



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL INTEGRÓN I EN LA
MULTIRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS
AISLADAS DE CARNE DE RES.**

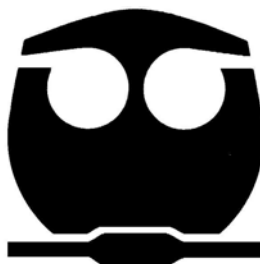
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JAVIER RANGEL MEDINA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. María del Carmen Wachter Rodarte
Vocal	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa
1er. Suplente	Q.F.B. Olga Velásquez Madrazo
2do. Suplente	Prof. Jose Ignacio Páramo Ramírez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 1-A anexo, edificio A, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre.	_____
Supervisor técnico: M. en C. Raquel Ortega Muñoz	_____
Sustentante: Javier Rangel Medina.	_____

Dedicatoria.

A mi mamá y a mi papá, gracias por toda su paciencia, regaños y desvelos, créanme que esta tesis es tan suya como mía.

A mi hermana, espero que esto pueda ser un ejemplo a seguir, para que siempre sigas brillando tanto o más que ahora.

A la memoria de la Dr. Biserka Sveshtarova, quien fue una excelente investigadora y profesora.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular pero no exclusivamente a la Facultad de Química, donde no solo obtuve mi formación académica, sino fue el lugar donde el lugar donde crecí y me hice adulto, y es y siempre será un hogar para mi.

A la M. en C. Raquel Ortega, por haber creído en mí cuando nadie más lo hubiera hecho, por haberme escuchado todas las veces que lo necesité, por sus invaluable consejos y apoyo que me ayudaron a ser una mejor persona y, por más que una asesora, haber sido una amiga.

Al Dr. Fernando Montiel, por brindarme su apoyo siempre que lo necesite.

A Cruz, por ser mi mejor amigo y un gran ejemplo de fuerza de voluntad.

A Ingrid, por haber estado conmigo siempre, en las buenas y en las malas y ser alguien tan importante en mi vida.

Al M. en C. Rodolfo Fonseca Larios por siempre haber creído en mis capacidades y por enseñarme a verlas, además de ser una gran persona y un excelente ejemplo a seguir.

A Xochitl, Pablo, Rodrigo, Jose Luis, Teresa, Karina, Ibeth, Héctor, Sandra, Puig y Marcos, por su valiosa amistad y por toda la ayuda que me brindaron desde que los conozco.

La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.

Miguel de Unamuno

INDICE.

I. GENERALIDADES

8

Uso de antibióticos para consumo humano

9

Promoción del crecimiento por acción de los antibióticos 11

Consecuencias del uso de antibióticos en la producción animal 13

Antibióticos 16

Definición 16

Clasificación 18

Resistencia a antibióticos 25

Mecanismos de resistencia. 27

Transferencia de la resistencia. 32

Transducción 33

Transformación 33

Conjugación 34

Elementos genéticos móviles 35

Plásmidos 35

Transposones 36

Integrones 37

Importancia clínica de los integrones 42

II. OBJETIVOS 44

III. METODOLOGÍA 46

<u>Aislamiento</u>	47
<u>Pruebas de sensibilidad a antibióticos</u>	48
<u>Protocolo general para la extracción de ADN total</u>	49
<u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	52
<u>Preparación de ADN plasmídico.</u>	53
<u>Técnica de eliminación de plásmidos mediante naranja de acridina</u>	56
<u>Pruebas bioquímicas.</u>	57
<i>IV. RESULTADOS</i>	63
<i>V. ANALISIS DE RESULTADOS</i>	87
<i>VI. CONCLUSIONES</i>	102
<i>VII. REFERENCIAS</i>	105

The image features a central point from which numerous thin, black lines radiate outwards, creating a starburst or sunburst effect. The lines are arranged in several distinct groups, with some extending towards the top-left, some towards the bottom-left, and some towards the bottom-right. The overall composition is minimalist and geometric.

I. GENERALIDADES

Uso de antibióticos en animales para consumo humano.

Existen tres casos para la utilización de agentes antimicrobianos en animales destinados al consumo humano (Phillips *et al.*, 2004). El primero, profilaxis o prevención, consta de la administración del antibiótico a animales saludables que se considere que estén en peligro de sufrir una infección, antes de que ésta ocurra. Por otra parte, el tratamiento de grupos enteros de animales tan pronto como se presentan los primeros signos de enfermedad en algunos miembros del grupo es una práctica ampliamente aceptada; en este caso se trata del uso terapéutico de los antibióticos. (Wegener, 2003). Finalmente, se tiene el caso del uso de antibióticos como promotores de crecimiento, en donde se administra un antimicrobiano como un aditivo alimentario, con el objetivo de lograr una ganancia de peso en el animal (Phillips *et. al*, 2004). En los tres casos anteriormente mencionados, la mayor parte de los antibióticos son administrados al animal en su alimento o en el agua destinada para su consumo (Wegener, 2003; Avila, 1990).

Los antibióticos utilizados terapéuticamente son medicinas que requieren prescripción del veterinario. Los antibióticos que tienen como destino ser usados para profilaxis o para promover el crecimiento del animal son catalogados como aditivos alimentarios, y son distribuidos en países desarrollados a través de canales bien estructurados y separados de los que se consiguen por prescripción (DANMAP, 2000) . Los más comúnmente usados en animales para consumo

humano pertenecen principalmente a cinco clases: beta-lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, aminoglicósidos y sulfonamidas (Wassenaar, 2005).

Actualmente el uso de antibióticos como promotores de crecimiento está muy difundido. Tan solo en Estados Unidos, se estima que el 70 por ciento de la producción total de antibióticos se administra a ganado completamente sano. Esto representa 12 500 toneladas al año, distribuidas de la siguiente manera: 5000 toneladas en la producción de ganado porcino, 5500 toneladas en aves (principalmente pollo, pero también se consideran otras, como el pavo) y 2000 toneladas para bovinos (Akhter, et al., 2001; Hardy 2002). Se estima que más de la mitad de la producción total de antibióticos a nivel mundial se emplea como suplemento alimenticio para animales de consumo humano (Doyle, et al., 2006).

En nuestro país están autorizados los siguientes antibióticos para su uso como promotores de crecimiento en animales para consumo humano: avoparcina, avilamicina, vancomicina, teicoplanina, bacitracina, banbermicina, tilosina, espiramicina, virginamicina, salinomicina de sodio y flavofosfolipol (Diario Oficial de la Federación, 2004).

Este uso tan generalizado de antimicrobianos ha generado preocupación entre los consumidores, quienes se han manifestado por que el uso de antibióticos como promotores de crecimiento se detenga (Dibner et al., 2005). En 1969 en el Reino Unido, el reporte Swann recomendaba un control gubernamental estricto sobre el uso de los antibióticos, ya que se establecía que podría fomentar la aparición de cepas resistentes, y que no deberían ser usados en la alimentación animal (Hardy

2002; Witte, et al., 2002). Un ejemplo de esto es la política que McDonald's adoptó desde 2004, que consiste en prohibir a sus proveedores directos el uso de antibióticos en el ganado (Millar et al., 2006). Por su parte, la Unión Europea, entre 1995 y 2000 prohibió el uso de los antibióticos avoparcina, bacitracina, espiramicina y virginamicina (Errecalde, 2004; Miller, et al., 2006) y desde el primero de enero de 2006, ha quedado prohibido el uso de cualquier antibiótico destinado para promover el crecimiento (UCS, 2006) . Destacan también los casos de Dinamarca , que desde 1994 prohibió su uso (DANMAP, 2000) y Suecia, que hizo lo mismo en 1995 (Errecalde, 2004).

Promoción del crecimiento por acción de los antibióticos.

Los efectos promotores de crecimiento de los antibióticos fueron descubiertos en la década de 1940, cuando se observó que los pollos cuyos alimentos eran suplementados con tetraciclina crecían más rápidamente que los que no consumían dichos productos (Phillips et al., 2004).

Los cambios favorables en el peso del animal están asociados principalmente con la mejora en el metabolismo del nitrógeno, incluyendo un incremento en la digestibilidad aparente de nitrógeno (3%), incremento en la retención de nitrógeno (5.8%) y una reducción en el nitrógeno fecal (10%) (Roth et al., 1993).

Aunque el mecanismo exacto por el cual los antibióticos actúan como promotores de crecimiento no se conoce, se han propuesto cuatro hipótesis: i) Inhibición de infecciones sub-clínicas, ii) Reducción de la producción de metabolitos inhibidores del crecimiento, iii) Reducción del uso microbiano de nutrientes y iv) Mejora en el aprovechamiento de nutrientes a través de una pared intestinal mas delgada, la cual es asociada con animales alimentados con antibióticos. Las cuatro hipótesis existentes coinciden en postular que las bacterias intestinales, ya sean comensales o patógenas, directa o indirectamente, retardan el crecimiento del animal debido a sus actividades metabólicas (Gaskins et al., 2002; Avila, 1990).

A pesar de que existe una gran variedad de microorganismos capaces de producir efectos tóxicos en el intestino delgado del animal, predominan principalmente los Gram positivos anaerobios facultativos; los cuales usualmente producen varios catabolitos tóxicos a la vez (Gaskins et al., 2002).

Las bacterias presentes en el intestino delgado tienden a competir con el huésped por energía y aminoácidos. Las bacterias del intestino delgado, al utilizar estos últimos, además de disminuir la eficiencia de la utilización del nitrógeno, producen diversos metabolitos tóxicos, como aminas (como la histamina y la cadaverina), fenoles, indoles y amoniaco (Gaskins, et al., 2002; Dibner, et al., 2005).

La microbiota del animal también afecta negativamente la digestibilidad de las grasas, debido a que algunas especies bacterianas (principalmente *Lactobacillus*)

catabolizan las sales biliares requeridas para la digestión de las grasas (Dibner et al., 2005).

Finalmente, la microbiota fomenta las secreciones mucosas en la membrana epitelial del intestino (que tienen como principal función lubricar el tracto intestinal y evitar que la microbiota invada las células epiteliales del huésped), debido a que varias especies bacterianas digieren enzimáticamente la capa de mucosa, causando que el organismo huésped deba secretar más. Las células encargadas de secretar mucosa en el epitelio tienen una vida sumamente corta. Este rápido recambio celular va acompañado por un aumento del metabolismo, especialmente de la síntesis de proteínas, lo que resulta entre el 23 y 36 % de la energía total que el organismo utiliza. (Dibner et al., 2005; Avila 1990).

Consecuencias del uso de antibióticos en la producción animal.

La práctica rutinaria de administrar antibióticos a animales para consumo humano como promotores de crecimiento o para fines terapéuticos o de profilaxis es un importante factor en la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos. El consumo continuo de antibióticos, aún en concentraciones subterapéuticas, como ocurre cuando se les utiliza como promotores de crecimiento, fomenta la aparición en los animales de cepas de microorganismos resistentes a uno o varios agentes antimicrobianos, debido a la presión selectiva que los antibióticos ejercen sobre los microorganismos (White et al., 2001; Cancho, et al., 2000). El uso de los promotores de crecimiento antimicrobianos ha creado un reservorio de bacterias

resistentes en los animales a los que se les administra; estos microorganismos podrían llegar al ser humano ya sea por contacto con el animal o bien a través de los alimentos (Wegener, 2003).

A pesar de que es innegable que el extenso uso de los antibióticos en la alimentación animal ha creado una fuerte presión selectiva sobre los microorganismos, existen muchas otras formas en las que se podrían esparcir genes que confieran resistencia a antibióticos, como se puede ver en la Figura 1 (Phillips et al., 2004).

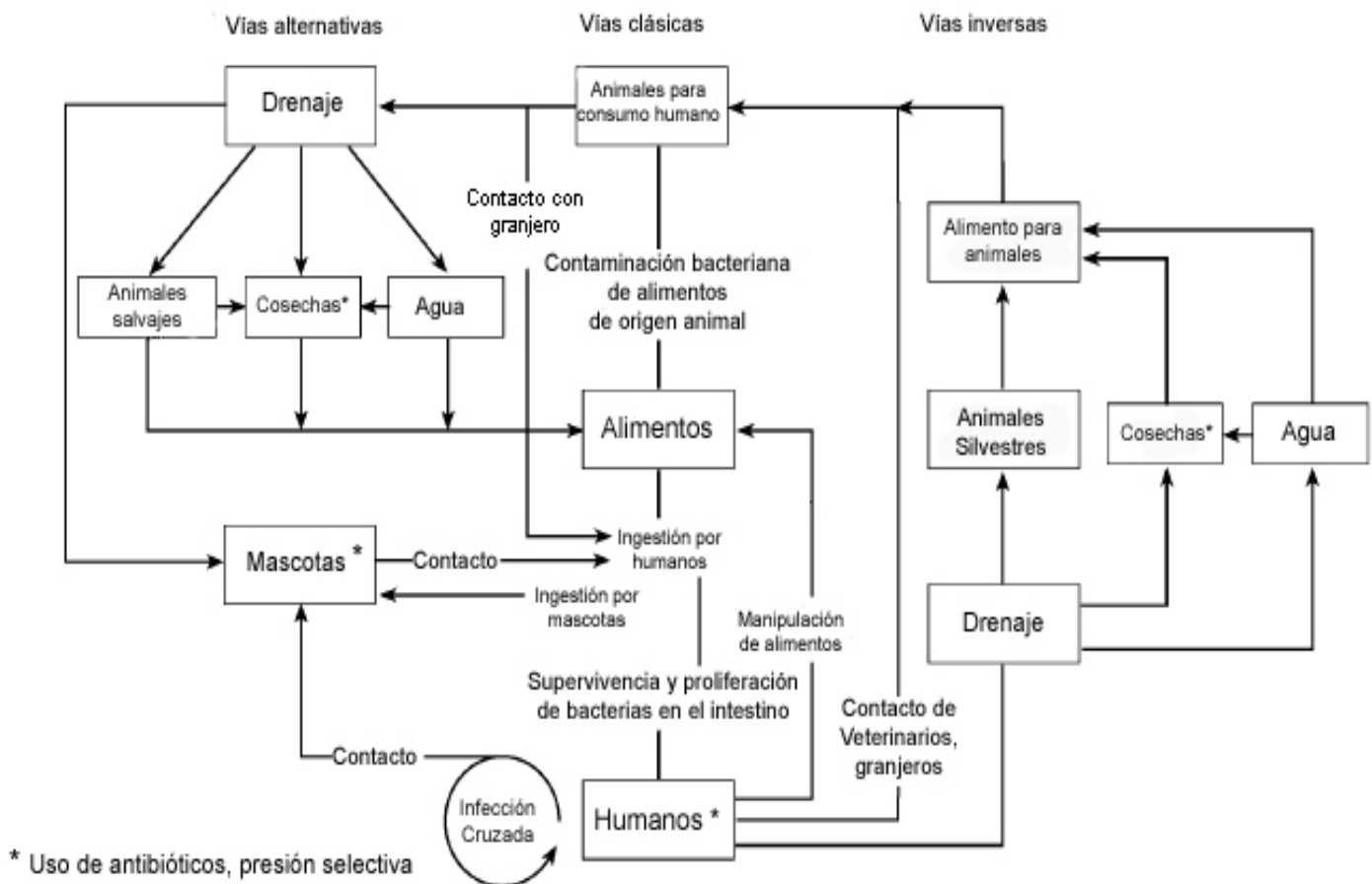


Figura 1. Algunas rutas por las cuales podrían transmitirse genes de resistencia entre patógenos y la microbiota normal. Este diagrama aplica también para algunas de las rutas por las cuales podría existir contaminación de los alimentos por bacterias resistentes a antibióticos (Phillips et al., 2003).

Los microorganismos resistentes pueden pasar a los productos cárnicos durante el sacrificio y el procesamiento del animal. Esto ha sido extensamente documentado para patógenos comúnmente relacionados con alimentos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y enterococos (Wegener, 2003). Tomando como ejemplo el caso de *Campylobacter*, existe evidencia que liga directamente el uso de fluoroquinonas en la alimentación animal y la aparición de cepas resistentes a este antibiótico poco tiempo después de que comenzó el uso de dicho fármaco como promotor de crecimiento (Doyle et al., 2006).

Es importante hacer énfasis en que no es necesario que los organismos resistentes a varios antibióticos sean patógenos para que éstos representen un riesgo a la salud (Sørum, 2002). En caso de que se ingiriese algún microorganismo no patógeno resistente a uno o varios antibióticos y éste estuviera presente en el tracto intestinal solo por un breve periodo de tiempo, existe una gran posibilidad de que pueda transmitir genes de resistencia a la flora intestinal normal, y ésta a su vez, constituye un importante reservorio de genes de resistencia para bacterias patógenas (McDermott et al., 2002; Wassenaar, 2005).

Además de lo anteriormente destacado, la Organización Mundial de la Salud advierte que entre las consecuencias adversas del uso de antibióticos en animales

para consumo humano destacan las siguientes (Organización Mundial de la Salud, 1997):

- Un incremento en la prevalencia de bacterias resistentes en animales; lo que puede llevar a la transferencia de patógenos a los humanos ya sea por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados.
- La transferencia de genes de resistencia a las bacterias presentes en el humano.
- Un incremento en la incidencia de infecciones humanas causadas por patógenos.
- Potenciales problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales.

Antibióticos.

Definición.

Los antibióticos son sustancias producidas de forma natural por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que matan (bactericidas) o inhiben el crecimiento (bacteriostáticos) de otros microorganismos (Goodman et al., 1996). Otras sustancias son sintetizadas por medios químicos. En conjunto las sustancias naturales y sintéticas que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos se denominan agentes antimicrobianos; sin embargo el uso común a menudo ha ampliado el término antibiótico para denominar a ambas sustancias (Goodman et al., 1996; Forbes et al., 2004).

Al comienzo de los años 1900, el científico alemán Paul Ehrlich desarrolló el concepto de toxicidad selectiva, mediante una serie de trabajos que consistían en observar los efectos que algunos colorantes tenían frente a los microorganismos. Observó que algunos colorantes teñían a los microorganismos, pero no a los tejidos animales. Ehrlich ensayó una gran variedad de productos químicos y descubrió los primeros agentes quimioterapéuticos de los cuales, el Salvarsan, que se utilizaba para el tratamiento de la sífilis fue el de mayor importancia. Continuando las investigaciones con azocolorantes, en 1932 Gerhard Domagk, quien trabajaba para Bayer descubrió uno que contenía un grupo sulfonamida y que se llamó *Prontosil*. Desde entonces, se han obtenido nuevas variantes de las sulfonamidas mediante la unión de diferentes radicales a la molécula de sulfonamida (Goodman et al., 1996; Katzung 1994; Madigan et al., 2001).

En 1928 Alexander Fleming observó la lisis de algunas colonias de estafilococos cuando el cultivo se contaminaba con el hongo *Penicillium notatum*, a la sustancia responsable se le llamó penicilina y se comenzó a utilizar de manera extendida unos años después de terminada la segunda guerra mundial (Errecalde 2004; Madigan, et al. 2001).

Los primeros antibióticos de la familia de las tetraciclinas, la clortetraciclina y la oxitetraciclina fueron descubiertos en 1948. Estas moléculas son producidas por *Streptomyces aureofaciens* y *S. rimosus*, respectivamente. Posteriormente, se

identificaron otras tetraciclinas, siendo productos producidos por diferentes especies de *Streptomyces* (Chopra et al., 2001).

En la tabla 1 se resumen y ordenan cronológicamente los hallazgos más trascendentes en materia de antimicrobianos (Errecalde, 2004).

Década	Antibióticos
1940	Estreptomicina, cloranfenicol y clortetraciclina
1950	Eritromicina y vancomicina
1960	Gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina.
1970	Cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor.
1980	Cefotaxima, moxalactam, aztreonam.
1990	Fluoroquinolonas, nuevos macrólidos y nuevas cefalosporinas.
2000	Quinolonas de espectro ampliado.

Tabla 1. Principales descubrimientos en el campo de los antibióticos (Errecalde, 2004).

Clasificación.

Los diferentes agentes antimicrobianos que existen se clasifican en diferentes familias de acuerdo a su mecanismo de acción dentro de la célula bacteriana y a su estructura química. Principalmente se tienen cuatro familias distintas: compuestos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibidores de la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y compuesto que afectan la permeabilidad de la membrana celular (McDermott et al., 2003).

Inhibidores de la biosíntesis de la pared celular.

Dentro de este grupo se encuentran los beta lactámicos (a su vez, éste está subdividido en penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las beta lactamasa) (Marín et al., 2003).

Un componente que únicamente se encuentra presente en la pared celular de las células bacterianas es el peptidoglicano. Este polímero consiste en una serie repetitiva de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acilmurámico (NAM). La subunidad NAM está unida a una corta cadena peptídica, formada por aminoácidos L y D y típicamente terminando en D-Alanina-D-Alanina. Este péptido es responsable del entrecruzamiento de moléculas de peptidoglicano (el cual se forma mediante las reacciones de transpeptidación, véase la figura 2) (McDermott et al., 2003).

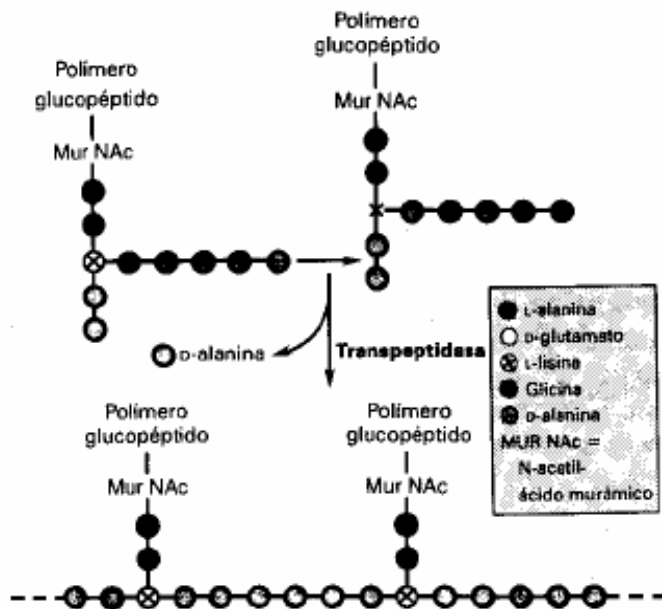


Figura 2. Reacción de transpeptidasa en *S. aureus*; que es inhibida por penicilinas y cefalosporinas (Goodman et al., 1996).

La acción de los betalactámicos consiste en la fijación de éstos a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP, por sus siglas en inglés). Las PBP son las enzimas responsables de la unión de dos o más cadenas de peptidoglicano (Madigan et al., 2001). Una vez unido el betalactámico a las PBP se inhiben las reacciones de transpeptidación y se bloquea la síntesis de péptidoglicanos (Marín et al., 2003) . Los betalactámicos son los antibióticos más ampliamente utilizados tanto en la medicina humana y en la producción de carne como promotores de crecimiento (McDermott, et al., 2002; Marín et al., 2003).

Existe otro grupo de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, los glicopéptidos; como ejemplos de esta familia tenemos a la vancomicina y la teicoplanina. Su actividad antimicrobiana se debe a la unión de las cadenas de D-Ala-D-Ala en el peptidoglicano o alguno de sus precursores, con lo que se previene el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. La actividad antimicrobiana de los glicopéptidos esta limitada a las bacterias Gram positivas (Fluit et al., 2001).

Inhibidores del metabolismo de los ácidos nucleicos.

En general, los antimicrobianos que interfieren la síntesis del ADN o el ARN lo hacen interfiriendo ya sea con un nucleótido (como las sulfonamidas) o bien con los procesos de biosíntesis de los ácidos dentro de la célula (como las quinolonas y las rifamicinas) (McDermott et al., 2003).

Las sulfonamidas actúan como compuestos análogos del ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (Madigan et al., 2001). La acción de las sulfonamidas es bacteriostática, y es reversible al suspender su administración o en exceso de PABA (véase la figura 3). El PABA es un sustrato en la síntesis del ácido tetrahidrofólico, que es un donador de unidades de un carbono en la síntesis de nucleótidos. Las sulfonamidas pueden participar en la reacción en vez del PABA y competir por la enzima dihidropterato sintetasa y formar análogos no funcionales del ácido tetrahidrofólico (Katzung et al., 1994).

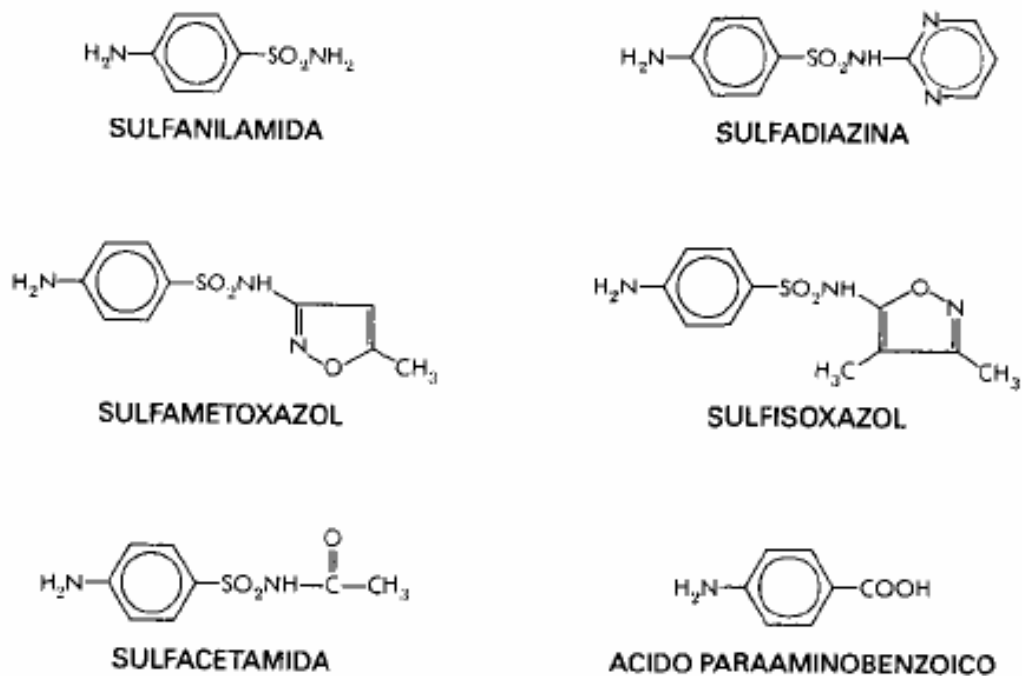


Figura 3. Fórmulas estructurales para algunas de las sulfonamidas más comunes y el PABA (Goodman et al., 1996).

El mecanismo de acción de las quinolononas consiste fundamentalmente en la inhibición de la síntesis de ADN bacteriano, provocada por el bloqueo de la ADN girasa (topoisomerasa II) y la ADN topoisomerasa IV (McDermott et al., 2003). La topoisomerasa II ayuda a remover el superenrollamiento que se presenta por delante del punto de replicación del ADN. Las quinolononas no permiten que se remueva este superenrollamiento, detienen la replicación del ADN bacteriano y por ende llevan a la muerte de la bacteria. La topoisomerasa IV ayuda a separar el ADN formado del utilizado como plantilla para la replicación, por lo tanto se produce la muerte bacteriana al estar inhibida esta enzima (Morrejón et al., 2003).

El mecanismo de acción de las rifamicinas consiste en la unión del medicamento a la ARN polimerasa, inhibiendo selectivamente el comienzo de la transcripción (McDermott et al., 2003).

Inhibidores de la síntesis de proteínas.

Dentro de este grupo podemos encontrar a los aminoglicósidos, macrólidos, cloranfenicol y tetraciclinas. La selectividad de estos agentes es el resultado de diferencias en el ribosoma procarionte y el ribosoma eucarionte (Madigan et al., 2001).

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Todas las tetraciclinas presentan un núcleo de cuatro anillos fusionados a los cuales se unen varios

grupos funcionales (figura 3). Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas bacteriana al prevenir la asociación del aminoacil ARNt con el ribosoma bacteriano. Se unen permanentemente a la subunidad ribosomal 30S, impidiendo el acceso del aminoacil ARNt al sitio aceptor del complejo ARNm-ribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. Para llegar a su sitio de acción las tetraciclinas deben de entrar a la célula mediante poros o por transporte activo (Chopra et al., 2001; Rodríguez et al., 1998).

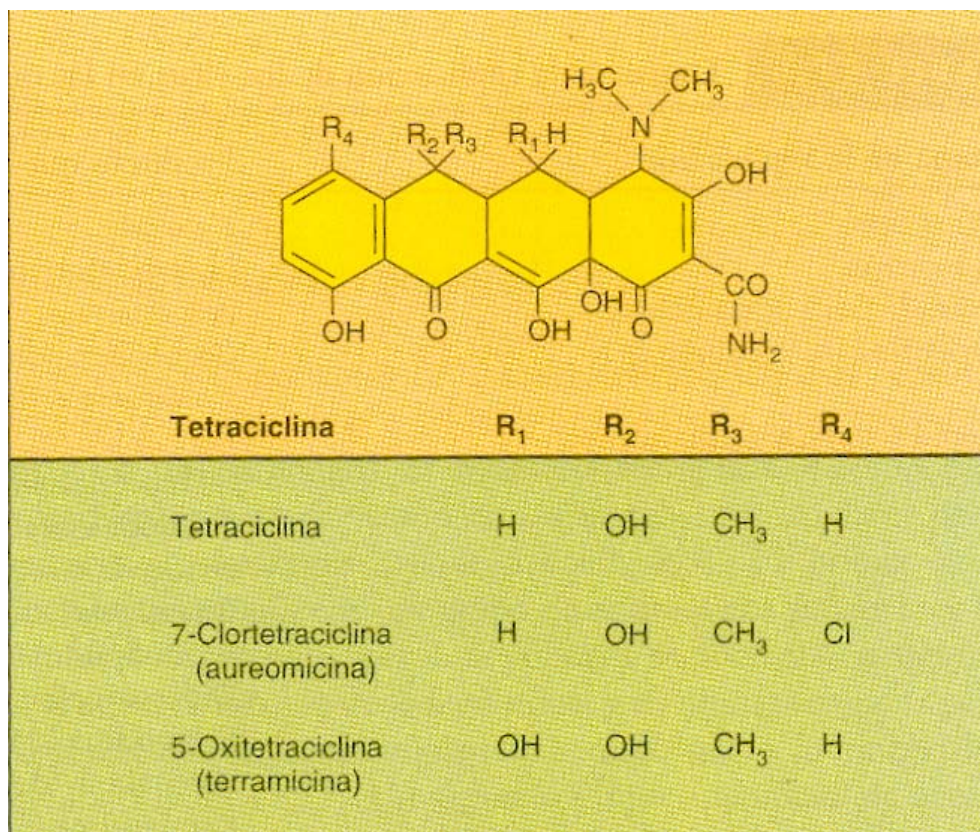
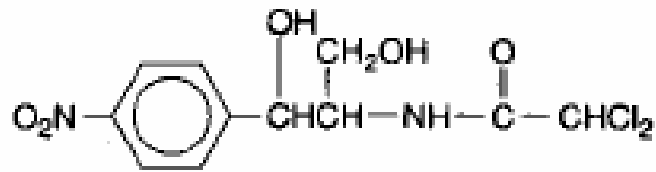


Figura 4. Estructura la Tetraciclina y derivados importantes (Madigan et al., 2001).

Los antibióticos aminoglicósidos son un grupo de medicamentos obtenidos originalmente de especies de *Streptomyces*. El mecanismo por el cual presentan actividad antimicrobiana consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas por la unión del fármaco a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Katzung et al., 1994; McDermott et al., 2003). Dentro de esta categoría encontramos a la gentamicina, amikacina y estreptomicina, fármacos ampliamente utilizados (Fluit et al., 2001).



CLORANFENICOL

Figura 5. Estructura del cloranfenicol (Goodman et al., 1996).

El cloranfenicol (figura 5) es un antibiótico originalmente obtenido a partir de *Streptomyces venezuelae*, aunque actualmente se obtiene por síntesis química. El cloranfenicol penetra en las células bacterianas por difusión pasiva, e inhibe la síntesis de proteínas al unirse de manera reversible con la subunidad ribosomal 50S; cuando esto ocurre, no puede llevarse a cabo la reacción de la enzima peptidiltransferasa y el correspondiente aminoácido, de modo que el enlace peptídico no puede formarse. Los macrólidos, como la eritromicina contienen anillos policíclicos a los cuales se encuentran unidos uno o varios desoxiazúcares. Son agentes antimicrobianos que previenen la síntesis de proteínas al unirse a la

subunidad ribosomal 50S, de la misma manera que el cloranfenicol (Goodman, et al., 1996).

Resistencia a Antibióticos.

Cuando se introdujeron los primeros antibióticos durante la primera mitad del siglo XX, fueron vistos como “medicinas milagrosas”, provocando un gran entusiasmo e incluso se llegó a especular acerca de la erradicación total de las enfermedades infecciosas (McDermott et. al, 2003; Salyers et al., 1997). Los antibióticos se consideraban, prácticamente, la “panacea” de la medicina, y eran usados indiscriminadamente para tratar toda clase de infecciones (incluso algunas de naturaleza no bacteriana) (Alanis, 2005). Dentro de la comunidad científica este entusiasmo no estaba tan extendido, ya que varios científicos, incluido Alexander Fleming, el descubridor de la penicilina, predijeron que el uso de los antibióticos eventualmente llevaría a la aparición de cepas resistentes a estos. Poco tiempo después de que se comenzaron a utilizar los antibióticos aparecieron cepas resistentes (las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina aparecieron solo un año después del uso difundido de dicho antibiótico) (Alanis, 2005). A medida que el uso de antibióticos se volvió una práctica más común, continuaron apareciendo cepas resistentes, convirtiéndose en un problema notable de salud pública (Tenover, 2006). Sin embargo, no fue hasta 1960 que se detectó por primera vez que la resistencia a antibióticos podría ser transferible (McDermott et al., 2002; Wolfgang et al., 2002).

En la tabla 2 se presentan, esquemáticamente los años de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y los años en que las resistencias a los mismos fueron comunicadas (Errecalde, 2004).

Antibiótico	Descubrimiento	Uso Clínico	Resistencia Clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Tabla 2. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos (Errecalde 2004).

Es claro que el uso y abuso de los antibióticos por los humanos ha ocasionado una enorme presión selectiva sobre los microorganismos, ya que a lo largo de 50 años el número de especies y cepas bacterianas resistentes a antibióticos, al igual que el número de antibióticos a los cuales son resistentes, se ha incrementado constantemente, de manera que ya no es posible tratar algunas infecciones (Andersson et al., 1999).

El incremento de la resistencia a antibióticos es simplemente un resultado de la selección natural debida a la presión selectiva ejercida por los antibióticos, las bacterias han mostrado ser poseedoras de una habilidad sorprendente para sobrevivir y adaptarse a su entorno, logrando desarrollar una amplia variedad de mecanismos de resistencia a la mayoría de los antibióticos que se conocen (Anderson, et al., 1999; Grohmann, et al., 2003; Alanis 2005).

La resistencia a antibióticos es tan antigua como los mismos antibióticos, es posible que los genes que confieren la resistencia a antibióticos hallan tenido su origen en los distintos organismos productores de estos agentes (Phillips, et al., 2004). Los genes de resistencia probablemente evolucionaron en los organismos productores como un mecanismo de defensa intrínseco para protegerse de los efectos tóxicos de su propio antibiótico. Esta hipótesis se apoya principalmente en que todos los mecanismos de resistencia a antibióticos que han sido identificados existen en los organismos productores de antibióticos (Grohmann, et al., 2003). Sin embargo, es importante señalar que los organismos productores de antibióticos no son la única fuente potencial de genes de resistencia, ya que se ha sugerido que algunos genes de mantenimiento propios de las células, como las carbohidrato cinasas y las acetiltransferasas, podrían haber evolucionado para modificar a los antibióticos aminoglicósidos (Davies, 1994).

Mecanismos de resistencia.

Las bacterias presentan tres fenotipos fundamentalmente: susceptibilidad, resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es natural para los organismos productores de agentes antimicrobianos, aunque también puede ser que el organismo carezca del sitio de acción del agente antimicrobiano. La resistencia se puede adquirir por una gran variedad de mecanismos, los cuales se explicarán más adelante (McDermott, et al., 2003; Tenover, 2006).

La resistencia a antibióticos puede ser debida a varios mecanismos: i) la presencia de una enzima que inactive el agente antimicrobiano, ii) la presencia de una enzima alternativa que pueda realizar la misma actividad que la molécula que se vea inhibida por el agente antimicrobiano, iii) una mutación en el sitio de acción del agente antimicrobiano que impida la unión de este con su sitio activo, iv) modificaciones post-transcripcionales al sitio de acción del agente antimicrobiano, v) expulsión del antibiótico, vi) reducción del transporte del agente antimicrobiano al interior de la célula bacteriana y vii) sobreproducción del blanco del agente antimicrobiano (Fluit et al., 2001; Nikaido, 1998, Tenover, 2006). Además de los anteriormente mencionados, podrían existir otros mecanismos aún no descubiertos (Fluit, et al., 2001).

En la tabla 3 se muestran los mecanismos por los cuales se desarrolla resistencia a las distintas clases de antimicrobianos:

Familia de antibióticos	Mecanismo de Resistencia
Beta lactámicos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mutaciones en la PBP de manera que tiene menor afinidad por el antibiótico (McDermott et al., 2003). 2. Alteraciones en la permeabilidad de la membrana, de manera que la entrada del antibiótico a la célula se dificulta (Marín et al., 2002). 3. Producción de betalactamasas, que actúan rompiendo el anillo betalactámico, causando que el antibiótico no pueda unirse a las PBP (Marín et al., 2002). 4. Expresión de mecanismos de transporte, que bombean al antimicrobiano fuera de la célula (Markham, et al., 2001).
Glicopéptidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Unión al dipéptido de D-Ala-D-Ala de los precursores del péptido glicano, impidiendo la síntesis de la pared celular (Goodman et al., 1996).

Sulfonamidas	<ol style="list-style-type: none">1. Alteración de la dihidropteroato sintetasa, debida a mutaciones (Goodman et al., 1996).2. Sobreproducción del PABA, de manera que éste se encuentre en una concentración mucho mayor que la sulfonamida y por lo tanto, no exista inhibición de la síntesis del ácido fólico (Goodman et al., 1996).
Quinolonas	<ol style="list-style-type: none">1. Mutaciones en los genes de las topoisomerasas (McDermott et. al., 2003).2. Disminución de la permeabilidad de la membrana (McDermott et. al., 2003).3. Transporte activo del fármaco fuera de la célula (Markham, et al., 2001).
Rifamicinas	<ol style="list-style-type: none">1. Mutaciones en el gen que codifica la ARN polimerasa (McDermott et. al., 2003).2. Modificación enzimática del medicamento (McDermott et. al., 2003).3. Transporte activo del fármaco fuera de la célula (Markham, et al., 2001).

Tetraciclinas	<ol style="list-style-type: none">1. Transporte activo, hacia el exterior de la célula, de manera que el antibiótico no se concentre en el interior de la célula (Markham, et al., 2001).2. Inactivación enzimática de la tetraciclina (Chopra et al., 2001).3. Protección del ribosoma de la acción de la tetraciclina, mediante la producción de una proteína que interactúa con el ribosoma de manera que el antibiótico no puede interactuar con éste (Chopra et al., 2001).
Cloranfenicol	<ol style="list-style-type: none">1. La resistencia a cloranfenicol se debe a la presencia de una acetiltransferasa específica para el cloranfenicol, comúnmente encontrada en plásmidos (Fluit et al., 2001).

Aminoglicósidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alteración en los ribosomas, principalmente causada por mutaciones en los genes que codifican a las proteínas ribosomales (Mingeot-Leclercq et al., 1999). 2. Eliminación o alteración de los mecanismos de transporte hacia el interior de la célula (Mingeot-Leclercq et al., 1999). 3. Inactivación de los aminoglicósidos por la acción de aminoglicósido acetiltransferasas, aminoglicósido adeniltransferasas y aminoglicósido nucleotidiltransferasas (Mingeot-Leclercq et al., 1999).
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Es importante señalar que estos mecanismos de resistencia, así como los genes que los codifican existían mucho tiempo antes de la introducción de los antimicrobianos en la medicina (Hughes et al., 1983). Como evidencia experimental de esto, se han logrado aislar bacterias resistentes a antibióticos de glaciares en las regiones árticas de Canadá, y se estima que estas tienen aproximadamente 2000 años de antigüedad (Dancer et al., 1997).

Transferencia de la resistencia.

Las poblaciones de bacterias normalmente susceptibles a algún antibiótico pueden volverse resistentes ya sea por mutaciones o por la adquisición de información genética que codifique para algún mecanismo de resistencia; esto puede ocurrir por alguno de los siguientes eventos: transformación, conjugación o transducción. El desarrollo de la resistencia mediante la adquisición de nuevo material genético de otros organismos se denomina evolución horizontal (Tenover, 2006).

La resistencia adquirida por mutaciones y posterior selección se conoce como evolución vertical, y se produce por errores aleatorios en el proceso de replicación del ADN (esto ocurre muy poco, con una frecuencia de 10^{-9} a 10^{-10} por gen), lo que pueda resultar ya sea en la alteración de alguno de los sitios de acción del antibiótico, inactivación del antibiótico, pérdida de receptores o la sobreexpresión de sistemas de expulsión (Livermore, 2003). Tradicionalmente, las mutaciones ocurren en el ADN cromosomal, pero también pueden ocurrir en plásmidos o transposones. Las mutaciones incluyen sustituciones de bases, pérdida, inserción y reordenamiento de bases. Los genes con mutaciones pueden transferirse a otras bacterias por tres mecanismos, principalmente: transducción, transformación y conjugación (Madigan et al., 2001; Livermore, 2003).

Transducción.

La transducción consiste en la adquisición de material genético mediante un virus capaz de infectar a alguna bacteria (bacteriófago). Al atacar a la célula bacteriana, el fago utiliza los mecanismos del huésped para auto replicarse, llevando normalmente a la lisis de la célula y a la producción de muchas copias del bacteriófago. Otra posibilidad menos común es que las partículas víricas incorporen aleatoriamente fragmentos del ADN celular, por lo tanto, prácticamente cualquier gen del donador puede ser transferido (incluyendo los genes responsables de la resistencia a antibióticos), pero la eficiencia de este proceso es muy baja (Alanís, 2006; Madigan et al., 2001).

Transformación.

La transformación consiste en la incorporación de ADN libre (presente en el medio) a la célula receptora. El ADN libre proviene generalmente de bacterias muertas que se han roto (Alanís, 2006). La captación de moléculas de ADN por la bacteria receptora es un proceso activo que requiere energía. No implica la entrada pasiva de moléculas de ADN a través de paredes celulares y membranas permeables, por lo que la transformación solo ocurre en las células competentes que son capaces de funcionar como receptores en la transformación, ya que poseen el denominado factor de competencia (probablemente una proteína de la superficie celular o una enzima que interviene en la unión o captación de ADN) producido sólo en momentos específicos durante el ciclo de crecimiento (Livermore 2003) . El proceso de transformación puede dividirse en varias etapas:

- 1) unión reversible de moléculas bicatenarias o de doble cadena de ADN a los

sitios receptores de la superficie celular; 2) captación irreversible del ADN del donador; 3) conversión de las moléculas bicatenarias de ADN del donador en moléculas de cadena sencilla o monocatenarias por digestión nucleolítica de una cadena; 4) integración de toda o parte de la cadena sencilla de ADN del donador en el cromosoma del receptor y 5) segregación y expresión fenotípica del gen o genes donadores integrados en la célula recombinante (transformada) (Gardner et al., 2000).

Es probable que la transformación ocurra con frecuencia en la naturaleza, ya que se ha observado que la mayoría de especies bacterianas son capaces de incorporar material genético bajo ciertas condiciones (Davies, 1994).

Conjugación.

El tercer mecanismo, la conjugación, es el más difundido en la naturaleza. Es un proceso altamente específico en el cual se transfiere ADN de una bacteria a otra mediante una conexión intracelular especializada o tubo de conjugación (apéndices superficiales especializados que se denominan pili F). Con el contacto intracelular especializado, se emprende la movilización cromosómica que incluye la síntesis del ADN. Una nueva cadena de ADN es producida por el donante y pasa al receptor, donde se sintetiza una cadena complementaria a la cadena del donante. La síntesis del pili F está controlada por varios genes que se localizan en una molécula circular pequeña de ADN o minicromosoma denominado factor F (Grohmann, et al., 2003). En la naturaleza, esta transferencia de información genética ocurre tanto en especies Gram positivas como en Gram negativas

(Grohmann, et al., 2003). Se ha demostrado también que la transferencia de información genética entre bacterias Gram positivas y Gram negativas ocurre mediante conjugación bajo condiciones de laboratorio, lo que indicaría que en la naturaleza podría ocurrir también (Courvalin, 1994).

Además del ADN cromosómico, los genes codificados en elementos genéticos no cromosómicos, como los plásmidos y los transposones pueden transferirse por conjugación (Courvalin, 1996). El ADN del plásmido también puede incorporarse en el cromosoma de la célula huésped (Salysers, et al., 1997).

Elementos genéticos móviles.

Actualmente se han identificado varios elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, de los cuales los más conocidos son los plásmidos autotransferibles, los transposones (conjugativos y no conjugativos) y los integrones y *cassettes* genéticos de resistencia (Rowe-Magnus, et al., 2001; González, et al., 2004).

Plásmidos.

Un plásmido es una unidad de material genético extracromosomal capaz de duplicarse independientemente; su replicación depende de las mismas enzimas que replican al cromosoma de la célula huésped, y se distribuye en las células hijas en la división celular, al mismo tiempo que el cromosoma del huésped. Los plásmidos pueden llevar una gran variedad de genes, que le otorgan a la célula que los porta distintas funciones, como la capacidad para utilizar algunos

compuestos tales como hidrocarburos como fuente de carbono (Furukawa et al., 1982), capacidad para fijar nitrógeno, resistencia a antibióticos (plásmidos R), resistencia a metales como mercurio, zinc, etc. Existe un gran número de plásmidos cuya función se desconoce; estos se denominan plásmidos crípticos (Madigan et al., 2001; Grohmann et al., 2003).

Transposones.

Los transposones son elementos genéticos (segmentos de ADN) capaces de moverse entre varias estructuras genéticas intracelularmente (en las bacterias los transposones pueden moverse dentro de los plásmidos, desde un plásmido a un cromosoma o a otro plásmido) o entre células bacterianas (transposones conjugativos) (Singer et al., 1998). El tamaño de los transposones varía entre 2.000 y 10.000 pares de bases (pb), estudios realizados con diversos organismos, incluyendo bacterias, insectos, plantas y mamíferos sugieren que los transposones están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en eucariontes como en procariontes (Gardner et al., 1998).

Los transposones bacterianos más sencillos son las secuencias de inserción o elementos IS. Miden menos de 1500 pb y solo contienen genes que intervienen en la promoción o la regulación de la transposición. Algunas veces dos elementos IS homólogos flanquean uno o varios genes funcionales para formar un transposón compuesto (Tn) (Gardner et al., 1998). La secuencia entre los elementos IS pueden entonces ser transpuesta por la actividad conjunta de los elementos que la flanquean. Otro grupo mayor de transposones, son los transposones complejos,

que consisten de elementos en donde la transposasa/resolvasa es codificada junto con otros genes como genes de resistencia a antibióticos dentro de una estructura flanqueada por repeticiones cortas invertidas (Singer, et al., 1998). Los elementos IS ocasionan mutaciones al desplazarse entre diferentes regiones del genoma, debido a que se interrumpen regiones reguladoras o codificantes (Singer et al., 1993).

Los transposones conjugativos son segmentos de ADN que presentan tamaños de entre 18 y 150 Kpb, los cuales están presentes en el genoma bacteriano. Para transferirse, se separan del cromosoma formando un intermediario circular no replicante, este es posteriormente transferido mediante conjugación a un organismo receptor, donde se integra al genoma de éste, la integración es mediada por una enzima integrasa, presente en el transposón conjugativo (Salysers et al., 1997).

Integrones.

La caracterización de plásmidos y transposones capaces de codificar resistencia a varios antibióticos, encontrados en bacterias Gram negativas llevó al descubrimiento de los integrones (Bennett, 1999). Los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos (González et al., 2004).

Los componentes esenciales de un integrón son, básicamente, un gen (*IntI*) que codifica una enzima con actividad de recombinasa específica de sitio (integrasa), un sitio de recombinación específica (*attI*), en el cual se integra el *cassette* genético de resistencia, y dos promotores, uno que controla la expresión de la

integrasa, y otro que controla la expresión de los genes insertados en el integrón, puesto que los genes insertados en los integrones carecen de sus propios promotores (Bennett, 1999; García, 2000; Lévesque et al., 1995). La integrasa es miembro de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago λ , denominadas tirosina recombinasas (González et al., 2004). Estas enzimas catalizan la excisión e integración de unidades de ADN, mediante dos pasos consecutivos de ruptura de la cadena de ADN y la posterior reparación de ésta. Es importante mencionar que estos procesos ocurren sin que se lleve a cabo síntesis de ADN o la intervención de cofactores de alta energía, como el ATP (Carattoli, 2001).

Los integrones poseen dos extremos (5' y 3') altamente conservados, los cuales están separados por una región variable en la cual se encuentran integrados los *cassettes* genéticos (Lévesque, et al., 1995). En el extremo 5' se encuentra el gen de la integrasa (*intI*), el cual se transcribe de derecha a izquierda y el sitio *attI*; en el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región que contiene los promotores anteriormente mencionados (García, 2000). A continuación, se encuentra la región central variable, en la cual podemos encontrar los genes insertados en el integrón, y, finalmente podemos encontrar el extremo conservado 3', en el cual se encuentra el gen *sull*, que confiere resistencia a las sulfonamidas, el gen *qacE Δ 1*, que es responsable de la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio y al bromuro de etidio; además de estos genes, se encuentra un gen, denominado *orf5*, cuya función se desconoce (Lévesque et al., 1995; Hall et al., 1994).

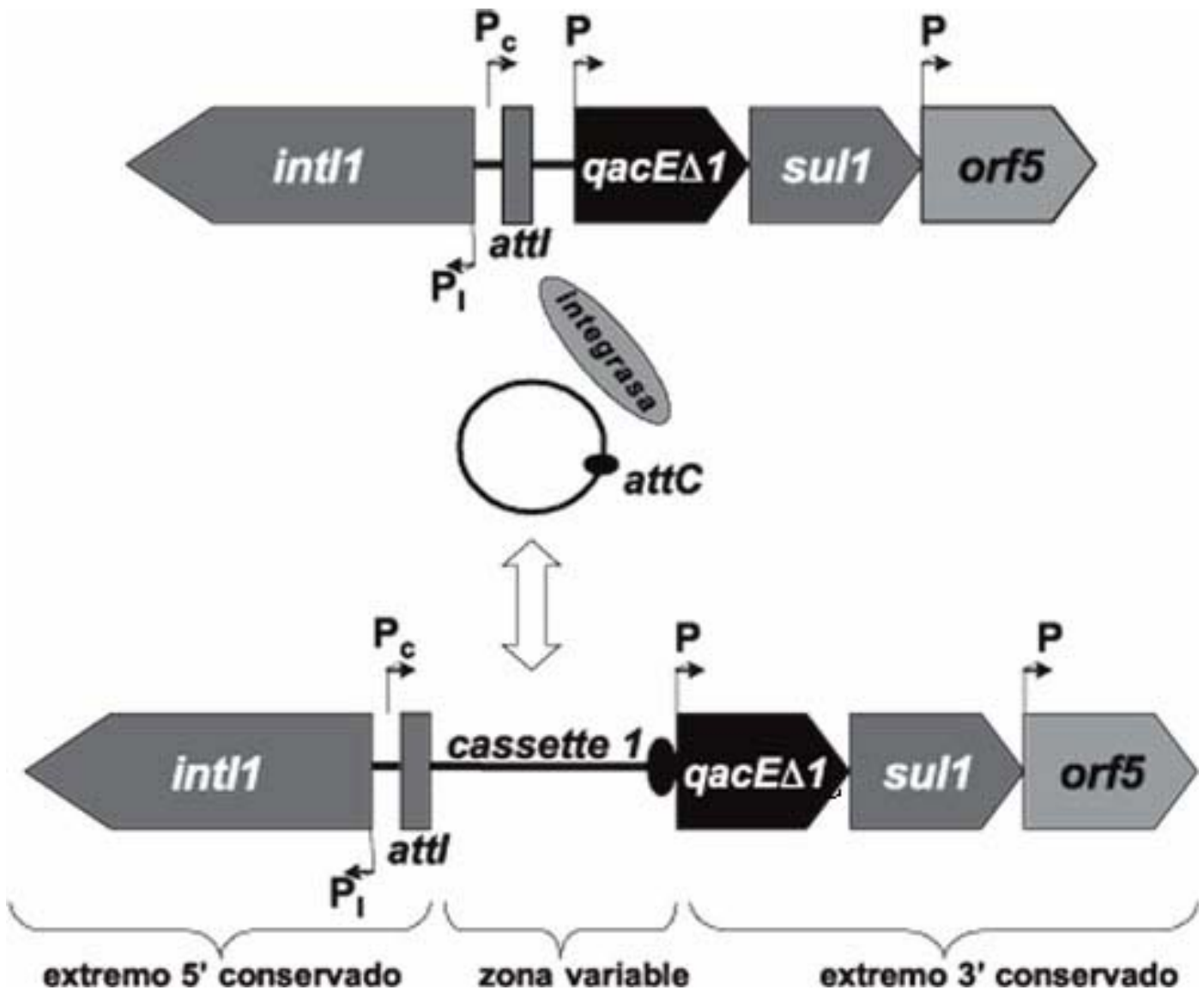


Figura 6. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *int1*: gen que codifica a la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (González et al., 2004).

Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que constan de un gen y un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del gen (Dubois et al., 2002). A pesar de que los *cassettes* genéticos se consideran elementos móviles, estos no codifican enzimas u otros productos implicados en su propia movilización; los *cassettes* genéticos pueden existir como elementos circulares libres, y solo se transcriben cuando se encuentran insertados en un integrón (White et al., 2001). Los *cassettes* genéticos carecen de un promotor, por lo que el promotor localizado en el extremo conservado 5' del integrón es esencial para la expresión de los *cassettes*. La inserción específica de los *cassettes* genéticos al interior de la región variable de los integrones ha sido solamente detectada en las células que expresan la actividad de la integrasa (González et al., 2004). La integrasa es esencial para la integración de los *cassettes*, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón. La integrasa actúa con los dos sitios primarios de recombinación, *attI* de los integrones y el sitio *attC* del *cassette* genético. Cualquiera de los *cassettes* presentes en un integrón puede ser eliminado por recombinación específica entre cualquiera de los elementos de 59 pb y el sitio *attI* o un segundo elemento de 59 pb (Bennet, 1999).

La especificidad de la orientación de los *cassettes* genéticos integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5' conservado de los integrones, cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando

incluso a niveles tan bajos de expresión que la bacteria puede parecer fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia (Levésque et al., 1995; González et al., 2004).

Hasta el momento se han descrito cuatro clases diferentes de integrones. La clasificación de estos se basa en los diferentes genes que codifican a la integrasa (*int*) (Carattoli, 2001). Las clases 1,2 y 3 están asociadas con resistencia a antibióticos, mientras que los integrones de clase 4, también conocidos como súper integrones, han sido localizados en el genoma de varias especies de *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Shewanella* y *Nitrosomonas*, y no se relacionan con la resistencia a antibióticos (Rowe-Magnus, et al., 1999; White, et al., 2001).

Las integrasas 1,2 y 3 presentan entre 45% y 58% de similitud, sugiriendo una divergencia evolutiva por un periodo superior a 50 años, lo que corresponde, aproximadamente, a la era de los antibióticos (González et al., 2004). Los integrones de clase 2 se distinguen de los de clase 1 en que, además de las diferencias existentes en el gen *int*, no presentan el gen *sul1*, pero en su lugar, presentan genes cuya función está relacionada con mecanismos de transposición. A la fecha, solo se ha reportado un integrón clase 3, y el gen que codifica su integrasa (*int3*) es idéntico en un 60.9% al gen *int1* (Carattoli, 2001).

Es importante señalar que a pesar de las diferencias en los genes de la integrasa y en las secuencias *attI* , es posible que se adquirieran los mismos *cassettes* genéticos por cualquier clase de integrones, ya que se han encontrado *cassettes* genéticos idénticos entre integrones de clase 1 y de clase 2; así como entre integrones de clase 1 y clase 3 (Carattoli, 2001).

Los integrones de clase 4 se distinguen por tener hasta cientos de *cassettes* genéticos insertados, y fueron descubiertos por primera vez en el genoma de *Vibrio cholerae* (Carattoli, 2001). Entre la gran variedad de genes que porta el integrón de clase 4 encontrado en *Vibrio cholerae*, se han identificado algunos que codifican para mecanismos de patogenicidad propios de la especie (hemaglutininas y lipoproteínas), así como para algunas otras proteínas, como acetiltransferasas, ADN-metil transferasas, etc. (Rowe-Magnus, et al., 1999; Carattoli, 2001).

Importancia clínica de los integrones.

Los integrones usualmente se localizan en elementos genéticos, como plásmidos y transposones, y su habilidad para integrar *cassettes* genéticos explica la gran importancia que tienen en la difusión de la resistencia a antibióticos (Dubois et al., 2002). La diseminación de estos genes de resistencia ha aumentado considerablemente cuando ellos forman parte de los *cassettes* genéticos móviles, lo cual facilita considerablemente su transferencia horizontal por varios mecanismos (González et al., 2004).

Los *cassettes* genéticos codifican para una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos beta lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas (White et al., 2001; Xiangdang et al., 2005). Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial, aunque de igual forma, se han podido identificar en bacterias aisladas a partir de ambientes acuáticos y de animales domésticos, lo que demuestra que los integrones están ampliamente distribuidos en la naturaleza (González et al., 2004; Carattoli, 2001). Como ejemplo de algunas de la especies en que se han podido encontrar integrones, se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae*, *Proteus sp.*, entre muchas otras (White et al., 2001; González et al., 2004; Dubois et al., 2002; Xiangdang et al., 2005).

An abstract graphic composed of numerous thin, black lines that converge at a central point on the right side of the page. The lines radiate outwards, creating a star-like or fan-like shape that fills the page. The lines are closely spaced, creating a sense of depth and movement.

II. OBJETIVOS

Objetivo general.

Aislar e identificar microorganismos multirresistentes a antibióticos posibles portadores del integrón 1, a partir de muestras de carne molida de res.

Objetivos particulares.

- ❖ Aislar cepas de microorganismos multirresistentes a antibióticos partir de muestras de carne molida res.
- ❖ Realizar la identificación presuntiva de los microorganismos aislados.
- ❖ Determinar la susceptibilidad de los microorganismos aislados a distintos antibióticos.
- ❖ Determinar si la carne de res es reservorio de microorganismos multirresistentes.
- ❖ Determinar la presencia de integrones en cepas de enterococos multirresistentes.
- ❖ Determinar si el o los integrones se encuentran presentes en el cromosoma de las cepas multirresistentes o si se encuentra ubicado en un plásmido.
- ❖ Determinar el peso molecular del material genético presente en los integrones que se encuentren.

An abstract graphic consisting of numerous thin, parallel black lines that intersect at a central point, forming a large 'X' shape. The lines are distributed across the entire page, with some appearing as solid bands and others as fine, hair-like lines.

III. METODOLOGIA

Metodología.

Aislamiento

Se realizó el aislamiento a partir de muestras de carne molida de res, comprada en supermercados aledaños a Ciudad Universitaria: *Superama* (sucursal Copilco) y *Wal-Mart* (sucursal Copilco); también se utilizaron muestras compradas en un tianguis y un mercado del sur de la ciudad. El método fue una modificación al propuesto en la NOM-110-SSA, pues en este caso se deseó hacer crecer a la mayor cantidad posible de microorganismos, esto se logró realizando un preenriquecimiento. La carne se mantuvo refrigerada hasta que se trabajó con ella; y fue utilizada el mismo día en que fue comprada. Se tomaron 10 g de carne y se agregaron 90 mL de Agua Peptonada estéril, esta mezcla se homogenizó durante un minuto a velocidad media, utilizando un *Stomacher* (NOM-110-SSA1-1994; NOM-114-SSA1-1994; Palao et al., 2000).

De dicho homogenizado se realizaron diluciones de la siguiente manera: se tomó 1 mL y se agregó a un tubo de ensayo con 9 mL de medio enriquecido (infusión cerebro corazón, BHI), se consideró entonces que esta dilución fue 10^{-2} , puesto que al colocar 10 gramos de carne en 90 mL de agua peptonada se considera la dilución 10^{-1} . Se prepararon las siguientes diluciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Estas se incubaron 24 horas a 37°C (NOM-110-SSA1-1994; NOM-114-SSA1-1994; Palao et al., 2000).

Se realizó una dilución 1:10⁶ a partir del cultivo de la dilución 10⁻⁶, con el fin de tener colonias aisladas. Posteriormente se inocularon 100 µL de dicha dilución en los siguientes medios: Agar soya-tripticosa, Agar para enterococos, Agar MacConkey, Agar Hecktoen y) Agar CPS2 (*Biomerux*).; se incubaron dichas cajas durante 24 h a 37°C. Se tomaron 25 colonias de cada medio y se resembraron en agar BHI, este muestreo se realizó de modo que fuese representativo, es decir, se deseaba que estuvieran presentes todos los microorganismos que crecieron, en la misma proporción (NOM-110-SSA1-1994; Palao et al., 2000).

Pruebas de sensibilidad a antibióticos.

Las colonias aisladas por el método anterior se inocularon en un medio que contenía los siguientes antibióticos: Amikacina (64 µg/mL), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32µg/mL). Posteriormente se realizará la prueba para determinar la sensibilidad a antibióticos utilizando multidiscos Bio-Rad. El método que se siguió fue el sugerido por el fabricante: se inocularon 5 mL de caldo soya tripticosa y se incubó a 37°C durante toda la noche; posteriormente se siembra por extensión en agar Mueller-Hinton y se incubó a 37°C durante 24 horas (White et al., 2001).

Clave	Antibiótico	Concentración
AM	Ampicilina	100 µg / mL
CF	Cefalotina	300 µg/mL
CTX	Cefotaxima	300 µg/mL
CAZ	Ceftazidima	300 µg/mL
CXM	Cefuroxima	300 µg/mL
DC	Dicloxacilina	10 µg/mL
E	Eritromicina	150 µg/mL
GE	Gentamicina	100 µg/mL
PEF	Pefloxacina	50 µg/mL
PE	Penicilina	10 U/ mL
TE	Tetraciclina	300 µg/mL
SXT	Trimetoprim-Sulfametoxazol	250 µg/mL
AK	Amikacina	64 µg /mL

Tabla 4. Antibióticos (y las claves con las que se hará referencia a los mismos) utilizados en las pruebas de sensibilidad a antibióticos.

Se realizó extracción de ADN total de acuerdo al siguiente método (Montiel, 1994).

Protocolo general para extracción de ADN total (Palumbi, et al., 1991).

- 1.- Utilizar aproximadamente 0.1g a 5.0g de tejido en 100mL de medio.
- 2.-Agregar un volumen aproximadamente igual de *Buffer de lisis.
- 3.-Macerar el tejido en frío empleando un mortero, licuadora, homogenizador, sonicador, etc.
- 4.-Centrifugar a 10,000 g's durante 10 min. a 4°C; (en micro centrifuga ependorff, 10,000 rpm)

- 5.-Recuperar el sobrenadante y extraer suavemente con un volumen igual de fenol equilibrado.
- 6.-Separar las fases centrifugando a 10,000 g's por 10 min. a 4°C.
- 7.-Recuperar la fase acuosa superior y agregar un volumen igual de fenol / cloroformo (1:1), mezclar suavemente.
- 8.-Separar las fases centrifugando a 10,000 g's por 10 min. a 4°C.
- 9.-Recuperar la fase acuosa superior y agregar un volumen igual de cloroformo, mezclar suavemente.
- 10.-Separar las fases centrifugando a 10,000 g's por 10 min. a 4°C.
- 11.-Recuperar la fase acuosa midiendo su volumen.
- 12.-Agregar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M o bien 0.5 vol. de acetato de amonio 7.5M.
- 13.-Agregar 0.5 volúmenes de isopropanol o bien 1.5 vol de etanol, mezclar.
- 14.-Dejar 15 min. en reposo a temperatura ambiente.
- 15.-Centrifugar a 10,000 g's durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 16.-Desechar cuidadosamente el sobrenadante, lavar el pellet con etanol al 70%.
- 17.-Centrifugar igual que en el punto numero 15.
- 18.-Decantar cuidadosamente y secar el pellet; resuspender en agua aproximadamente 30 μ L, dependiendo de la cantidad del pellet.

NOTAS:

- 1.Se crecen las células en 100 mL de medio BHI, (se recomienda crecer en medio con antibiótico, en caso de que se esté trabajando con bacterias resistentes a antibiótico, para que no se pierda la resistencia).

2. Se dejan incubando durante 24h a 30°C con agitación.
3. Se colocan 20 mL de cultivo en tubos para centrifuga, se centrifuga durante 5 min. a 4000 rpm.
4. Una vez obtenido el pellet se adiciona 2 mL de buffer de lisis con 1g de piedritas de vidrio previamente estériles, por tubo.
5. Con la ayuda de un vortex, se agita vigorosamente durante 8 min. para romper a las células.
6. Después de realizar éstos pasos, se continúa con el método anterior señalado en el punto 4.

El ADN extraído se corrió en un gel de agarosa al 1%, el cual fue cargado con 5 μ L de muestra, 4 μ L de agua destilada estéril y 1 μ L de buffer de carga. Se corrió a 90 volts durante aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, se tiñó sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), durante 5 minutos y se destiñe sumergiéndolo en agua destilada durante aproximadamente 15 minutos. Finalmente, se visualiza el gel bajo la luz ultravioleta. Se procedió a determinar la presencia del integrón 1 en el ADN de las muestras, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La metodología para realizar PCR fue la siguiente:

1. Agregar los siguientes componentes en el orden descrito.
 - a) 45 μ L de buffer PCR Platinum® *supermix INVITROGEN*¹
 - b) Agregar 1 μ L de cada una de las soluciones de los *primers* SUL 1B e INT F (la concentración final de cada primer fue de 200 nM).
 - c) Adicionar 1 μ L de ADN bacteriano (se recomienda tener una concentración de 1-3ng)
 - d) Adicionar 2 μ L de agua deionizada estéril para obtener un volumen total de 50 μ L.
2. Tapar y mezclar perfectamente el contenido de los tubos.
3. Colocar los tubos en el termociclador, con el siguiente programa.
 - I. Arranque 3 minutos a 96°C
 - II. Desnaturalización 15 segundos a 96°C
 - III. Hibridación 30 segundos, 55°C
 - IV. Amplificación 90 segundos, 72°C.
 - V. Etapa final 10 minutos a 72°.
 - VI. Enfriamiento hasta alcanzar 4°C.

Terminado el programa de PCR se realizó un gel de agarosa al 1% y se corrieron las muestras junto con el marcador de pesos moleculares (ADN del fago λ ,

¹ Contiene todo lo necesario para que se de a cabo la reacción, incluyendo la enzima, que en este caso (*Platinum*) esta unida a un anticuerpo que impide que trabaje a temperatura ambiente, el cual se desnaturaliza a 70°C.

contado con la enzima de restricción HIND III marca Sigma). Dicho gel se corrió y tiñó de la misma manera que el de ADN total.

Los geles de agarosa realizados con las muestras tratadas en la reacción de PCR fueron fotografiados para ser posteriormente analizados, utilizando regresión lineal. Para realizarla se midió la distancia recorrida por los fragmentos a partir del pozo de cada carril y se graficó contra el peso de los fragmentos del marcador de peso molecular, que en este caso fue ADN del fago λ cortado con la enzima de restricción Hind III; los fragmentos de ADN tienen pesos de 23.1, 9.4, 6.7, 4.4, 2.3, 2.0 y 0.56 Kpb. Una vez que se obtiene la gráfica de regresión lineal (distancia recorrida contra peso molecular), se mide la distancia recorrida por los fragmentos que se observen en las muestras obtenidas por la PCR, y se sustituye dicha distancia en la ecuación de regresión lineal, para obtener una estimación del peso molecular del fragmento. El análisis de regresión lineal fue realizado utilizando MS Excel ver. 2002.

Posteriormente, se realizó extracción de ADN plasmídico por el método que se describe a continuación (Montiel, 1994).

Preparación de ADN Plasmídico (Método de Birnboim y Doly, 1979).

1. Crecer 5 mL de bacterias durante toda la noche en medio de Luria.

Medio de Luria.

NaCl..... 5 g

Triptona.....10 g
Extracto de levadura 5 g
H₂O1000 mL

2. Tomar 1.5 mL del cultivo anterior, pasarlo a un tubo Ependorff y centrifugar por un minuto.
3. Decantar dejando el pellet lo más seco posible.
4. Resuspender a las células en 100 µL de solución I fría.

Solución I.

Sacarosa 15%
Tris•HCl pH 8.0 25 mM
EDTA10 mM

5. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 µL de solución II fresca. Mezclar por inversión y no usar vortex.

Solución II. (preparar en el momento)

NaOH..... 0.2 N
SDS1.0%

7. Incubar 10 minutos en hielo.
8. Agregar 150µL de solución III fría. Mezclar por inversión e incubar 15 minutos en hielo.

Solución III.

Acetato de potasio 5 M 60 mL

Ácido acético glacial.....11.5 mL

H₂O28.5 mL

9. Centrifugar por 5 minutos.
10. Recuperar el sobrenadante y centrifugar por 5 minutos.
11. Recuperar el sobrenadante y agregar 20 µg/mL de ARNsa I (opcional).
Incubar 20 minutos a 37°C.
12. Agregar un volumen igual de fenol / cloroformo (1:1) saturado con Tris-EDTA. Mezclar vigorosamente. Centrifugar 30 segundos.
13. Recuperar la fase acuosa y agregar 2.5 volúmenes de etanol. Incubar a –70°C por 5 minutos.
14. centrifugar por 5 minutos.
15. Decantar, enjuagar el pellet con etanol al 70%.
16. Secar el pellet y resuspenderlo en 20 µL de agua.

Tras haber comprobado la presencia de ADN plasmídico se procedió a eliminar este de las células portadoras mediante el método descrito a continuación (Hirota, 1960; Inuzuka et al., 1969; Stapler, et al., 1972).

Técnica de eliminación de plásmidos mediante naranja de acridina.

1. Se elabora una solución con naranja de acridina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en agua; se esteriliza en autoclave y se almacena en la oscuridad.
2. Se utiliza un medio que contenga 10g de extracto de levadura y 10g de peptona por litro de agua, en el cual se ajusta el pH con NaOH a 7.6 (el pH es un factor importante).
3. Después se inocula el cultivo que va a ser curado en el medio de cultivo.
4. Se inoculan alrededor de 10^4 células dentro de una serie de tubos que contengan el medio de cultivo y concentraciones de naranja de acridina de 0,10,20,30,...,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
5. Se incuba a 37°C toda la noche, en la oscuridad.
6. Se toma el cultivo que muestre crecimiento a la mayor concentración de naranja de acridina.

Posteriormente, se realizó extracción de ADN plasmídico (utilizando el método anteriormente descrito) de las cepas que sufrieron este tratamiento; y se corrió un gel de agarosa para verificar si fue posible llevar a cabo la eliminación del plásmido. Las cepas curadas fueron inoculadas en agar BHI adicionado con los siguientes antibióticos: Amikacina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Pruebas bioquímicas.

Las cepas que amplificaron en la reacción de PCR fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas para lograr una identificación presuntiva, basándose en la morfología presentada en la tinción de Gram y en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron las siguientes: rojo de metilo, Vogues-Proskauer, catalasa, sulfuro, indol, movilidad, fermentación de carbohidratos (lactosa, maltosa, glucosa, sacarosa), ureasa, citrato, hidrólisis de esculina, hemólisis y susceptibilidad a la bacitracina.

Prueba del rojo de metilo (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó el medio de cultivo (caldo RM/VP) con las cepas de trabajo, estos cultivos fueron incubados a 37°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó en condiciones estériles una alícuota de 3 mL de cada tubo y se transfirieron a tubos vacíos y estériles. A cada uno de dichos tubos se le adicionó 1 mL (5 gotas aproximadamente) de indicador rojo de metilo. El desarrollo de un color rojo en la superficie del medio indicó que el resultado de la prueba fue positivo, puesto que el pH del medio debe de ser menor de 4.4 para que el indicador presente viraje, y se considera que el cambio en la acidez del medio se debe a la producción de ácidos durante el periodo de incubación de las cepas bacterianas.

Prueba de Voges-Proskauer (Mac Faddin, 2003).

Para la prueba de Vogues-Proskauer se inoculó el medio RM/VP con las cepas de trabajo, y estas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Finalizado el periodo de incubación, se añadió a cada tubo 0.6 mL de alfa naftol y posteriormente 0.2 mL de hidróxido de potasio; se agitaron los tubos para poder exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó reposar durante 15 minutos. La presencia de un color rojo tras los 15 minutos de reposo indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína, subproducto de la degradación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta.

Prueba de la catalasa (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó el medio de cultivo (puede ser cualquier medio sólido con excepción del agar sangre) con las cepas a evaluar, sembrando por agotamiento para poder obtener colonias aisladas. Se incuba durante 24 horas a 37°C. Se agrega una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% sobre una colonia aislada. Una rápida efervescencia indica la producción de oxígeno gaseoso por acción de la catalasa, y por lo tanto, una prueba positiva.

Utilización del citrato (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó el medio (agar citrato de Simmons) con las cepas de trabajo, y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación, la presencia de una coloración azul intenso indicó una prueba positiva, y revela que el microorganismo de estudio fue capaz de utilizar el citrato y sales de amonio contenidos en el medio, con la formación de productos básicos.

Utilización de carbohidratos (Camacho, et al., 2006).

Se utilizó como base caldo rojo de fenol, adicionado con uno de los carbohidratos a evaluar (lactosa, maltosa, glucosa, sacarosa). Se adicionó el medio de cultivo a tubos de ensayo que contenían un tubo Durham en su interior. Estos tubos fueron inoculados con las cepas de trabajo, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Un vire en el color del medio (rojo originalmente, amarillo en medio ácido) indicó la utilización del carbohidrato. La presencia de una burbuja de gas dentro del tubo Durham indicó producción de gas a partir del carbohidrato evaluado.

Pruebas del Sulfuro y Movilidad (Camacho, et al., 2006).

Estas pruebas bioquímicas fueron realizadas utilizando el medio SIM, que evalúa las pruebas del sulfuro, movilidad e indol en un solo ensayo; la prueba del indol se realizó por separado para poder apreciarla mejor. El agar SIM se inoculó por picadura en condiciones de asepsia con las cepas de trabajo, y se incubó durante 24 horas a 37°C. La producción de ácido sulfhídrico se detectó al observarse un precipitado negro e insoluble en el fondo del tubo de ensayo. Para la prueba de movilidad; ésta resultó ser negativa en el caso de que solo se observase crecimiento alrededor de la picadura del asa bacteriológica, y se consideró positiva cuando se apreció crecimiento ramificado a partir de la zona donde se inoculó.

Prueba del Indol (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó el medio de cultivo (caldo triptona) con un cultivo de 24 horas de los microorganismos de trabajo; se incubaron los tubos de ensayo durante 24 horas a

37°C. Finalizado este tiempo se agregaron 5 gotas del reactivo de Ehrlich al cultivo, inmediatamente después se agregó 1 mL de cloroformo. La aparición de un color fucsia (p-dimetilaminobenzaldehído) en la interfase del reactivo y del cultivo unos segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol, y esto a su vez indica que el microorganismo es capaz de utilizar el triptofano.

Prueba de la Ureasa (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó el caldo urea con tres asadas de los cultivos de 24 horas de las cepas de trabajo. Se incubaron estos tubos a 37°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se revisaron los tubos, y el vire del indicador por alcalinización del medio indicó un resultado positivo. En caso de no haberse visto vire del indicador se consideró prueba negativa.

Hemólisis (Facklam, 1982).

Se inocularon cajas de petri de agar sangre, con cultivos de 24 horas de las cepas de trabajo. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. La presencia de un halo transparente alrededor del área de crecimiento indica hemólisis; se distinguen tres clases de hemólisis; la beta (hemólisis total de los glóbulos rojos alrededor de la zona de crecimiento), alfa hemólisis (hemólisis parcial de los glóbulos rojos alrededor del crecimiento) y gamma hemólisis (ausencia de hemólisis).

Hidrólisis de Esculina (Facklam, 1991).

Esta prueba se realizó inoculando el agar bilis-esculina con cultivos de 24 horas de las cepas de trabajo. Se incubó a 37°C durante 24 horas. El ennegrecimiento del medio indica una prueba positiva.

Prueba de tolerancia a la sal (Facklam, 1991).

Se crecen las cepas de trabajo en el siguiente medio de cultivo (medio con NaCl al 6.5%), durante 24 horas a 37°C:

Caldo de infusión cerebro corazón	25	g
NaCl	60	g
Indicador (1.6 g de púrpura de bromocresol en 100 mL de etanol)	1	g

Un vire del indicador (purpura, originalmente, amarillo en pH ácido) indica que el microorganismo es resistente a la sal.

Susceptibilidad a la bacitracina (Facklam, 1991).

Se inoculó agar adicionado con sangre de oveja al 5% con un cultivo puro del microorganismo en estudio, sembrando por extensión. Se utilizó un disco de papel con 0.04 U de bacitracina en el centro de la caja petri. Se incubaron las cajas petri durante 24 horas a 37°C. En caso de presentarse una zona de inhibición del crecimiento el microorganismo se consideró que el microorganismo fue sensible a la bacitracina; en caso de no presentarse halo de inhibición se consideró que el microorganismo fue resistente.

The image features a large, abstract graphic composed of numerous thin, parallel black lines. These lines are arranged to form a large 'X' shape that spans the entire page. The lines are most densely packed at the center of the 'X' and become more sparse towards the corners. The overall effect is a sense of depth and movement, as if the lines are converging and diverging from a central point.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS.

A continuación se muestran las claves utilizadas en este estudio, utilizadas para denominar la procedencia de las muestras y los medios de cultivo utilizados para aislarlas:

- RM. (*muestra*) Carne molida de res comprada en mercado.
- RT. (*muestra*) Carne molida de res comprada en tianguis.
- MRS. (*muestra*) Carne molida de res comprada en supermercado (Superama).
- MRW. (*muestra*) Carne molida de res comprada en supermercado (Wal-Mart).

- TSA. (*medio de cultivo*) Agar soya-tripticasa.
- MEN. (*medio de cultivo*) Agar para enterococos.
- MCK. (*medio de cultivo*) Agar Mac Conkey.
- Heck. (*medio de cultivo*) Agar Hecktoen.
- CPS2. (*medio de cultivo*) Agar CPS2 (*Biomerux*).

En la tabla 6, que a continuación se muestra, se presentan los resultados del aislamiento realizado; se muestran las colonias que crecieron favorablemente en los medios utilizados después de haber realizado el preenriquecimiento en medio BHI.

Clave	Medio	Número de colonias	Número de colonias por muestra
RT	TSA	24	68
RT	MEN	24	
RT	CPS2	20	
RT	MCK	0	
RT	Heck	0	
RM	MCK	23	68
RM	Heck	14	
RM	TSA	25	
RM	MEN	0	
RM	CPS2	6	
MRS	TSA	23	60
MRS	MCK	17	
MRS	CPS2	20	
MRS	MEN	0	
MRS	Heck	0	
MRW	CPS2	23	72
MRW	TSA	24	
MRW	MCK	25	
MRW	MEN	0	
MRW	Heck	0	
TOTAL	268	colonias aisladas de carne de res	

Tabla 6 . Resultados del aislamiento. Se muestra el número de colonias totales para cada muestra utilizada: RT (carne molida de res comprada en tianguis), RM (carne molida de res comprada en tianguis), MRS (carne molida de res comprada en Superama), MRW (carne molida de res comprada en Wal-Mart).

Número de cepas procedentes de muestras de supermercado
132
Número de cepas procedentes de muestras de tianguis
68
Número de cepas procedentes de muestras de mercado
68

Tabla 7. Cantidad total de cepas de acuerdo al origen de la muestra. En el rubro supermercado se agrupan aquellas cepas aisladas de las muestras MRS y MRW (carne molida de res comprada en Superama, MRS, y carne molida de res comprada en Wal-Mart, MRW).

En la tabla 8, se muestran los resultados obtenidos después de haber realizado la prueba de sensibilidad a antibióticos en el medio simultáneamente contenía los siguientes antibióticos : Amikacina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Clave de Procedencia	Medio de cultivo de procedencia.	Número de colonias.	Número de colonias resistentes por muestra
RT	TSA	4	20
RT	MEN	15	
RT	CPS2	1	
RT	MCK	0	
RT	Heck	0	
RM	MCK	12	27
RM	Heck	0	
RM	TSA	15	
RM	MEN	0	
RM	CPS2	2	
MRS	TSA	8	28
MRS	MCK	9	
MRS	CPS2	11	
MRS	MEN	0	
MRS	Heck	0	
MRW	CPS2	22	49
MRW	TSA	16	
MRW	MCK	11	
MRW	MEN	0	
MRW	Heck	0	
Total	126	Cepas resistentes aisladas de carne de res	
% de resistencia		47.01	

Tabla 8. Resultados de la primer prueba de sensibilidad a antibióticos. Se utilizó medio Luria que contenía Amikacina (64 µg/mL), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32µg/mL).

De las cepas que fueron capaces de crecer en el medio de cultivo que incluía los antibióticos Amikacina (64 µg/mL), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32µg/mL) fueron seleccionadas las que se muestran en la tabla 9, de acuerdo a la muestra de procedencia y su capacidad de crecimiento en el medio.

Cepa	GRAM	Medio y muestra de origen
R2	Cocos G + en cadenas	RM TSA
R3	Cocos G + en cadenas	MRS TSA
R4	Cocos G + en cadenas	MRW TSA
R5	Cocos G + en cadenas	MRS CPS2
R7	Cocos G + en cadenas	MRW TSA
R9	Cocos G + en cadenas	MRS CPS2
R11	Cocos G + en cadenas	MRS MCK
R25	Cocos G + dispersos	MRW TSA
R26	Cocos G + en cadenas	MRS TSA
R30	Cocos G + dispersos	MRS TSA
R32	Cocos G + en cadenas	MRW CPS2
R34	Cocos G + en pares	MRW CPS2
R36	Cocos G + en cadenas	RM TSA
R37	Cocos G + en pares	RM TSA
R38	Cocos G + en racimos	RM TSA
R98	Cocos G + en racimos	RT TSA
R99	Cocos G + en racimos	RT TSA

Tabla 9. Cepas seleccionadas para la prueba de sensibilidad a antibióticos; se incluye la clave de la muestra y del medio del que fue aislada.

En la siguiente página se muestran los resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos realizada con multidiscos. Cabe mencionar que se determinó si una cepa era resistente o sensible de acuerdo al diámetro del halo de inhibición que se presentaba; si éste era mayor a 14 mm (en promedio, el diámetro varía dependiendo del antibiótico usado), entonces se consideraba que la cepa era sensible a ese antibiótico.

Antibiótico														
Cepa	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	E	GE	PEF	PE	TE	SXT	AK	TOTAL
R2	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	6
R3	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	6
R4	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	7
R5	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	10
R7	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	8
R9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	9
R25	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	6
R26	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	7
R32	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	9
R34	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	9
R36	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	9
R37	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	8
R38	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	8
R98	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	9
R99	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	9

Tabla 10. Resultados de las pruebas de sensibilidad a antibióticos usando multidiscos. Las muestras resistentes se indican con R, mientras las que fueron sensibles se indican con S. Claves: AM – Ampicilina, AK – Amikacina, CF – Cefalotina, CTX Cefotaxima, CAZ Caeftazidima, CXM Cefuroxima, DC Dicloxacilina, E Eritromicina, GE Gentamicina, PEF Pefloxacina, PE Penicilina, TE Tetraciclina, SXT Trimeptoprim-sulfametoxazol.

Porcentaje de Resistencia a Diferentes antibióticos

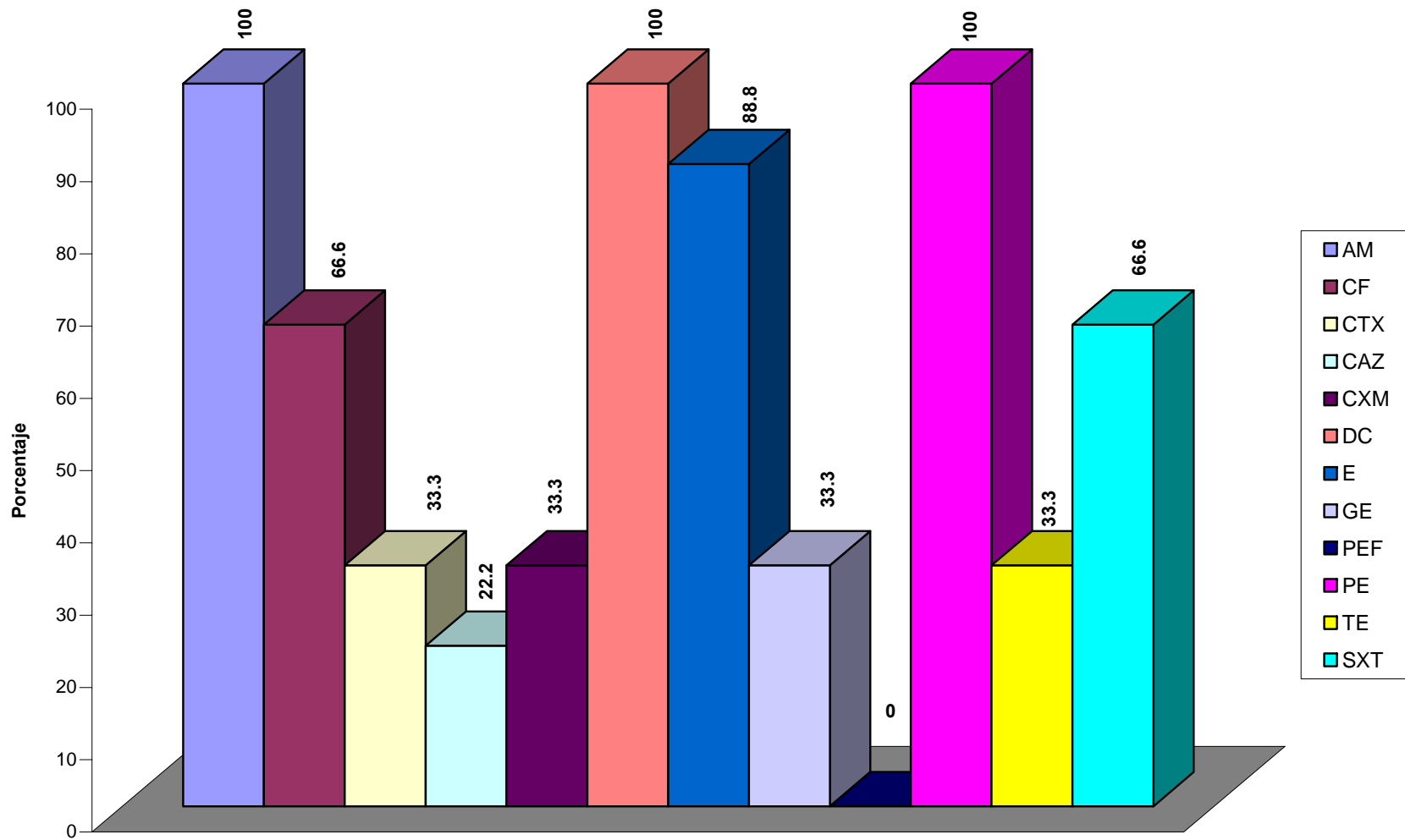


Gráfico 1. Porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos evaluados. Claves: AM – Ampicilina, AK – Amikacina, CF – Cefalotina, CTX Cefotaxima, CAZ Caeftazidima, CXM Cefuroxima, DC Dicloxacilina, E Eritromicina, GE Gentamicina, PEF Pefloxacina, PE Penicilina, TE Tetraciclina, SXT Trimeptoprim-sulfametoxazol.

En la tabla 11 se muestran las cepas que fueron seleccionadas (utilizando como criterio el número de antibióticos a los que fueron resistentes) para realizar extracción de ADN total y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a cada una de ellas, con el objetivo de constatar la posible presencia del integrón clase I en su ADN.

Cepa	Medio de procedencia	Procedencia	Gram
R2	TSA	Mercado	Cocos G + en cadenas
R3	TSA	Superama	Cocos G + en cadenas
R4	TSA	Wal-Mart	Cocos G + en cadenas
R5	CPS2	Superama	Cocos G + en cadenas
R7	TSA	Wal-Mart	Cocos G + en cadenas
R9	CPS2	Superama	Cocos G + en cadenas
R25	TSA	Wal-Mart	Cocos G + en cadenas
R26	TSA	Superama	Cocos G + dispersos
R32	CPS2	Wal-Mart	Cocos G + en cadenas
R34	CPS2	Wal-Mart	Cocos G + dispersos
R36	TSA	Mercado	Cocos G + en cadenas
R37	TSA	Mercado	Cocos G + en pares
R38	TSA	Mercado	Cocos G + en cadenas
R98	TSA	Tianguis	Cocos G + en pares
R99	TSA	Tianguis	Cocos G + en cadenas

Tabla 11. Cepas que se utilizaron para comprobar la presencia del integrón 1, mediante i)Extracción de ADN total y ii)Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas cepas fueron seleccionadas por el número de antibióticos a las que fueron resistentes (lo cual se puede ver en la Tabla 8). Todas estas cepas mostraron secuencias de ADN amplificado al realizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las cepas mencionadas en la tabla 11 produjeron secuencias amplificadas, dando como resultado múltiples bandas, como se puede ver en las figuras que a continuación se presentan.

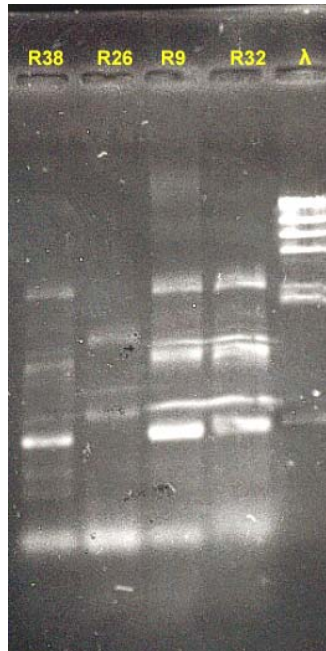


Figura 8. Fotografía de uno de los geles de agarosa al 1% realizados con los productos de PCR. Se muestra el producto para la cepa R38 en el carril 1; en el carril 2 la cepa R26, en el carril 3 la cepa R9, en el carril 4 la cepa R32, y en el carril 5 se tiene el marcador de peso moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III marca Sigma).

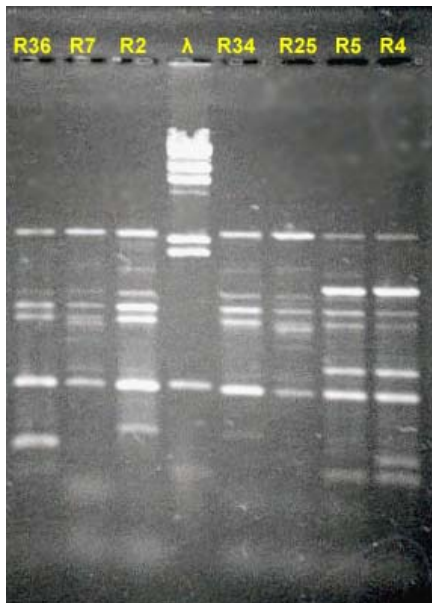


Figura 9. Fotografía de uno de los geles de agarosa al 1% realizados con los productos de PCR. Se muestra el producto para la cepa R36 en el carril 1; en el carril 2 la cepa R7, en el carril 3 la cepa R2, en el carril 4 se tiene el marcador de peso moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III marca Sigma); carril 5 cepa R34; carril 6 cepa R25; carril 7 cepa R5 y carril 8 cepa R4.



Figura 10. Fotografía de uno de los geles agarosa al 1% realizados con los productos de PCR. Se muestra el producto para la cepa R98 en el carril 1; en el carril 2 la cepa R99, en el carril 3 la cepa R37, en el carril 4 la cepa R3, y en el carril 5 se tiene el marcador de peso moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III marca Sigma).

En el gel de PCR que se muestra en la figura 8, se pueden apreciar diferentes fragmentos amplificados; en la tabla 12 se muestra la distancia recorrida por los marcadores de peso molecular que fueron seleccionados para obtener la gráfica de regresión (se eliminaron algunos puntos para lograr tener un mejor coeficiente de correlación lineal), el peso molecular de los marcadores de peso molecular (en Kbp), y el logaritmo de los pesos moleculares de los marcadores, esto para lograr una nueva gráfica de regresión, que arrojará un mejor coeficiente de correlación lineal.

Distancia (mm)	(PM Kbp)	LOG PM
48	6.7	0.8260748
52	4.4	0.64345268
62	2.3	0.36172784
65	2	0.30103
100	0.56	-0.25181197

Tabla 12. Distancia recorrida por los marcadores de peso molecular, para el gel mostrado en la figura 8, así como el valor de logaritmo de estos.

Graficando los valores mostrados en la tabla 12, se obtienen los gráficos 2 y 3:

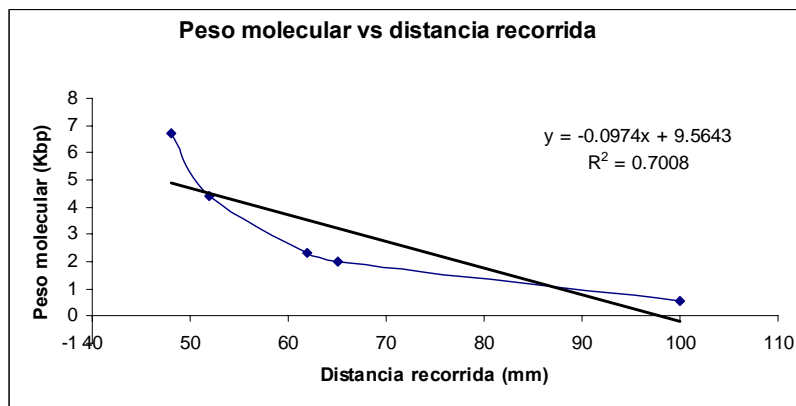


Gráfico 2. Peso molecular de los marcadores de peso molecular contra distancia recorrida, para el gel mostrado en la figura 8.

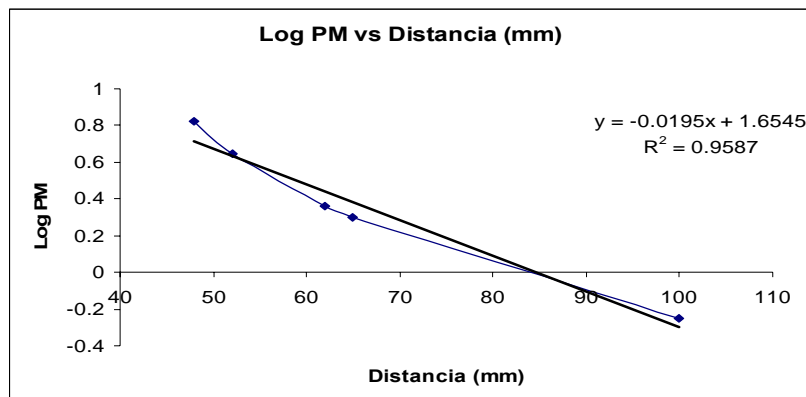


Gráfico 3. Logaritmo del peso molecular de los marcadores contra distancia recorrida, para el gel mostrado en la figura 8.

Como se puede ver en los gráficos 2 y 3; el mejor coeficiente de correlación lineal es el obtenido a partir de la gráfica 3; por lo que la ecuación de regresión que se utilizó para calcular el peso de los fragmentos fue:

$$\text{Log PM} = -0.0195x + 1.6545 \quad (\text{ec. 1})$$

Donde x = distancia recorrida, en mm.

En la Tabla 13 se muestran las distancias recorridas por los fragmentos amplificados, y el valor de su peso molecular, de acuerdo a la (ec 1).

Distancia (mm)	PM (Kbp)
60	3.05140603
75	1.55596563
79	1.30016958
90	0.79341426
94	0.66297935
100	0.50640735

Tabla 13. Distancia recorrida por los fragmentos amplificados en el gel de PCR mostrado en la figura 8 y su peso molecular calculado con la ec. 1.

A continuación se muestra el gel de PCR de la figura 8 con los pesos moleculares correspondientes a los fragmentos amplificados.

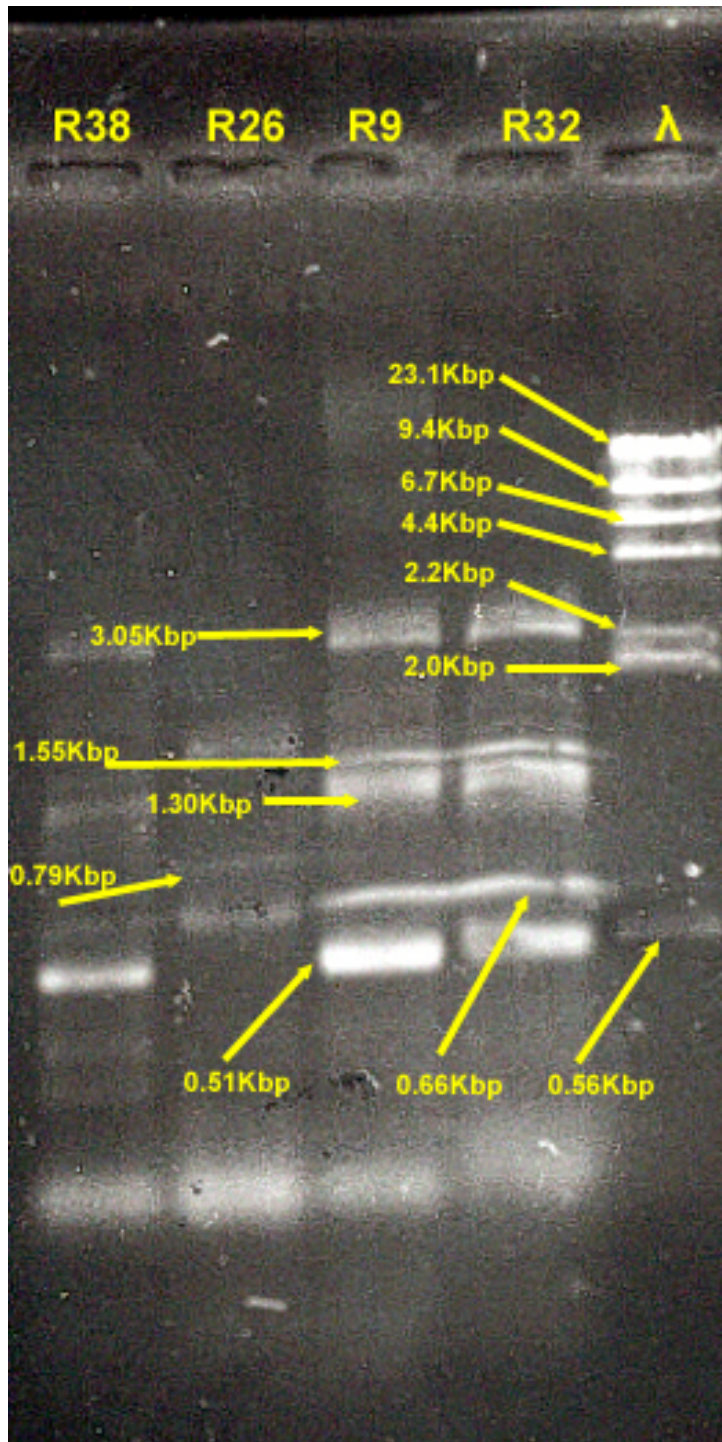


Figura 11. Gel de agarosa al 1% ,donde se muestran los productos de la reacción de PCR para la cepa R38 en el carril 1; en el carril 2, la cepa R26, en el carril 3, la cepa R9, en el carril 4, la cepa R32 y en el carril 5, se tiene el marcador de pesos moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III marca Sigma); el cual presenta fragmentos con los siguientes pesos moleculares: 23.1, 9.4, 6.7, 4.4, 2.2, 2.0 y 0.56 Kbp. Se muestran también los pesos de los fragmentos amplificados. Se puede observar que todas las cepas evaluadas presentaron secuencias amplificadas por la PCR.

En la tabla 14 se muestra la distancia recorrida por los marcadores de peso molecular que fueron seleccionados para obtener la gráfica de regresión correspondientes al gel de PCR mostrado en la figura 9; el peso molecular de los marcadores de peso molecular (en Kbp), y el logaritmo de los pesos moleculares de los marcadores.

Distancia (mm)	(PM Kbp)	Log PM
26	9.4	0.97312785
28	6.7	0.8260748
31	4.4	0.64345268
42	2.3	0.36172784
45	2	0.30103
76	0.56	-0.25181197

Tabla 14. Distancia recorrida por los marcadores de peso molecular, así como el valor de logaritmo de estos, para el gel mostrado en la figura 9.

Graficando los valores mostrados en la tabla 14, se obtienen los gráficos 4 y 5:

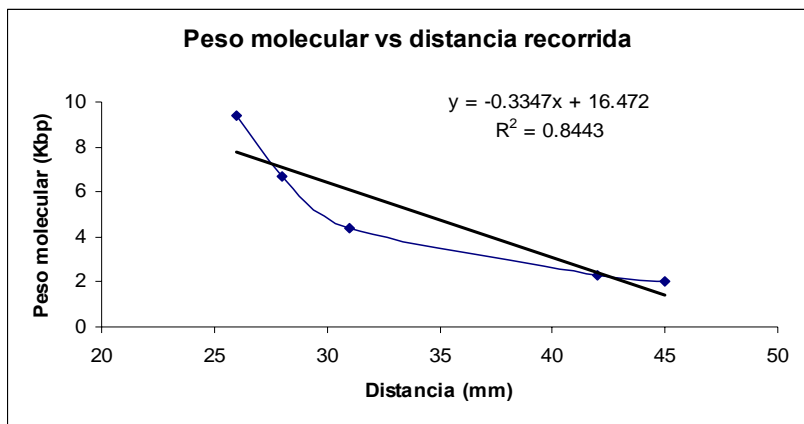
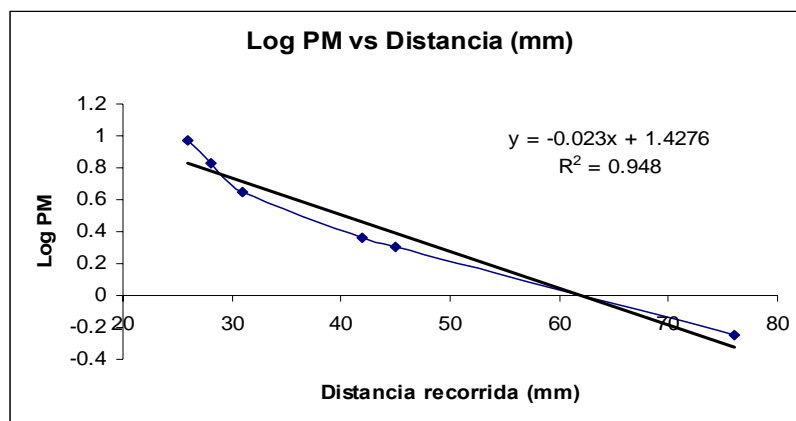


Gráfico 4. Peso molecular de los marcadores de peso molecular contra distancia recorrida, para el gel mostrado en la figura 9.



$$\text{Log PM} = -0.023x + 1.4276 \text{ (ec. 2)}$$

Donde x = distancia recorrida, en mm.

En la Tabla 15 se muestran las distancias recorridas por los fragmentos amplificados, y el valor de su peso molecular, de acuerdo a la (ec 2).

Distancia (mm)	PM (Kbp)
41	3.05210872
43	2.74536441
50	1.89495979
54	1.5332042
58	1.24050923
61	1.05827857
76	0.47818946

Tabla 15. Distancia recorrida por los fragmentos amplificados en el gel de PCR mostrado en la figura 9 y su peso molecular calculado con la ec. 2.

En la figura 12 se muestra el gel de PCR de la figura 9 con los pesos moleculares correspondientes a los fragmentos amplificados.

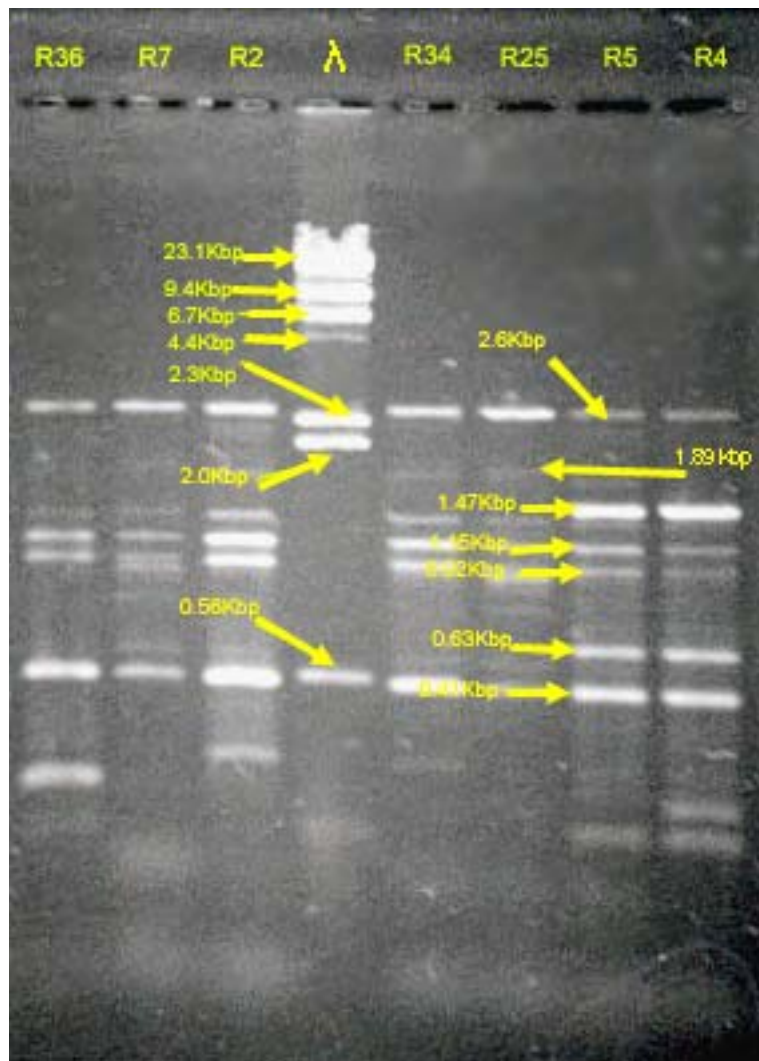


Figura 12. Fotografía de uno de los geles agarosa al 1% realizados con los productos de PCR. Se muestra el producto para la cepa R36 en el carril 1; en el carril 2 la cepa R7, en el carril 3 la cepa R2, en el carril 4 se tiene el marcador de pesos moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III); carril 5 cepa R34; carril 6 cepa R25; carril 7 cepa R5; carril 8 cepa R4. Se muestran también los pesos (en kilo pares de bases) de los fragmentos, tanto de los productos de PCR como de el marcador de peso molecular. Se puede apreciar que todas las cepas evaluadas presentaron secuencias amplificadas por la reacción de PCR.

En la tabla 16 se muestra la distancia recorrida por los marcadores de peso molecular que fueron seleccionados para obtener la gráfica de regresión correspondientes al gel de PCR mostrado en la figura 10; el peso molecular de los marcadores de peso molecular (en Kbp), y el logaritmo de los pesos moleculares de los marcadores.

Distancia (mm)	(PM Kbp)	Log PM
32	9.4	0.97312785
37	6.7	0.8260748
40	4.4	0.64345268
49	2.3	0.36172784
53	2	0.30103
81	0.56	-0.25181197

Tabla 16. Distancia recorrida por los marcadores de peso molecular, así como el valor de logaritmo de estos, para el gel mostrado en la figura 10.

Graficando los valores mostrados en la tabla 16, se obtienen los gráficos 6 y 7:

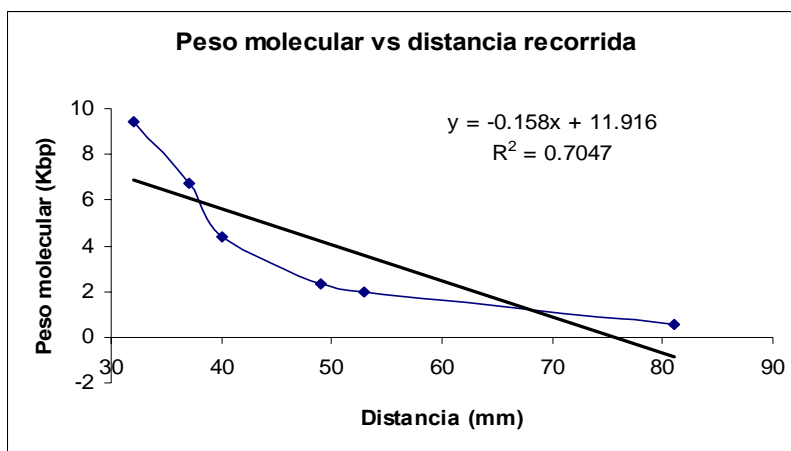


Gráfico 6. Peso molecular de los marcadores de peso molecular contra distancia recorrida, para el gel mostrado en la figura 10.

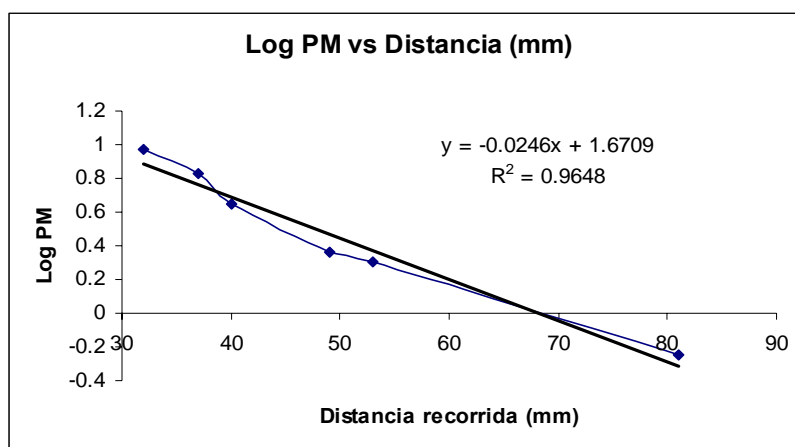


Gráfico 7. Logaritmo del peso molecular de los marcadores contra distancia recorrida, para el gel mostrado en la figura 10.

El mejor coeficiente de correlación lineal se obtuvo a partir de la gráfica 7; por lo que la ecuación de regresión que se utilizó para calcular el peso de los fragmentos mostrados en el PCR de la figura 10 fue:

$$\text{Log PM} = -0.0195x + 1.6545 \quad (\text{ec. 3})$$

Donde x = distancia recorrida, en mm.

En la Tabla 17 se muestran las distancias recorridas por los fragmentos amplificados, y el valor de su peso molecular, de acuerdo a la (ec 3).

Distancia (mm)	PM
60	3.05140603
75	1.55596563
79	1.30016958
90	0.79341426
94	0.66297935
100	0.50640735

Tabla 17. Distancia recorrida por los fragmentos amplificados en el gel de PCR mostrado en la figura 10 y su peso molecular calculado con la ec. 3.

En la figura 13 se muestra el gel de PCR de la figura 10 con los pesos moleculares correspondientes a los fragmentos amplificados.

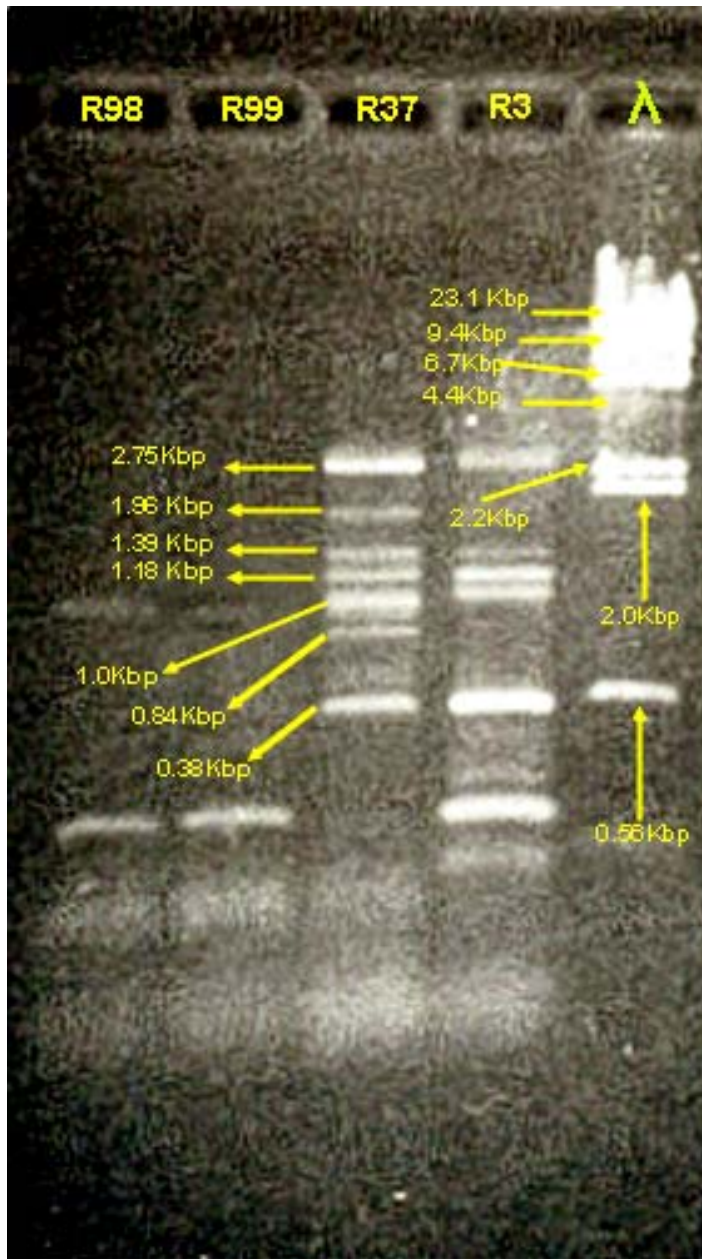


Figura 13. Fotografía de uno de los gels agarosa al 1% realizados, donde se muestra el producto de la reacción en cadena de la polimerasa para la cepa R98 en el carril 1; carril 2 la cepa R99, carril 3 la cepa R37, carril R3; se muestra también el marcador de pesos moleculares, así como también los pesos (en kilo pares de bases) de los fragmentos, tanto de los productos de PCR como de el marcador de peso molecular. Se puede observar que las cuatro cepas presentaron secuencias amplificadas.

Se extrajeron ADN plasmídico de las siguientes cepas: R37, R2, R25, R36, R4, R99, R98, R38 y R5. Se pudo observar que las cepas R37, R2, R25, R7, R4, R5, R99 y R38 presentaron un plásmido de alto peso molecular (figura 14).

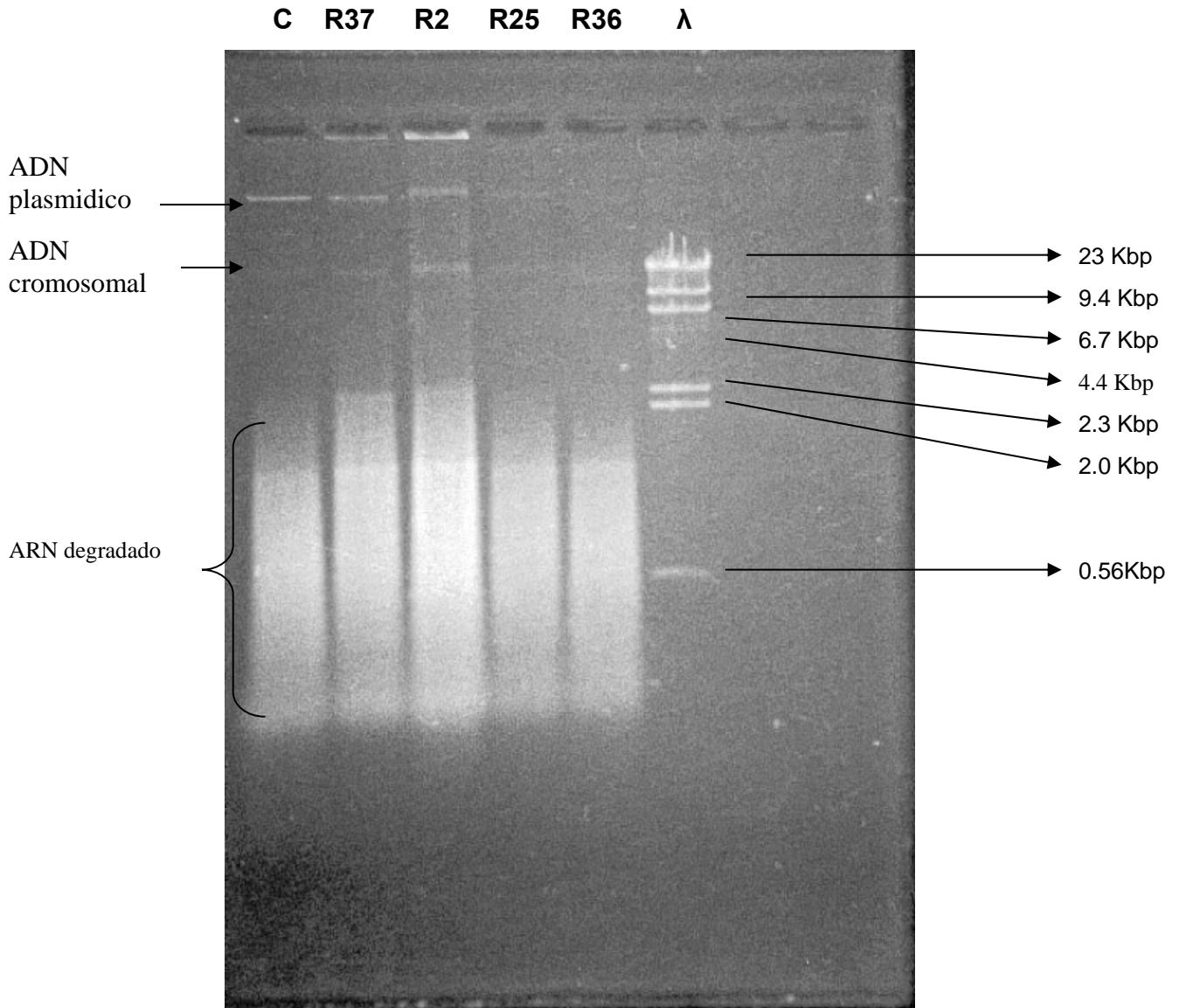


Figura 14. Gel de agarosa al 1%, con ADN plasmídico. En el carril 1 se tiene el ADN de *E. coli* cepa 49766 (ésta presenta un plásmido de alto peso molecular, de aproximadamente 40 Kbp), Carril 2, cepa R37, carril 3, cepa R2, carril 4, cepa R25, carril 5, cepa R36, carril 6, marcador de peso moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III). El ADN plasmídico se distingue por su alto peso molecular, por lo que generalmente aparece por arriba de los 23.1 Kbp; el ADN cromosómico aparece aproximadamente a 23 Kbp; lo que se ve debajo de éste es fundamentalmente ARN degradado.

En la figura 15 podemos ver el resultado de la eliminación del plásmido que se realizó con las cepas R25, R37 y R7. Las tres cepas curadas del plásmido crecieron sin problemas en el medio adicionado con tres antibióticos: Amikacina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

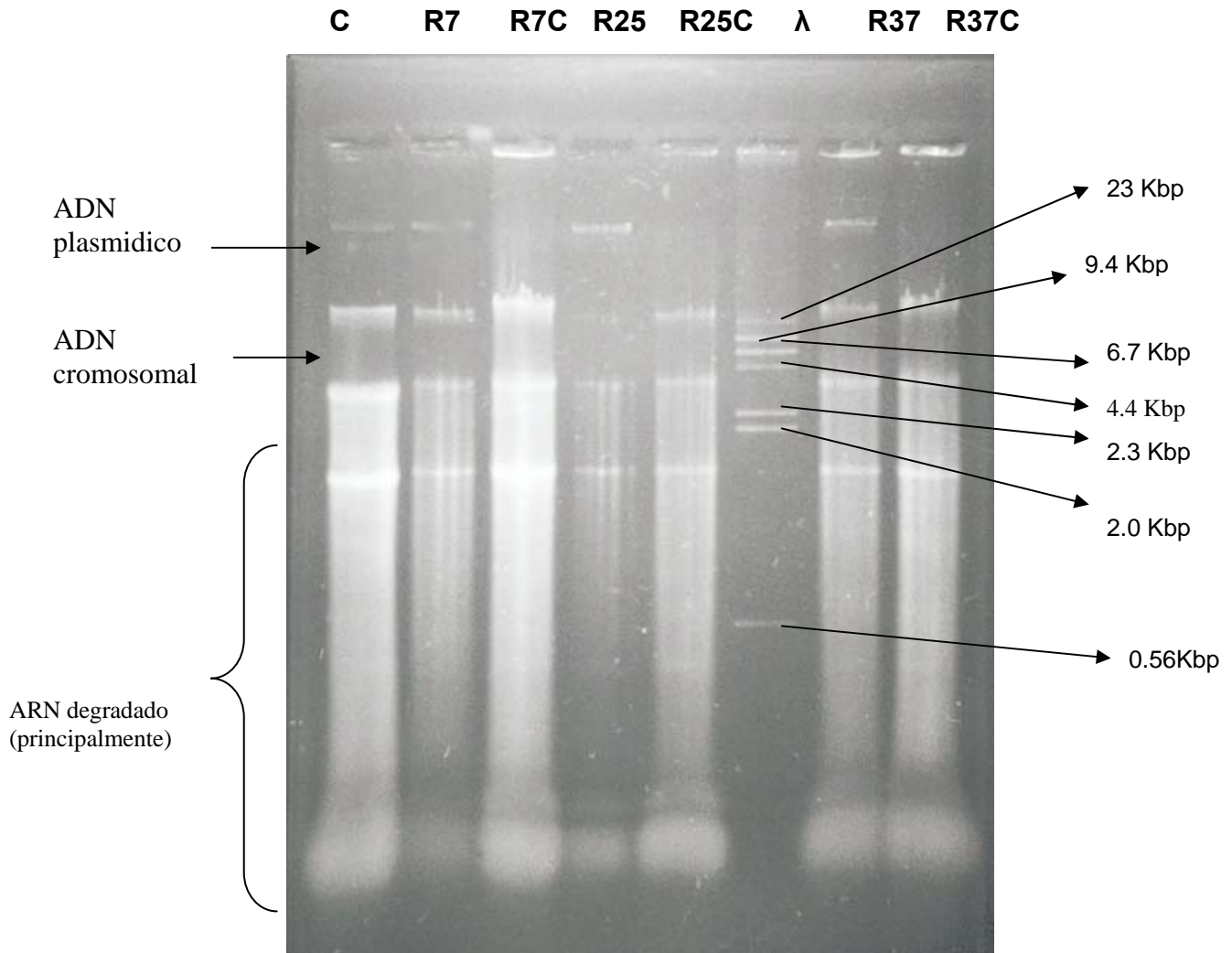


Figura 15. Gel de agarosa al 1% , con ADN plasmídico. En el carril 1 se muestra el ADN de E. coli cepa 49766 (esta presenta un plásmido de alto peso molecular), Carril 2 cepa R7, carril 3 cepa R7 curada, carril 4 cepa R25, carril 5 cepa R25 curada, carril 6 marcador de peso moleculares (ADN del fago lambda cortado con Hind III), carril 7 cepa R37, carril 8 cepa R37 curada. El ADN plasmídico se distingue por su alto peso molecular, por lo que generalmente aparece por arriba de los 23.1 Kbp; el ADN cromosómico aparece aproximadamente a 23 Kbp, lo que se ve debajo de éste es principalmente ARN degradado.

Pruebas de identificación bioquímica.

Las pruebas bioquímicas para identificar presuntivamente el género de las cepas con las que se trabajó arrojaron los resultados que se muestran a continuación.

Tinción de Gram.

Cepa	Gram
R2	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R3	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R4	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R5	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R7	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R9	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R25	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R26	Cocos G + dispersos
R32	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R34	Cocos G + dispersos
R36	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R37	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R38	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)
R98	Cocos G + en pares
R99	Cocos G + en cadenas (Estreptococos)

Tabla 18. Resultados obtenidos al realizar la tinción de Gram a las cepas de trabajo.

Cepa	Rojo de metilo	VP	Citrato	Lactosa	Maltosa	Glucosa	Sacarosa	Sulfuro	Indol	Movilidad	Ureasa	Hemólisis	NaCl 6.5%	Bacitracina	Catalasa	Esculina
R2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R5	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R7	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R9	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
R25	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R26	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R32	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R34	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
R36	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
R37	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R38	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R98	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R99	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 19. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para lograr la identificación presuntiva de las cepas de trabajo



***V. ANALISIS DE
RESULTADOS.***

Análisis de resultados.

Como se puede ver en la Tabla 6, se logró aislar un número similar de cepas a partir de las diferentes muestras de carne de res, procedentes de diferentes puntos de venta. Puede verse que el número de colonias aisladas no presentó grandes variaciones de acuerdo al sitio en del que fueron aisladas. Es importante mencionar que, independientemente de cual haya sido el número de colonias aisladas de cada muestra, ésto no es un parámetro que pueda considerarse como un indicador de la carga microbiana en el alimento, puesto que se llevó a cabo un preenriquecimiento previo al aislamiento.

En la Tabla 8 se puede ver el porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos utilizados para seleccionar a las cepas con que se trabajaría (medio Luria, adicionado con amikacina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (10 U/mL) y ampicilina (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En total, el 47 % de las cepas aisladas inicialmente resultó ser resistente a los tres antibióticos evaluados. Se prefirió utilizar el medio con los tres antibióticos puesto que ésto crearía una mayor presión selectiva, y nos permitiría tener una mayor probabilidad de aislar bacterias multirresistentes a antibióticos, portadoras del integrón I, puesto que se ha reportado previamente que existe una relación entre la multirresistencia a antimicrobianos y la presencia del integrón I (White et al., 2001; González et al., 2004; Nandi et al., 2004). Debe entenderse el hecho de que los ecosistemas microbianos están interconectados entre sí, ya que no deben considerarse necesariamente distintos a los organismos que se

encuentran en el tracto intestinal de los animales para consumo humano y el de los propios humanos. El consumo de alimentos es la vía más importante de entrada para las bacterias al ser humano y, por lo tanto, la presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en alimentos es un importante problema de salud pública (Schroeder et al., 2004).

Estudios llevados a cabo previamente por otros autores (White et al., 2001; Yücel et al., 2005) arrojaron resultados similares: en el estudio llevado a cabo por White, et al., a partir de muestras de carne de res, pollo, pavo y cerdo obtenidas en supermercados del área de Washington, D.C. se logró aislar un total de 200 cepas, de las cuales el 57% resultó resistente a por lo menos tres antibióticos distintos. En el caso del estudio realizado por Yücel y colaboradores, 79 cepas de *Listeria spp.* fueron aisladas a partir de carne de res; de las cuales el 100% resultó ser resistente a dos antibióticos; cefalotina y ácido nalixídico, 66% fue resistente al trimetoprim-sulfametoxazol (Yücel et al., 2005). En ambos casos se puede observar el alto porcentaje de cepas resistentes a varios antibióticos; al igual que en este estudio, donde se obtuvo un 47.01% de cepas resistentes a por lo menos tres antibióticos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó un reporte en 2002 donde se recomendaba no utilizar como promotores del crecimiento agentes antimicrobianos utilizados para fines terapéuticos en humanos. En el caso de Dinamarca, la avoparcina fue prohibida para este fin en 1995, y se observó una reducción del 60% a menos del 5% del número de cepas resistentes a este

antibiótico en solo 5 años de que se comenzó a aplicar la prohibición, mientras que la resistencia a virginamicina disminuyó de 65% al 30% (Aarestrup, et al., 2001). En ausencia del antibiótico, la resistencia a éste tiene mayor probabilidad de reducirse, o incluso, desaparecer, ya que aunque existan cepas que contengan genes de resistencia éstas tienden a ser reemplazadas por cepas susceptibles (Phillips, et al., 2004). Salyers y colaboradores, en 1997 reportaron que en un estudio realizado analizando los patrones de resistencia a antibióticos en heces fecales de niños mexicanos de ambientes rurales y urbanos se observaba que aquellas cepas aisladas de ambientes urbanos presentaban mayor resistencia a antibióticos, y en el caso de las cepas aisladas de ambientes rurales también se presentaba resistencia, pero sólo a aquellos medicamentos que también se utilizaban para fines agrícolas (Salyers, et al., 1997). Como ejemplo de esto, se tiene al transposón denominado *Tn21* el cual contiene un integrón de clase 1 (*In2*) y el operón *mer*, que codifica a la enzima encargada de eliminar los iones de mercurio tóxicos para la célula; *In2* está localizado entre el operón *mer* y el sistema de transposición, dicho integrón contiene el cassette genético *aadA* que confiere resistencia a la estreptomina (Carattoli, 2001).

Incluso en ausencia de presión selectiva, los genes que confieren resistencia a antibióticos, así como sus respectivos mecanismos de transmisión prevalecen: un estudio llevado en el Reino Unido en 2006 (Hoyle et al., 2006) detectó un 40.7% de cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina, aisladas a partir de muestras fecales de distintos animales de una granja *orgánica*, en donde no se utilizaron fármacos como promotores de crecimiento; el 4.9% del total de las cepas aisladas presentó

un integrón de clase I; por lo que se pudo concluir que a pesar de que no exista presión selectiva en el medio ambiente microorganismos como los que fueron aislados en el estudio actúan como reservorios de genes de resistencia a antibióticos capaces de ser transferidos a organismos patógenos (Hoyle, et al., 2006). Esto se debe a que en muchos casos la persistencia de los genes responsables de causar la resistencia a antibióticos no solo depende de la presencia del antibiótico en el medio ambiente, sino de otros factores, que no tienen relación significativa con el uso de los antibióticos. Los integrones resultan ser un buen ejemplo de ese fenómeno, ya que además de contener *cassettes* genéticos en su región variable, presentan algunas veces genes que confieren resistencia a los metales pesados. Por lo tanto, la contaminación ambiental por metales pesados, como el mercurio de las amalgamas dentales por citar un ejemplo, podría proveer la presión selectiva para mantener a los elementos genéticos portadores de la resistencia a estos metales y a antibióticos. Si estos estuviesen presentes en el mismo elemento genético transferible (integrón, plásmido, transposón) los genes causantes de la resistencia a antibióticos se mantendrían a pesar de la ausencia de la presión selectiva ejercida por dichos fármacos (Salyers et al., 1997).

La presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en las diferentes muestras de carne que se trabajaron en este estudio nos indica que éstas muy posiblemente tienen origen en el animal. Podemos descartar que tengan su origen en algún ser humano portador de estas bacterias, ya que i) se trató de muestras compradas en cuatro diferentes puntos de venta, y ii) no existe una presión selectiva en los

humanos tan fuerte como en el caso de los animales. Se podría entonces rastrear la contaminación al momento del sacrificio del animal, y este puede ocurrir por un mal manejo de la carne (por ejemplo, si algún fragmento de intestino del animal llegase a romperse, este, al tener contacto con el lugar donde se lleve a cabo el corte de las piezas, por ejemplo, contaminaría la carne del animal con bacterias multiresistentes).

Hay evidencia experimental (Sánchez et al., 1996) de que existe presión selectiva en los rastros, al haberse encontrado residuos de antibióticos en estos lugares,. Estos residuos tienen su origen en el animal y contribuyen a conservar la presión selectiva que existe sobre las bacterias presentes en la flora del animal. Las bacterias multiresistentes presentes en rastros pueden transferir por diferentes mecanismos resistencia a uno o varios antibióticos a otras bacterias, incluso entre géneros filogenéticamente distantes, como es el caso entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Courvalin, 1994, Salyers et al., 1997).

El solo hecho de haber podido aislar cepas multiresistentes a partir de las muestras de carne de res es un indicador de que dichas cepas poseen elementos genéticos (que bien pueden ser elementos genéticos propios del microorganismo o bien elementos adquiridos como integrones, plásmidos, transposones, o incluso una combinación de los anteriores) que les permiten sobrevivir bajo la presión selectiva ejercida por los antibióticos. La resistencia a los dos grupos de antibióticos evaluados en esta parte del estudio (puesto que la penicilina y la

ampicilina pertenecen al grupo de los beta-lactámicos, mientras que la amikacina es un aminoglucósido) puede deberse al uso de antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, ya que las familias de antibióticos más utilizadas para este fin son los beta-lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, y sulfonamidas (McDermott et al., 2002).

A pesar de que se siguen descubriendo nuevos antibióticos, la mayoría de los que se han introducido al mercado en los últimos 40 años son solo pequeñas variantes químicas de los principales antibióticos, para los cuales ya existen mecanismos de resistencia. De hecho, sólo se ha introducido una familia de antibióticos totalmente nueva, las oxazolidinonas (Lipsitch et al., 2002). A pesar de que el uso de antibióticos en humanos representa un mecanismo de presión selectiva para promover la aparición de microorganismos multirresistentes; el uso en animales está mucho más extendido que en humanos: más de la mitad de los antibióticos que se producen en Estados Unidos se utilizan para este fin, y esta tendencia se puede observar en la gran mayoría de los países del mundo (Lipsitch et al., 2002).

Cerca del 90% de los antibióticos que se utilizan en la industria agropecuaria son utilizados como agentes promotores del crecimiento; y las dosis que se utilizan para este fin han aumentado desde que se comenzaron a utilizar para este fin, de 5-10 ppm en la década de 1950 a 50-200 ppm en la actualidad (Khachatourians, 1998). Desafortunadamente, la regulación del uso agropecuario de antibióticos en a nivel mundial esta fuertemente influenciada por las grandes compañías farmacéuticas, las cuales se enfocan a promover la idea de que el uso de los

antibióticos en la alimentación animal es un problema difícil de cuantificar con precisión (Lipsitch, et al., 2002).

Las cepas seleccionadas mencionadas en la tabla 9 resultaron ser, como se puede ver en la tabla 10, resistentes a por lo menos 6 antibióticos y, como máximo, se observó una cepa (R5) resistente a 10 antibióticos; se observó en total un promedio de 7.9 antibióticos para las cepas seleccionadas. Estos resultados nos indican que es muy probable que los mecanismos por los cuales se inactivan a los agentes antimicrobianos evaluados provengan de un intercambio genético ocurrido entre bacterias resistentes y bacterias sensibles al antibiótico, capaces de obtener nuevos genes que le puedan conferir resistencia a dichos fármacos, puesto que es poco probable que las cepas con que se trabajó presentaran intrínsecamente resistencia a dicho número de agentes antimicrobianos.

Correlacionando los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos con los resultados mostrados en la tabla 10, podemos ver que el 100% de las cepas que se probaron con los multidiscos, y que fueron resistentes a por lo menos 6 agentes antimicrobianos, produjeron una reacción positiva. Podemos ver en las figuras 11,12 y 13 que todas las reacciones de PCR llevadas a cabo produjeron varios fragmentos de diferentes pesos moleculares; ésto indica que las cepas son portadoras de más de un integrón clase I; las variaciones en los pesos moleculares corresponden sin duda, a diferentes *cassettes* genéticos insertados en la región variable del integrón, y por el tamaño de los *cassettes* genéticos, se podría suponer, que cargan uno o dos *cassettes* genéticos, considerando que

cada aminoácido es codificado por un triplete, mientras que las variedades de pesos moleculares permiten suponer que se trata de secuencias distintas. Por el momento solo podemos suponer esto, puesto que es necesario aislar y secuenciar cada uno de los fragmentos producidos por la reacción en cadena de la polimerasa para poder saber que genes específicos están insertados en los *cassettes*.

Por otra parte, comparando los patrones de las cepas R36, R7, R34 y R25 se observa que presentan un patrón idéntico, lo cual haría suponer que sus patrones de resistencia a antibióticos (mostrados en la tabla 10) también podrían ser idénticos. Pero al comparar dicho perfil, puede observarse que mientras que R36 es resistente a la cefalotina, R7, R34 y R25 no lo son; R36 resulta ser resistente a 9 antibióticos, mientras que R25 resulta ser resistente sólo a 6. En la misma figura 12 se puede ver que las cepas R5 y R4 presentan un patrón similar, aunque como se ve en la tabla 10, R5 es resistente a los mismos antibióticos que R4, aunque además es resistente a cefotaxima, cefuroxima y gentamicina.

Como se puede ver en la tabla 20, a pesar de que se tienen cepas con patrones de resistencia a antibióticos idénticos, como es el caso de las cepas R37, R38 y R7; así como las cepas R99 y R98; y también las cepas R4 y R26, los *cassettes* genéticos que presentan son diferentes en el caso de R37, R38 y R7; al igual que en el caso de R4 y R26. Solamente R99 y R98 presentaron patrones de resistencia a antibióticos idénticos así como los mismos *cassettes* genéticos.

El análisis de los patrones de resistencia a antibióticos mostrado en la tabla 20 indica que el número de antibióticos a los que una cepa es resistente no es necesariamente proporcional a la cantidad o a los *cassettes* genéticos que porte la cepa en sus integrones, como ejemplo de esto tenemos la cepa R5, que resultó ser resistente a 10 antibióticos, pero que presenta exactamente el mismo patrón de productos de PCR que la cepa R4, la cual fue resistente a 7 antibióticos. O también es destacable el caso de las cepas R98 y R99, que fueron resistentes a 9 antibióticos cada una y que presentaron sólo dos fragmentos amplificados; a diferencia de las cepas R9, R34 (5 amplicones cada una) y R36 (6 amplicones). Para poder decir por qué pasa esto tendría que realizarse un estudio más a fondo para secuenciar todos los amplicones obtenidos por PCR y realizar un análisis de que genes se están expresando en el momento en que la bacteria está en la presencia del antibiótico.

Los integrones participan en la múltiple resistencia a antibióticos en bacterias y han sido descritos particularmente en patógenos Gram negativos como *Salmonella sp.*, *E. coli* y *Pseudomonas sp.*. Se han encontrado *cassettes* genéticos que confieren resistencia a beta lactámicos, cloranfenicol, trimetoprim, y a algunos aminoglicósidos (Bennet, 1999). Aunque está bien documentada la importancia de los integrones en bacterias Gram negativas, poco se ha estudiado acerca de la presencia de éstas en bacterias Gram positivas (Shi et al., 2006). En este estudio, el 100% de las cepas multiresistentes a antibióticos caracterizadas por el patrón de resistencia a estos fármacos, así como por PCR, resultaron ser Gram positivas.

En el estudio realizado por Shi y colaboradores en 2006, se reportó que el 96% de las bacterias Gram positivas aisladas resultaron ser resistentes a por lo menos tres agentes antimicrobianos; dentro de éstas, el 76% fue resistente a eritromicina y el 70% fue resistente a penicilina. El gen *Int1* fue detectado por PCR en el 100% de las cepas resistentes, produciendo un amplicón de 1.9 Kpb. Principalmente, se trató con bacterias del género *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* Al analizar los cassettes genéticos presentes en el amplicón, se llegó a la conclusión de que estos se asemejaban mucho a otros reportados previamente en *E. coli*, lo que sugiere una transferencia horizontal desde *E. coli* a las bacterias Gram positivas mencionadas con anterioridad (Shi et al., 2006). Estos resultados se asemejan mucho a los obtenidos en este estudio, puesto que el 93% de las cepas estudiadas a detalle fueron resistentes a la eritromicina, mientras que el 100% de las cepas fue resistente a la penicilina.

A pesar de que las cepas portadoras de integrones de mayor importancia clínica, y por la misma razón, sobre las cuales se han realizado la mayor parte de los estudios son Gram negativas, Nandi y colaboradores lograron demostrar que, en el ecosistema bacteriano de los desechos de la industria de la carne de pollo, más del 85% de los microorganismos portadores del integrón I son Gram positivos, lo que significa que el mayor reservorio de genes de resistencia a antibióticos está constituido por bacterias Gram positivas de poca o nula importancia clínica (Nandi et al., 2004). Esto es muy importante para el presente estudio, ya que las bacterias aisladas no son presuntivamente organismos patógenos; sin embargo,

su importancia radica en la posibilidad de proveer de genes necesarios para sobrellevar la presencia de fármacos antimicrobianos a bacterias patógenas de importancia clínica.

Resulta de importancia mencionar que a pesar de que las cepas R3, R4, R5, R9, R11, R26, R30, R32, y R36 (vease la Tabla 10) fueron sensibles a la sulfonamida-trimeptoprim, éstas amplificaron en la reacción de PCR detectándose la presencia del integrón I, el cual usualmente posee en su región constante 3' el gen *sull*, que confiere resistencia a la sulfonamidas. Esta observación puede deberse a dos factores: i) el efecto sinérgico que pudiera ocasionar el trimeptoprim junto con la sulfonamida, sugiriendo que dichas cepas son resistentes a las sulfonamidas pero que son sensibles al trimeptoprim (Goodman et al., 1996), o bien ii) a que la región 5' del integrón de clase I de estas cepas estaba bien conservada, mientras que la región 3' pudo haber variado y no haber presentado el gen *sull*. Esto puede llegar a ocurrir, como lo demostraron en diferentes estudios, Hall y Sunde (may et al., 1994; Sunde, 2005).

El análisis de ADN plasmídico llevado a cabo mostró, como se puede ver en la figura 14, que las cepas de las cuales se extrajo el ADN plasmídico presentaron un plásmido. Tras haber curado a las cepas del plásmido, estas crecieron de manera satisfactoria en el medio adicionado con los antibióticos amikacina (64 µg/mL), Penicilina (10 U/mL) y Ampicilina (32µg/mL) podemos suponer que el integrón que confiere la resistencia a dichos antibióticos no se encuentra presente en el plásmido, y que el plásmido que presentaron las cepas de trabajo se trata

posiblemente de un plásmido críptico. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que el integrón presente en el cromosoma haya llegado a la célula por un plásmido, y que se halla reubicado dentro de la célula por algún otro mecanismo, como podría ser por la intervención de un transposón.

Comparando los resultados de las pruebas bioquímicas con la literatura (Sneath, et al., 1989). Podríamos ubicar a las cepas de trabajo dentro del grupo de los estreptococos, por su morfología colonial. El género es difícil de establecer con pruebas bioquímicas tradicionales y sólo puede ser estimado. Con base en las características encontradas para los estreptococos, encontramos a las cepas de trabajo dentro del grupo de los gama hemolíticos (o hemólisis negativa) y en base a pruebas específicas como el crecimiento en medio con NaCl al 6.5%, el crecimiento en medio con bilis-esculina, y la susceptibilidad a la bacitracina; por lo que, comparando los resultados obtenidos con los encontrados en la literatura, podríamos situar a las cepas de trabajo dentro del género *S. bovis* o bien *S. equinus*, ya que se pudo observar que *S. bovis* crece bien en medio con NaCl al 6.5%, a diferencia de *S. equinus*, que no es capaz de crecer en este medio. En la tabla 19 se puede ver que solamente dos cepas podrían catalogarse como *S. bovis* tomando en cuenta el criterio de la prueba del crecimiento en medio con NaCl. Otra prueba bioquímica que nos puede ayudar a afirmar el punto anterior es la hemólisis, ya que *S. bovis* usualmente presenta alfa hemólisis, mientras que se pudo observar que las cepas trabajadas no presentaron.

Está reportado (Sneath, et al., 1989) que las cepas de *S. bovis* se encuentran presentes en el tracto intestinal de los bovinos, ovejas y otros rumiantes, heces de cerdos, heces humanas, leche no pasteurizada, crema y queso; por lo que la posibilidad de que también esté presente esta bacteria en la carne de res es bastante amplia, aunque no se halla aparentemente no se halla encontrado en este estudio. Sin embargo, la presencia de *S. equinus* en un rastro está completamente justificada, ya que podría haberse sacrificado algún caballo, que es donde normalmente se encuentra a esta bacteria, y ésta haber tenido contacto con alguna cepa multiresistente de *S. bovis* y posiblemente gracias a una mala manipulación, haber contaminado por contaminación cruzada la carne en cuestión. Es importante señalar que es necesario llevar a cabo la identificación de cepas por un método más preciso, como el sistema API, o bien, alguna técnica como el análisis de ARN 16S, o bien mediante ensayos inmunológicos.

Cepa	Antibióticos a los que presentó resistencia	Tamaño de los amplicones que presentó en la reacción de PCR (Kb)	Procedencia
R2	AM, CF, DC, PE, SXT, AK	2.6, 1.47, 1.15, 0.92, 0.41	Mercado
R3	AM, CF, DC, E, PE, AK	2.75, 1.39, 1.13, 1.0, 0.38	Superama
R4	AM, CF, CAZ, DC, E, PE, AK	2.6, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Wal-Mart
R5	AM, CF, CTX, CAZ, CXM, DC, E, GE, PE, TE, AK	2.6, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Superama
R7	AM, DC, E, PEF, PE, TE, SXT, AK	2.6, 1.89, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Wal-Mart
R9	AM, CF, CTX, CAZ, CXM, DC, E, PE, AK	3.05, 1.55, 1.30, 0.66, 0.51	Superama
R25	AM, DC, E, PE, SXT, AK	2.6, 1.89, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Wal-Mart
R26	AM, CF, CAZ, DC, E, PE, AK	1.75, 0.79, 0.66	Superama
R34	AM, CAZ, DC, E, PEF, PE, TE, SXT, AK	2.6, 1.89, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Wal-Mart
R36	AM, CF, CAZ, CXM, DC, E, PE, TE, AK	2.6, 1.89, 1.47, 1.15, 0.92, 0.63, 0.41	Mercado
R37	AM, DC, E, PEF, PE, TE, SXT, AK	2.75, 1.96, 1.39, 1.18, 1.0, 0.84	Mercado
R38	AM, DC, E, PEF, PE, TE, SXT, AK	3.05, 1.55, 1.30, 0.66, 0.51	Mercado
R98	AM, CF, CXT, CXM, DC, E, GE, PE, SXT, AK	1.0, 0.84	Tianguis
R99	AM, CF, CXT, CXM, DC, E, GE, PE, SXT, AK	1.0, 0.84	Tianguis

Tabla 20. Tamaño de amplicones obtenidos por PCR por cada cepa de trabajo, se muestra además los antibióticos a los que fueron resistentes:
AM-Ampicilina, AK – Amikacina, CF – Cefalotina, CTX Cefotaxima, CAZ Caef tazidima, CXM Cefuroxima, DC Dicloxacilina, E Eritromicina, GE Gentamicina, PEF Pefloxacina, PE Penicilina, TE Tetraciclina, SXT Trimeptoprim-sulfametoxazol.



VI. CONCLUSIONES

Conclusiones.

Se aislaron bacterias multiresistentes a antibióticos portadoras de diferentes integrones de clase I de la carne de res comprada en los diferentes puntos de venta en que se realizó el muestreo, lo cual podría ser una consecuencia, directa o indirecta, del uso de los antimicrobianos como agentes promotores del crecimiento.

El haber encontrado microorganismos multiresistentes a antibióticos en las diferentes muestras de carne de res sugiere que los genes responsables de la resistencia a antibióticos se encuentran presentes en la cadena de producción de ésta, y aunque es difícil averiguar el punto exacto en donde la transmisión de material genético ocurre, se puede atribuir al uso desmesurado de los antibióticos en la producción de la carne de res.

El uso de antibióticos en la alimentación animal contribuye de manera significativa a la permanencia y diseminación de los genes causantes de la resistencia a antibióticos.

Existen factores que indirectamente promueven la persistencia de los genes de resistencia a antibióticos, puesto que se ha identificado que algunos de éstos se encuentran asociados a genes que cumplen otras funciones para el microorganismo, un ejemplo de esto son los genes que confieren resistencia a

metales pesados, o bien, aquellos que confieren resistencia a compuestos cuaternarios de amonio.

Los resultados de este estudio muestran que la carne de res, así como la cadena de producción de la misma, son reservorio de elementos genéticos de importancia clínica como los integrones. A pesar de no estar presentes en bacterias patógenas, éstas pueden transmitir los anteriormente mencionados elementos genéticos a otras bacterias potencialmente peligrosas para la salud humana. Esta transferencia puede ocurrir de manera *trans-Gram* (entre bacterias con diferentes tipos de pared celular).

Es necesario estudiar la secuencia de cada uno de los amplicones obtenidos con la PCR para conocer a los genes presentes en los integrones de las bacterias utilizadas en este estudio y así poder ver cuales son aquellos que están contribuyendo al fenotipo resistente. También es necesario identificar el género y especie por métodos mas precisos como la identificación utilizando el sistema API o bien análisis de ARN ribosomal 16S.

The image features a large, stylized 'X' shape composed of numerous thin, parallel black lines. The lines are arranged in four quadrants, meeting at a central point. The top-left and bottom-right quadrants are filled with lines that are more densely packed, while the top-right and bottom-left quadrants have fewer, more widely spaced lines. The overall effect is a sense of depth and movement.

VII. REFERENCIAS

Referencias.

1. Aarestup, F., Seyfart, A., Emborg, H., Pedersen, K., Hendriksen, R., Bager, F. (2001) ***Effect of the Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(7):2054-2059.
2. Agersø, Y., Sandvang, D. (2005) ***Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in Alcaligenes, Arthrobacter, and Pseudomonas spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil.*** Applied and Environmental Microbiology. 71(12):7941-7947.
3. Akhter M., et al., ***70 Percent of All Antibiotics Given to Healthy Livestock.*** [en línea, disponible en <http://www.mindfully.org/Health/Antibiotics-Healthy-Livestock-UCS.htm>; accesado el 2 de septiembre de 2007]
4. Alanis A.J. (2005) ***Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?*** Archives of Medical Research; 36: 697-705.
5. Andersson D. and Levin B. (1999) ***The biological cost of antibiotic resistance.*** Current Opinion in Microbiology 2:489-493.
6. Anónimo. (2006) ***Union of Concerned Scientists. European Union Bans Antibiotics for Growth Promotion.*** [En línea, disponible en: http://www.ucsusa.org/food_and_environment/antibiotics_and_food/european-union-ban.html accesado el 2 de septiembre de 2007].
7. Avila G. E., et al., (1990) ***Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria.*** Sistema de Educación Continúa en Producción Animal, Primera edición, México.

8. Bass, L., Liebert, C., Lee, M., Summers, A., White, D., Thayer, S., Maurer, J. (1999) ***Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance in Avian Escherichia coli.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43(12):2925-2929.
9. Bennett, P. (1999) ***Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.*** Journal of antimicrobial Chemotherapy. 43:1-4.
10. Camacho, A., Hernández, L., Luna, B., Mejía A., Müggenburg, I., Ramírez, R., Tsuzuki, G., Vierna, L., Velázquez, O., Ursúa, M. (2006) ***Manual de Prácticas de Microbiología General.*** Quinta edición. Facultad de Química, UNAM, México D.F., México.
11. Cancho B., García M., Simal, J. (2000). ***El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual.*** Ciencia y Tecnología Alimentaria 3(1): 39-47.
12. Carattoli A. (2001) ***Importance of integrons in the diffusion of resistance.*** Vet. Res. 32: 243-259.
13. Chopra I. and Roberts M. (2001) ***Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance.*** Microbiology and Molecular Biology Reviews; 65: 232-260.
14. Collins, C. and Hall, R. (1992) ***Site-Specific Deletion and Rearrangement of Integron Insert Genes Catalyzed by the Integron DNA Integrase.*** Journal of Bacteriology. 174(5):1574-1585.

15. Collins, C., Hall, R. (1995) ***Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39(1):155-162.
16. Courvalin P. (1994) ***Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram-positive and Gram-Negative Bacteria.*** Antimicrobial Agents Chemotherapy 38(7):1447-1451.
17. Courvalin P. (1996) ***Evasion of antibiotic action by bacteria.*** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 37:855-869.
18. Dancer S., Shears P., Platt D.J. (1997) ***Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic.*** Journal of Applied Bacteriology 82:597-609.
19. Davies J. (1994) ***Inactivation of Antibiotics and the dissemination of Resistance Genes.*** Science 264:375-382.
20. Diario Oficial de la Federación. ***Acuerdo por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.*** Publicado el 12 de julio de 2004.
21. Dibner J.J. and Richards J.D. (2005) ***Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action.*** Poultry Science; 84: 634-643.
22. Dubois, V., Poirel, L., Marie, C., Arpin, C., Nordmann, P. and Quentin, C. (2002) ***Molecular Characterization of a Novel Class 1 Integron Containing blaGES-1 and a Fused Product of aac(3)-Ib/aac(6')-Ib' Gene Cassettes in Pseudomonas aeruginosa.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46(3):638-645.

23. Eldon J.G., Simmons M.J., Snstad P. (1998). ***Principios de genética***. Cuarta edición. Editorial Limusa. México.
24. Emborg, H., Andersen, A., Seyfarth, S., Boel, J., Wegener, H. (2003) ***Relations between the occurrence of resistance to antimicrobial growth promoters among Enterococcus faecium isolated from broilers and broiler meat***. International Journal of Food Microbiology. 84:273-284.
25. Errecalde J. ***Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública***. Estudios FAO: Producción y sanidad animal, 2004.
26. Facklam, R. (1982) ***Presumptive Identification of Streptococci with a New Test System***. Journal of Clinical Microbiology, June 1982. 15(6): 987-990.
27. Facklam, R. (1991) ***Manual de Procedimientos. Aislamiento e Identificación de Estreptococos***. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, EUA.
28. Fernandez R., López J., Ponce, L., Machado, C. (2003) ***Resistencia Bacteriana***. Revista Cubana de Medicina Militar. 32:44-48.
29. Fluit C., Visser M. and Schmitz F. (2001) ***Molecular Detection of Antimicrobial Resistance***. Clinical Microbiology Reviews; 14: 836-871.
30. Forbes, Sahm, Weissfeld. (2004) ***Diagnóstico microbiológico***. 11va ed. Ed. Médica panamericana, Argentina, 2004.

31. Furukawa K. and Chakrabarty M. (1982) ***Involvement of Plasmids in Total Degradation of Chlorinated Biphenyls.*** Applied and Environmental Microbiology. Sept. 1982 p.619-626.
32. García J.M. (2000) ***Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos.*** Actualidad SEM. 28:18-22. Mayo de 2000.
33. Gardner, E. J., Simmons, M. J., Snustad, D. P., (2000). ***Principios de genética.*** Ed. Limusa Wiley, México, pp. 205-246.
34. Gaskins H.R. , Collier C.T., Anderson D.B. (2002) ***Antibiotics as Growth Promotants: Mode of action.*** Animal Biotechnology. 13(1): 29-42.
35. Giraffa, G. (2002) ***Enterococci from foods.*** FEMS Microbiology Reviews 163-171.
36. González R., Mella M., Zemelman R., Bello H., y Domínguez M. (2004) ***Integrones y Cassettes Genéticos de Resistencia: Estructura y Rol Frente a los Antibacterianos.*** Revista Médica de Chile. 132:619-626.
37. Goodman et al., (1996) ***Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.*** Novena Edición. Volumen II. Ed. McGraw Hill Interamericana. México.
38. Gronhmann E., Muth G., and Espinosa M. (2003) ***Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria.*** Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(2):277-301.
39. Hall R., Brown H., Brookes D. and Stokes H. (1994) ***Integrans Found in Different Locations Have 5' Identical Ends but Variable 3' Ends.*** Journal of Bacteriology. 176(20):6286-6294.

40. Hardy B. (2002) ***The Issue of Antibiotic Use in the Livestock Industry: What Have We Learned?*** *Animal Biotechnology* 13(1):129-147.
41. Hirota Y. (1960) ***The effect of acridine dyes on mating type factors in Escherichia coli.*** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46:57.
42. Hoyle, D., Davison, HH., Knight, H., Yates, C., Dobay, O., Gunn G., Amyes, S., Woolhouse M. (2006) ***Molecular characterization of bovine faecal Escherichia coli shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class I integrons on an organic beef farm.*** *Veterinary Microbiology*. 115:250-257.
43. Hughes V.M. and Datta N. (1983) ***Conjugative Plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era.*** *Nature* 302:725-726.
44. Inuzuka N., Nakamura S., Inuzuka M. and Tomoeda M. (1969) ***Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of Escherichia coli.*** *J Bacteriol*, 100: 827.
45. Katzung et al., (1994) ***Farmacología Básica y Clínica.*** Quinta Edición. Ed. El Manual Moderno. México.
46. Khachatourians, G. (1998) ***Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria.*** *Canadian Medical Association*. 159:1129-1136.
47. Knudtson, L., Hartman, P. (1992) ***Routine Procedures for Isolation and Identification of Enterococci and Fecal Streptococci.*** *Applied and Environmental Microbiology*. 58(9):3027-3031.

48. Lévesque C., Piché L., Larose C. and Roy P. (1995) ***PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39(1): 185-191.
49. Lipsitch, M., Singer, R., Levin, B. (2002) ***Antibiotics in agriculture: When is it the time to close the barn door?*** Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(9):5752-5754.
50. Livermore D.M. (2003) ***Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology and Impact.*** Clinical Infectious Diseases 36: S11-S23.
51. Mac Faddin, J. (2003) ***Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.*** Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina.
52. Madigan, et al., (2001) ***Brock. Biología de los microorganismos.*** Ed. Prentice Hall. España.
53. Marin M., Gudiol F. (2002) ***Antibióticos Betalactámicos.*** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21(1):42-55.
54. Markham P. And Neyfakh A. (2001) ***Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria.*** Current Opinion in Microbiology 4:509-514.
55. McDermott P., Walker R. and White D. (2003) ***Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance.*** International Journal of Toxicology; 22: 135-143.
56. McDermott P., Zhao S., Wagner D., Simjee S., Walker R. and White D.. (2002) ***The Food Safety Perspective of Antibiotic Resistance.*** Animal Biotechnology. Vol 13, No. 1, pp 71-84.

57. Miller G., McNamara P., Singer R. (2006) **Stakeholder position paper: Economist's perspectives on antibiotic use in animals.** Preventive Veterinary Medicine; 73:163-168.
58. Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, and P. M. Tulkens. (1999) **Aminoglycosides: activity and resistance.** Antimicrob. Agents Chemother. 43(4):727-737.
59. Montiel F. (1994) **Introducción a la Metodología del ADN Recombinante e Ingeniería Genética.** Tercera Edición. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.
60. Morrejón M. y Salup R. (2003). **Actualización en Quinolonas.** Revista Electrónica de Biomedicina 1(3):170-178.
61. Nandi, S., Maurer, J., Hofacre, C., Summers, A. (2004) **Gram-positive bacteria are a mayor reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(18):7118-7122.
62. Nikaido H. (1998) **Multiple antibiotic resistance and efflux.** Current Opinion in Microbiology 1: 516-523.
63. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. **Preparación y Dilución De Muestras De Alimentos Para Su Análisis Microbiológico.**
64. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. **Método Para la Determinación de Salmonella en Alimentos.**
65. Organización Mundial de la Salud. (1997). **The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals.** Reporte de la OMS, Berlín, Alemania; disponible en el sitio web de la OMS: <http://www.who.int/emc>

66. Palao M., Ortegón A., Giles M. (2000) ***Técnicas microbiológicas de aplicación en el control de calidad de alimentos*** . Departamento de Biología, Facultad de Química UNAM.
67. Phillips I., Casewell M., Cox A., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. and Waddell J. (2004) ***Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data***. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 53: 28-52.
68. Pool, K. (2001) ***Multidrug resistance in Gram-Negative Bacteria***. Current Opinion in Microbiology 4:500-508.
69. Rice, L. (2006) ***Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria***. The American Journal of Medicine. 119(6A): S11-S19.
70. Rodríguez M.A., Hundían J., Barreto J., Lim M., Areu A., Pardo A.. (1998) ***Tetraciclinas***. Acta Médica 8 (1): 75-79.
71. Roth F.X., Kirchgessner, M. (1993) ***Influence of Avilamycin and Tylosin on Retention and Excretion of Nitrogen in Finishing Pigs***. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 69: 245-250.
72. Rowe-Magnus D. And Mazel D. (2001) ***Integrans: natural tools for bacterial genome evolution***. Current Opinion in Microbiology 4:565-569.
73. Rowe-Magnus D., Guerout A., Mazel D. (1999) ***Super-Integrans***. Research Microbiology 150: 641-651.
74. Salyers A. and Amabile-Cuevas C. (1997) ***Why Are Antibiotic Resistance Genes So Resistant to Elimination?*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 41: 2321-2325.

75. Sánchez, M., Gutierrez, L., Castaño A., Zancajo, A. (1996) ***Residuos de Antibióticos en Carnes de Mataderos.*** Alimentaria, Abril, 1996, 35-38.
76. Schroeder, C.; White D.G.; Meng, J. (2004) ***Retail Meat and Poultry as a Reservoir of Antimicrobial-resistant Escherichia coli.*** International Journal of Food Microbiology 21:249-255.
77. Shi, L., Zheng, M., Xiao, Z., Asakura, M., Su, J., Li, L., Yamasaki, S. (2006) ***Unnoticed Spread of class 1 Integrons in Gram-Positive Clinical Strains Isolated in Guangzhou, China.*** Microbiology and Immunology. 50(6):463-467.
78. Silva L. M., et al., (2005) ***Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci.*** International Journal of Food Microbiology 103:191-198.
79. Singer M., Berg P. (1993) ***Genes y Genomas. Una perspectiva cambiante.*** Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.
80. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, E., Holt, J. ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*** (Volume 2). Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, U.S.A., 1989. Pags 1048, 1069.
81. Sørum, H.; L'abee-Lund T.M. (2002) ***Antibiotic resistance in food-related bacteria: a result of interfering with the global web of bacterial genetics.*** International Journal of Food Microbiology 78:43-56.
82. Stadler J. and Adelberg E. (1972) ***Temperature Dependence of Sex-Factor Maintenance in Escherichia coli K-12.*** Journal of Bacteriology 109:447.
83. Sunde, M. (2005) ***Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in Escherichia coli isolated from meat and meat***

- products of Norwegian origin.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56:1019-1024.
84. Tenover F. (2006) ***Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.*** The American Journal of Medicine; 199: S3–S10.
85. Thal, L., Chow J, Mahayni, R., Bonilla, H., Perri, M., Donabedian, S., Silverman, J., Taber, S. and Zervos, M. (1995) ***Characterization of Antimicrobial Resistance in Enterococci of Animal origin.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 39: 2112-2115.
86. Threlfall, J. et al., (2000) ***The Emergence and Spread of Antibiotic Resistance in Food-borne bacteria.*** International Journal of Food Microbiology 62:1-5.
87. Wassenaar T. (2005) ***Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Implications for Human Health.*** Critical Reviews in Microbiology 31:155-169.
88. Wegener H.C. (2003) ***Antibiotics in Animal Feed and Their Role in Resistance Development.*** Current Opinion in Microbiology 6:439-445.
89. White P., McIver C., and Rawlinson W. (2001) ***Integrins and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae.*** Antimicrobial agents and Chemotherapy. 45(9):2658-2661.
90. White, D., Zhao, S., Sudler, R, Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P., McDermott, S., Wagner, D, and Meng J. (2001) ***The Isolation of Antibiotic-Resistant Salmonella from Retail Ground Meats.*** The New England Journal of Medicine 345:1147-1154.

91. Witte W., Klare I., Werner G. (2002) ***Molecular Ecological Studies on Spread of Antibiotic Resistance Genes.*** Animal Biotechnology 13(1):57-70.
92. Yücel, N., Citak, M, Önder. (2005) Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology. 22:241-245.