiento bacteriano acentuado a lo largo de la línea de siembra; el medio que la rodea permanece claro.

Medio control (no inoculado) sin crecimiento, el medio permanece incoloro y claro.

### **Prueba de ureasa**

Principio. Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad.

Bioquímica. El sustrato urea, una diamida del ácido carbónico, a menudo se designa como una carbamida. Todas las amidas son hidrolizadas con facilidad. La urea es hidrolizada por una enzima específica, la ureasa (o urea amidohidrolasa), para dar dos



moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza a carbonato de amonio como producto final.

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada constitutiva debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o ausencia de su sustrato, la urea.

En el caso de la ureasa, el nitrógeno es dissociado como amoníaco. La ureasa actúa en los compuestos a nivel de los puentes C-N, excepto en aquellos que contienen puentes peptídicos.

#### Interpretación

##### Caldo con urea Stuart

##### 1. Positivo (+)

- a. Color rosa-rojo intenso en todo el caldo
- b. Ciertas especies de Proteeae.

##### 2. Negativo (-): sin cambios de color (amarillo-naranja)



### **Prueba de Voges-Proskauer**

Principio. Determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (AMC, acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. Voges-Proskauer (VP) es un epónimo doble; Voges y Proskauer fueron los primeros bacteriólogos en observar una coloración roja en los medios de cultivo después del tratamiento con hidróxido de potasio.

Bioquímica. La prueba Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección de acetoína, un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. La glucosa es metabolizada a ácido pirúvico, las bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos; la producción de acetoína es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en las bacterias.

La prueba de Voges-Proskauer para la acetoína se utiliza sobre todo para separar *Escherichia coli* de los grupos *Klebsiella-Enterobacter* y se basa en la detección de acetína, un precursor del 2,3-butanodiol.

Interpretación.

A. VP positivo (+): color rosado-rojo en la superficie del medio (acetoína presente).

B. VP negativo (-): color amarillo en la superficie del medio. Puede formarse un color cobrizo, pero es un resultado negativo.



## 11. Referencias

1. Sherwood L., Gorbach M. D., **Antimicrobial Use in Animal Feed – Time to Stop.** The New Eng. J. Med. 2001; 345:1202.
2. Van de Venter T. **Perspectivas para el futuro: nuevos problemas - Problemas químicos/biológicos** Conferencia sobre Comercio Internacional de Alimentos a Partir del Año 2000: Decisiones basadas en criterios científicos, armonización, equivalencia y reconocimiento mutuo. Melbourne, Australia. Departamento de Salud, Sudáfrica. FAO. 11-15 de octubre de 1999.
3. Cancho, B., García, M. S. **El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual.** Ciencia, tecnología y alimentos 2000, 3:39-47.
4. Ávila, E., Shimada, A., Llamas, G. **Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria.** Sistema de Educación Continúa en Producción Animal. 1990, 165.
5. Goodman, Gilman. **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.** McGraw Hill Interamericana, 1996.
6. Katzung B. G. **Farmacología Básica y Clínica.** El Manual Moderno. 1994. 134-139.
7. Meade-Callahan, M.J. **Los Microbios: Cómo Funcionan y Cómo los Cambian los Antibióticos.** Action Bioscience, 2001:1.
8. Madigan, Brock. **Biología de los microorganismos.** Pretende Hall, 2001. 24-35.
9. <http://www.engormix.com> Diciembre, 2006
10. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 **Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.**





11. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. **Preparación y Dilución De Muestras De Alimentos Para su Análisis Microbiológico.**
12. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. **Método Para la Determinación de *Salmonella* en Alimentos.**
13. **Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual.** Gaithersburg, Md. AOAC International, 1998;8.
14. White D. G., Zhao S., Sudler R. **The Isolation of Antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats.** New Eng. J. of Med., 2001; 345:16 1147-1153.
15. Merck, **Manual de medios de cultivo MERCK,** 1994.
16. <http://service.merck.de/microbiology> Febrero, 2007.
17. Márquez, M. L., **Manual de aditivos y suplementos para la alimentación animal.** Los antibióticos como promotores del crecimiento. 1987; 2:4.
18. Cercos, P. A., **Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias.** Salvat Editores. 1957;314-343.
19. Bergoglio R. M., **Antibióticos.** Panamericana. 1993; 5:3-23.
20. Calderón E. **Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos.** Méndez Editores. 2004;10:56-75.
21. González R. G., **Integrones y cassetes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antimicrobianos.** Méd. Chile. 2004; 132:5, 619-626.
22. Woodbine, M. **Antibiotics in agricultures.** London. 1972;439.
23. Braude, A. I., **Microbiología clínica.** Panamericana. 1984.



24. Wzible, P. E., **Disappearance of Growth Responses of Chicks to Dietary Antibiotics in Environment.** *Poultry*, 1954;33:1141-1146.
25. Dulancey, **The problems of drug resistant pathogenic bacteria,** *Ann New York Acad. Sci.* 1971;182.
26. Doucet-Populaire F, Trieu-Cuot P, Andremont A, Courvalin P. **Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 502-4.
27. Courvalin P. **Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria.** *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1447-51.
28. Salyers AA, Shoemaker NB, Li LY, Stevens AM. **Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements.** *Microbiol Rev* 1995; 59: 579-90.
29. Stokes HW, Hall RM. **A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons.** *Mol Microbiol* 1989; 3: 1669-83.
30. Hall R. M., Collis C. M., **Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination.** *Mol Microbiol* 1995; 15: 593-600.
31. Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. **Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria.** *Lancet* 1997;349: 1742-3.



32. Schmidt AS, Bruun MS, Larsen JL, Dalsgaard I. **Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas.** *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 735-43.
33. Azaro MA, Landy A. **I integrase and the I Int family.** Washington, DC, USA 2002.
34. Van Duyne G. D., **A structural view of tyrosine recombinase site-specific recombination.** Washington, DC, USA 2002; 93-117.
35. Partridge S. R., Recchia G. D., Scaramuzzi C, Collis C. M., Stokes H. W., Hall R. H., **Definition of the attI1 site of class 1 integron.** 2000; 146: 2855-64.
36. Recchia GD, Sherrat DJ. **Gene acquisition in bacteria by integron mediated site specific recombination.** Washington, DC, USA 2002; 162-76.
37. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S et al. **A novel integron-like element carrying the metallo  $\beta$ -lactamase gene bla<sub>IMP</sub>.** *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612-5.
38. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. **A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome.** *Science* 1998; 280: 605-8.
39. Bennett PM. **Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.** *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1-4.
40. Sabaté M, Prats G. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 341-5.
41. <http://www.biorom.uma> Febrero, 2007.
42. Hall, R. M., Collis C. M., **Mobile gene cassettes and integrons in evolution.** *Acad Sci* 1999; 870:68-80



43. Paulsen, I.T; Littlejohn, T.G. **The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidry resistance to antiseptics and disinfectants.** Antimicrob Agent Chemother. 1993; 37: 761-768.
44. Collis, C. M., Grammaticopoulus, G., Britan J., **Site-specific insertion of gene cassettes into integrons.** Mol Microbiol 1993; 9:41-52.
45. Hall, RM, Collis, CM, **Mobile gene cassettes and integrons capture and spread of genes by site-specific recombination,** Mol Microbiol 1995; 15:593-600.
46. Mellon M, Benbrook C. **Hogging its estimates of antimicrobial abuse in livestock.** Cambridge, Mass: Union of Concerned Scientist, 2001. 1-13
47. White D. G., Zhao, Sudler R. **The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats.** N Engl J Med 2001;345:1147-54.
48. Trieu-Cuot, P., M. Arthur, P. Courvalin (1987): **Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes.** Microbiol. Sci. 4: 263-266.
49. Bellomo, J. A., **Mecanismos de acción de los antibióticos y quimioterápicos.** El Médico 6:21. 1980. 45-48
50. Braude, A.I, **Enfermedades infecciosas.** Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1986. 23-32
51. Braude, A. I, **Farmacoterapia antimicrobiana.** Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1986. 34-40.
52. Smith, H. **Antibióticos en la práctica clínica.** Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1984. 45-56.
53. Welch, H. **Terapia antibiótica,** Med. Encyc, New York, 1970. 15-20



54. Franklin, T.J., **Biochemistry of antimicrobial action**. Chapman and Hall, London 1989; 4:23-34
55. García Lobo, J. M., **Mecanismos de formación de transposones bacterianos con resistencia a múltiples antibióticos**. 1990; 45-51.
56. Grieco M. H., **Resistencia a los antibióticos**. Interamericana 1986; 56-59.
57. Mayer K.H., Opal S.M., Medeiros A. A., **Mecanismos de resistencia a antibióticos en Mendell-Douglas-Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica**. Panamericana, 1993; 46-58.
58. Pitton J. S., **Bases genéticas y bioquímicas de la resistencia a los agentes antimicrobianos**. Folia Therapéutica-Roche, 1985; 47-56.
59. Andremont A. **Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in Escherichia Coli**. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 56-78.
60. García Rodríguez J. A., **Sensibilidad de microorganismos patógenos después de 4-6 años de utilización de las nuevas quinolonas**. 1991; 34-46.
61. Gutmann L. **Resistencia a las quinolonas asociadas con resistencia cruzada a otras familias de antibióticos**. 1991. 12-14
62. <http://www.lajornadasanluis.com.mx> Abril, 2007.
63. Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. 1991. **The simple fool's guide to PCR**. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
64. <http://www.iqb.es/diccio/c/cl.htm> Mayo, 2005.



**65. Del Cerro S. M., Soto, M. C., Virulence and antimicrobial-resistance gene Profile dtermined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from simples of animal origin.** Food Microbiology 2002; 20: 431-438.

**Referencias de anexos.**

1. MacFaddin J. F., **Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.** Tercera edición. Editorial Panamericana. 2000;3.
- 2.- Gunsalus I. C., Stanier R.Y., **The Bacteria,** Academy Press, 1970:2.
- 3.-Oehr P, Willecke K. **Citrate-Mg<sup>2+</sup>transport in Bacillus subtilis studies with 2-fluoro-Lerytrocitrate as a substrate.** J Biol Chem 1974:249 (7):2037-2042.
- 4.- Washington J. A., **Laboratory Procedures in Clinical Microbiology.** New York, Springer Verlag, 1985;2:194.
- 5.- Sokatch J.R., **Bacterial Physiology and Metabolism.** New York. Academic Press, 1969, 133-141.
- 6.- Doelle H. W., **Bacterial Metabolism.** New York. Academic Press, 1969; 335.
- 7.- Koneman E.W., Allen E.W., Janda W.M., **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** Philadelphia. JB Lippincott, 1983;4 121-123, 143, 146, 151, 177.
- 8.- Baron E. J., Finegold S. M., **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 1991;1239-1240.
- 9.- Simmons J.C. **A culture medium for differentiating organisms of the typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi.** J Infect Dis. 1926;39:209-214.
- 10.- Fridovich I. **The biology of oxygen radicals.** Science 1978, 185, 21-37.