



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Presencia de bacterias multiresistentes a
antibióticos en carne de pescado portadoras
de integrón tipo 1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Jiménez González Jacqueline Bethsabe



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Olga del Carmen Velázquez Madrazo

Vocal Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez

Secretario Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre

1er. Suplente Prof. Eduardo Bonilla Espinosa

2do. Suplente. Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López

Sitio en donde se desarrollo el tema: Edificio "A" Facultad de Química, anexo de laboratorio 1A. Laboratorio de Microbiología Molecular.

Asesor

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Supervisor técnico

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

Sustentante

Jacqueline Bethsabe Jiménez González



AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que a nadie agradezco a DIOS, por haberme permitido llegar a este momento tan importante en mi vida, por haberme dado salud, serenidad y fuerza para superar esos grandes problemas por los cuales pase y ahora he superado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, así como a la Facultad de Química por permitirme ser parte de esta gran institución y darme un espacio para desarrollarme como persona y como profesionista.

A mis profesores: Fernando Montiel Aguirre y Raquel Ortega Muñoz que más que asesores, fueron un completo apoyo en la realización de este trabajo. Gracias.

A cada uno de los profesores que forman parte de este jurado, por dedicar parte de su tiempo a apoyar este trabajo y por aquellas recomendaciones que permitieron enriquecerlo.

Agradezco principalmente por su apoyo incondicional, su amor, cariño, comprensión y una lista interminable de cualidades a una de las dos personas más importantes en mi vida, a tí Fernando por ser el hombro en el cual puedo llorar, por ser el oído que escucha mis enojos y frustraciones, por tener siempre un consejo o palabra de aliento que darme y sobre todo por ser el amor que ha impulsado mi vida y que espero la siga impulsando. Gracias por estar a mi lado. Te amo.

A mi padre Arturo que ha sido y es una parte fundamental de mi vida, por darme una palmada en la espalda cuando lo necesitaba, por alentarme a ser una persona cada día mejor y sobre todo por su confianza, apoyo, regaños, lágrimas y consejos que me han permitido lograr esta meta.

Y por último, pero no por eso menos importante, agradezco a todos mis compañeros y amigos, con los que he compartido y me permitieron compartir a lo largo de estos últimos años momentos de risas, juegos, charlas en el tiempo libre que daban un poco de oxígeno a esos momentos de estrés y presión, enojos, riñas y apoyo en esos momentos difíciles dentro y fuera de la escuela. A todas y cada una de esas personas con las que compartí aunque sea una sonrisa a través de todo este trayecto, les agradezco su tiempo, apoyo, cariño y amistad.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, que me ha costado tiempo, esfuerzo y constancia a Fernando G.M., el amor de mi vida, ya que este orgullo y logro es tanto mío como tuyo, pues sin tí nunca hubiera llegado hasta aquí; a mi chaparrito Arath G.J., que fue un impulso más en mi vida para llegar hasta esta meta y a mi papito Arturo quien ha sido en estos últimos años un apoyo enorme en muchos aspectos de mi vida y que sin ninguno de ellos, probablemente muchas cosas se hubieran ido por la borda.



C O N T E N I D O

PÁGINAS

I. INTRODUCCIÓN	8
------------------------------	---

II. ANTECEDENTES

1. Antibióticos

1.1 ¿Qué son los antibióticos?	15
1.2 Clasificación de los antibióticos	17
1.2.1 Estructura química y mecanismo de acción	18
1.2.2 Efecto bacteriostático y bactericida	23
1.2.3 Espectro de actividad	24
1.2.4 Biosíntesis	25
1.3 Antibióticos más frecuentemente empleados	25
1.4 Uso de los antibióticos	28

2. Antibióticos en los alimentos

2.1 Antibióticos en pescado	34
2.2 Microbiología del pescado destinado a consumo humano	42
2.2.1 Conservación del pescado	43
2.3 Surgimiento de resistencia a antibióticos en el pescado	47
2.2 ¿Es posible utilizar los antibióticos sin peligro para los consumidores? Problemas que generan.....	49

3. Factores que rigen la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos en los seres humanos

3.1 Factores de los pacientes que influyen en la resistencia a los antibióticos	56
---	----



3.2 Factores en los médicos y personal que proporcionan los antibióticos y que influyen en la resistencia a los antibióticos	59
4. Mecanismos de resistencia a antibióticos	61
4.1 Origen no genético (Mecanismos fisiológicos).....	61
4.2 Origen genético	65
4.3 Plásmidos.....	70
4.3.1 Clasificación	71
4.3.2 Estructura	74
4.4 Integrones	76
4.4.1 Estructura	77
4.4.2 La integrasa y los sitios primarios de actuación	80
4.4.3 Cassettes de resistencia	81
4.4.4 Importancia de los integrones	85
III. JUSTIFICACIÓN	87
IV. HIPÓTESIS	89
V. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	90
VI. PARTE EXPERIMENTAL	
6.1 Diagrama de trabajo	92
6.2 Metodología	94
VII. RESULTADOS	
Extracción, aislamiento y determinación de morfología bacteriana	114
Resistencia a antibióticos	115
Identificación bioquímica	123
Determinación de la presencia del integrón tipo 1	126



VIII. DISCUSIÓN	140
IX. CONCLUSIONES	154
X. SUGERENCIAS	156
XI. ANEXOS	
Anexo 1. Determinación de la muestra a estudiar	159
Anexo 2. Material, equipos y reactivos usados durante la etapa final	160
Anexo 3. Composición de los medios de cultivo usados	164
Anexo 4. Resultados de las primeras 5 etapas realizadas a muestras de pescado	170
Anexo 5. Información de los antibióticos empleados para las pruebas de sensibilidad microbiana	176
Anexo 6. Antibióticos usados en pescado	185
Anexo 7. Características del género <i>Aeromonas</i>	187
Anexo 8. Gráficos de cada uno de los geles de PCR	190
XI. REFERENCIAS	195



I. INTRODUCCIÓN

Un problema que actualmente se presenta en los alimentos de consumo humano es el surgimiento de ciertas cepas bacterianas resistentes a antibióticos, debido a la selección ejercida por el uso amplio e indiscriminado que se da a dichos compuestos, ya sea con el fin de preservación o usados como promotores de crecimiento. Organizaciones como la OMS, recomiendan ciertas medidas para minimizar la aparición de nuevas resistencias, como el uso prudente de los antimicrobianos en animales destinados al consumo humano y acabar con la utilización, como complemento alimentario, de agentes usados en la medicina humana como la penicilina y la tetraciclina. Otra medida a seguir es, controlar la automedicación, frecuentemente a dosis subóptimas que pueden contribuir también al aumento de resistencias. Pruebas microbiológicas y clínicas demuestran que las bacterias resistentes o que determinada resistencia puede ser pasada de animales a humanos, resultando en infecciones que son más difíciles de tratar (OMS, 2001).

Los antibióticos y compuestos afines capaces de mejorar la productividad animal tienen algo en común: la supresión o disminución del crecimiento de ciertos microorganismos. En la industria animal se usan generalmente: bacitracina, clorotetraciclinas, bambermicinas, eritromicina, neomicina, avilamicina, virginiamicina, oxitetraciclina, oleandomicina, penicilina, estreptomycin, sulfas,



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

arsenicales, nitrofuranos y sulfato de cobre (Hammerum et al., 1998; Sherwood and Gorbach, 2001).

Informes epidemiológicos han implicado a alimentos de origen animal como importantes vehículos asociados con enfermedades de origen alimentario, por lo que la seguridad microbiana de la comida se ha vuelto una preocupación creciente de la salud pública mundial. La importancia que tienen la detección y estudio de bacterias resistentes a antibióticos en los diferentes alimentos de consumo humano radica en mantener la inocuidad para la salud pública, evitando y/o controlando la transmisión de agentes patógenos resistentes que pudieran ocasionar el surgimiento de infecciones en los consumidores por la ingestión de alimentos contaminados con este tipo de microorganismos. La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos es indispensable para obtener información sobre la magnitud y las tendencias del problema. Aunque es difícil calcular cuantitativamente el impacto total de esta resistencia en la salud, hay datos que señalan que la morbilidad y la mortalidad aumentan cuando se retrasa la administración de tratamientos eficaces para las infecciones causadas por agentes patógenos resistentes. La prolongación de las enfermedades infecciosas y la hospitalización de los pacientes con infecciones resistentes sumados a otros procedimientos y medicamentos que podría ser necesario administrar, conllevan repercusiones económicas. También puede haber consecuencias económicas para el paciente debido a pérdida de productividad. Las infecciones resistentes a los antimicrobianos producidas por los alimentos de consumo humano también



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

pueden tener consecuencias económicas graves tanto para el productor como para el consumidor (OMS, 2001).

La mayor parte de los microorganismos resistentes a los fármacos surge como resultado de cambios genéticos y de los procesos subsecuentes de selección por los antimicrobianos. La adquisición de la resistencia a antibióticos ocurre algunas veces por mutación espontánea, que controla la susceptibilidad a un antimicrobiano determinado; estos mutantes cromosómicos son más resistentes en virtud de los cambios en un receptor estructural para el fármaco (Madigan *et al.*, 1997). En otros casos, la resistencia está dada por transferencia horizontal de genes, que llegan a estar situados en elementos móviles como integrones, plásmidos o en transposones que se pueden transmitir entre las mismas bacterias, principalmente por conjugación.

En 1994, se presentó el primer caso de infección causada por enterococos resistentes a glicopéptidos, provenientes de alimentos animales; desde entonces, numerosos artículos han reportado la presencia de diferentes microorganismos resistentes a antibióticos en diversos alimentos, como el caso de la presencia de *Salmonella* en diferentes carnes de venta al menudeo (pavo, puerco, pollo y res) en países industrializados (White *et al.*, 2001); *Enterococcus faecium* en pollo y carne de puerco (Sorensen *et al.*, 2001); *Aeromonas* presentes en pescado de venta al menudeo (Radu *et al.*, 2003).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Existen diferentes trabajos reportados acerca de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en pescado, aunque éstos se refieren al tipo cultivado en centros acuícolas, donde el antibiótico es usado como factor de crecimiento y queda acumulado en los sedimentos, provocando la selección de las bacterias resistentes. En el caso de este proyecto se estudia pescado silvestre de origen marino, usando como base información documentada sobre la presión selectiva producida por el intenso desecho de “basura farmacéutica” dentro del mar llevando al surgimiento y mantenimiento de bacterias resistentes a antibióticos en aguas costeras; lo que puede ocasionar una transferencia de genes a bacterias marinas nativas (Peele *et al.*, 1981; Grimes *et al.*, 1984).

En estudios relacionados con el tema de resistencia, se ha determinado la frecuencia de bacterias resistentes en agallas y contenido intestinal de pescado capturado en la Bahía de Concepción, Chile, destinado para consumo humano, evaluando peces pelágicos y dermales. En dicho estudio, se encontró que las bacterias presentes en las agallas fueron resistentes a tres antibióticos, en un porcentaje de 36.9% en peces pelágicos y 33.3% en peces de origen dermal; en cuanto al contenido intestinal, los microorganismos presentes fueron resistentes a tres y cuatro antibióticos en un 29.2% (pelágicos) y 46.2% (dermales). Los microorganismos aislados de estos dos tipos de peces fueron: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonas* sp. y bacilos no identificados gram-negativos no fermentativos (Miranda and Zemelman, 2001).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

En otra revisión se estudiaron de 87 muestras, representando cinco tipos de pescado evaluando la presencia de *Aeromonas* spp. De las muestras examinadas, 69%, 55%, 11.5% y 2.3% pertenecen a *Aeromonas* spp., *A. veronii* biovar *sobria*, *A. hydrophilia* y *A. caviae*, respectivamente. Las 60 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas demostraron resistencia a tres o más de los antibióticos probados y todas fueron susceptibles a ceftazimida. Treinta y cuatro (56.7%) de las sesenta aisladas presentaron plásmidos (Radu *et al.*, 2003).

El presente trabajo busca aislar, identificar y estudiar a microorganismos presentes en muestras de carne de pescado, consumida con mayor frecuencia por la gente en la Ciudad de México, ya que este tipo de alimento está fuertemente relacionado con infecciones gastrointestinales debidas a su consumo en diferentes presentaciones (crudo, frito o cocido), seleccionando a microorganismos multiresistentes a antibióticos, mediante pruebas de susceptibilidad y buscando la presencia del integrón tipo 1 en el ADN de las bacterias seleccionadas, mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), lo que podría relacionarse con su multiresistencia.

Aparentemente, es posible el uso de antibióticos como forma de conservación de este producto tan perecedero, empleándose generalmente como soluciones, baños o incorporándolos al hielo, ya que las distancias a las que es preciso transportarlo son grandes (Frazier, 2003), aunado al tiempo que transcurre hasta que el pescado llega al lugar de exposición a la venta. Esta práctica parece



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

realizarse en México, aunque no existen reportes oficiales ni estudios bien documentados sobre ello, lo que podría conducir a la selección de bacterias resistentes en nuestro país, ya que el uso de agentes antimicrobianos en cualquier ambiente favorece la supervivencia de patógenos resistentes a antibióticos. Por ello, la presencia de cepas resistentes puede ser un indicativo del uso inadecuado de antibióticos en el pescado, produciendo en los distribuidores una señal de alerta en cuanto a la manipulación del alimento.



I. ANTECEDENTES



1. ANTIBIÓTICOS

1.1 ¿Qué son los antibióticos?

Se define a los antibióticos (*anti*: contra y *bios*: vida) como sustancias químicas específicas derivadas o producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que tienen acción bacteriostática, bactericida o fungicida, es decir, suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos (Goodman & Gilman, 1996).

Su origen puede ser **a)** natural o biológico, cuando se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser de hongos (*Penicillium*, *Cephalosporum*, *Micromonospora*) o bacterias (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Chromobacterium*); **b)** semi-sintético, cuando a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades (Velasco *et al.*, 1993) o **c)** sintético, algunos antibióticos se preparan totalmente por síntesis, por ejemplo el cloranfenicol.

Los primeros antibióticos se aislaron de los productos de fermentaciones de los actinomicetos (Facultad de Ciencias, 2003), figura 1, que constituyen un importante grupo de organismos procarióticos habitantes del suelo y del material vegetal compostado. El género principal del grupo es *Streptomyces*, que son ante todo



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

organismos del suelo. De hecho, el olor característico del suelo se origina de la producción de una serie de metabolitos de los estreptomicetos denominados geosminos. Estas sustancias son compuestos de sesquiterpenoides, anillos de carbono insaturados, oxígeno e hidrógeno (Carrillo, 2003). La propiedad más notable de los estreptomicetos es el grado en que producen antibióticos. Está comprobado que más de 500 sustancias antibióticas distintas son producidas por ellos y tienen múltiples aplicaciones en la medicina, veterinaria y agricultura. Muchos antibióticos producidos son eficaces en el control de bacterias patógenas o infecciosas. Algunos ejemplos de los antibióticos producidos por los actinomicetos son: Rubeomicinas, actividad biológica = antitumoral; 2'-N-metil-8-metoxiclortetraciclina, actividad biológica = antibacteriana; Macrolactamas, actividad biológica = antifúngica; Antibiótico SF-2140, actividad biológica = antiviral (Gutiérrez Lugo y Mata Essayag, 2007).

Figura 1. Cultivo de actinomicetos.



Figura 1. Fuente: Facultad de Ciencias, 2003.

En la actualidad algunos se obtienen de metabolitos microbianos e incluso de plantas superiores y de animales. (Korolkovas, 1979).



La producción industrial de antibióticos se desarrolla ante la necesidad de controlar las enfermedades infecciosas, concretamente, las enfermedades causadas por bacterias, por lo que también se les denomina "antimicrobianos". En el uso de los antibióticos se aprovecha su característica de actuar sobre células bacterianas (células procariotas) a las que se pretende eliminar en su totalidad, mientras que tienen menor efecto en las células del hombre (células eucariotas) (Mediavilla, 2000).

1.2 Clasificación de los antibióticos.

Actualmente existen nueve grandes familias de antibióticos, con diversas formas de administración que proporcionan opciones terapéuticas diversas y a las que la investigación permite encontrar nuevos usos (Fundación Farmaindustria, 2004).

La clasificación más común se ha basado en su estructura química y en el mecanismo de acción propuesto, su efecto bacteriostático o bactericida o su espectro de actividad, aunque también pueden emplearse criterios tales como su utilización terapéutica, la producción de resistencia o la toxicidad, biosíntesis, familias, etc. (Velasco, *et al.*, 1993).



1.2.1 Estructura química y mecanismo de acción.

1) Compuestos que inhiben la síntesis de la pared celular. La lesión de la pared celular o la inhibición de su formación, puede conducir a la lisis de la célula; forman parte de este grupo los antibióticos β -lactámicos (*penicilinas* y *cefalosporinas*, que guardan semejanza estructural), y también medicamentos disímbolos como *cicloserina*, *vancomicina*, *bacitracina* y los antimicóticos del tipo de *imidazol* (*miconazol*, *ketoconazol* y *clotrimazol* (Goodman & Gilman, 1996).

La acción de los inhibidores de la síntesis será más eficaz cuanto más crezca y se multiplique la bacteria. La síntesis de la pared celular tiene lugar en cuatro etapas: formación del precursor en el citoplasma, que es la conversión de L-alanina en D-alanina y la unión de dos moléculas de D-alanina. La cicloserina inhibe competitivamente la conversión de L-alanina en su forma D. La cicloserina es eficaz frente a bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas. Posteriormente, el dipéptido D-ala se une a otros tres aminoácidos y un aminoazúcar, el ácido N-acetil-muránico. Esta estructura se une a otra molécula de otro aminoazúcar, la N-acetil-glucosamina. Este arreglo de moléculas es transportado por una molécula transportadora de lípidos, el isoprenil fosfato, desde el citoplasma hasta el exterior de la membrana celular en donde se une al crecimiento de cadenas poliméricas (las cadenas lineales de peptidoglucano), a partir de las cuales se forma la nueva pared celular (Stainer *et al.*, 1989). La bacitracina interfiere el proceso de transporte



uniéndose al isoprenil fosfato para formar un complejo inutilizable (Velasco *et al.*, 1993).

El último paso en la síntesis de la pared celular es un entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano mediante una reacción de transpeptidación, que es catalizada por diferentes enzimas, según las especies bacterianas (Pelczar *et al.*, 1993). Los antibióticos β -lactámicos se fijan al centro activo de la enzima y evitan la formación de los entrecruzamientos. La especificidad de penicilinas y cefalosporinas para las transpeptidasas que participan en la síntesis de la pared celular bacteriana se debe a la semejanza de la estructura tridimensional de estos antibióticos a la de la D-ala-D-ala, que es lugar de la cadena del peptidoglucano al que se fijan estas enzimas (F. Jane, 1993).

2) Compuestos que actúan de modo indirecto en la membrana celular del microorganismo, por lo que afectan su permeabilidad y permiten la fuga de compuestos intracelulares; entre ellos están la *polimixina* y *el colistimetato* y los antimicóticos poliénicos *nistatina* y *anfotericina B*, que se ligan a esteroides de la pared del microorganismo (Goodman & Gilman, 1996).

Si la integridad de la membrana celular se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere. El empleo de agentes que afectan a la membrana celular en la terapéutica antiinfecciosa se debe al hecho de que las membranas celulares de ciertos hongos y bacterias son más fáciles de alterar que las de los animales, lo cual permite una actividad quimioterápica relativamente



selectiva. Por ejemplo, las polimixinas son activas especialmente frente a bacterias gram-negativas, actuando como un detergente catiónico sobre membranas que son especialmente ricas en fosfatidil-etanolamina (Velasco, *et al.*, 1993).

3) Compuestos que se unen a la unidad ribosómica 30S y alteran la síntesis proteínica; este grupo de antibacterianos incluyen, *tetraciclinas*, *cloranfenicol*, *eritromicina* y *clindamicina*, además de los *aminoglucósidos*, que a diferencia de los antibacterianos antes mencionados, tienen un efecto bactericida (F. Jane, 1993).

La síntesis de proteínas tiene lugar gracias a la traducción de la información genética codificada en el RNAm. La síntesis se realiza en los ribosomas en tres etapas: iniciación, elongación (que comprende tres fases, reconocimiento, transferencia y translocación) y terminación. El ribosoma 70S, que a su vez está compuesto por dos subunidades, 30S y 50S, es la unidad funcional de la síntesis proteica en las bacterias (Pelczar *et al.*, 1993).

Los aminoglucósidos se fijan irreversiblemente a la subunidad 30S de los ribosomas e inhiben la síntesis en diferentes puntos, bloqueando la actividad normal del proceso de iniciación, interfiriendo la fijación del RNAt y distorsionando el codón del RNAm, con lo que hay una lectura equivocada del mensaje genético y una síntesis de proteínas no funcionales (Palomino and Pachón, 2003). Las tetraciclinas tienen un mecanismo de acción parecido a los aminoglucósidos en cuanto a que también se fijan a los ribosomas, pero el efecto inhibitorio de las tetraciclinas depende de la



acumulación activa de este antibiótico en el interior de las bacterias, con lo que se produce toxicidad (Rodríguez *et al.*, 1998).

El cloranfenicol se fija a la subunidad 50S inhibiendo una peptidil-transferasa (en la enlogación); la clindamicina también se une a la subunidad 50S pero este antibiótico inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas. Los macrólidos tienen su efecto inhibiendo la translocación, la tercera fase de la enlogación en la síntesis de proteínas (Escolar *et al.*, 1998).

4) Medicamentos que afectan el metabolismo de ácidos nucleicos. Existen tres posibles mecanismos por los que los antimicrobianos pueden modificar la síntesis o función de los ácidos nucleicos: pueden interferir con la replicación del DNA; logran impedir la transcripción o bien, consiguen inhibir la síntesis de metabolitos esenciales. A través del primero de estos mecanismos actúan las quinolonas, ya que inhiben la enzima DNA girasa. Esta enzima corta la doble hélice del DNA cromosómico en fragmentos a los que superenrolla en sentido negativo, para posteriormente proceder al sellado de los extremos de DNA que fueron cortados. Las quinolonas impiden el cierre de los puntos de los extremos de ruptura (Azanza *et al.*, 2000).

Los fármacos que impiden la transcripción, como la rifampicina y la actinomicina, inhiben a la RNA polimerasa. La primera (la rifampicina) se fija a la subunidad B de la enzima impidiendo la formación completa de esta enzima y del complejo que



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

inicia la transcripción, mientras que la actinomicina bloquea la progresión de la RNA polimerasa en cualquier fase (Velasco *et al.*, 1993).

La síntesis de los ácidos nucleicos se interrumpe cuando se bloquea la formación de las bases púricas y pirimídicas. El ácido fólico actúa como coenzima para la transferencia de unidades monocarbonadas de una molécula a otra, un paso necesario para la síntesis de timidina y otros nucleótidos. El ácido fólico debe de ser sintetizado a partir de ácido p-aminobenzoico (PABA) en las bacterias. Las sulfamidas inhiben competitivamente la incorporación del PABA para la formación de ácido fólico, de aquí su efecto selectivamente antibacteriano. Las diaminopirimidas (trimetoprim, pirimetamina, metotrexato) inhiben a la dihidrofolato reductasa, impidiendo el paso de ácido fólico a ácido folínico, paso necesario para la síntesis de bases púricas y pirimídicas (Hospital de la Universidad de Wisconsin, 1996; Azanza *et al.*, 2000).

5) Antimetabolitos como el *trimetoprim* y las *sulfonamidas* que bloquean fases metabólicas específicas que son esenciales para los microorganismos (Chambers, 1996).

6) Análogos de ácidos nucleicos, que bloquean a las enzimas virales que son esenciales para la síntesis de DNA y así impiden la replicación viral, como *zidovudina*, *ganciclovir*, *vidarabina* y *aciclovir*, (Goodman & Gilman, 1996).



1.2.2 Efecto bacteriostático o bactericida.

Los antimicrobianos bacteriostáticos son aquellos que, a las concentraciones que se alcanzan en el suero o los tejidos, inhiben el crecimiento y la multiplicación bacteriana, pero permaneciendo viables las bacterias de forma que al retirar el antimicrobiano los microorganismos pueden multiplicarse de nuevo. Se incluyen dentro de este grupo: cloranfenicol, lincosamidas, macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas o trimetoprim.

Se definen como bactericidas los que producen la lisis de las bacterias, por una variedad diferentes de mecanismos; con efectos irreversibles. Dentro de este grupo están; aminoglucósidos, β -lactámicos, fosfomicina, nitrofurantoínas, polipéptidos, quinolonas, rifampicina y vancomicina (Fundación Farmaindustria, 2004).

Algunos antibióticos pueden actuar como bacteriostáticos o como bactericidas, dependiendo de la concentración en la que estén, es decir, cuando la concentración de un antibiótico que esta produciendo un efecto bacteriostático aumenta, comienza a producir un efecto bactericida y viceversa (FDI Commission, 1999).



1.2.3 Espectro de actividad.

El número de clases o especies de microorganismos sobre los que puede actuar un antimicrobiano se conoce como espectro de actividad. Puede actuar sobre bacterias, hongos o protozoos, o más de uno de ellos, o sobre muchas especies bacterianas (espectro amplio), un número limitado (espectro intermedio) o sobre una sola o unas pocas (espectro reducido). La mayor parte de los antimicrobianos son de espectro intermedio (aminoglucósidos, macrólidos); de amplio espectro se suele definir a tetraciclinas, cloranfenicol y algunos β -lactámicos y de espectro reducido a los antibacterianos como la isoniacidina, que actúa solamente frente a *M. tuberculosis*. Sin embargo, debe señalarse que el concepto de amplio espectro puede ser equivoco cuando se emplea como sinónimo de mejor, ya que en principio debe de ser de elección el antimicrobiano de efecto más específico sobre el patógeno causal (Velasco *et al.*, 1993).

1.2.4 Biosíntesis

Esta es una clasificación poco usada actualmente. Según su biosíntesis, los antibióticos se pueden clasificar en (Korolkovas, 1979):

- I. Antibióticos derivados de aminoácidos: cloranfenicol, penicilinas, cefalosporinas, bacitracina, viomicina, cicloserina, gramicidina, tirocidina, polimixina, colistina, capreomicina.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

- II. Antibióticos derivados de carbohidratos: estreptomicina, kanamicina, neomicina, gentamicina, lincomicina.
- III. Antibióticos derivados principalmente del acetato y del propionato: macrólidos, poliénicos, tetraciclinas.
- IV. Antibióticos varios: rifamicinas, vancomicina, novobiocina.

1.3 Antibióticos más frecuentemente empleados en la clínica.

Los antibióticos se agrupan en familias o grupos según tengan en común su composición química o actúen sobre la misma estructura de la bacteria, características que condicionarán sus indicaciones terapéuticas. En la tabla 1 se resume la clasificación de los antibióticos de acuerdo a familia estructural química a la cual pertenecen; en la tabla 2 se exponen algunos de los grupos de antibióticos más frecuentemente utilizados en la clínica habitual.

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por familias

FAMILIA	ACCIÓN	ANTIBIÓTICO(S)
Aminoglucósidos	Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al RNA ribosomal 30S.	- Amikacina (semi-sintético derivado de la kanamicina A). - Gentamicina (producido por fermentación de <i>Micromonospora purpurea</i> o <i>M. echinospora</i>). - Kanamicina (producido por <i>Streptomyces kanamyceticus</i>). - Netilmicina (semi-sintético de amplio espectro).

(Continúa)



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por familias (continuación)

FAMILIA	ACCIÓN	ANTIBIÓTICO(S)
Cefalosporinas (derivados β-lactámicos)	Interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana.	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalotina (semi-sintética) - Cefazolina (semi-sintético derivado del ácido 7-aminocefalosporínico). - Cefoperazona (de 3ra generación de amplio espectro). - Cefotaxima (de 3ra generación de amplio espectro). - Ceftazidima (de 3ra generación). - Ceftriaxona (de 3ra generación).
Fenicoles	Inhibe la síntesis protéica	- Cloranfenicol
Macrólidos	Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al RNA ribosomal 30S.	<ul style="list-style-type: none"> - Azitromicina (semi-sintético relacionado con la eritromicina). - Lincomicina (producido por <i>Streptomyces lincolnensis</i> var. <i>lincolnensis</i>).
Penicilinas (β-lactámicos)	Interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido clavulánico (inhibidor de la β-lactamasa, producido por <i>Streptomyces clavuligerus</i>) - Ampicilina (semi-sintética relacionada estructuralmente con la penicilina). - Amoxicilina (semi-sintética relacionada estructuralmente con la penicilina). - Aztreonam (primer antibiótico totalmente sintético, β-lactámico monocíclico). - Carbenicilina (semi-sintética relacionado con la penicilina). - Ticarcilina (semi-sintético, relacionado con la penicilina, de amplio espectro).
Péptidos	Interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana.	- Bacitracina (complejo polipeptídico producido por <i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>).
Quinolonas	Inhiben enzimas involucradas en la replicación del ADN.	- Nal-quinolona
Tetraciclinas	Inhibe la síntesis de proteínas al unirse al RNA ribosomal 30S	- Tetraciclina
Trimetroprim	Inhibe la síntesis del ADN al interferir con la síntesis de ácido tetrahidrofólico	- Trimetroprim-sulfametoxazol

Tabla 1. En la tabla se presenta un resumen de los antibióticos clasificados según la familia a la cual pertenecen, además de describirse la acción de cada una de las familias.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 2. Antibióticos más utilizados en la clínica.

ANTIBIÓTICO	INFECCIÓN
Aminoglucósidos	Infecciones graves
Beta-lactámicos	Infecciones graves Infecciones nosocomiales Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía) Profilaxis quirúrgica
Fenicoles	De segunda elección en abscesos cerebrales De segunda elección en salmonelosis Meningitis
Glucopéptidos	De segunda elección en la profilaxis quirúrgica Infección de las prótesis Infección del corazón Infección del hueso
Macrólidos	Enfermedades de transmisión sexual Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía)
Quinolonas	Gonorrea Infección cutánea Infección del hueso Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía) Infecciones urinarias
Rifamicinas	Brucelosis Meningitis TBC
Sulfonamidas	De segunda elección a la profilaxis de la meningitis De segunda elección al tratamiento de la malaria Diarrea del viajero Infecciones respiratorias (por ejemplo, neumonía) Infecciones urinarias Toxoplasmosis
Tetraciclinas	De segunda elección en el tratamiento de la malaria De segunda elección en infecciones respiratorias Brucelosis Cólera Diarrea del viajero Fiebre Q Gonorrea Sífilis Tifus

Tabla 2. Fuentes: Azanza *et al.*, 2000; Cesur, 2002; Ernst *et al.*, 1998; Escolar *et al.*, 1998; Gallego *et al.*, 2002; Jurado, 2002; Martín *et al.*, 1998; Palomino and Pachón, 2003; Sábada *et al.*, 1998; Yu V. L., 1997



1.4 Uso de los antibióticos.

Junto con las medidas de higiene y salubridad, los antibióticos suponen uno de los más importantes puntos de inflexión en la mortalidad en el siglo XX.

El descubrimiento de los agentes causales (los microorganismos causantes) y, como consecuencia el posterior desarrollo de los antibióticos, han hecho posible el control y/o la curación de la gran mayoría de enfermedades infecciosas. Los antibióticos, descubiertos hace tan sólo 75 años constituyen actualmente la piedra angular en el tratamiento de enfermedades infecciosas que durante siglos han causado gran sufrimiento a la humanidad (Fundación Farmaindustria, 2004). La época actual de la quimioterapia antimicrobiana comenzó con el empleo de la sulfonilamida en seres humanos en 1936. ya que hasta entonces el tratamiento se basaba en la acción de iones metálicos, que actuaban indistintamente sin discriminar a las células procariotas de las eucariotas, siendo por lo tanto igual de dañinos para el propio organismo humano que para el microbio invasor (Goldworthy and McFarlane, 2002).

La “época de oro” de los antibióticos comenzó con la producción de penicilinas en 1941, fecha en que se produjo en forma masiva dicho compuesto y se le pudo obtener para estudios ilimitados en seres humanos. Cuando menos 30% de todos los sujetos hospitalizados en la actualidad recibe uno o más ciclos de antibioticoterapia, y los compuestos de esta categoría han curado millones de infecciones que pudieran ser letales (Goodman & Gilman, 1996). En pocos



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

decenios se han descubierto antibióticos para enfermedades que habían provocado epidemias, e incluso pandemias, entre la población mundial.

Las enfermedades infecciosas son enfermedades provocadas directamente por la presencia o multiplicación de microorganismos en el organismo (Ausina y Arnal, 2000).

La gran mayoría de las enfermedades de origen conocido son producidas por agentes biológicos. La importancia de las enfermedades infecciosas radica en su alta incidencia y la necesidad de implantar medidas de salud pública para evitar que se expandan a través del contagio (Petersdorf and Root, 1987).

El triángulo de Davis que se muestra en la figura 2, describe la relación de equilibrio entre el hombre (huésped) y el medio que lo rodea: el ser humano se encuentra expuesto de forma habitual y continua a multitud de microorganismos. Normalmente existe un equilibrio entre estos agentes y el huésped. Los microorganismos causan la enfermedad ante la disminución en las defensas del huésped (alteración del sistema inmunitario), o bien cuando la cantidad de microorganismos infecciosos supera la capacidad defensiva del huésped (gran inóculo), y en aquellas situaciones en que el ser humano no reconoce el microorganismo, ya sea como consecuencia de ser la primera vez que se enfrenta a él, o bien porque el microorganismo ha sufrido una serie de cambios o mutaciones que lo hacen irreconocible. Ante estas situaciones se produce un



desequilibrio entre el agente infeccioso y el huésped, que resulta en la aparición de la enfermedad infecciosa (Kindelán, *et al.*, 2002).

FIGURA 2. Triángulo de Davis

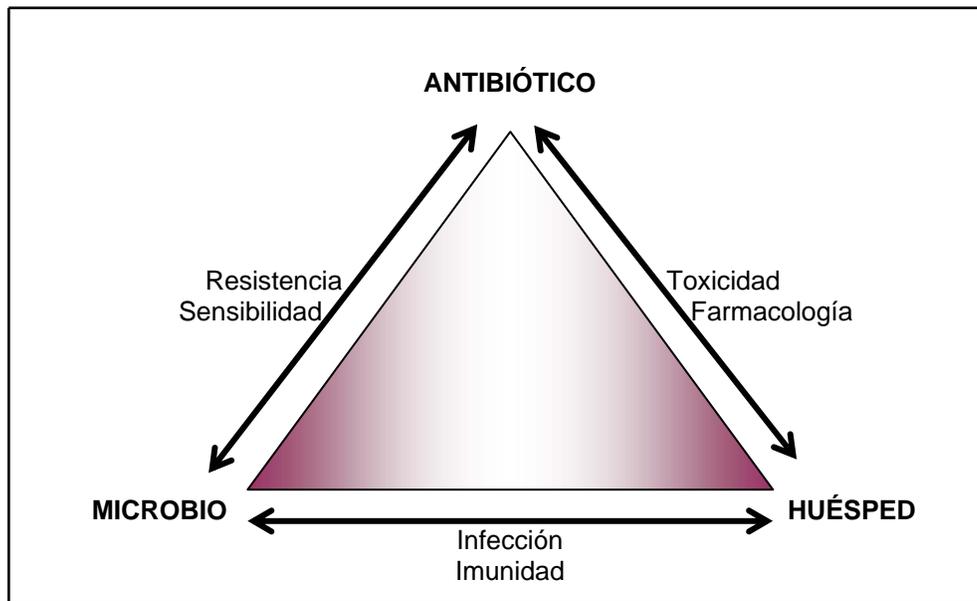


Figura 2. Descripción de la relación de equilibrio entre el hombre (huésped) y el medio que lo rodea.
Fuente: Kindelán *et al.*, 2002

El descubrimiento y desarrollo de los antibióticos es fruto de la inversión en investigación, tiempo y trabajo humano a lo largo de decenios por la industria farmacéutica. La investigación en el campo de los antibióticos tiene, y ha tenido, dos grandes vertientes. Por una parte la modificación de moléculas a partir de los antibióticos originales y, por otra, la síntesis de moléculas nuevas, capaces de actuar en una cepas de bacterias originalmente no susceptibles a antibióticos o con mayor potencia. La actividad de un antibiótico se define por tanto por su espectro antibacteriano, es decir, los distintos grupos de bacterias sobre los que



actúan por su poder bactericida, y su potencia antibacteriana (Fundación Farmaindustria, 2004).

La penicilina fue el primer antibiótico que se descubrió, y demostró ser tan eficaz para combatir infecciones anteriormente mortales que los científicos le dieron el sobrenombre del "medicamento milagroso". El descubrimiento de Fleming desencadenó una revolución sanitaria sin precedentes en los anales de las ciencias médicas (Diggins, 1999; 2000). Desde entonces la innovación ha sido constante, y en los últimos años se han creado moléculas derivadas de varios de los antibióticos ya existentes, mejorando su efectividad y su selectividad, a la vez que se han desarrollado nuevos medicamentos y se han mejorado las pautas y vías de administración y el perfil de tolerabilidad de los antibióticos disponibles. Estos medicamentos han salvado millones de vidas, han reducido la morbilidad y han permitido el desarrollo de complejos procedimientos quirúrgicos que antes se consideraban demasiado peligrosos debido a las infecciones post-operatorias asociadas, así como han contribuido a mejorar el control de las infecciones neonatales. Al mismo tiempo, los antibióticos han evitado discapacidades como sordera, ceguera y deformaciones causadas por enfermedades infecciosas (Cesur, 2002; Poschl *et al.*, 2003).

Además, los antibióticos se han desarrollado facilitando la disponibilidad de diversas vías de administración, oral, parenteral (endovenosa o intramuscular) o tópica que permiten cubrir diversas necesidades terapéuticas y maximizar siempre que es posible la comodidad del paciente y su satisfacción con el tratamiento,



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

evitando además los ingresos hospitalarios no estrictamente necesarios (Barie, 2000).

La mayoría de los antibióticos tienen más de una indicación terapéutica, es decir, un antibiótico puede curar más de una enfermedad infecciosa. Del mismo modo, una misma enfermedad puede ser curada por antibióticos distintos (bien sean de la misma familia o de familias distintas). La elección del antibiótico, vía de administración y dosificación, dependerá de su poder antibacteriano, de su capacidad de penetración en los diferentes órganos, de su toxicidad potencial y sobre todo de las características de la enfermedad bacteriana responsable del proceso (Fundación Farmaindustria, 2004).



2. ANTIBIÓTICOS EN LOS ALIMENTOS

Los antimicrobianos han sido usados como aditivos en alimentos para animales destinados para consumo humano en Norte América y Europa desde hace casi medio siglo. Entre los más comunes se usan los medicamentos que son idénticos o que están relacionados a los administrados en los humanos, como son las penicilinas, tetraciclinas, cefalosporinas (incluyendo a las cefalosporinas de tercera generación), fluoroquinolonas, avoparcina (un glicopéptido que esta relacionado a la vancomicina), y virginiamicina (Sherwood and Gorbach, 2001).

En 1946 se informó que algunos antibióticos, incorporados a los alimentos en muy pequeñas proporciones, estimulaban el desarrollo de los pollos (estreptomina y sulfasuxidina). Una vez comprobada la ampliación bacteriostática de diversos antibióticos, surgió la esperanza de poder aplicarlos a la preservación de alimentos frescos perecederos en el caso de que fueran efectivos en dosis muy por de bajo de las profilácticas (Huertas, 2000).

Desde 1950, con la aparición de las tetraciclinas, la aplicación de los antibióticos cobró un mayor impulso tanto que, hacia 1955, se estimaba que el 13% de la producción de antibióticos se destinaba a estimular el desarrollo de distintos animales domésticos, especialmente las tetraciclinas, la penicilina y la bacitracina. En la actualidad se calcula que un 50% de todos los antimicrobianos producidos en Estados Unidos son administrados a los animales, en su mayoría en dosis



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

subterapéuticas; un estimado de 11.2 millones de kg de antimicrobiales, son administrados a animales con propósitos no terapéuticos y 900, 000 kg son usados como terapia; en contraste, sólo 1.3 millones de kg de antibióticos son consumidos por humanos (Mellon *et al.*, 2001).

El uso de antimicrobianos en relación con los animales tiene tres formas: como profilaxis, tratamiento y promoción del crecimiento. Así, un gran número de animales resulta expuesto a dosis frecuentes de antimicrobianos en dosis subterapéuticas (Dupont and Steele, 1987).

2.1 Antibióticos usados en la acuicultura.

Una de las principales características de la acuicultura intensiva es el manejo de altas densidades de organismos cultivados en un reducido volumen de agua, con el objeto de obtener proteína de origen animal para consumo humano, harina de pescado para la elaboración de alimento de animales y reproducción de peces de ornato. En tales condiciones las enfermedades infecciosas representan una continua amenaza para la obtención de una producción exitosa (Pillay, 1977).

En México tradicionalmente se ha desarrollado la acuicultura con fines de consumo humano, deportivo y esparcimiento. Sin embargo, últimamente el



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

“acuarismo” ha cobrado fuerte interés como estrategia importante de ingreso de divisas (Negrete *et al.*, 2004).

Como una forma de minimizar el impacto de las enfermedades, la industria acuícola hace uso de antibióticos, antiparasitarios y desinfectantes para controlar y prevenir la diseminación de los patógenos entre los diferentes stock de peces sometidos a crianza (Alderman, 2002). En la tabla tres se muestran los principales antimicrobianos usados en la acuicultura a nivel mundial, así como las dosis empleadas de cada uno.

Tabla 3. Principales drogas antimicrobianas reportadas para la acuicultura mundial en 1992.

GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICO	DOSIS
Beta-lactámicos	Ampicilina Amoxicilina	50-80 mg/kg/10 días 50-80 mg/kg/10 días
Aminoglucósidos	Neomicina Kanamicina	50-80 mg/kg/10 días 20 mg/ l
Tetraciclinas	Tetraciclina Oxitetraciclina Doxiciclina	50-80 mg/kg/10 días 50-80 mg/kg/10 días 20 mg/ l
Macrólidos	Eritromicina	50mg/kg/10 días
No-clasificados	Cloranfenicol	50-80 mg/kg/10 días
Sulfonamidas	Sulfamerazina Sulfadimetoxina Sulfaguanidina	200 mg/kg/ 10 días 200 mg/kg/ 10 días 200 mg/kg/ 10 días
Sulfonamidas potenciadas	Trimetropin+ sulfadiazina	50mg/kg/10 días
Nitrofuranos	Furazolidona Furaltadona Nifurpirinol	50-80 mg/kg/10 días 50-80 mg/kg/10 días 10-50mg/kg/10 días
Quinolonas Fluoroquinolonas	Ácido oxolinico Flumequina	12mg/kg/10 días 12mg/kg/10 días

Tabla 3. Fuente: Alderman and C. Michel, 1992



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Las enfermedades son la principal causa de las pérdidas económicas en la acuicultura. Las pérdidas económicas atribuidas a las enfermedades hasta ahora están sustentadas en las mortalidades provocadas directamente por las enfermedades, sin contemplar las pérdidas en peso, pérdidas en calidad y los costos incurridos por efecto de los tratamientos empleados para su control, además de los costos incurridos para su prevención. Las enfermedades están presentes en las distintas etapas de desarrollo de los organismos acuáticos sometidos a cultivos. Sin embargo, son los peces los que han sido severamente abatidos por los patógenos, con un fuerte impacto económico y las enfermedades han estado presentes en cada una de las etapas de desarrollo de los peces cultivados (Bravo *et al.*, 2005).

La acuicultura considera dos etapas en el desarrollo de los peces, en las cuales se usan diferentes antibióticos; estas etapas son:

Fase de agua dulce: Los medicamentos utilizados en esta etapa están relacionados principalmente con el control de hongos, parásitos y myxobacterias, que están presentes en los cuerpos de agua dulce y que forman parte de los patógenos habituales de los peces silvestres. Como la mayoría de estos patógenos son externos, localizados en la superficie corporal y branquias, los tratamientos empleados para su control corresponden a desinfectantes aplicados a través de baños.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Fase Mar: Esta es la fase más complicada, al registrarse las principales pérdidas económicas de la industria, producto de las enfermedades, y los mayores volúmenes de antibiótico usados para su control. Entre los patógenos de mayor impacto para la industria acuícola se destacan (Bravo, 1998):

- *Piscirickettsia salmonis* (Salmonid Rickettsial Septicaemia = SRS). Patógeno intracelular de alta peligrosidad para la acuicultura.
- *Renibacterium salmoninarum* (Bacterial Kidney Disease = BKD). Al igual que *Piscirickettsia*, esta bacteria es intracelular, por lo que el control de la enfermedad no es completamente efectivo con los antimicrobianos disponibles actualmente en el mercado.
- *Aeromonas salmonicida atípica*: Enfermedad bacteriana de fácil control a través de antibacterianos, para la cual actualmente existen vacunas disponibles en el mercado.
- **Streptococosis**. Enfermedad bacteriana asociada a *Streptococcus phocae*, controlada con antibacterianos y para la cual actualmente existen autovacunas disponibles para su prevención.
- **Vibriosis** Enfermedad bacteriana causada por *Vibrio ordalii*, de aparición reciente y restringida hasta ahora al salmón del Atlántico. Es controlada a través de antibacterianos y también se han desarrollado autovacunas para su prevención.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

En la tabla 4 y 5 se enlistan los antibióticos usados en cada etapa de producción en la acuicultura del salmón en Chile, así como los antibióticos usados contra las diferentes patologías que afectan a los peces.

Tabla 4. Antibacterianos usados por la industria del salmón en Chile en la fase de agua dulce.

Patología	Antibacteriano	Vía de administración	Dosis	Periodo de aplicación
Flavobacteriosis	Florfenicol	Oral	20-25 mg/kg pez/día	10-14 días
	Florfenicol	Baño	20 ppm	1 hora
	Oxitetraciclina	Oral	100-120 mg/kg pez/día	14-21 días
	Oxitetraciclina	Baño	40-100 ppm	1 hora
	Amoxicilina	Oral	80-100 mg/kg pez/día	7-10 días
	Amoxicilina	Baño	80 ppm	1 hora
Yersenosis	Sulfa+trimetoprim	Oral	33 mg/kg pez/día	7-10 días

Tabla 4: **Tratamiento vía oral:** la droga se incorpora en el alimento y así lo ingieren los peces.

Tratamiento por baño: El medicamento es adicionado al agua de la unidad de cultivo a tratar, se cierra previamente la entrada y salida de agua para lograr un volumen de agua conocido y constante durante el tiempo de tratamiento (generalmente 1 hora). Una vez finalizado el tratamiento se restaura el flujo normal de agua. Fuente: Aquatic Health. 2004.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 5. Antibacterianos usados por la industria del salmón en Chile en la fase de mar.

Patología	Antibacteriano	Vía de administración	Dosis	Periodo de aplicación
SRS	Flumequina	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
	Ácido oxolínico	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
	Oxitetraciclina	Oral	100-120 mg/kg pez/día	14-21 días
	Oxitetraciclina	Inyectable	30-35 mg/kg pez/día	-----
	Florfenicol	Oral	20 mg/kg pez/día	10-14 días
BKD	Eritromicina	Oral	100 mg/kg pez/día	21 días
	Eritromicina	Inyectable	20 mg/kg pez/día	-----
	Oxitetraciclina	Oral	100-120 mg/kg pez/día	21 días
Furunculosis atípica	Flumequina	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
	Ácido oxolínico	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
Vibriosis	Flumequina	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
	Ácido oxolínico	Oral	20-30 mg/kg pez/día	14-21 días
	Oxitetraciclina	Oral	100-120 mg/kg pez/día	14-21 días
Estreptococosis	Oxitetraciclina	Oral	100-120 mg/kg pez/día	21 días
	Eritromicina	Oral	50-100 mg/kg pez/día	12-21 días
	Florfenicol	Oral	20 mg/kg pez/día	10-14 días

Tabla 5: **Tratamiento vía oral:** la droga se incorpora en el alimento y así lo ingieren los peces.

Tratamiento por inyección: Normalmente utilizado para tratar un número reducido de peces, generalmente adultos valiosos (reproductores). El medicamento se inyectado por diferentes vías: subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Fuente: Aquatic Health. 2004.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

El proceso de aprobación de drogas para uso en acuicultura varía entre cada país y continente. En la tabla 6 se presenta un listado de drogas aprobadas para la acuicultura en Japón, Australia, Europa, Canadá y Estados Unidos (Schnick *et al.*, 1997).

Tabla 6. Antimicrobianos aprobado para su uso en la acuicultura

ANTIMICROBIANOS	JAPÓN	AUSTRALIA	EUROPA	CANADÁ	EEUU
Amoxicilina	X	---	X	---	---
Ampicilina	X	---	---	---	---
Bicozamcina benzoato	X	---	---	---	---
Cianfenicol	X	---	---	---	---
Doxiciclina	X	---	---	---	---
Eritromicina	X	---	---	---	---
Florfenicol	X	---	X	X	---
Flumequina	X	---	X	---	---
Yosamicina	X	---	---	---	---
Kitasamicina	X	---	---	---	---
Lincomicina	X	---	---	---	---
Miroxacina	X	---	---	---	---
Ácido Nalidixico	X	---	---	---	---
Acido Nifurtilénico	X	---	---	---	---
Novobiocina	X	---	---	---	---
Oleandomicina	X	---	---	---	---
Acido oxolínico	X	---	X	---	---
Oxitetraciclina	X	---	X	X	X
Penicilina-dihydrostreptomycin	---	---	X	---	---
Fosfomicina	X	---	---	---	---
Acido pirimidico	X	---	---	---	---
Espiramicina	X	---	---	---	---
Sulfadiazina- trimetropin	---	---	X	X	---
Sulfadimetoxina	X	---	---	---	---
Sulfadimetoxina-ormetoprin	---	---	---	X	X
Sulfamerazina	---	---	X	---	X
Sulfamonometoxina	X	---	---	---	---
Sulfamonometoxina-ormetoprim	X	---	---	---	---
Sulfisoxazol	X	---	---	---	---
Tiamfenicol	X	---	---	---	---

Tabla 6. En esta tabla se muestran los antibióticos aprobados para la industria acuícola de algunos lugares, X: antimicrobianos aprobados y usados en cada lugar; --- : antimicrobianos no aprobados. Fuente: Schnick *et al.*, 1997.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

En nuestro país no existe alguna normatividad sobre el control o uso de antibióticos en la acuicultura o en el pescado destinado al consumo humano, ya que las normas publicadas solo se aplican a los productos procedentes de la pesca. Estas normas son emitidas por organismos e instituciones como Secretaría de Salud (Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, Dirección General de Salud Ambiental y Laboratorio Nacional de Salud Pública), Secretaría de Pesca, Dirección General de Promoción Pesquera, Instituto Nacional de la Pesca, Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología) y la Cámara Nacional de la Industria Pesquera; en ninguna de estas normas se habla del uso de antibióticos en el pescado destinado a consumo humano. Las normas vigentes y de uso en México que aplican a los productos de la pesca son: Norma Oficial Mexicana NOM-027-SSA1-1993, Bienes y Servicios. "Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados". Especificaciones sanitarias; Norma Oficial Mexicana NOM-028-SSA1-1993, Bienes y servicios. "Productos de la pesca. Pescados en conserva". Especificaciones sanitarias; Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA1-1993, Bienes y servicios. "Productos de la pesca. Crustáceos frescos-refrigerados y congelados". Especificaciones sanitarias; Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA1-1993, Bienes y servicios. "Productos de la pesca. Crustáceos en conserva". Especificaciones sanitarias; Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. "Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados". Especificaciones sanitarias y Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA1-



1993, Bienes y servicios. "Productos de la pesca. Moluscos bivalvos en conserva". Especificaciones sanitarias.

2.2 Microbiología del pescado destinado a consumo humano.

La carne y los órganos internos del pescado sano recién capturado son normalmente estériles, pero en la piel, agallas e intestino suelen encontrarse ciertos generos bacterianos (Silliker *et al.*, 1985).

La microflora del pez vivo depende de la carga microbiana de las aguas donde vive. En el mucílago que recubre la superficie externa del pescado se han encontrado bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio* y *Bacillus*. En el pescado de agua dulce se encuentran representantes de la mayoría de los géneros que se encuentran en las aguas saladas y, además, especies de los géneros *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, *Alcaligenes* y *Streptococcus*. En el intestino de los pescados de ambas procedencias se encuentran bacterias de los géneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Escherichia* (Bourgeois *et al.*, 1994).

El número de bacterias existentes en el mucílago y en la superficie de la piel del pescado recién capturado en el mar puede oscilar desde cifras tan bajas como



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

100/cm², a cifras del orden de 10⁷ bacterias/cm², mientras que en el líquido intestinal se pueden encontrar desde 1 000 a 10⁹ bacterias/mL. El tejido de las branquias puede albergar de 1 000 a 1 000 000 de bacterias/g (Silliker *et al.*, 1985; Frazier, 2003).

Existen dos especies bacterianas de gran importancia sanitaria que pueden formar parte de la microflora normal del pescado, se trata de *Clostridium botulinum* del tipo E y de los tipos no proteolíticos B y F y de *Vibrio parahaemolyticus*. Otras bacterias patógenas asociadas al pescado son *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae* (Silliker *et al.*, 1985).

El número de microorganismos existentes en la piel del pescado puede estar influido por los sistemas de pesca. Por ejemplo, el sistema de pesca de arrastre en el que las redes recorren el fondo del mar durante un tiempo prolongado, da como resultado que el pescado esté expuesto a los elevados recuentos de bacterias del sedimento removido del fondo, y este elevado número de bacterias se puede reflejar en la carga microbiana inicial de la superficie del pescado (Adams and Moss, 1997).



2.2.1. Conservación del pescado

Los principales problemas microbiológicos asociados al pescado son su aprovechamiento y la conservación de su calidad.

Las bacterias que con mayor frecuencia intervienen en la alteración del pescado forman parte de la flora propia del mucílago que recubre el cuerpo de los peces y de la flora de su contenido intestinal. De todos los alimentos carnosos, el pescado es el más sensible a la autólisis, a la oxidación e hidrólisis de las grasas y a la alteración por los microorganismos. Por consiguiente, su conservación supone el empleo de tratamientos rápidos. Cuando el pescado se captura lejos de la planta de tratamiento, los métodos de conservación se deben aplicar incluso en el mismo barco pesquero (Frazier and Westhoff, 2003).

Los métodos de asepsia para reducir la contaminación de los alimentos marinos son difíciles de aplicar, aunque parte de la contaminación que tiene lugar antes de tratar el pescado se puede evitar mediante una limpieza y desinfección generales de los barcos, las cubiertas, las bodegas, de los cubos y recipientes, del equipo de la planta de tratamiento y empleando hielo de excelente calidad bacteriológica.

La eliminación de los microorganismos resulta difícil, aunque el hecho de que la mayor parte de la contaminación del pescado y de los demás alimentos marinos se localiza en la parte externa de los mismos, permite eliminar muchos de los microorganismos arrastrando con agua el mucílago y la suciedad de la superficie (Bourgeois *et al.*, 1994).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Cuando las temperaturas ambientales son elevadas y las distancias a las que es preciso transportar el pescado a la planta de proceso son grandes, en el propio barco pesquero se hace necesario someter a refrigeración tanto el pescado como los productos derivados, introduciéndolos en cajas con hielo triturado o mediante refrigeración mecánica, con el fin de retardar la autólisis y la multiplicación de los microorganismos hasta que estos alimentos no sean vendidos o sometidos a otros tratamientos para conseguir que se conserven durante más tiempo. En general, el almacenamiento bajo refrigeración en la costa únicamente tiene utilidad cuando los mercados de venta al por menor están próximos y la venta es rápida. De no concurrir las citadas circunstancias, se emplea cualquier otro procedimiento de conservación, como por ejemplo la congelación. La congelación destruye algunos de los microorganismos existentes, aunque no todos, y de aquí que una vez descongelado el pescado, tendrá lugar la multiplicación de las bacterias si se les da tiempo para ello. El pescado contiene una flora de bacterias psicrótrofas, la mayoría de las cuales resisten la congelación y están disponibles para multiplicarse tras su descongelación, por ejemplo, las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium* (Silliker *et al.*, 1985).

En la gran cantidad de investigaciones llevadas a cabo para encontrar conservadores químicos que se puedan emplear para aplicarlos directamente sobre el pescado o como baños para introducir en los mismos las rodajas o los filetes de pescado, o bien incorporados en el hielo, se han ensayado numerosos



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

agentes químicos, desde aquéllos que la mayoría de los órganos de control los autorizarían, hasta otros cuyo empleo sería discutible.

El ácido benzoico y los benzoatos sólo han resultado medianamente útiles como conservadores. Tanto los nitritos como los nitratos sódicos y potásicos prolongan el período de conservación, estando permitidos en algunos países. En Europa, se ha empleado el ácido bórico para mejorar la calidad de la conservación del pescado. Otros compuestos químicos a los cuales se les atribuye haber dado buenos resultados como conservadores, aunque su empleo está contraindicado, son los siguientes: el formaldehído, los hipocloritos, el peróxido de hidrógeno, el dióxido de azufre, el ácido undecilénico, el ácido caprico, el ácido p-oxibenzóico y el cloroformo. Se ha ensayado el uso de antibióticos, empleándose generalmente como soluciones, baños o incorporándolos al hielo. De los ensayados, parece ser que los que mejores resultados han dado son la clorotetraciclina y la oxitetraciclina y en la actualidad está permitido usarlos. El cloranfenicol es medianamente eficaz, mientras que la penicilina, la estreptomina y la subtilina tienen una eficacia escasa o nula. En la actualidad, tanto el gobierno de Canadá como el de Estados Unidos y los gobiernos de otras naciones, permiten incorporar tetraciclinas al hielo que emplean los pescadores para conservar el pescado en los barcos de pesca de arrastre y durante su transporte, en la proporción de hasta 7 ppm (Frazier and Westhoff, 2003).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Los denominados hielos germicidas se preparan añadiendo un conservador químico al agua antes de congelarla. La incorporación de los antibióticos al hielo se ha ensayado por uno de los siguientes métodos:

- a. Usar hielo al que se le ha incorporado oxitetraciclina en la proporción de 5 p.p.m., con lo que se prolonga la frescura del pescado en un 150%.
- b. Sumergir o rociar el pescado con solución de 25 p.p.m. del antibiótico; se obtiene una preservación por el triple de tiempo, en comparación con el pescado sin antibiótico.

Para distribuir homogéneamente al antibiótico en el hielo se han ensayado la carragenina y la carboximetilcelulosa; se prepara primero una solución concentrada del antibiótico, el agente dispersante y el estabilizante y luego se le agrega el agua para diluir y helar (Huertas, 2000).

El objeto de aplicar conservadores químicos al pescado, ya sea directamente, o en forma de baños o como hielos germicidas, consiste en destruir o inhibir los microorganismos de la superficie del pescado, en donde, inicialmente, más abundan y son más activos (Adams and Moss, 1997).

2.3 Surgimiento de resistencia a antibióticos en el pescado.

Una granja acuícola es una empresa cuyo propósito, además de cultivar determinadas especies, es evitar las pérdidas económicas, por lo que los acuicultores deben prevenir los ingresos, la dispersión y permanencia de bacterias



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

dentro de sus instalaciones. Para evitarlo, y considerando que la mejor estrategia es la prevención, se ha usado y abusado de la aplicación de químicos y antibióticos para las infecciones, los cuales son rutinariamente incorporados en el alimento balanceado para peces (4-6 antibióticos), o son administrados directamente dentro de los estanques de cultivo, desconociendo si existe una enfermedad infecciosa, la especie de bacteria que ha infectado la producción y, en caso de que así sea, el tipo de antibiótico adecuado para destruir a la bacteria específica y la dosificación necesaria (Negrete *et al.*, 2004).

El extenso uso de los antibióticos para el tratamiento de infecciones humanas, ha resultado en un amplio esparcimiento de bacterias multiresistentes a los medicamentos en varios ambientes, incluyendo el agua. Muy probablemente estos microorganismos llegan hasta el agua del mar a través del agua de las coladeras que se vierten en el mar (Miranda and Zemelman, 2001).

La presión selectiva producida por el intenso desecho de aguas farmacéuticas dentro del mar conduce a la emergencia y mantenimiento de bacterias resistentes a antibióticos en aguas costeras (Peele *et al.*, 1981; Grimes *et al.*, 1984).

Probablemente, el alto nivel de nutrientes en el intestino de los peces aumenta el crecimiento y persistencia de bacterias resistentes a antibióticos, introducidas al océano a través de los desechos que llegan al mar; pudiéndose producir una transferencia de genes hacia las bacterias nativas que codifican la resistencia a los antibióticos (Mazodier and Davies, 1991).



2.4 ¿Es posible utilizar los antibióticos sin peligro para los consumidores? Problemas que genera el uso de antibióticos en los alimentos.

Nos encontramos ante un problema semejante al de los conservadores químicos aunque, en este caso, se trata de sustancias menos peligrosas y que se emplean en menor proporción. Pero recordemos que su acción es principalmente bacteriostática, es decir, que existe el peligro de que se encuentren presentes bacterias resistentes a su acción que se desarrollen en el alimento. También existe la posibilidad de que los microorganismos sensibles, pasado el efecto inhibitor de los antibióticos (cuya acción es relativamente breve) vuelvan a su acción y a tornar peligroso al alimento contaminado. Además, hay que tener en cuenta el peligro de la sensibilidad personal a los antibióticos (Huertas, 2000).

La administración de antimicrobianos a los animales de consumo humano puede afectar la salud de la gente debido a la presencia de residuos de fármacos en los alimentos y, especialmente, por la selección de bacterias resistentes en los animales, que amenazan nuestra vida y la de los animales. Las consecuencias de esa selección incluyen (OMS, 2001):

- El aumento del riesgo de que se transmitan agentes patógenos resistentes a las personas por contacto directo con los animales o a través del consumo de agua o alimentos contaminados.
- La transferencia de genes resistentes de la flora bacteriana animal a la humana.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Los humanos y animales constituyen un reservorio de resistencia, y consecuentemente el uso de antimicrobianos en animales puede causar un impacto en la salud pública. Por ejemplo, la presencia de enterococos resistentes a vancomicina en alimentos de origen animal está asociado con el uso de avoparcina, que es usado como un aditivo en el alimento de los animales para la promoción del crecimiento. Los enterococos resistentes a la vancomicina y los determinantes de la resistencia pueden diseminarse de animales a humanos (Wegener, 2003).

Los factores que inciden en la aparición de resistencia a los antibióticos en los animales de consumo humano aparentemente son similares a los que causan resistencia entre los seres humanos. Por lo general, los antibióticos usados en animales ni siquiera se consideran como medicamentos y, por ende, no tienen licencia o solo requieren licencia como aditivo alimentario (WHO, 1997).

Otra preocupación por el uso de antibióticos en los alimentos es el esparcimiento horizontal de genes, desde bacterias resistentes a fármacos que se encuentran en los alimentos de origen animal, a las bacterias de la microflora intestinal de los humanos. La transferencia de genes de resistencia a antibióticos ha sido demostrada entre bacterias entéricas y bacterias gram-positivas del colon humano. Estos organismos sirven como reservorio de genes de resistencia que pueden ser transferidos a otros miembros de la microflora o a bacterias patógenas (Sherwood and Gorbach, 2001).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Algunos antimicrobianos cuando se administran en cantidades subterapéuticas en la alimentación de los animales humano alteran la flora intestinal de los animales expuestos, de modo que frecuentemente contienen bacterias resistentes al antibiótico usado. Cuando los antibióticos usados son de una clase similar a la de los fármacos que se usan en medicina humana, las bacterias resistentes de los animales a menudo también son resistentes a antimicrobianos importantes de uso humano; esto es lo que se denomina resistencia cruzada (Aarestrup, 1998).

A medida que fue aumentando la preocupación a los microorganismos resistentes a los antibióticos simultáneamente fue disminuyendo el empleo de éstos como conservadores de los alimentos. La Unión Europea recientemente prohibió el uso de bacitracina, tilosina, espiramicina, virginiamicina y avoparicina por temor a la posible resistencia cruzada (Hammerum *et al.*, 1998).



3. FACTORES QUE RIGEN LA RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS A LOS ANTIMICROBIANOS EN LOS SERES HUMANOS

Cada vez que se ha puesto en uso un nuevo agente antibacteriano en el ámbito clínico, el laboratorio ha detectado a continuación cepas de microorganismos resistentes al mismo, a nivel nosocomial y también comunitario, es decir, cepas que pueden reproducirse en presencia de concentraciones mayores del fármaco de las que se administra a las personas en dosis terapéuticas. Este tipo de resistencia puede resultar de una característica de toda la especie o presentarse entre cepas de distintas especies que por lo general son sensibles, pero desarrollan resistencia por mutación o transferencia genética. Los genes resistentes codifican varias proteínas por medio de las cuales los microorganismos pueden resistir los efectos inhibitorios de agentes antimicrobianos específicos. Tales mecanismos también generan resistencia a otros antimicrobianos de la misma clase y, a veces, a muchos compuestos de diferentes clases (WHO, 1998).

Todos los agentes antimicrobianos tienen el potencial de seleccionar subpoblaciones de microorganismos farmacoresistentes. Es más, con el amplio uso que se da a estos medicamentos, la prevalencia de la resistencia a cada fármaco nuevo ha ido aumentando (Williams, 2001).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Hay muchas pruebas que avalan la posición de que el consumo total de antibióticos es el elemento fundamental de la selección de la resistencia. No obstante, la relación entre uso y resistencia no constituye una simple correlación ya que, en particular, poco se conoce sobre la contribución relativa del modo de empleo (dosis, duración del tratamiento, vía de administración, intervalo entre dosis) en comparación con la del consumo total. Paradójicamente, el uso insuficiente debido a la falta de accesos, dosis inadecuadas, incumplimiento o productos de mala calidad pueden ser tan importantes en cuanto a la resistencia, como el uso excesivo. El uso inadecuado de antimicrobianos no da los resultados terapéuticos esperados y se asocia con la generación de resistencia (OMS, 2001).

Las infecciones bacterianas que generan más enfermedades entre los seres humanos son también las que presentan más resistencia a los antimicrobianos. Se han agrupado en cuatro grupos clave (Nicolle, 2001):

- Diarrea
- Infecciones del aparato respiratorio y meningitis
- Infecciones de transmisión sexual
- Infecciones nosocomiales

En las tablas 7 y 8 se presentan algunos factores importantes que rigen la resistencia de algunos microorganismos en enfermedades diarreicas e infecciones nosocomiales; así como la intervención que debería de existir de algunos grupos para poder combatir la resistencia a antibióticos.



TABLA 7. INFECCIONES BACTERIANAS: ENFERMEDADES DIARREICAS CAUSADAS POR BACTERIAS

Agente patógeno	Factores importantes				
	Uso humano inadecuado en la comunidad	Uso humano inadecuado en el hospital	Uso inadecuado en la industria agropecuario	Importancia de la vigilancia de la resistencia antibacteriana	Vacunas potencialmente importantes para uso futuro
<i>Campylobacter</i> spp.	+/-	-	+++	++	-
<i>Shigella</i> spp.	++	-	+/-	++	-
<i>Salmonella</i> spp:					
<i>S. typhi</i> y <i>S. paratyphi</i>	++	-	-	+++	+
Salmoneras no tifoideas	-/+	-	+++	+++	-
<i>Vibrio cholerae</i>	+ / ++	-	-	+++	+
Enfermedades diarreicas como un todo	+		++/++	+++	-/+

↓

Alta prioridad intervenciones de los grupos 1, 2, 5 y 7

↓

Alta prioridad intervenciones de los grupos 4 y 7

↓

Alta prioridad intervenciones del grupo 5

↓

Prioridad moderada intervenciones del grupo 6

Tabla 6. Resumen de los factores más importantes que influyen en la aparición y propagación de la resistencia.

Intervenciones: Grupo 1 Pacientes y la comunidad en general; Grupo 2 Quienes prescriben y dispensan; Grupo 4 Administración de antimicrobianos a los animales de consumo humano; Grupo 5 Gobiernos nacionales y sistemas de salud; Grupo 6 Desarrollo de medicamentos y vacunas; Grupo 7 Promoción de los medicamentos. Fuente: OMS, 2001.



Tabla 8. INFECCIONES BACTERIANAS: INFECCIONES NOSOCOMIALES

Agente patógeno	Factores importantes				
	Uso humano inadecuado en la comunidad	Uso humano inadecuado en el hospital	Uso inadecuado en la industria agropecuario	Importancia de la vigilancia de la resistencia antibacteriana	Vacunas potencialmente importantes para uso futuro
Bacilos gram positivos spp:					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	-	+++	-
Estreptococos	-	+	-	-	-
Enterococos	-	+++	+ / +++	++	-
Bacilos gram negativos spp:					
<i>Escherichia coli</i>	+	++	+	++	-
<i>Enterobacter</i> spp.	+	+++	-	+++	-
<i>Klebsiella</i> spp.	+	+++	-	+++	-
<i>Pseudomonas aureuginosas</i>	-	+++	-	++	-
Hongos	-	++	-	-	-
Infecciones nosocomiales como un todo	+	++ / +++	+	+++	

Alta prioridad intervenciones de los grupos 1, 2, 5 y 7

Alta prioridad intervenciones de los grupos 3 y 7

Prioridad moderada intervenciones del grupo 6

Alta prioridad intervenciones del grupo 5

Tabla 8. Resumen de los factores más importantes que influyen en la aparición y propagación de la resistencia. Intervenciones: Grupo 1 Pacientes y la comunidad en general; Grupo 2 Quienes prescriben y dispensan; Grupo 3 Hospitales; Grupo 5 Gobiernos nacionales y sistemas de salud; Grupo 6 Desarrollo de medicamentos y vacunas; Grupo 7 Promoción de los medicamentos. Fuente: OMS, 2001.



3.1 Factores de los pacientes que influyen en la resistencia a los antibióticos.

En los elementos de la resistencia tiene un peso importante el uso inapropiado de los antimicrobianos que contribuye a aumentar la prevalencia de la resistencia microbiana. Muchos pacientes son de la idea de que la mayoría de las infecciones, se curan con antibióticos y, por lo tanto, esperan que el médico les dé una receta ante cualquier percepción de infección. Se cree que los siguientes factores relacionados con los pacientes, contribuyen al problema de la resistencia a los antimicrobianos (WHO, 1999):

- percepciones erradas
- automedicación
- propaganda y promoción
- falta de cumplimiento de las dosis

Algunos ejemplos de la influencia de estos factores son: en un estudio realizado, 85% de los pacientes creían que sus síntomas respiratorios eran consecuencia de una infección y 87% pensaba que los antimicrobianos servirían para resolverles el problema (Macfarlane *et al.*, 1997 (1)). En otro estudio se mostró que en 75% de los casos el prestador del servicio de salud respondía a la expectativa del paciente de recibir una prescripción (Macfarlane *et al.*, 1997 (2)). Branthwaite y Pechére realizaron una encuesta a 3610 pacientes; el 81% esperaba ver una mejoría de sus síntomas respiratorios a los tres días, y 87% creía que sentirse mejor era una buena razón para suspender el tratamiento antimicrobiano. La mayoría de los pacientes



pensaba que podía guardar el resto del medicamento para usar en el futuro (Branthwaite and Pechére, 1996).

También hay muchos pacientes que creen que los antibióticos más nuevos y caros son más eficaces que los antiguos y en esto coinciden con algunos prestadores de atención sanitaria que recetan y proporcionan los fármacos. A menudo esto tiene como consecuencia la utilización innecesaria de medicamentos más nuevos. Esta práctica estimula la resistencia tanto a estos nuevos fármacos como a los más antiguos de la misma clase. Los pacientes interpretan mal la acción farmacológica de los agentes antimicrobianos (OMS, 2001).

La automedicación es una práctica que a menudo se cita como uno de los principales factores que contribuyen a la farmacoresistencia (Vuckovic and Nichte, 1997), ya que la incertidumbre que surge de no saber si el paciente tiene una afección que podría mejorarse o no con tratamiento antimicrobiano, provoca que los antibióticos sean administrados en dosis inadecuadas, cuando éstos son tomados por decisión propia (Guillemot, 1998). Los pacientes que no completan el tratamiento tienen más posibilidad de tener recaídas, desarrollar resistencia y la necesidad de volverse a tratar.

Se considera que los factores más importantes para la selección de microorganismos resistentes son el tratamiento anterior con microbianos y la duración excesiva de la farmacoterapia (Harbat *et al.*, 2000).



3.2 Factores en los médicos y personal que proporcionan los antibióticos y que influyen en la resistencia a los antibióticos

Con el fin de mejorar la salud y disminuir la necesidad de tratamiento con antimicrobianos, el objetivo principal de las intervenciones debería ser prevenir las infecciones. El uso de antimicrobianos influye tanto en el origen de la resistencia como en su mantenimiento. Es más, una vez que las cepas resistentes se dispersan, son muy difíciles de reemplazar por sus congéneres sensibles a los antimicrobianos (OMS, 2001).

Al emplear antibióticos para tratar una infección, los resultados terapéuticos satisfactorios dependen de varios factores. En términos sencillos, los buenos resultados dependen de alcanzar una concentración del antibiótico en el sitio de la infección que baste para inhibir la proliferación bacteriana. La selección óptima y juiciosa de antimicrobianos para combatir enfermedades infecciosas puede ser sencilla en presencia de agentes causales conocidos o que puedan deducirse con bastante certeza. Sin embargo la falta de conocimiento sobre diagnóstico diferencial, enfermedades infecciosas, diagnóstico microbiológico fidedigno y el tratamiento antimicrobiano apropiado para las diversas infecciones, son todos los elementos que contribuyen a las prácticas de prescripción inapropiadas (Kunin *et al.*, 1987). No es raro que los representantes de ventas de las compañías farmacéuticas y las publicaciones comerciales de la industria sean la fuente principal de información que utilizan las personas que recetan (Bosu and Ofori-Adje,



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

1997). En países como México, la mayoría de los antimicrobianos son recetados por el vendedor de la farmacia o los compran los pacientes sin receta, a pesar de que debería de exigirse la prescripción (Haak, 1988).

La falta de acceso o de utilización de medios de diagnóstico apropiados y la tardanza e inexactitud de los resultados de las pruebas llevan al personal de salud a cubrir con una prescripción la posibilidad de que la causa de la enfermedad del paciente sea infecciosa, aunque no sea de hecho así. En condiciones ideales, la elección del medicamento debería de hacerse con base en la información local o regional de la vigilancia de la resistencia y siguiendo las normas de tratamiento. No obstante, la realidad dista mucho del ideal (OMS, 2001).

Por desgracia, a menudo la decisión de utilizar antibióticos se hace a la ligera, sin considerar la identidad del posible microorganismo infectante o de las características farmacológicas del medicamento. La primera decisión del médico es saber si realmente está indicada la administración del antimicrobiano. Muchos facultativos en forma casi automática relacionan la fiebre con las infecciones tratables y recetan antimicrobianos sin mayores valoraciones y a menudo generan un uso excesivo de antimicrobianos nuevos que incluyen fármacos de amplio espectro. Hay varias razones que llevan a un aumento de la prescripción de antimicrobianos: no hay certeza sobre el diagnóstico, el prestador de servicios de salud no conoce los métodos de diagnóstico óptimos o tiene el temor de que el



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

tratamiento del paciente sin ellos dé malos resultados (Butler *et al.*, 1998; Fidler, 1998).

En algunos países europeos, las cepas de neumococos resistentes a penicilina comprenden la mitad o más de los gérmenes patógenos aislados y la proporción de dichas cepas va en aumento en Estados Unidos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilcilina están distribuidas ampliamente en hospitales y se les identifica con frecuencia cada vez mayor en infecciones de origen comunitario. De ese modo, se ha creado un gran conflicto para el médico y la necesidad constante de contar con antibióticos nuevos (Goodman & Gilman, 1996).

Si se desea revertir la tendencia anterior y que continúen siendo de utilidad los antibióticos, se necesita un enfoque más responsable en el empleo de estos productos, es decir, de los que se disponen hoy y de los nuevos medicamentos que se obtengan en el futuro. Se requiere de un uso apropiado de los antibióticos, es decir, usar de manera eficaz en relación con el costo de los antimicrobianos, con lo cual se obtiene el máximo efecto clínico-terapéutico y simultáneamente se minimiza la toxicidad del medicamento y el desarrollo de la resistencia microbiana (Quick, 1997).



4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Uno de los principales problemas con los que se enfrenta la quimioterapia de las enfermedades infecciosas es la aparición de resistencia en los microorganismos previamente susceptibles, como consecuencia del amplio e indiscriminado uso de antibióticos. El desarrollo de las resistencias es extremadamente variable. Para un solo mecanismo de resistencia, su puesta en marcha puede ser inmediata o tardía, dependiendo de los gérmenes y los antibióticos implicados (Velasco *et al.*, 1993).

El término resistencia a los medicamentos no hace generalmente referencia a la resistencia natural de una especie, sino a cambios genotípicos adquiridos que persisten durante el cultivo en ausencia del fármaco (Davis, 1984).

La resistencia a los agentes antimicrobianos puede ser de origen genético o no genético. El primero es con mucho el más importante.

4.1 Origen no genético (Mecanismos Fisiológicos)

En realidad se define como a aquel que depende de características estructurales, bioquímicas o fisicoquímicas de algunas bacterias, que pueden hacerlos circunstancialmente más resistentes, es decir que las hacen no susceptibles a ser atacadas por los antimicrobianos. Por ejemplo, los microorganismos que son



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

metabólicamente inactivos y se multiplican con mucha lentitud son menos sensibles a la acción de los antibióticos que los que se multiplican con mayor rapidez y por tanto tienen mayores necesidades metabólicas (Fuentes, 1993).

En el caso de las bacterias se han descrito hasta la fecha los siguientes mecanismos fisiológicos (fenotípicos) de la resistencia a los antibióticos:

Inhibición enzimática. Existen dos formas de resistencia por acción enzimática, la destrucción del antibiótico y la inactivación mediante la incorporación al mismo de grupos activos que impiden su actividad. En el primer caso se encuentran las llamadas β -lactamasas, enzimas capaces de inactivar diversos antibióticos del grupo de los β -lactámicos, codificadas por genes cromosómicos. Se han descrito distintos tipos de estas enzimas: el A, que hidroliza preferentemente a las penicilinas y el B, que ataca especialmente a las cefalosporinas.

La inhibición por incorporación de radicales a la molécula del antibiótico se ha descrito en el caso del cloranfenicol, que puede ser inactivado por una acetiltransferasa que se encuentra en organismos gram-positivos y gram-negativos, y especialmente en el caso de los aminoglucósidos, para los que este proceso constituye el principal mecanismo de inactivación. Se han identificado más de dos docenas de enzimas capaces de dar lugar a tres tipos generales de reacción sobre los grupos funcionales de estos antibióticos: N-acetilación, O-adenilación y O-fosforilación, procesos que tienen lugar una vez que el antibiótico llega al espacio periplásmico. La incorporación de estos grupos funcionales a los aminoglucósidos no impide su penetración al interior de la célula bacteriana, pero los hace



incapaces de fijarse eficazmente a los ribosomas y de interferir con la síntesis protéica (Velasco *et al.*, 1993).

Modificación de la permeabilidad de las membranas bacterianas. Las bacterias Gram (-) se caracterizan por disponer de una membrana externa a la membrana celular, de naturaleza lipídica, de la que carecen las bacterias gram-positivas. La superficie externa de esta membrana tiene una naturaleza lipopolisacárida, que impide también la penetración de antibióticos hidrofóbicos como la eritromicina. El paso a través de esta membrana depende de dos factores, la existencia de unas proteínas estructurales llamadas *porinas* dispuestas de forma tal que constituyen canales de difusión llenos de agua a través de los cuales pueden penetrar los antibióticos; cuanto mayor sea su tamaño o más cargado negativamente esté o cuanto más hidrofóbico sea, tanto menor será su penetración. Se ha descrito la posibilidad de que mutaciones de las porinas o de otras proteínas estructurales puedan explicar la resistencia a ciertos antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, cloranfenicol, teicoprina, vancomicina o polimixinas, pero su importancia clínica no está aún bien definida. Mejor conocida es la resistencia debida a la falta de penetración de algunos antibióticos, particularmente los aminoglucósidos, a través de la membrana celular hacia el interior de la célula. En condiciones normales este proceso se realiza por medio de un sistema de transporte activo, por lo cual las bacterias anaeróbicas son resistentes a estos antibióticos. Aunque el desarrollo de este tipo de resistencia por bloqueo del sistema de transporte activo no es muy frecuente, puede presentarse en el curso



de un tratamiento prolongado con estos antibióticos, y ser irreversible (Gleckman and Czachor, 2000).

Alteración de los lugares específicos de fijación. Puede ser o bien los ribosomas o las enzimas. La alteración de la capacidad de fijación a los ribosomas es una importante causa de resistencia a los fármacos que actúan por este mecanismo de acción, especialmente los macrólidos, las tetraciclinas, las lincosamidas y el cloranfenicol y, en menor grado, los aminoglucósidos. Por ejemplo, la resistencia de los gram-positivos a las lincosamidas y a los macrólidos se debe a una alteración del lugar receptor de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano por una enzima metilasa que altera los residuos de adenina del RNA ribosómico 23S.

En el caso de las enzimas se conocen también algunos ejemplos. Las alteraciones inducidas en las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), que catalizan la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana, pueden interferir con el efecto de los β -lactámicos (Pascuzzo, 2005).

Puesta en marcha de una vía metabólica alternativa ("bypass"). Algunas mutantes celulares bacterianas pueden desarrollar diferentes vías metabólicas alternativas empleando factores de crecimiento diferentes a los de las células no resistentes. Ciertas bacterias resistentes a las sulfonamidas no requieren de PABA intracelular, sino que emplean ácido fólico preformado. Otras son resistentes al trimetoprim por la alteración de la enzima timidilato sintetasa, ya que pueden sintetizar ácido timidílico a partir de timidina por vías alternas (Goodman & Gilman, 1996).



Expulsión del antibiótico hacia el exterior. La disminución de la concentración intracelular de algunos antibióticos puede ser debida, como se ha visto, a dificultades en su captación. El ejemplo más típico es la resistencia a las tetraciclinas desarrollada por muchas bacterias (ya que el efecto inhibitor de las tetraciclinas depende de la acumulación activa de este antibiótico); se ha descrito una disminución de su concentración dentro de las bacterias resistentes por la puesta en marcha de un mecanismo activo de flujo de antibiótico hacia el exterior (Avellaneda and Pecho, 2002).

4.2 Origen genético.

La inmensa mayoría de los gérmenes resistentes a los antibióticos han aparecido como consecuencia de los cambios genéticos en sucesivos procesos de selección. La mayoría de los microorganismos son capaces de desarrollar resistencia a la acción de los antibióticos. Dentro de la resistencia genética existen dos grandes grupos:

Resistencia cromosómica. Este tipo de resistencia se desarrolla como consecuencia de la mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un determinado agente antimicrobiano. Tal fenómeno puede ser propio de la bacteria o condicionado por la acción de agentes tales como mutágenos



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

químicos o la luz ultravioleta, a los que las bacterias están frecuentemente expuestas (Madigan *et al.*, 1997).

Estos cambios genéticos sirven como mecanismo de selección en la presencia del un antimicrobiano, al suprimir a los microorganismos susceptibles y favorecer el crecimiento de los mutantes resistentes al fármaco. Las células alteradas por la mutación son generalmente más débiles desde el punto de vista metabólico a las no mutantes y tienden a ser suprimidas y diluidas en le crecimiento competitivo de una población bacteriana. Sin embargo, las mutantes pueden suponer un peligro cuando la presión sobre las no mutantes por un antibiótico se mantiene por una exposición sub-óptima al antibiótico o por otros factores que permiten que las mutantes adquieran ventaja competitiva. La mutación espontánea ocurre al azar, en una frecuencia de una bacteria por cada 10^{-7} a 10^{-10} células y se transmiten en sentido vertical (Madigan *et al.*, 1997; Hayes and Wolf, 1990; Velasco *et al.*, 1993) y por tanto es un acontecimiento muy poco frecuente.

Resistencia extracromosómica. La transferencia de DNA entre cepas de procariontas está muy difundida y contribuye de manera importante a la notable diversidad genética entre las bacterias. El intercambio genético entre bacterias se caracteriza por la transferencia de fragmentos relativamente pequeños de un genoma donador a una célula receptora. Para que tenga éxito esta transferencia genética, se requiere que el DNA donado se replique en el organismo receptor (Madigan *et al.*, 1997).



El material genético puede transferirse mediante los siguientes mecanismos, los cuales se diferencian por la forma en que se dona el DNA:

TRANSDUCCIÓN. Esta surge por la intervención de un bacteriófago (virus que infecta bacterias) que contiene DNA bacteriano. Si el material genético incluye un gen que codifica para la resistencia medicamentosa, una bacteria recién infectada puede adquirir resistencia a dicho compuesto y será capaz de transmitir el rasgo a sus células hijas (Goodman & Gilman, 1996).

TRANSLOCACIÓN O TRANSPOSICIÓN. Dentro de una célula bacteriana puede ocurrir la transferencia de secuencias cortas del DNA (transposones, elementos que pueden moverse de un replicón a replicón y se diseminan a través de conjugación); esto se puede dar también entre un plásmido y otro o entre un plásmido y una porción del cromosoma bacteriano (Velasco *et al.*, 1993).

TRANSFORMACIÓN. El DNA desnudo pasa de una célula o células de otra especie y altera así su genotipo. La captación directa del ADN donador por las células receptoras depende de la competencia de éstas para la transformación. La ocurrencia natural de esta propiedad es rara entre las bacterias y algunas cepas son transformables solamente en presencia de factores de competencia, producidos sólo en momentos específicos durante el ciclo de crecimiento; otras sufren con facilidad transformación natural que requiere enzimas específicas producidas por la célula receptora (Madigan *et al.*, 1997).



CONJUGACIÓN. La idea de que las bacterias pudieran tener una forma de reproducción sexual fue admitida por bacteriólogos en 1940.

Recibe este nombre la transferencia de genes de una célula a otra en forma de "apareamiento" por contacto directo a través de un pelo sexual o puente (pili sexual= túbulo protéico) que permite el paso de material genético de una bacteria a otra; en la actualidad se le ha reconocido como un mecanismo de gran importancia para la perpetuación de la resistencia a antibióticos porque gracias a este fenómeno puede transferirse el DNA que codifica la resistencia a múltiples fármacos (Fuentes, 1993; Goodman & Gilman, 1996).

Durante un proceso de apareamiento (conjugación) puede tener lugar una transferencia unilateral de material genético entre bacterias del mismo o diferente género. La conjugación requiere de la presencia en una de las bacterias de un factor de fertilidad; la célula que contiene este factor se llama F^+ y se considera como bacteria masculina. Las cepas femeninas no contienen factor F y se consideran como F^- . Este factor de fertilidad confiere ciertas características a las células donadoras como un pelo sexual, una proteína extracelular protuberante que adhiere la célula donadora al microorganismo receptor carente del factor de fertilidad F^+ . Durante la conjugación, el material genético solo pasa de la bacteria F^+ a al F^- , llegando luego a integrarse en el cromosoma de la F^- mediante la recombinación del material genético de ambas cepas. El cromosoma bacteriano circular se abre y se hace lineal para su transferencia a través del puente de conjugación. Como el puente puede romperse en cualquier momento durante el



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

proceso, se pueden transferir pocas o muchas características genéticas, según el tiempo que estén unidas las dos bacterias (Burdon and Williams, 1985).

La transferencia genética por conjugación surge más bien entre bacilos gram-negativos. Cabe destacar el hecho de que la "comunicación" puede establecerse aún entre bacterias de distinto género o especie, lo que le confiere un papel muy importante desde el punto de vista epidemiológico (Neu, 1984).

La conjugación puede acaecer en las vías intestinales, entre microorganismos no patógenos y patógenos. La eficacia de la transferencia es pequeña *in vitro* y aún menor *in vivo*, pero los antibióticos ejercen una "presión selectiva potente" (de orden filogenético) que permite la aparición de una cepa resistente. De este modo, en los últimos 30 años ha aumentado de manera inexorable la proporción de bacterias entéricas que portan plásmidos de resistencia a múltiples fármacos, ya que los plásmidos son los elementos genéticos que más frecuentemente se transfieren por conjugación. En algunas investigaciones, se ha notado que más de la mitad de las personas portan bacilos coliformes con resistencia múltiple y que contienen factores R; tales bacterias se han aislado en un número cada vez mayor de la corriente de ríos que contienen agua negras tratadas. De ese modo, se ha vuelto un problema a nivel mundial la aparición de *Enterobacteriaceae* resistentes a múltiples fármacos (Madigan *et al.*, 1997).



4.3 PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas cíclicas de DNA extracromosómico de doble cadena y de replicación autónoma distinta del cromosoma celular, que determinan ciertos rasgos, que no son vitales, pero que de alguna manera determinan la capacidad del organismo para adaptarse. Cada plásmido contiene al menos una secuencia de ADN que sirve como un origen de replicación u ORI (un punto inicial para la replicación del ADN). Su tamaño varía desde menos de uno a más de un millón de daltons y puede encontrarse en forma libre en el citoplasma bacteriano o estar integrado en el cromosoma bacteriano. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula (Duarte, 2004; Velasco, *et al.*, 1993).

Este mecanismo se disemina rápidamente aún entre diferentes especies bacterianas, pueden conferir resistencia a varios antibióticos a la vez, no suelen producir una desventaja adaptativa, es decir, no disminuyen la tasa de crecimiento de la bacteria ni la hace perder sus propiedades de virulencia (Avellaneda and Pecho, 2002).

Hay algunos plásmidos que tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano. Esto ocurre gracias a que rompen el cromosoma y se insertan, con lo cual, automáticamente la maquinaria celular también replica el plásmido. Cuando ese plásmido se ha insertado se le da el nombre de episoma (Clowes, 1972).



Los plásmidos son elementos bien adaptados como agentes de la evolución genética y a menudo contienen genes o paquetes de genes que le confieren una ventaja selectiva a las bacterias que lo contiene por la diseminación de genes de resistencia, entre otras funciones como la virulencia, la capacidad metabólica, la fertilidad y la replicación.

4.3.1 CLASIFICACIÓN

Una forma de agrupar a los plásmidos es por su habilidad de transferirse a otra bacteria. Los plásmidos que gobiernan su propia transferencia se llaman **conjugativos** y contienen genes "tra", los cuales ejecutan complejos procesos de conjugación. No todos los plásmidos son conjugativos, a estos se les llama **no-conjugativos** y son incapaces de iniciar una conjugación, de allí que ellos pueden transferirse únicamente con la asistencia de los plásmidos conjugativos y lo hacen "por accidente". Una clase intermedia de plásmidos son los "mobilizables" los cuales llevan solo un subtipo de genes requeridos para la transferencia. Pueden "parasitar" un plásmido conjugativo, transfiriéndose a una alta frecuencia solo en su presencia (Duarte, 2004).

Otra forma de clasificar plásmidos es por función. Hay 5 clases principales:

- *Plásmidos de fertilidad*: los cuales contienen genes *tra*, ellos son capaces de inducir conjugación.
- *Plásmidos de resistencia*: los cuales contienen genes que pueden codificar resistencia contra sustancias tóxicas o antibióticos. Históricamente se



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

denominaron como Factores R, antes de que se entendiera la naturaleza de los plásmidos.

- *Col-plásmidos*: los cuales contienen genes que codifican (determinan la producción de) colinas y proteínas que pueden matar a otra bacteria.
- *Plásmidos degradativos*: los cuales habilitan el catabolismo de sustancias inusuales como tolueno o ácido salicílico.
- *Plásmidos virulentos*: los cuales convierten a la bacteria en un patógeno.

Los plásmidos pueden pertenecer a más de uno de estos grupos funcionales (Amabile Cuevas and Chicurel, 1992).

Los plásmidos también pueden dividirse en dos clases principales. Los grandes plásmidos, de 60 a 120 kilobases de longitud, que son en su mayor parte CONJUGATIVOS (llamados también autotransmibles). Los plásmidos pequeños de 1.5 a 40 kilobases de longitud, no son conjugativos (Davis, 1984).

Los llamados *plásmidos R* son círculos de DNA de doble filamento, es un tipo de plásmido que transporta genes para la resistencia a uno, o a menudo varios antibióticos. Son la causa de la resistencia a antibióticos por su modo de acción que está localizado en los productos que codifican sus genes. Estos productos son las proteínas, producto de la traducción de sus genes. No es que necesariamente codifique la resistencia sino que por diferencias genéticas, codifican otras proteínas que, por ejemplo, cambian la estructura de la membrana y el antibiótico que



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

atacaba la membrana con la característica genética original ya no lo podría hacer o por la formación de enzimas inactivantes o destructoras, por producción de elementos de las membranas celulares que interfieren con los sistemas de transporte o que bloquean los poros, o por síntesis de enzimas resistentes a antibióticos. Esta es la acción que confiere la resistencia, alterar algunos aspectos vitales de forma que el antibiótico dirigido a estos ya no pueda actuar. Además la naturaleza conjugativa del plásmido R tiene importancia en la rápida diseminación de genes de resistencia a fármacos y antibióticos a través de poblaciones de bacterias patógenas (Duarte, 2004; Velasco *et al.*, 1993).

Los antibióticos no han inducido a los plásmidos de resistencia sino que los han seleccionado. Estos han sido encontrados incluso en cepas de bacterias que estaban almacenadas desde antes del uso de los antibióticos. La selección de plásmidos R por el tratamiento antibiótico, juntamente con su transferencia interespecífica, constituye una amenaza creciente y acumulativa contra el tratamiento de las enfermedades bacterianas (Davis, 1984).

Los plásmidos de fertilidad son los llamados plásmidos F, similares a los R, pero éstos no codifican genes de resistencia sino que son un factor de fecundación que convierte a la célula que lo posee en donadora, para conjugarse. El factor F tiene 4 regiones: de transferencia; de integración; de replicación; y de resistencia a bacteriófagos de cepas F⁻. En la región de transferencia se encuentran los genes responsables de la transferencia, poseyendo éstos una agrupación a manera de



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

operón. Este plásmido es muy importante a la hora de hablar de conjugación ya que es el que da las características para saber cuál será el donador y que característica tendrá ese donador. Los mismos están relacionados con la reproducción asexual de las bacterias. Las bacterias que tienen este factor F en su citoplasma se consideran donadoras o F⁺ y esta condición es transferible ya que el factor F puede pasarse en la conjugación convirtiendo a la receptora en donadora. Otro aspecto importante de este plásmido es que el factor de fertilidad F⁺ se puede integrar en numerosos *loci* en el cromosoma bacteriano, convirtiendo a la cepa en Hfr (alta frecuencia de recombinación) que lo que hace es elevar la frecuencia con la que las bacterias se recombinan. Estos aumentan la frecuencia de recombinantes de 1 a 1000 células o más. El operón Tra es la región de transferencia y el responsable de la formación de cepas Hfr mediante un proceso de recombinación propio de la bacteria (Madigan *et al.*, 1997; Duarte, 2004).

4.3.2 ESTRUCTURA.

Los llamados plásmidos o factores R clásicos son grandes plásmidos con dos partes funcionales distintas, cada una de ellas puede existir de manera independiente o se combinan para formar un factor R completo (figura 3); una es el FACTOR DE TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA (RTF), de unos 80 kilobases de longitud y que contiene los genes para la replicación autónoma y para la conjugación. La otra parte es un DETERMINANTE DE RESISTENCIA (determinante R) que varía



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

considerablemente de tamaño y en cuanto a su contenido en genes de resistencia farmacológica (genes R), es el que codifica la resistencia real (Davis, 1984).

Figura 3. Formación de un factor R completo

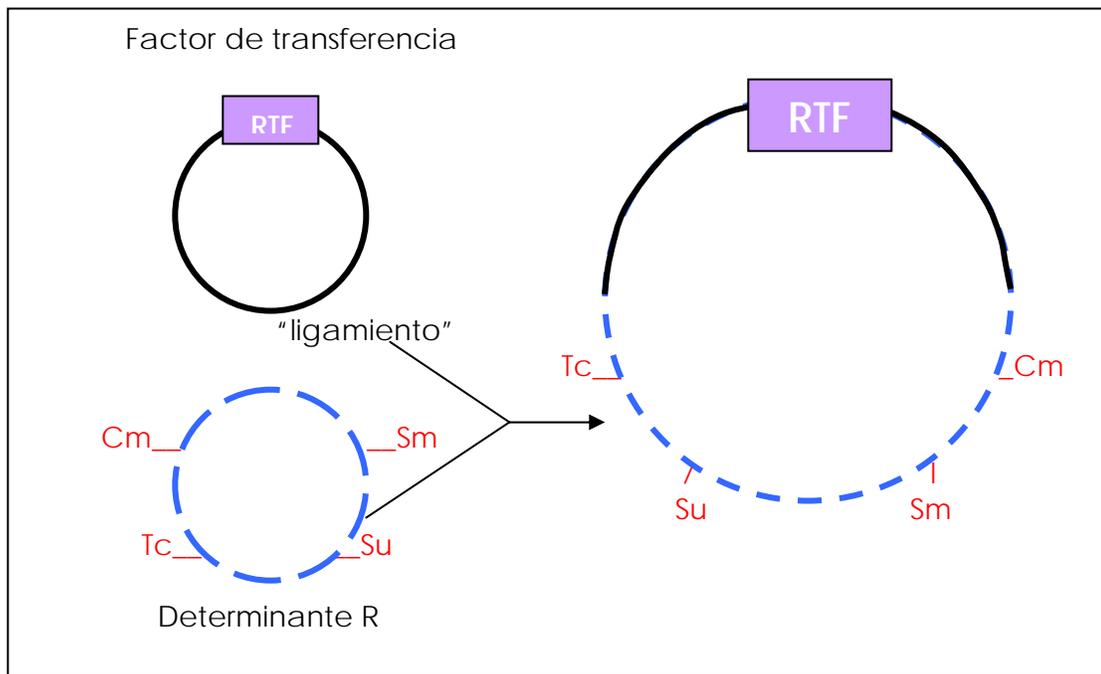


Figura 3. Formación de un factor R que contiene información genética que confiere resistencia a tetraciclina (Tc), sulfonamida (Su), estreptomicina (Sm) y cloranfenicol (Cm). Fuente: Goodman & Gilman, 1996.



4.4 INTEGRONES

A lo largo del último cuarto de siglo, la atención de los investigadores de las bases genéticas de la resistencia a antibióticos en bacterias se ha fijado en una serie de nuevos elementos genéticos, los integrones. Las primeras pistas sobre la existencia de esta clase de elementos se obtuvo estudiando el transposón Tn21 (García Loba, 2000)

Un integrón se puede definir como un elemento genético de alta eficiencia recombinatoria (Hall and Stoke, 1993). Inicialmente fueron identificados como parte de la familia Tn21, en el que por un mecanismo de recombinación sitio específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos (Sallen *et al.*, 1995).

Se conocen 4 clases de integrones, definidos en función del tipo de integrasa, pero su estructura es similar. De las cuatro clases conocidas, la familia de la clase 1 es la más frecuente (Álvarez *et al.*, 2003).

Los integrones son elementos frecuentemente identificados en *Enterobacteriaceae* (Martínez *et al.*, 1998) y cada día se acumulan nuevos datos que indican que los integrones son ubicuos, sobre todo en plásmidos o cromosomas de bacterias Gram negativas, pero también se han descrito en Gram positivas.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Los integrones no son móviles por sí mismos, pero con frecuencia se hallan asociados a transposones que a su vez se encuentran en plásmidos conjugativos, por lo que su movilidad horizontal está asegurada (Sabaté and Prats, 2002).

4.4.1 Estructura

Los integrones tienen la información genética necesaria para expresar una proteína implicada en la captura y liberación de ciertos elementos móviles de DNA, en los que se incluyen los genes de resistencia a antibióticos. Todos los integrones están compuestos de tres elementos esenciales para obtener genes exógenos (Mazel, 2004).

En la **región conservada 5'** existen 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (cassettes); un gen que codifica para una integrasa o recombinasa encargada de catalizar la recombinación genética sitio específica (*int1*), que transcribe de izquierda a derecha y tiene una longitud de 1.36 kb; el otro es el sitio primario de la recombinación sitio específica que es uno de los lugares donde se insertan las IS (inserted sequences), (*att1*) y por último un promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes cassettes integrados (Torres *et al.*, 2005).

A continuación se encuentra una **región central variable** en la que se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

como los genes de resistencia a los aminoglucósidos, que son los más abundantes donde se pueden insertar uno o varios tipos de genes (cassettes génicos) en un número variable que suele oscilar de uno a cuatro, aunque se conocen integrones descargados (*int0*) que no contienen ningún gen en la región central. En el interior del integrón también se han encontrado genes de resistencia a trimetoprim, cloranfenicol y betalactámicos. Hasta el momento se han identificado más de 40 genes de resistencia que pueden incluirse en la estructura del integrón (Martínez *et al.*, 1999).

Las regiones constantes 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes de la región central están separados unos de otros por secuencias *attC* (García Loba, 2000).

La región constante 3' tiene una longitud de al menos 2 kb y la secuencia de esta zona se halla menos conservada entre los distintos integrones que la de la zona 5'. En este segmento se incluyen unos genes que dotan a la bacteria de resistencia a distintos compuestos, no sólo antibióticos. El gen *qacEA1* es un determinante de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio como determinados antisépticos y desinfectantes. El gen *sul1* determina resistencia a las sulfonamidas. Después de éstos, existen otros dos marcos de lectura abiertos en donde uno de ellos (*orf 5*) contiene un gen de función desconocida (Martínez *et al.*, 1999; Waites, 2000).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

En algunas ocasiones se han detectado integrones que carecen de los genes *qacEA1* y *sull* en este extremo 3'. Varios autores han sugerido que podría tratarse de un integrón primitivo, a partir del cual han evolucionado los actuales, en los que dichos genes se insertaron y conservaron, probablemente por la ventaja selectiva que supone la expresión de estos genes frente al masivo uso clínico de compuestos tales como cloruro de benzalconio, acriflavina, etc. (Bissonnette and Roy, 1992; Paulsen *et al*, 1997).

Figura 4. Esquema de la estructura del integrón tipo 1

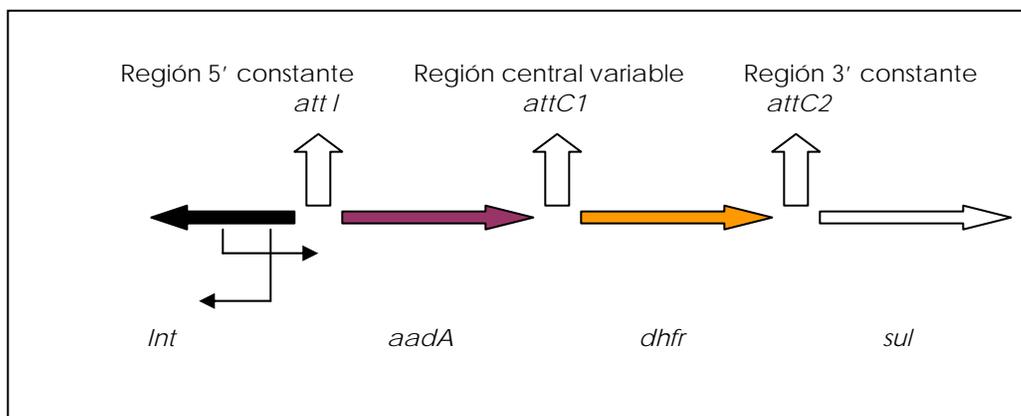


Figura 4. *attI*. Sitio de reconocimiento de la integrasa
attC1 y 2. Secuencias que pueden actuar como terminadores de la transcripción
Int. Gen de la integrasa
aadA y *dhfr*. Genes de resistencia adquiridos
sul. Gen de resistencia a sulfonamidas
Fuente: García Loba, 2000.



Figura 5. Esquema de la estructura de un integrón descargado (int0)

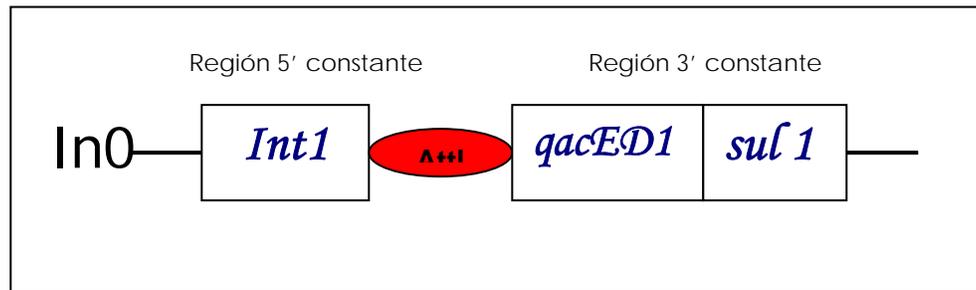


Figura 5. In0. Integrón descargado
Int1. Gen de la integrasa
qacED1. Locus de resistencia a bromuro de etidio
sul 1. Gen de resistencia a sulfonamidas
Fuente: Waites, 2000

4.4.2 La integrasa y los sitios primarios de actuación.

En los integrones de clase 1 la integrasa es una proteína de 337 aminoácidos con un tamaño calculado de 38 kDa, que pertenece a una amplia familia cuyo prototipo es la integrasa del fago λ . La integrasa actúa sobre dos clases de sitios primarios llamados *attI* y *attC*. Lo que siempre sucede en todos los sitios *attC* es que su secuencia es un palíndromo imperfecto, lo que les confiere la capacidad de formar estructuras tipo horquilla cuando están en forma de DNA de cadena sencilla o de forma cruciformes cuando se localizan en DNA superenrollado. La secuencia más frecuente en los extremos de los sitios *attC* es CTAAC.....(50-110 pb).....GTTAG. El sitio *attI* se localiza al lado del gen de la integrasa, y marca la separación entre la región conservada y la región central variable. Al contrario de lo que sucede con los sitios *attC*, el sitio *attI* es prácticamente igual en todos los integrones (García Loba, 2000).



4.4.3 Cassettes de resistencia.

Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierto completo (*orf*), o región codificante (*gen*). Además, formando parte de su estructura, a continuación del *orf*, existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del *gen*. Aunque se considera que los *cassettes* genéticos son elementos móviles, no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización. Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el *cassette* desde un integrón. Estos *cassettes* no pueden ser replicados o transcritos de esta forma, por lo que se transcriben a partir de los promotores existentes en la región conservada 5' (García Loba, 2000; González *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 1999; Waites, 2000).

La inserción específica de sitio 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. Esto indica que esta recombinasa es necesaria para la integración de los *cassettes*, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón (González *et al.*, 2004).

Los *cassettes* de resistencia son sustrato para la reacción de la integrasa, ya que contienen un sitio *attC*. La integrasa interactúa con los dos sitios primarios de recombinación, el sitio *attI* de los integrones y el sitio *attC* de cada *cassette*



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

genético. Estos elementos tienen en su extremo final (3') una secuencia de 59 pares de bases. Esta secuencia es variable tanto en la composición de sus bases como en longitud. A través de estas zonas se va a producir la inserción y escisión de las IS (inserted sequences), mediante una recombinación genética sitio específica catalizada por la integrasa y en la que participan, la zona attI y attC, o bien otro elemento de 59 pb de otra IS; integrando el cassette dentro del integrón (González, 2004; Recchia and Hall, 1997).

Por otra parte, la especificidad de la orientación de los *cassettes* genéticos integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5' 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 aparece fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia. Por lo tanto, el uso de un determinado antibiótico, al ejercer la correspondiente presión selectiva, puede seleccionar las cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen, determinando la resistencia de las bacterias al antibiótico. El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un cassette genético de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común (Carattoli, 2001; Collis, 1993; Collis and Hall, 1995).

Varios de estos IS o cassettes insertados uno detrás de otro pueden ser leídos a partir de los promotores comunes. En este sentido, y dado que puede haber



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

insertados más de un gen de resistencia, cabe destacar que los genes situados en una zona más distal de los promotores tienen una expresión más baja que los situados al principio. De esta forma, a partir del primer gen se va perdiendo eficacia en la transcripción y expresión de los genes de resistencia; el gen que se inserta al último cronológicamente ocupará la primera posición, la más cercana a los promotores, y sería el más eficazmente transcrito. Estas características de las IS hacen posible que, cuando el ambiente de una bacteria cambia (debido a la presencia de antibióticos en el medio), uno de los genes que se expresa poco (lejano respecto al promotor) pueda ser intercambiado de posición pasando a posiciones más activas (Collis and Hall, 1995).

Los nuevos genes pueden provenir tanto de otros integrones que perderán el gen como de genes circulares aislados que se han separado previamente de un integrón (Collis, 1993).

Por este procedimiento se pueden generar integrones nuevos con cualquier combinación imaginable de cassettes preexistentes. Este gran número de posibilidades de recombinación e intercambio que poseen los integrones y los genes de resistencia, proporciona a las bacterias que los incluyen en su estructura, una gran versatilidad para hacer frente a los antibióticos, determinando en algunos casos la eficacia de éstos, ya que las bacterias pueden cambiar la posición y la expresión de sus genes en función de la presión ambiental provocada por los antimicrobianos (Jones *et al.*, 1997).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Figura 6. Modelo de la captura de genes mediados por integrones y del intercambio de cassettes de resistencia

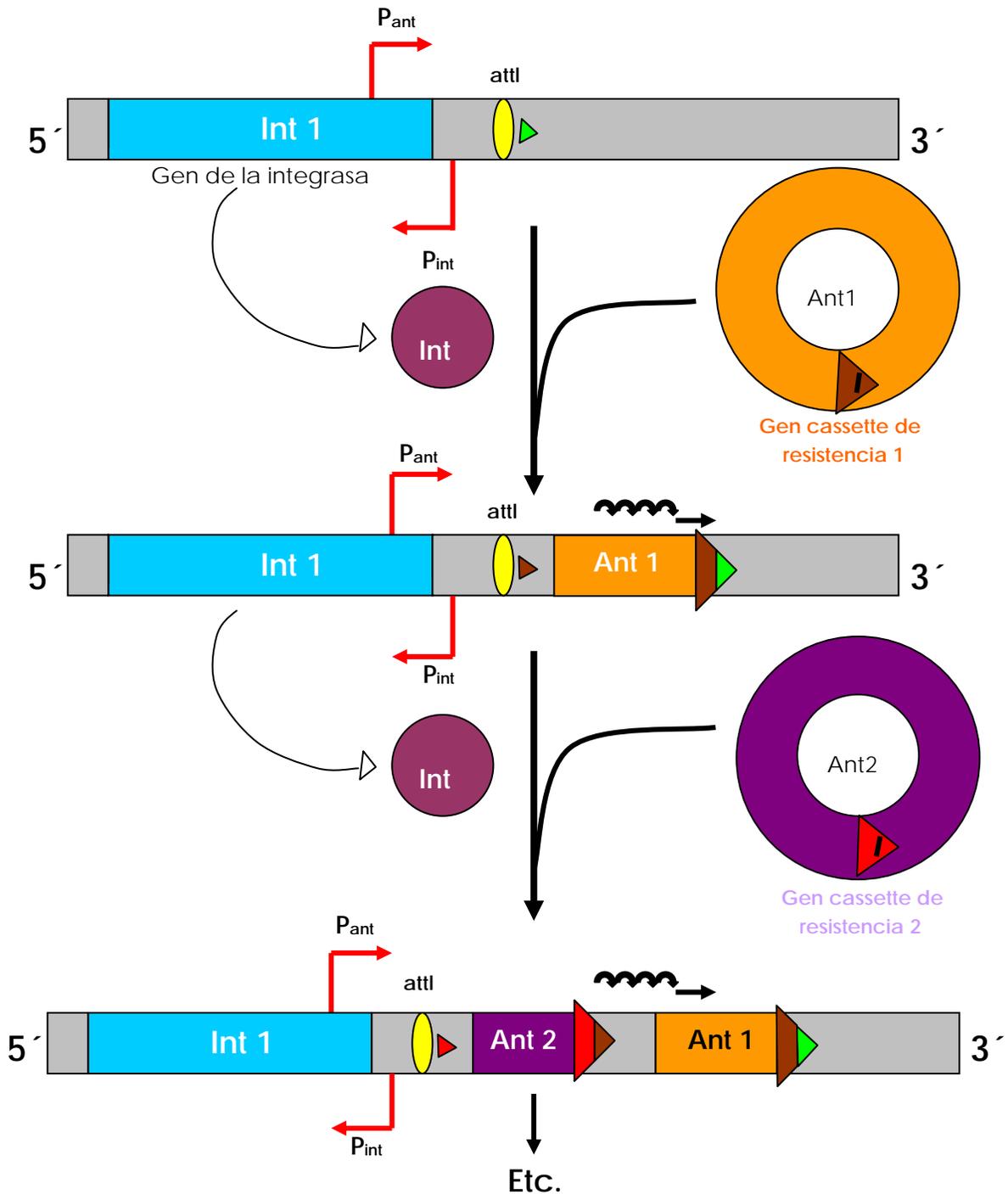


Figura 6. Bosquejo del proceso por el cual un gen cassette circular de resistencia a antibióticos (antR) adquirido, es repetidamente insertado al sitio específico *attI* en un integrón clase 1 delante del promotor fuerte (P_{ant} int 1). La flecha ondulada indica la dirección de la transcripción. Este proceso se repite de igual forma para cada gen de resistencia. Fuente: Mazel Didier, 2004.



Cualquier gen es susceptible de incorporarse en un integrón y es posible que si no se observan integrones con otro tipo de genes lo sea porque no existe presión selectiva necesaria para ponerlos de manifiesto (García Loba, 2000).

4.4.4 Importancia de los integrones

White y colaboradores han informado que la diseminación de genes de resistencia aumenta considerablemente cuando ellos forman parte de *cassettes* genéticos móviles, lo cual los habilita para su transferencia horizontal por varios mecanismos. Algunos incluyen la movilización de *cassettes* entre integrones, mediada por la integrasa. En el caso de integrones que forman parte de un transposón, pueden transponerse desde el cromosoma hacia plásmidos y viceversa. Aunque es un fenómeno no comprobado, se supone que los integrones completos pueden intercambiarse entre diferentes especies y cepas bacterianas, sin que ello suponga la transferencia total del plásmido o el transposón donde estuviera incluido el integrón. Los *cassettes* genéticos codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y, según informaciones recientes, a quinolonas (Recchia, 2002; Tran and Jacoby, 2002; White *et al.*, 2001).

Además, los integrones clase 1 contienen genes que podrían ser remanentes de *cassettes* genéticos como parte de su estructura conservada 3'CS y ellos



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacED1*) y sulfonamidas (*sul1*) (Bennett, 1999). Los mecanismos de resistencia relacionados con genes de integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las EMA, cloranfenicol acetil transferasas (CAT), modificantes de rifampicina, β -lactamasas, especialmente aquellas de más reciente descripción, incluyendo carbapenemasas, dihidrofolato reductasas (Collis and Hall, 1995; González, 2004; Jones *et al.*, 1997; White *et al.*, 2001).

Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial (Carottoli, 2001). De igual forma estas estructuras, con sus respectivos *cassettes* de resistencia, han sido detectadas en bacterias aisladas de ambientes acuáticos y de animales domésticos y de crianza, lo cual refleja su amplia diseminación en la naturaleza. Más aún, se ha demostrado la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes géneros, corroborando que estas estructuras son antiguas y que han evolucionado conjuntamente con el genoma bacteriano (Goldstein C. *et al.*, 2001; Rosser and Young, 1999; Sabaté and Prats, 2002).

La funcionalidad de un integrón no está restringida a su tamaño, hay integrones interrumpidos o truncados que realizan su función completa; por ejemplo, se reportó el hallazgo de un integrón truncado en una bacteria gram negativa, *M. fortuitum* y este mismo integrón se observó que aparecía en una bacteria gram positiva, *Corynebacterium glutamicum* (Nesvera *et al.*, 1998).



I. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tiene la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los alimentos para la salud pública y a la falta de información e investigación en nuestro país a cerca del tema de la resistencia a antibióticos, se decidió estudiar la presencia de este tipo de bacterias en la carne de pescado, así como los posibles mecanismos que provoquen esta resistencia, ya que el mal uso que se da a los antibióticos ha provocado que ciertas bacterias manifiesten mecanismos que les permite resistir la acción de éstos fármacos. La presencia de bacterias resistentes a antibióticos a nivel nosocomial, comunitario, agropecuario y en los alimentos de consumo humano, es un problema cada vez más común, por lo que es necesario realizar la detección y estudio de este tipo de microorganismos, así como de los mecanismos que producen esa resistencia, sobre todo los mecanismos genéticos que se relacionan con elementos móviles, pues éstos son de gran importancia por la facilidad con que pueden transferirse de bacteria a bacteria, ya sea del mismo o diferentes géneros bacterianos, dando a las bacterias la capacidad de oponer resistencia al efecto de los antimicrobianos.

En el caso de los alimentos de consumo humano es de importancia el estudio de bacterias resistentes a antibióticos para verificar la inocuidad de los alimentos, evitando que este tipo de microorganismos llegue hasta los consumidores causando infecciones de difícil tratamiento que afecten su salud, sobre todo en



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

productos tan perecederos y frecuentemente relacionados con enfermedades gastrointestinales, como es el pescado. Las investigaciones acerca de la resistencia a antimicrobianos en pescado fresco son muy escasas, ya que en su mayoría se refieren al pescado obtenido de la acuicultura; se considera que se requiere de más estudios sobre el pescado que se adquiere en mercados, tiendas de autoservicio o tianguis, que es en donde se obtiene comúnmente este alimento en el Distrito Federal, para detectar si este alimento se encuentra contaminado con bacterias resistentes a antibióticos, además de determinar si se encuentran presentes ciertos elementos genéticos móviles en esas bacterias que les dieran la capacidad de resistencia a antibióticos.

Todo esto daría bases para poner mayor atención al uso de antibióticos y evitar la emergencia de bacterias farmacoresistentes, así como de las probables causas relacionadas con esta resistencia.



IV. HIPÓTESIS

Bacterias aisladas a partir de la carne de pescado que es adquirida en tiendas de autoservicio del D.F. y que resulten ser resistentes a por lo menos cinco antibióticos, podrían ser portadoras de elementos genéticos como el integrón clase 1, elemento que les puede proporcionar la información genética necesaria para codificar mecanismos de resistencia a antibióticos, convirtiéndolas en un peligro potencial para los consumidores.



V. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

OBJETIVOS GENERALES

- ✚ Aislar bacterias de carne de pescado y determinar su resistencia a diferentes antibióticos.
- ✚ Determinar la posible presencia de integrones en las bacterias multiresistentes a antibióticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

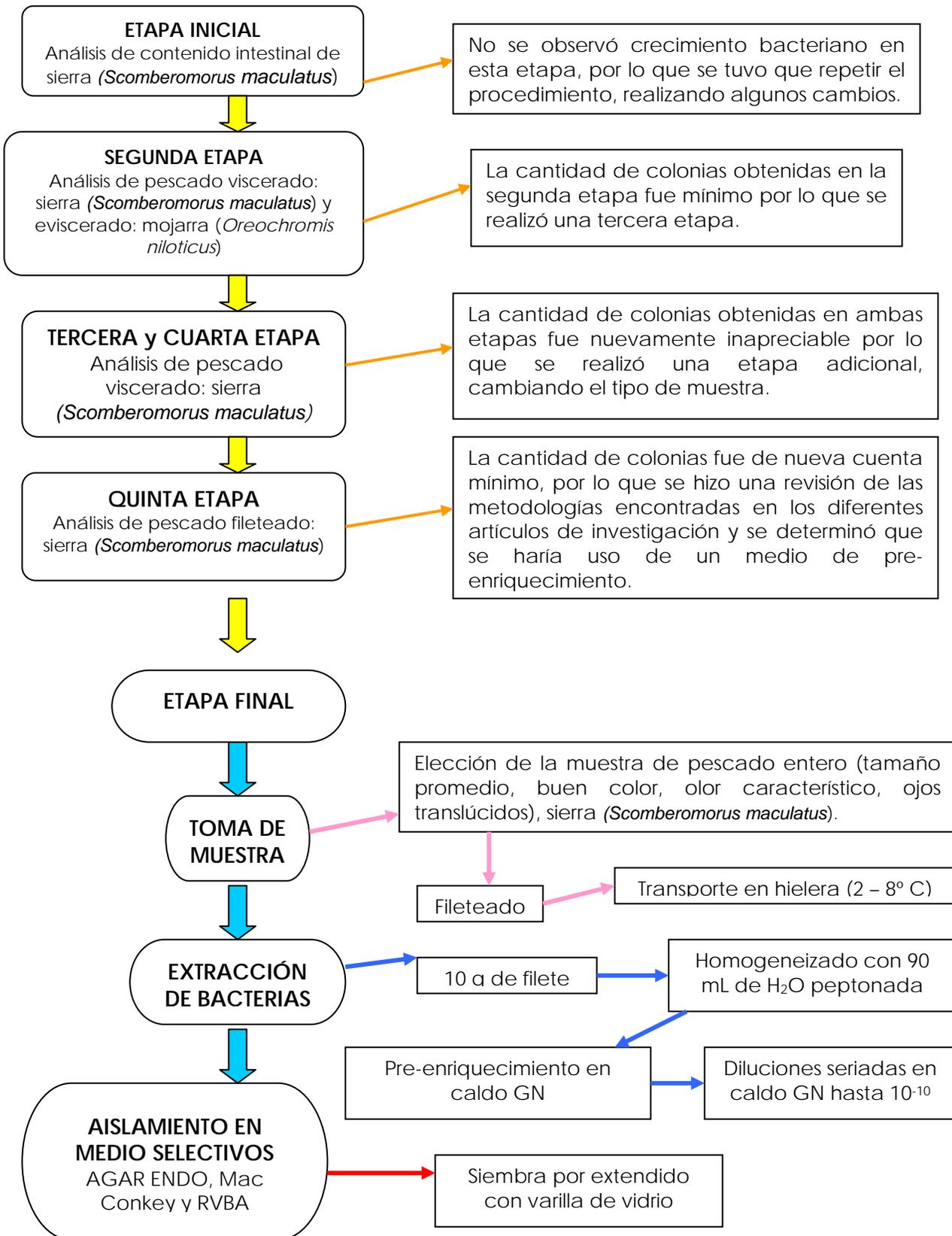
- ✓ Seleccionar e identificar microorganismos resistentes a antibióticos, mediante pruebas de susceptibilidad.
- ✓ Elegir cepas multiresistentes (resistentes a más de 5 antibióticos) e identificarlas con pruebas bioquímicas.
- ✓ Purificar ADN total de las cepas bacterianas seleccionadas.
- ✓ Búsqueda de la presencia del integrón 1 en el ADN de las bacterias seleccionadas, mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).



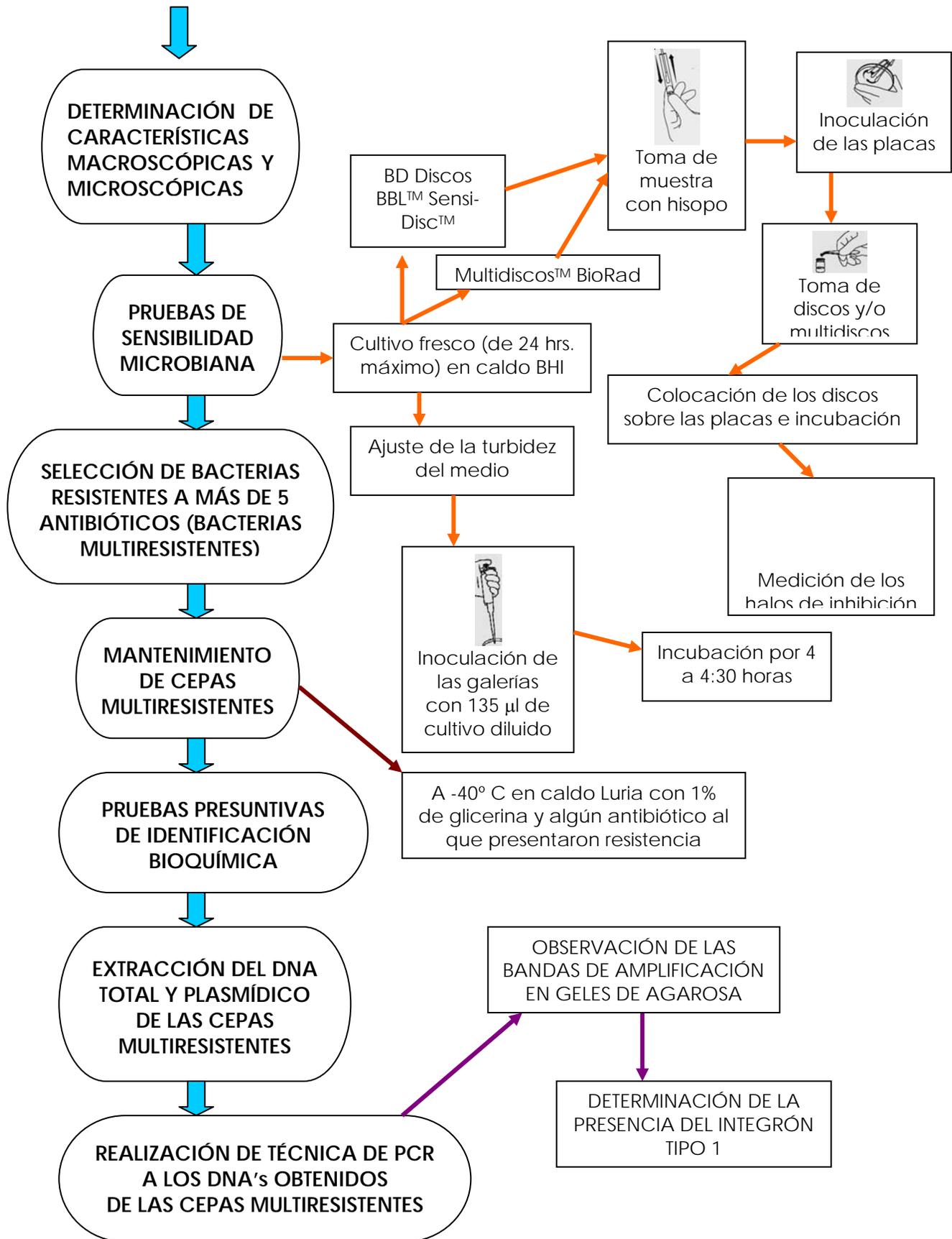
VI. PARTE EXPERIMENTAL



6.1 DIAGRAMA DE TRABAJO



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1



6.2 METODOLOGÍA

Para determinar el procedimiento a usar, se realizó una revisión bibliográfica de artículos de investigación basados en el tema (Castro E. G., *et al.*, 2003; Miranda C. D., Zemelman R., 2001; Petersen A., Dalgaard A., 2003; Radu S., *et al.*, 2003; Vitas A. I., *et al.*, 2004), además de las normas NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico"; NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico" y NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa".

- **ETAPA INICIAL (Análisis de contenido intestinal)**

TOMA DE MUESTRAS

Inicialmente se adquirió una muestra de pescado entero, con vísceras, de la especie sierra (*Scomberomorus maculatus*), la cual fue obtenida en una tienda de autoservicio, tienda Wal-Mart (Copilco), cercana a Ciudad Universitaria. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico", la toma de muestra debía realizarse evitando toda contaminación externa, tanto ambiental como humana, para asegurar su integridad; era difícil cumplir con estos lineamientos pues a pesar de venderse este alimento en un lugar cerrado se encuentra expuesto al aire libre. Para evitar



lo más que se pudiera la contaminación del pescado se tomaron algunas precauciones asépticas como tomar la muestra para análisis con guantes estériles y se transportó, independientemente del empaque en el que se expende el alimento en el supermercado, en una bolsa de polietileno estéril.

Se eligió un pescado de un tamaño promedio al resto de los exhibidos con características sensoriales admisibles como buen color, con un olor característico a pescado pero que ese olor no fuera demasiado intenso, ojos translúcidos y no amarillentos y con un color de piel parejo.

Para el transporte se mantuvo bajo condiciones de temperatura de 2 a 8 °C (con hielo) en una hielera, y se mantuvo a esa temperatura hasta el momento de comenzar el análisis.

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Inicialmente se decidió trabajar con el contenido intestinal del pescado, ya que en artículos revisados previamente se usaba esta parte del pescado.

Para la extracción y preparación de la dilución primaria se siguió el procedimiento de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico", para la preparación de la dilución primaria a partir de muestras sólidas o semisólidas; en este caso se trataba de una muestra sólida no congelada, pescado.

De forma aséptica se abrió el pescado, de la parte inferior, a la altura del estómago, cortando con sumo cuidado para no cortar el intestino. Una vez sacado el intestino del animal se procedió a "exprimir" el contenido intestinal,



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

todo lo que se pudiera obtener. Se pesaron 5 g de contenido intestinal, en una bolsa para Stomacher.

La muestra de contenido intestinal fue homogeneizada con 45 mL de agua peptonada al 1% (ver apéndice) durante un minuto hasta obtener una suspensión completa y homogénea.

Se dejó que las partículas grandes se sedimentaran, y se tomó 1 mL de la dilución primaria (10:1), tomándolo de las capas superiores de la suspensión y transfiriéndolo a un tubo que contenía 9 ml de agua peptonada al 1%, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Se mezcló cuidadosamente este tubo y se prepararon las diluciones decimales adicionales seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}).

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIOS SELECTIVOS

Se tomaron alícuotas de 1 mL de las últimas cuatro diluciones, las cuales fueron colocadas en cajas Petri estériles, por duplicado.

Se vertieron aproximadamente de 15 a 20 mL de los medios EMB-agar, KF-agar y BHI-agar (ver apéndice) que se encontraban a unos 45 °C, en las cajas con las distintas diluciones.

Una vez que se hubiesen enfriado los medios, se incubaron las cajas a 37 +/- 2 °C por 24 horas, en forma invertida.

De las mismas tres diluciones, se tomaron alícuotas de 100 µl, las cuales fueron sembradas por extendido con varilla de vidrio en cajas con medio agar Baird-Parker (ver apéndice). Cuando las muestras fueron absorbidas, las cajas fueron incubadas de forma invertida durante 24 horas a 37 +/- 2 °C.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Pasado el tiempo de incubación no se observó crecimiento bacteriano en ninguno de los medios usados, por lo que se tuvo que repetir el procedimiento, realizando algunos cambios.

- **SEGUNDA ETAPA (Análisis de pescado viscerado y eviscerado)**

TOMA DE MUESTRAS

Para repetir la técnica se usaron 2 tipos diferentes de pescado, uno de ellos fue con vísceras de la especie sierra (*Scomberomorus maculatus*) y se analizaron la piel, el músculo y el contenido intestinal; el otro tipo de pescado fue un eviscerado, mojarra (*Oreochromis niloticus*) del cual se analizaron la piel y el músculo que estaba en contacto con los intestinos.

Las muestras fueron obtenidas del mismo lugar y manejadas de igual manera que en el primer procedimiento.

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Para la extracción y preparación de la dilución primaria se siguió el procedimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico", para la preparación de la dilución primaria a partir de muestras sólidas o semisólidas; en este caso se trataba de una muestra sólida no congelada, pescado.

Del pescado que contenía vísceras fue tomada la muestra de contenido intestinal, de igual modo que en el primer procedimiento.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

De forma aséptica se obtuvieron y pesaron 5 g de contenido intestinal, piel y músculo de sierra (*Scomberomorus maculatus*), así como 5 g de piel y músculo (cercano a la parte donde se localizaba el intestino) de mojarra (*Oreochromis niloticus*), en bolsas para Stomacher.

Las muestras fueron homogeneizadas con 45 mL de agua peptonada al 1%, cada una, durante un minuto hasta obtener una suspensión completa y homogénea.

Se dejó que las partículas grandes se sedimentaran. Como se observó que haciendo uso de diluciones adicionales no se obtenía crecimiento bacteriano se decidió usar solo la dilución primaria.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIOS SELECTIVOS

Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada una de las diluciones primarias, las cuales fueron colocadas en cajas Petri estériles (por triplicado).

Para el vertido en placa se usó como medio selectivo ENDO-agar, realizando el mismo procedimiento que el anteriormente descrito.

El agar Baird-Parker fue inoculado y sembrado de igual modo que en el primer procedimiento.

Las placas con ambos medios fueron incubadas de forma invertida durante 24 horas a 37 +/- 2 °C.



DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS AISLADAS

Pasado el tiempo de incubación se realizó un conteo de las colonias obtenidas en cada medio y se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño, etc.

De las colonias que presentaron mejor crecimiento y que se encontraban más separadas, se les realizó tinción de Gram y se realizaron las observaciones microscópicas para determinar forma, agrupación, etc.

La cantidad de colonias obtenidas en la segunda etapa fue mínimo por lo que se realizó una tercera etapa.

- **TERCERA ETAPA (Análisis de pescado entero viscerado)**

TOMA DE MUESTRAS

En la tercera etapa se hizo uso de una muestra de pescado entero, con vísceras, de la especie sierra (*Scomberomorus maculatus*), la cual fue obtenida en un local de pescados y mariscos de mercado popular, ubicado en la colonia Obrero Popular en la delegación Azcapotzalco. Como la muestra es un alimento expuesto al aire libre en condiciones de venta poco controladas, no se requirió de precauciones estrictamente asépticas. Cuando se colectó la muestra se utilizaron guantes estériles desechables.

Las características del pescado fueron las mismas que en las etapas anteriores al igual que el manejo de la muestra.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

La extracción y preparación de la dilución primaria se realizaron como en la segunda etapa. Esto se realizó para piel, músculo y contenido intestinal.

El aislamiento de microorganismos en medios selectivos se realizó usando los medios RVBA (ver apéndice) y agar Baird-Parker; el primero se usó para vertido en placa y el segundo fue sembrado por extendido con varilla de vidrio. Las cajas fueron incubadas de forma invertida durante 24 horas a 37 ± 2 °C.

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS AISLADAS

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño, etc. La cantidad de colonias obtenidas en esta etapa fue nuevamente inapreciable por lo que se realizó una extracción más.

- **CUARTA ETAPA (Análisis de pescado entero viscerado)**

TOMA DE MUESTRAS

En el cuarto procedimiento se hizo uso de una muestra de pescado entero, con vísceras, de la especie sierra (*Scomberomorus maculatus*), la cual fue obtenida en otra tienda de autoservicio, tienda Comercial Mexicana (ubicada en el centro comercial Gran Sur). La toma de muestra, extracción y preparación de la dilución primaria fueron realizadas del mismo modo que en los procedimientos anteriores.

Las características del pescado y manejo de muestra fueron realizados del mismo modo que los descritos anteriormente.



La extracción y preparación de la dilución primaria, así como el aislamiento de microorganismos en medios selectivos fueron realizados siguiendo la misma metodología que en el cuarto procedimiento y usando los mismos medios.

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los medios selectivos (RVBA y Baird-Parker): forma, textura, tamaño, etc. La cantidad de colonias obtenidas en este procedimiento fue nuevamente inapreciable por lo que se realizó otra una etapa adicional, cambiando el tipo de muestra.

- **QUINTA ETAPA (Análisis de pescado fileteado)**

Se realizó una extracción más con muestra de filete de la especie sierra (*Scomberomorus maculatus*), obtenido en la misma tienda de autoservicio, tienda Comercial Mexicana (ubicada en el centro comercial Gran Sur). La toma de muestra, extracción y preparación de la dilución primaria fueron realizadas del mismo modo que en el primer y segundo procedimiento. En el caso de la muestra de filete de sierra solo se analizó el músculo obtenido de la parte cercana a donde se encontraba el intestino. Se realizaron diluciones hasta 10^{-3} , usando las tres diluciones para el aislamiento en medios selectivos. Se usaron los medios ENDO-agar y Agar Luria (ver apéndice), sembrando por agotamiento.

Al realizar la determinación de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas se observó que no hubo crecimiento en el medio ENDO y la cantidad de colonias en medio Luria era mínimo, por lo que se hizo una revisión



de las metodologías encontradas en los diferentes artículos de investigación y se determinó que se haría uso de un medio de pre-enriquecimiento.

- **ETAPA FINAL**

TOMA DE MUESTRAS

Se usaron 2 muestras de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*) adquiridas en una tienda de autoservicio, tienda Wal-Mart (Copilco), cercana a Ciudad Universitaria. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico", la toma de muestra debe realizarse evitando toda contaminación externa, tanto ambiental como humana, para asegurar su integridad; es difícil cumplir con estos lineamientos pues a pesar de venderse este alimento en un lugar cerrado se encuentra expuesto al aire libre; para evitar lo más que se pudiera la contaminación del pescado se tomaron algunas precauciones asépticas como tomar la muestra para análisis con guantes estériles y fue transportada, independientemente del empaque en el que se expende el alimento en el supermercado, en una bolsa de polietileno estéril.

Se eligieron pescados de un tamaño promedio al resto de los exhibidos con características sensoriales admisibles como buen color, con un olor característico a pescado pero que ese olor no fuera demasiado intenso, ojos translúcidos. El pescado se adquirió completo y en el lugar de venta fue fileteado y eviscerado.

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Para el transporte se mantuvo bajo condiciones de temperatura de 2 a 8 °C (con hielo) en una hielera, y se mantuvieron a esa temperatura hasta el momento de utilizarse.

EXTRACCIÓN DE BACTERIAS A PARTIR DE MUESTRAS DE FILETE DE SIERRA (nombre científico). Preparación de la dilución primaria y pre-enriquecimiento.

Para la extracción y preparación de la dilución primaria se siguió el procedimiento de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico".

Para la preparación de la dilución primaria a partir de muestras sólidas o semisólidas, en este caso se trataba de una muestra sólida no congelada, pescado; se pesaron de forma aséptica 10g de filete de sierra, los cuales fueron transferidos a una bolsa para Stomacher.

Se homogeneizó con 90 mL de agua peptonada al 1% durante un minuto a una velocidad media en el Stomacher, hasta obtener una suspensión completa y homogénea, se dejó que las partículas grandes se sedimentaran.

Para realizar el pre-enriquecimiento de la muestra se tomó 1 ml de la dilución primaria (10:1), tomándolo de las capas superiores de la suspensión y fue transferido a un tubo que contenía 9 ml de caldo GN (ver apéndice). Se mezcló cuidadosamente este tubo con el inóculo y se prepararon las diluciones decimales adicionales seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , y 10^{-4}) en el mismo caldo GN.

Los tubos con las diluciones realizadas fueron incubados a 37 +/- 2 °C durante 24 horas, contando con un control de esterilidad.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Al término del tiempo de incubación se observó un crecimiento abundante de muestra, por lo que se realizaron más diluciones, hasta 10^{-10} usando el mismo medio de pre-enriquecimiento.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIOS SELECTIVOS

Teniendo como referencia los procedimientos anteriores se decidió que no se estudiarían bacterias provenientes del ambiente y como la mayoría de éstas son cocos se hizo uso de medios que inhibieran el crecimiento de bacterias gram-positivas. Asumiendo esta consideración, se tomó de la última dilución hecha 100 μ l de inóculo, después del tiempo de incubación, y se transfirió a los medios ENDO-agar, agar MacConkey y RVBA, sembrando por extendido con varilla de vidrio cada uno de ellos.

Las cajas fueron incubadas de forma invertida durante 24 horas a 37 ± 2 °C.

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS AISLADAS

Se realizaron las observaciones macroscópicas de las colonias que crecieron en los diferentes medios selectivos: forma, textura, tamaño, etc.

De las colonias que presentaron mejor crecimiento y se encontraban más separadas, se les realizó tinción de Gram y se realizaron las observaciones microscópicas para determinar forma, agrupación, etc.

Las colonias mejor definidas y clasificadas microscópicamente fueron transferidas a caldo BHI para mantenerlas.



PRUEBAS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA

Para determinar la resistencia a antimicrobianos se utilizó un cultivo fresco (24 hrs. máximo) en caldo BHI de cada una de las cepas aisladas.

Se hizo uso de tres diferentes métodos de prueba: Multidiscos™ BioRad, BD Discos BBL™ Sensi-Disc™ y Antibiograma rápido para enterobacterias rapid ATB-G

La forma de usar cada uno fue la siguiente:

Multidiscos™ BioRad y BD Discos BBL™ Sensi-Disc™ para pruebas de susceptibilidad microbiana. Se inocularon placas de agar Muller-Hinton con un hisopo estéril de algodón, humedecido con la cepa a probar, se quitó el exceso del medio presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo; el medio fue estriado en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme. Cuando el inóculo se secó (de 3 a 5 minutos) se procedió a colocar los discos.

Los multidiscos™ BioRad o en su caso los discos BBL™ Sensi-Disc™ fueron colocados en las placas tomándolos con pinzas estériles (en un tiempo menor de 15 min. después de haber inoculado la placa) y presionando ligeramente para asegurar contacto con la superficie.

Después de colocar a los multidiscos y/o discos BBL™ Sensi-Disc™ se invirtieron las cajas Petri y se incubaron a 37 +/- 2 °C por 24 horas.

La medición de los halos de inhibición se realizó con regla, por el fondo de la caja.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Las cepas se clasificaron en resistentes (R), intermedias (I) o susceptibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición, según el instructivo de los discos utilizados (Barry Al and Thornsberry C., 1985).

Antibiograma rápido para Enterobacterias rapid ATB-G

En el caso de los antibiogramas, se realizaron cultivos frescos de cada una de las cepas, a los que les fue ajustada la turbidez a 0.5 unidades de McFarlan. De la suspensión se tomaron 50µl y se transfirieron a medio fresco. Se inoculó cada una de las galerías que contienen el antibiótico a probar, colocando 135µl del cultivo diluido en cada una de las cúpulas. Posteriormente se colocó una tapa sobre cada galería y se anotó la hora de inicio de incubación.

Se incubó a 37 +/- 2 °C durante 4-4:30 horas.

Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura de las galerías comparando el grado de turbidez de las cúpulas, clasificando las cepas en sensible o resistente.

Se seleccionaron las cepas que fueron resistentes a cinco o más antibióticos y se mantuvieron en caldo BHI, de ser posible, con algún antibiótico al cual sean resistentes y a la concentración correspondiente para seguir trabajando con ellas.

MANTENIMIENTO DE CEPAS MULTIREsISTENTES

Para mantener a las bacterias que presentaron resistencia a cinco o más antibióticos se crecieron las cepas en caldo Luria y se incubaron por 24 horas a 37 +/- 2 °C.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Después del tiempo de incubación los tubos donde se crecieron las bacterias fueron centrifugados a 3000 rpm. Se decantó el medio y con ayuda de una pipeta Pasteur se transfirió el pellet a un tubo eppendorf. Las células fueron resuspendidas en caldo Luria con 1% de glicerina y con algún antibiótico al que la cepa fue resistente.

Las cepas se mantuvieron a -40 °C.

PRUEBAS PRESUNTIVAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Las cepas seleccionadas como multiresistentes fueron sometidas a ensayos de identificación bacteriana, realizando las siguientes pruebas bioquímicas: Reducción de nitratos, Producción de ácido sulfhídrico (KIA), Prueba de la catalasa, Prueba del indol, Prueba de movilidad (SIM), Prueba de oxidación-fermentación (O/F), Prueba de la oxidasa, Prueba del rojo de metilo, Prueba de la ureasa, Prueba de utilización de carbohidratos, Prueba de Voges-Proskawer y Utilización del citrato.

EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL A PARTIR DE CEPAS AISLADAS DE CARNE DE PESCADO

Protocolo general para la extracción de ADN modificado de Palumbi S., 1991.

Se utilizaron aproximadamente entre 0.1 g y 5.0 g de células. Para obtener esta cantidad de células, se inocularon 100 ml de medio BHI, y se incubaron durante 18 horas en incubadora con agitación.

Se colocaron 20mL de cultivo obtenido en tubos para centrifuga, y se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm. Se retiró el sobrenadante.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Una vez conseguido el pellet se adicionaron 2 mL de buffer de lisis junto con 1g de perlas de vidrio que fueron previamente esterilizadas, en cada tubo usado.

Con la ayuda de un vortex se rompieron las células, agitando durante 8 minutos girando constantemente.

Se centrifugó a 10,000 g's durante 10 min. a una temperatura de 4 °C.

El sobrenadante fue recuperado y extraído suavemente con un volumen igual de fenol equilibrado.

Las fases fueron nuevamente centrifugadas a 10 000 g's, por 10 min., a 4 °C.

La fase acuosa (superior) fue recuperada y se le agregó un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1). Esto se mezcló suavemente.

Las fases fueron separadas por centrifugación a 10 000 g's, 10 min. a 4°C.

Se recuperó la fase acuosa (superior) y se agregó un volumen igual de cloroformo, mezclando suavemente.

Las fases se separaron centrifugando a 10 000 g's durante 10 min. a 4°C y se recuperó la fase acuosa (superior), midiendo su volumen.

Se agregaron 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M (o bien, 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M) y 0.5 volúmenes de isopropanol o bien, 1.5 volúmenes de etanol.

Se mezcló y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente.

Después del tiempo de reposo se centrifugó a 10 000 g's, por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se desecho cuidadosamente el sobrenadante lavando el pellet con etanol al 70%.

Se volvió a centrifugar a 10 000 g's, 10 minutos a temperatura ambiente.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Por último, se decantó el líquido cuidadosamente y se secó el pellet, resuspendiéndolo en 30 μ l de agua destilada estéril.

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

Se colocó cuidadosamente la siguiente mezcla con las cantidades indicadas en el gel de agarosa al 0.9%; 1 μ l de buffer de carga, 1 μ l de agua destilada estéril, 8 μ l de muestra o control.

El gel fue colocado en una cámara de corrida llena con solución Tris-boratos 0.5x aplicando una diferencia de potencial de 120 V durante 1 hora o bien cuando las bandas de bromofenol se encontraran a unos 4cm del borde anódico del gel.

Para visualizar a las bandas de DNA en el gel, se sumergió cuidadosamente en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) por 8 minutos. El exceso de bromuro de etidio fue eliminado del gel enjuagando en un recipiente con agua destilada por 10 min.

Se colocó el gel teñido sobre un trasluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298 nm).

EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE CEPAS AISLADAS DE CARNE DE PESCADO, minipreparación

Preparación de DNA plasmídico (Birmboin y Doly, 1979)

Para esta preparación se crecieron 5 mL de bacterias durante toda la noche en medio luria.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Del cultivo anterior se tomaron 1.5 mL, los cuales fueron transferidos a un tubo eppendorf y se centrifugó por 1 minuto.

Se decantó, dejando el pellet lo más seco posible.

Las células se resuspendieron en 100 μ l de solución I fría.

Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Fueron agregados 200 μ l de solución II fría y se mezcló por inversión e incubó por 15 minutos en hielo.

Se agregaron 150 μ l de solución III fría.

Se centrifugó por 5 minutos.

El sobrenadante se recuperó y centrifugó por 5 minutos.

Se volvió a recuperar el sobrenadante e incubó por 20 minutos a 37 °C.

Se agregó un volumen igual de fenol equilibrado/cloroformo (1:1) saturado con TE.

Se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 30 segundos.

La fase acuosa se recuperó y le fue agregados 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

Se incubó por 5 minutos a -70 °C. Después de este tiempo se centrifugó por 5 minutos.

Se decantó y enjuagó el pellet con 100 μ l de etanol al 70%.

El pellet fue secado y resuspendido en 20 μ l de agua.

Una vez que se obtuvo el DNA plasmídico, fue observado en un gel de agarosa al 0.9% junto con el marcador de pesos que corresponde a 0.1 μ g de DNA de fragmentos del fago λ por pocillo.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Se colocó cuidadosamente la siguiente mezcla con las cantidades indicadas en el gel de agarosa al 0.9%; 1 μ l de buffer de carga, 1 μ l de agua destilada estéril, 8 μ l de muestra o control.

El gel fue colocado en una cámara de corrida llena con solución Tris-boratos 0.5x aplicando una diferencia de potencial de 120 V durante 1 hora o bien cuando las bandas de bromofenol se encontraran a unos 4cm del borde anódico del gel.

Para visualizar las bandas de DNA en el gel, se sumergió cuidadosamente en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) por 8 minutos. El exceso de bromuro de etidio fue eliminado del gel enjuagando en un recipiente con agua destilada por 10 min.

Se colocó el gel teñido sobre un trasluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298 nm)

TÉCNICA DE PCR

Para empezar, se colocaron unos microtubos eppendorf en hielo.

Se agregaron los siguientes componentes en el orden descrito:

- a) 45 μ l de buffer PCR *Supermix INVITROGEN*
- b) 1 μ l de cada una de las soluciones de los *primers* SUL 1B e INT F (se recomienda tener una concentración final de 200nM de cada uno).
- c) Se adicionó 1 μ l de DNA bacteriano (se recomienda tener una concentración de 1-3ng)
- d) Se adicionaron 2 μ l de agua desionizada estéril para obtener un volumen total de 50 μ l.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Se taparon perfectamente los tubos y el contenido fue mezclado.

Los tubos se colocaron en el termociclador.

Se comenzó con el programa de PCR, amplificando por 30 ciclos.

1. Arranque 3 minutos a 96 °C
2. Desnaturalización 15 segundos a 96 °C
3. Hibridación 30 segundos, 55 °C
4. Elongación 90 segundos, 72 °C
5. Repetición del paso 2 al 4 durante 29 ciclos
6. Etapa final 10 min. a 72 °C

Al final, se realizó un gel de agarosa 0.9% y se corrieron las muestras junto con el marcador de pesos moleculares, con una diferencia de potencial de 120 V durante 35 minutos.

Para observar las bandas de amplificación, se utilizó la misma técnica descrita en el protocolo de DNA total y plasmidico.



VII. RESULTADOS



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

❖ EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE MORFOLOGÍA BACTERIANA

A partir de la extracción realizada a dos muestreos de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*), comprados en la tienda de autoservicio Wal-Mart, se aislaron un total de **120 colonias**, las cuales fueron obtenidas de la siembra en los medios selectivos: Mac Conkey, ENDO y Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis. La morfología colonial que presentaron en los distintos medios, se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Morfología macroscópica

MEDIO DE CULTIVO	# DE COLONIAS AISLADAS	MORFOLOGÍA COLONIAL
Mac Conkey	50	<ul style="list-style-type: none"> - colonias rojas, brillantes, planas y de aproximadamente 2mm de diámetro. - colonias rosas, opacas y de aproximadamente 1mm de diámetro.
ENDO	48	<ul style="list-style-type: none"> - colonias de color roja, puntiformes. - colonias de color roja, brillantes y de aproximadamente 1mm de diámetro. <p align="center">Ambos tipos de colonias eran lactosa positivo</p>
Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis (RVBA)	22	<ul style="list-style-type: none"> - colonias de color rosa muy tenue, opacas y puntiformes. - colonias blancas con centro de color rosa-rojo, planas, brillantes y de aproximadamente 1mm de diámetro.

Tabla 9. Tabla en donde se muestra la morfología macroscópica de las 120 colonias aisladas a partir de dos muestras de filete de sierra.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

La morfología microscópica observada de las cepas aisladas después de realizada la tinción de gram fue, en su totalidad bacilos cortos, de extremos redondos, gram-negativos, en su mayoría se confundían con cocos pues eran demasiados cortos, a esta forma se le denomina cocobacilos; en algunas colonias se pudieron observar ciertos bacilos que se encontraban agrupados en grupos de hasta 10 bacilos, en otras colonias unas cuantos bacilos se encontraban en pares, pero en su mayoría los bacilos no tenían agrupación.

A estas cepas, ya aisladas, se les dieron distintas claves para poder diferenciarlas, fueron numeradas al azar y se les puso una inicial dependiendo del medio de donde fueron aisladas, para las provenientes de agar ENDO se las identificó con una E (#E); a las procedentes de agar Mac Conkey se le marcó con una M y un uno o un dos, ya que se tomaron de dos cajas distintas (# M(1) o #M(2)); por último a las aisladas del medio RVBA se les marcó con una R (#R)

❖ RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Las 120 cepas aisladas se sometieron a pruebas de sensibilidad con un total de 30 antibióticos, los cuales fueron; amikacina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, azitromicina, aztreonam, bacitracina, carbenicilina, cefalotina, cefazolina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, cotrimoxazol, gentamicina, imipenem, kanamicina, lincomicina, nal-



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

quinolonas, netilmicina, nitrofurantoína, pefloxacina, penicilina, sulfametoxazol, tetraciclina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulánico, tobramicina.

El resultado de las pruebas de sensibilidad indicaron que, 31 cepas de las 120 aisladas, fueron resistentes a cinco o más antibióticos; mientras que el resto (89 cepas) solo fue resistente a 1 o hasta 4 antimicrobianos. Los porcentajes que representa cada caso se muestra en la figura 7.

Figura 7. Gráfica del porcentaje de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas

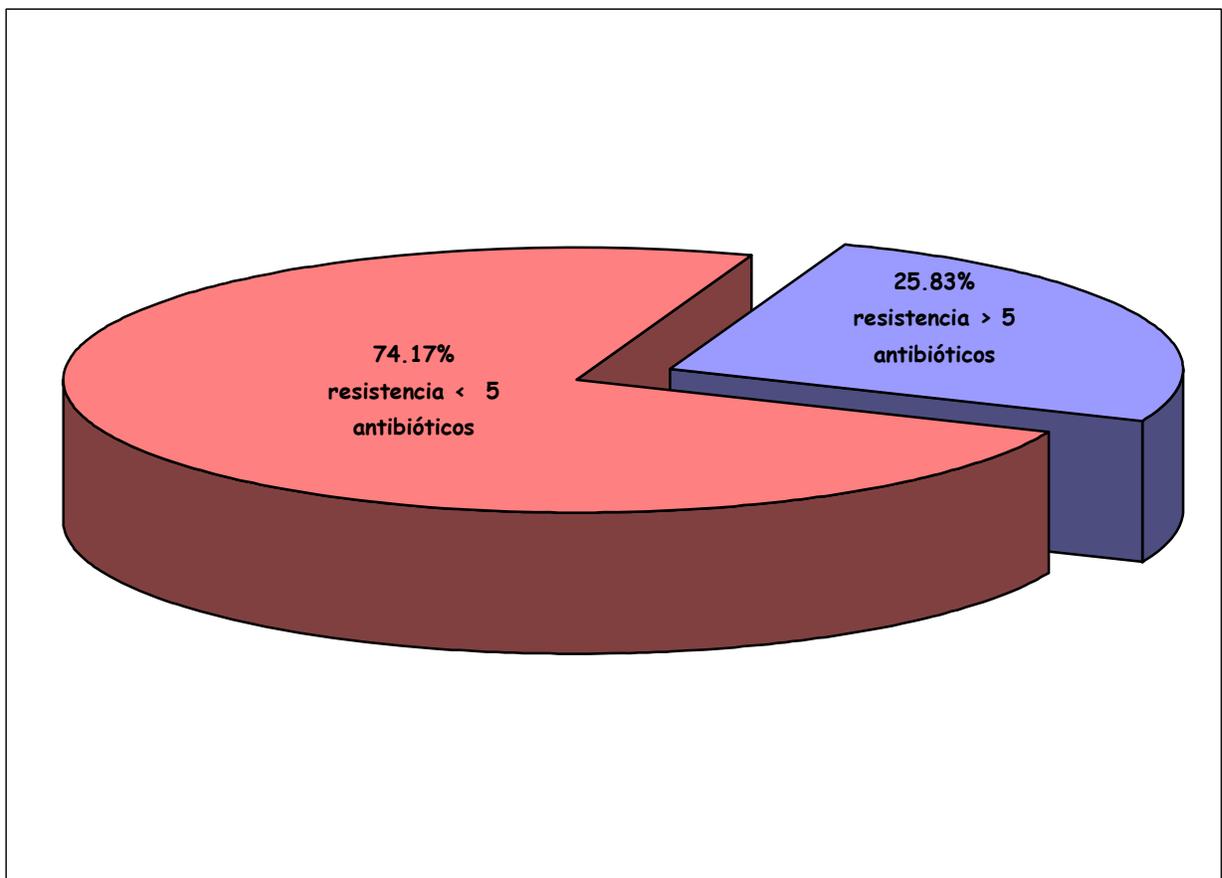


Figura 7. Gráfica en el que se muestra el porcentaje de cepas que fueron resistentes a 5 o más antibióticos, así como aquellas que fueron resistentes a menos de 5; de un total de 120 cepas.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Con base en estos resultados, se definió (para este trabajo) que una cepa que fuera resistente a por lo menos cinco antibióticos se consideraría como una bacteria multiresistente.

De los 30 antibióticos probados, resultó que el máximo de resistencia se dio a 16, mostrándose en la figura 8 la relación entre el porcentaje de cepas multiresistentes de acuerdo al número de antibióticos al que fueron resistentes, desde 5 hasta 16.*

Figura 8. Gráfica del porcentaje de resistencia de las cepas multiresistentes por número de antibiótico

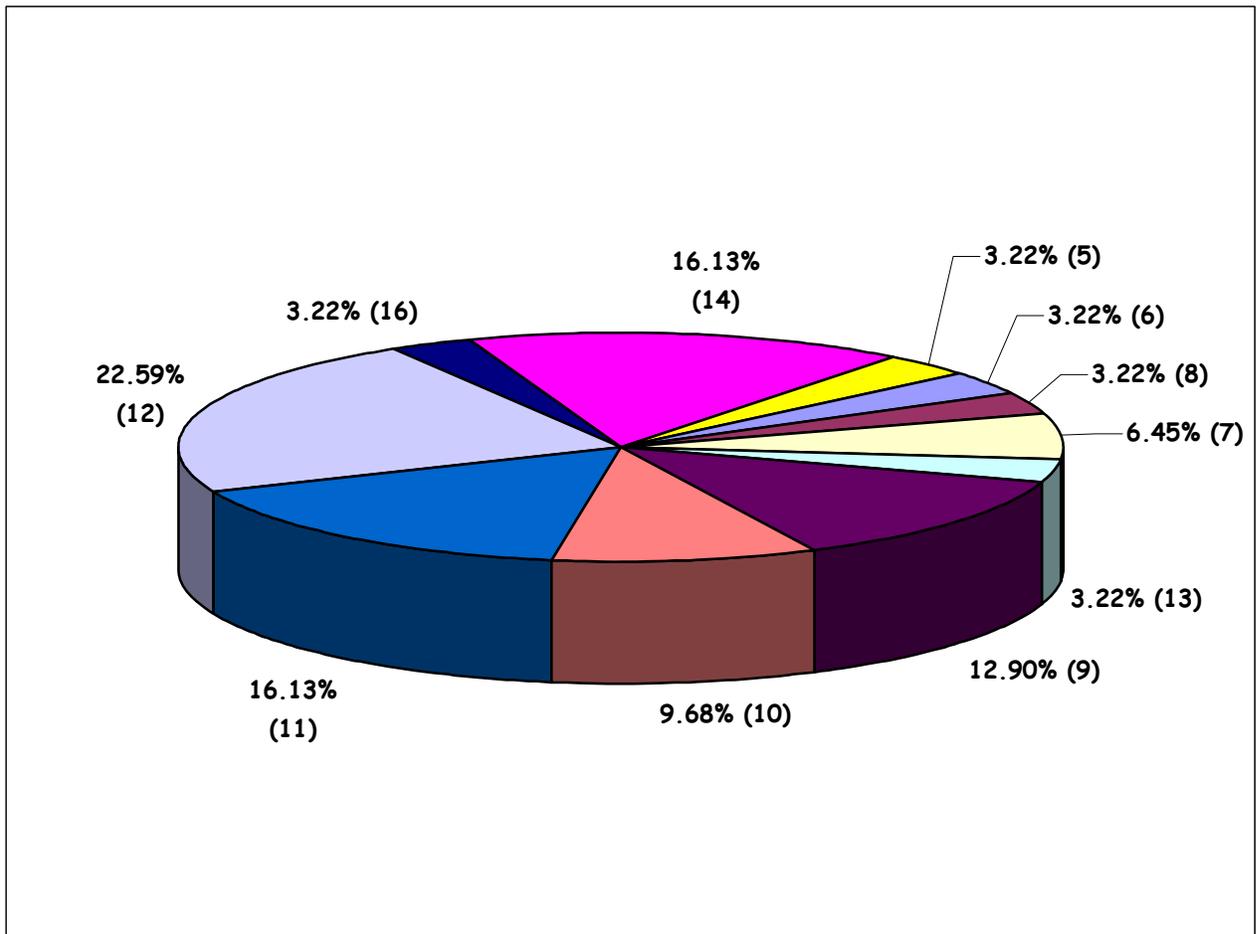


Figura 8. Gráfica de los porcentajes de resistencia que presentaron las cepas, a la menor y mayor cantidad de antibióticos a los que fueron multiresistentes.

*Los resultados de las pruebas de sensibilidad de cada cepa a cada uno de los 30 antibióticos se describe detalladamente en la tabla 10.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 10. Resultado de las pruebas de sensibilidad de las 31 cepas multiresistentes.

ANTIBIÓTICO	Amikacina (amk)	Amoxicilina (amo)	Amoxicilina / ácido clavulánico (amc)	Ampicilina (am)	Azitromicina (azm)	Aztreonam (atm)	Bacitracina (ta)	Carbenicilina (cb)	Cefalotina (cf)	Cefazolina (cz)
CEPA										
1E	R	I	R	R	S	I	R	R	R	R
2E	R	I	I	R	R	I	R	R	S	R
3E	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R
4E	R	I	I	R	R	I	R	R	R	I
5E	R	I	I	R	R	I	R	R	R	R
6E	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R
7E	R	I	I	R	R	I	R	R	I	R
8E	R	I	I	R	R	S	R	I	R	R
4R	R	I	I	R	R	S	R	R	R	R
6R	R	I	S	R	R	S	R	I	R	R
9R	S	R	R	I	I	S	R	S	R	R
11R	S	I	R	I	R	I	R	I	R	R
12R	S	I	S	I	R	S	R	R	R	R
13R	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R
15R	R	I	I	R	I	I	R	R	R	R
16R	R	I	S	R	I	I	R	R	R	R
18R	R	I	I	R	I	S	R	R	R	R
19R	R	I	R	R	I	S	R	R	R	R
20R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R
21R	R	I	S	R	I	S	R	R	R	R
22R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R
23R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R
24R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
4M(1)	S	R	R	I	R	S	R	I	I	R
5M(1)	S	I	S	I	R	S	R	I	R	R
8M(1)	S	I	I	I	R	S	R	S	R	R
9M(1)	S	R	R	I	R	S	R	S	R	R
11M(1)	R	R	R	I	R	S	R	S	R	R
15M(1)	S	I	S	I	R	S	R	S	R	R
16M(1)	S	R	R	I	R	S	R	S	R	R
12M(2)	R	I	I	R	R	S	R	I	R	S

(continúa)

Tabla 10. En esta tabla se presenta la respuesta de cada una de las 31 cepas multiresistentes a los 30 antibióticos probados. Las letras usadas representan **R = resistentes**, **I = intermedias**, **MS = moderadamente sensible**, **S = susceptible**. Los colores usados son para diferencia la respuesta de cada cepa a los distintos antibióticos.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 10. Resultado de las pruebas de sensibilidad de las 31 cepas multiresistentes
(continuación)

ANTIBIÓTICO	Cefoperazona (cfp)	Cefotaxima (ctx)	Ceftazidima (caz)	Ceftriaxona (cro)	Cloranfenicol (cl)	Cotrimoxazol (tsu)	Gentamicina (ge)	Imipenem (imi)	Kanamicina (ka)	Lincomicina (L)
CEPA										
1E	I	I	I	R	I	S	R	S	R	R
2E	I	I	I	S	S	S	R	S	R	R
3E	I	I	S	S	S	S	R	S	R	R
4E	I	R	I	S	S	S	R	S	R	R
5E	I	MS	S	S	S	S	R	S	R	R
6E	I	S	S	S	S	S	R	S	I	R
7E	I	S	S	S	S	S	R	S	R	R
8E	I	S	S	S	S	S	R	S	R	R
4R	I	I	I	S	S	S	R	S	I	R
6R	I	R	S	S	S	S	R	S	I	R
9R	S	I	S	S	S	S	R	S	I	R
11R	I	R	I	S	S	S	R	S	I	R
12R	I	R	I	S	R	S	R	S	I	R
13R	I	MS	I	S	R	S	R	S	I	R
15R	I	S	I	S	R	S	R	S	I	R
16R	I	R	I	S	S	S	R	S	I	R
18R	I	R	I	S	R	S	R	S	I	R
19R	I	R	I	S	S	S	R	S	I	R
20R	I	R	I	S	R	S	R	S	I	R
21R	I	I	S	S	S	S	I	S	I	R
22R	I	R	I	S	I	S	R	S	I	R
23R	S	R	I	S	S	S	I	S	I	R
24R	I	S	S	S	S	S	R	S	I	R
4M(1)	I	MS	S	S	I	S	R	S	R	R
5M(1)	I	S	S	S	S	S	R	S	I	R
8M(1)	I	S	S	S	I	S	I	S	I	R
9M(1)	I	S	S	S	S	S	R	S	I	R
11M(1)	R	I	S	S	I	S	R	S	I	R
15M(1)	R	I	S	S	S	S	I	S	I	R
16M(1)	R	I	S	S	S	S	R	S	I	R
12M(2)	I	I	S	S	S	S	R	S	I	R

(continúa)

Tabla 10. En esta tabla se presenta la respuesta de cada una de las 31 cepas multiresistentes a los 30 antibióticos probados. Las letras usadas representan **R = resistentes**, **I = intermedias**, **MS = moderadamente sensible**, **S = susceptible**. Los colores usados son para diferencia la respuesta de cada cepa a los distintos antibióticos.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 10. Resultado de las pruebas de sensibilidad de las 31 cepas multiresistentes (continuación)

ANTIBIÓTICO CEPA	Nal-quinolona (nal)	Netilmicina (net)	Nitrofurantoína (nf)	Pefloxacina (pef)	Penicilina (pe)	Sulfametoxazol (stx)	Tetraciclina (tet)	Ticarcilina (Tic)	Ticarcilina / ácido clavulánico (tim)	Tobramicina (tob)
1E	S	I	R	I	R	S	S	R	S	S
2E	S	I	S	I	R	S	S	R	I	I
3E	S	R	S	S	R	S	I	R	I	R
4E	S	R	R	S	R	S	I	R	I	I
5E	S	S	S	I	R	S	S	R	S	I
6E	S	I	I	S	R	S	S	R	I	R
7E	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S
8E	S	S	R	S	R	S	S	R	I	S
4R	S	I	S	I	R	S	S	R	S	S
6R	S	I	S	S	R	S	R	I	S	R
9R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
11R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R
12R	S	S	S	S	I	S	R	R	S	I
13R	S	S	S	S	I	S	S	I	S	R
15R	S	I	R	I	R	S	S	I	S	R
16R	S	R	S	I	R	S	S	I	S	S
18R	S	I	S	S	R	S	S	I	I	S
19R	S	I	R	S	R	S	S	R	I	R
20R	S	I	S	S	R	S	S	I	S	R
21R	S	S	S	I	R	S	S	R	S	S
22R	S	I	I	I	R	S	S	I	S	R
23R	S	S	S	I	R	S	S	I	S	R
24R	S	I	S	I	R	S	S	R	I	S
4M(1)	S	R	S	I	I	S	S	I	S	S
5M(1)	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S
8M(1)	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
9M(1)	S	R	S	S	I	S	S	I	I	S
11M(1)	S	R	S	S	I	S	S	I	S	S
15M(1)	S	R	S	I	I	S	S	I	I	S
16M(1)	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S
12M(2)	S	I	S	S	R	R	S	I	I	S

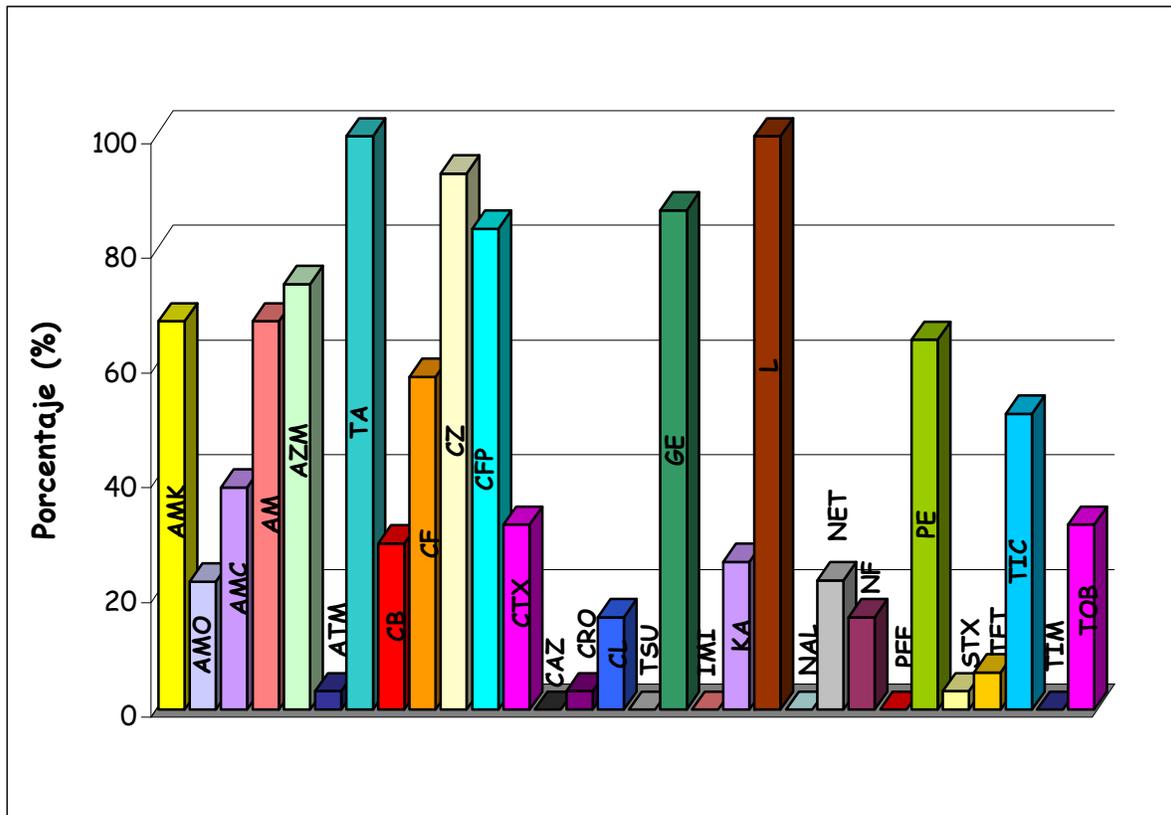
Tabla 10. En esta tabla se presenta la respuesta de cada una de las 31 cepas multiresistentes a los 30 antibióticos probados. Las letras usadas representan **R = resistentes**, **I = intermedias**, **MS = moderadamente sensible**, **S = susceptible**. Los colores usados son para diferencia la respuesta de cada cepa a los distintos antibióticos.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Al analizar la resistencia que tuvo cada cepa a determinado número de antibióticos, se pudo determinar la diferencia que había entre uno y otro, es decir, la resistencia a lincomicina no representa el mismo porcentaje que para tobramicina, etc. En la figura 9 se representan los porcentajes de resistencia hacia cada uno de los antibióticos probados por parte las 31 cepas multiresistentes aisladas; y en la tabla 11 se muestran estos porcentajes.

Figura 9. Gráfica del porcentaje de colonias resistentes a cada antibiótico



En la figura 9 se presenta una gráfica que muestra el porcentaje de resistencia que se presentó hacia cada uno de los antibióticos usados por parte de las cepas multiresistentes. Las iniciales usadas en cada barra corresponden a: **AMK**=amikacina, **AMO**=amoxicilina, **AMC**=amoxicilina/ácido clavulánico, **AM**=ampicilina, **AZM**=azitromicina, **ATM**=aztreonam, **TA**=bacitracina, **CB**=carbenicilina, **CF**=cefalotina, **CZ**=cefazolina, **CFP**=cefoperazona, **CTX**=cefotaxima, **CAZ**=ceftazidima, **CRO**=ceftriaxona, **CL**=cloranfenicol, **TSU**=cotrimoxazol, **GE**=gentamicina, **IMI**=imipenem, **K**=kanamicina, **L**=lincomicina, **NAL**=nal-quinolonas, **NET**=netilmicina, **NF**=nitrofurantoina, **PEF**=pefloxacina, **PE**=penicilina, **STX**=sulfametoxazol, **TET**=tetraciclina, **TIC**=ticarcilina, **TIM**=ticarcilina/ácido clavulánico, **TOB**=tobramicina.



Tabla 11. Porcentajes de resistencia a cada antibiótico

ANTIBIÓTICO	% DE RESISTENCIA	ANTIBIÓTICO	% DE RESISTENCIA
Amikacina	67.74	Cotrimoxazol	0
Amoxicilina	22.358	Gentamicina	87.1
Amoxicilina/ ácido clavulánico	38.71	Imipenem	0
Ampicilina	67.74	Kanamicina	25.81
Azitromicina	74.19	Lincomicina	100
Aztreonam	3.22	Nal-quinolon	0
Bacitracina	100	Netilmicina	22.58
Carbenicilina	29.03	Nitrofurantoína	16.13
Cefalotina	58.06	Pefloxacina	0
Cefazolina	93.55	Penicilina	64.52
Cefoperazona	83.87	Sulfametoxa	3.22
Cefotaxima	32.26	Tetraciclina	6.45
Ceftazidima	0	Ticarcilina	51.61
Ceftriaxona	3.22	Ticarcilina/ácido clavulánico	0
Cloranfenicol	16.13	Tobramicina	32.26

Tabla 11. En esta tabla se presentan los porcentajes de resistencia de las 31 cepas multiresistentes aisladas, frente a cada uno de los 30 antibióticos probados. En negritas se marcaron aquellos antibióticos a los que más del 50% de las cepas presentaron resistencia

De esta relación se pudo ver que las familias de antibióticos a las que las cepas (más de 50%) presentaron mayor frecuencia de resistencia, pertenecen a los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), las cefalosporinas (cefalotina, cefazolina y cefoperazona), macrólidos (azitromicina y lincomicina), penicilinas (ampicilina, penicilina y ticarcilina) y péptidos (bacitracina). El mecanismo de acción de cada una es: la bacitracina interfiere con el proceso de formación del polímero lineal de péptidoglucano; las penicilinas se fijan al centro activo de la



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

enzima transpeptidasa, evitando el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano, la cefalosporinas actúan del mismo modo que las penicilinas; los macrólidos y aminoglucósidos se fijan irreversiblemente a la subunidad 30S de los ribosomas e inhiben la síntesis protéica en distintos puntos.

❖ IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Para poder hacer una identificación presuntiva del tipo de microorganismos con los que se trabajó, las cepas multiresistentes aisladas fueron sometidas a identificación bioquímica. Los resultados de cada una de las pruebas se muestran en la tabla 12.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 12. Resultados de pruebas de identificación bioquímica

PRUEBA CEPA	Oxidasa	Citrato	Oxido/Fermentación glucosa	Urea	Catalasa	Movilidad	V/P	Reducción de nitratos	Indol
1E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
2E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
3E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-) H ₂ S +++	(-)	(+)	(-)
4E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-) H ₂ S +++	(-)	(+)	(-)
5E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-) H ₂ S ++++	(-)	(+)	(-)
6E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-) H ₂ S ++	(+)	(+)	(-)
7E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-) H ₂ S ++	(-)	(+)	(-)
8E	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
4R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
6R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
9R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
11R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
12R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
13R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
15R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
16R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
18R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
19R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
20R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
21R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
22R	(+)	(+)*	F	(-)	(+) muy poco	(-)	(-)	(+)	(-)
23R	(+)	(+)*	F	(-)	(+)muy poco	(-)	(-)	(+)	(-)
24R	(+)	(+)*	F	(-)	(+) muy poco	(-)	(-)	(+)	(-)
4M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+) muy poco	(-)	(-)	(+)	(-)
5M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
8M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
9M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
11M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
15M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
16M(1)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
12M(2)	(+)	(+)*	F	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)

Tabla 12. En esta tabla se presentan las reacciones que tuvieron las cepas como respuesta a las pruebas bioquímicas que se les realizaron. La nomenclatura usada en cada caso es (+) = reacción positiva; (+)* = reacción positiva con crecimiento bacteriano; (-) = reacción negativa; H₂S = producción de ácido sulfhídrico; F = metabolismo fermentativo



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 12. Resultados de pruebas de identificación bioquímica (continuación)

PRUEBA	Agar Kingler	Fermentación de carbohidratos								
		Dextrina	Galactosa	Inositol	Maltosa	Manitol	Sacarosa	Salicina	Sorbitol	Xilosa
1E	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
2E	24h A/A 48h Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
3E	Alc/A (c/gas) H ₂ S	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
4E	Alc/A (c/gas) H ₂ S	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
5E	Alc/A (c/gas) H ₂ S	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
6E	Alc/A (c/poco gas) H ₂ S	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
7E	Alc/A (c/ mucho gas) H ₂ S	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
8E	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
4R	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
6R	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
9R	24h A/A 48h Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
11R	24h A/A 48h Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
12R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
13R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	Alc	A	A	A
15R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	Alc	A	A	A
16R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
18R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
19R	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
20R	Alc/A (c/poco gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
21R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
22R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
23R	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
24R	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
4M(1)	Alc/A (c/poco gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
5M(1)	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
8M(1)	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	Alc	A	A	A
9M(1)	A/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
11M(1)	Alc/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	Alc	A	A	A
15M(1)	A/A (c/gas)	Alc	A	Alc	A	A	Alc	A	A	A
16M(1)	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A
12M(2)	Alc/A (c/mucho gas)	Alc	A	Alc	A	A	A	A	A	A

Tabla 12 (continuación). En la continuación de la tabla la nomenclatura usada en cada caso es; Alc/A = fondo del tubo ácido y pico de flauta ácido (fermentación de glucosa); A/A = fondo del tubo ácido y pico de flauta ácido (fermentación de lactosa); Alc = respuesta alcalina; A = respuesta ácida



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Las reacciones presentadas en cada una de las pruebas permiten decir presuntivamente que los microorganismos presentes en las muestras de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*) pertenecen al género *Aeromonas*, siendo de especial interés la identificación de este microorganismo en la muestra ya que forma parte de la flora normal del pescado (Frazier and Westhoff, 2003), además de ser un microorganismo autóctono de ambientes acuáticos. Algunas de las reacciones que presenta este género bacteriano al someterlo a un mayor número de pruebas de identificación, así como otra información relevante son descritas en el anexo 7.

❖ DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INTEGRÓN TIPO 1.

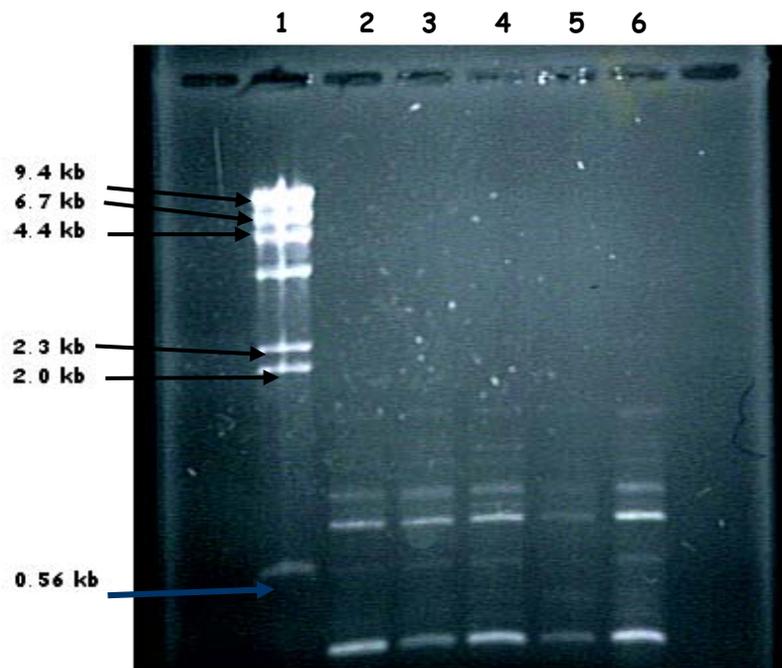
Se realizó la extracción de DNA total de cada una de las 31 cepas multiresistentes, además de la extracción de DNA plasmídico de algunas de estas cepas, para determinar la posible presencia del integrón tipo 1, por medio de la técnica de PCR. Para la realización de esta técnica se usaron dos *primers* específicos para el integrón tipo 1, uno de ellos es denominado sul1-B y posee la secuencia de nucleótidos 5' GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC 3', el otro primer es int-F el cual posee la secuencia 5' GGC ATC CAA GCA GCA AGC3'.

Los productos obtenidos con esta técnica fueron analizados en geles de agarosa, los cuales se presentan a continuación, tanto para DNA total como para DNA plasmídico.



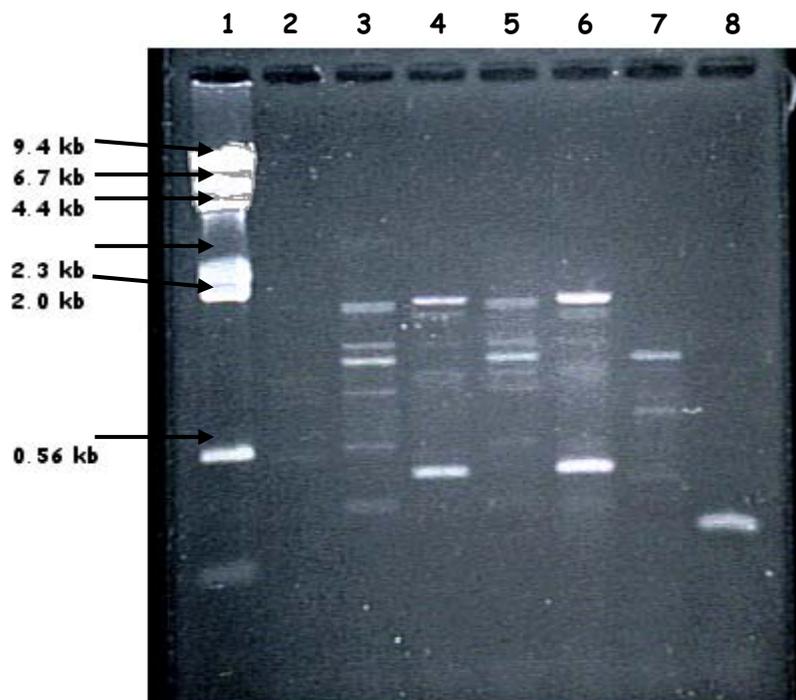
Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Figura 10. Gel con productos de amplificación de DNA total.



En la figura 10 se presentan los productos de PCR de DNA total, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Cepa 4R. 3) Cepa 20R. 4) Cepa 4M (1). 5) Cepa 5M (1). 6) Cepa 9M (1).

Figura 11. Gel con productos de amplificación de DNA total.

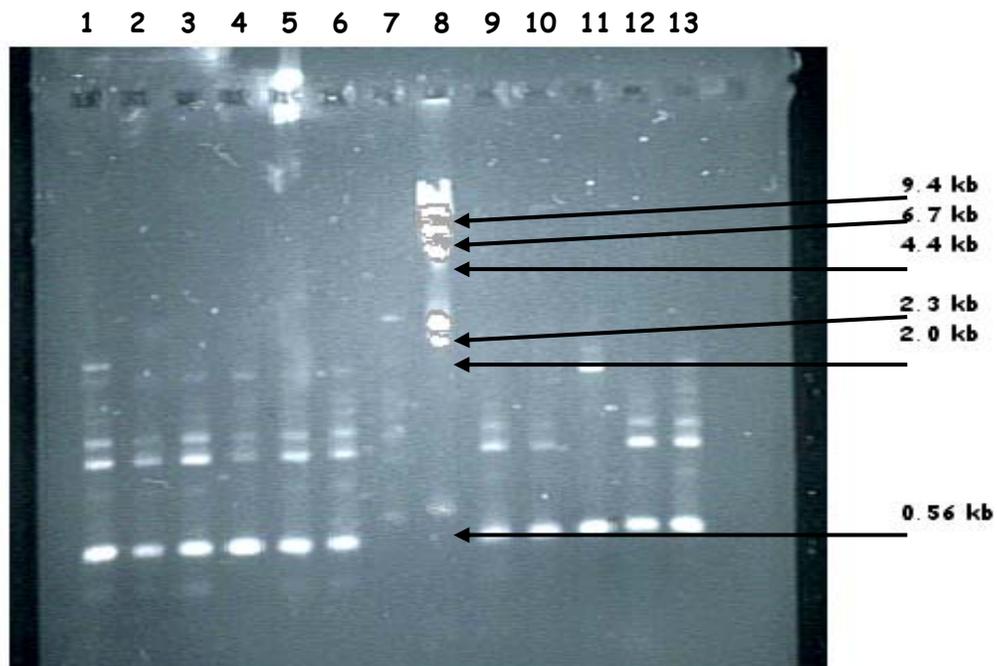


En la figura 11 se presentan los productos de PCR de DNA total, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 3) Cepa 1E. 4) Cepa 3E. 5) Cepa 4E. 6) Cepa 5E. 7) Cepa 6R. 8) Cepa 9R.



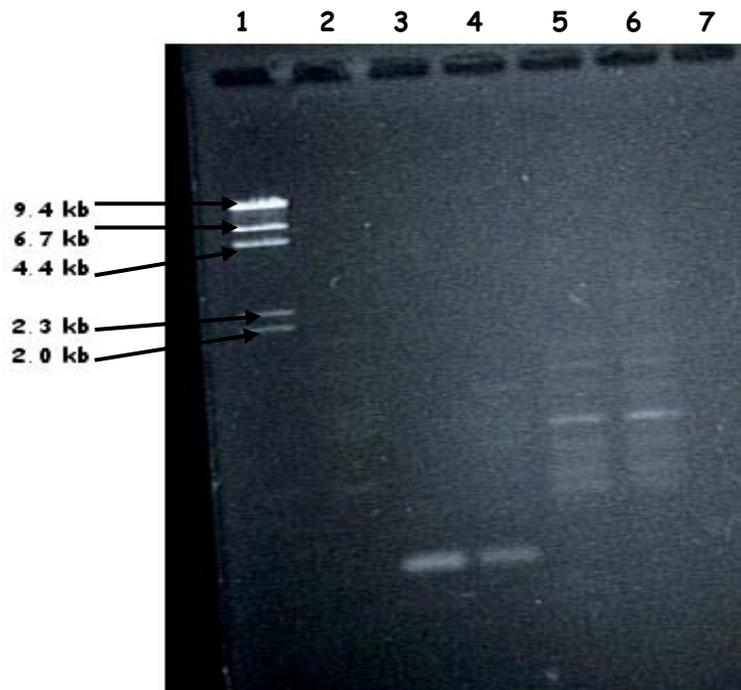
Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Figura 12. Gel con productos de amplificación de DNA total.



En la figura 12 se presentan los productos de PCR de DNA total, de las muestras: Carriles: 1) Cepa 2E. 2) Cepa 6E. 3) Cepa 12R. 4) Cepa 13R. 5) Cepa 15R. 6) Cepa 16R. 7) Control negativo. 8) Marcador de pesos moleculares λ . 9) Cepa 18R. 10) Cepa 19R. 11) Control positivo. 12) Cepa 20R. 13) Cepa 21R.

Figura 13. Gel con productos de amplificación de DNA total.

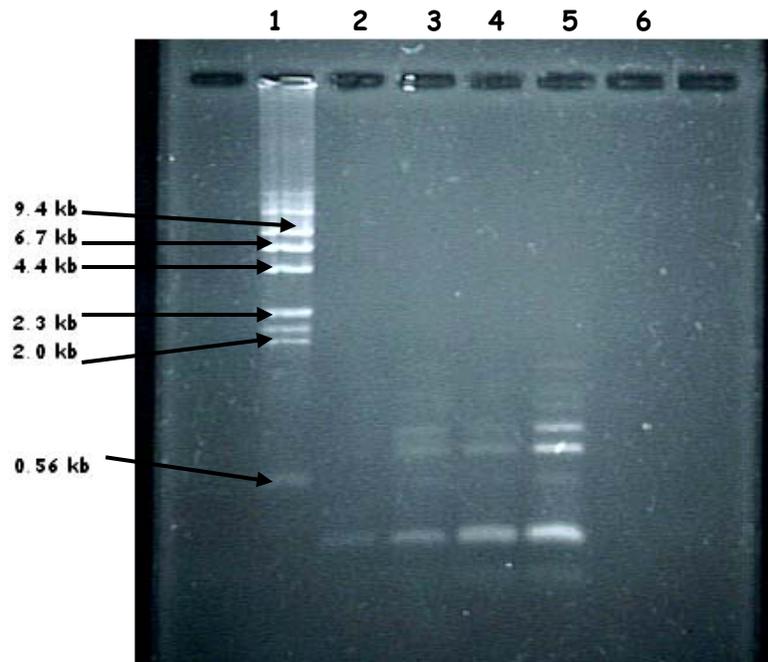


En la figura 13 se presentan los productos de PCR de DNA total, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Control negativo. 3) Cepa 11M (1). 4) Cepa 11R. 5) Cepa 23R. 6) Cepa 24R. 7) Cepa 7E.



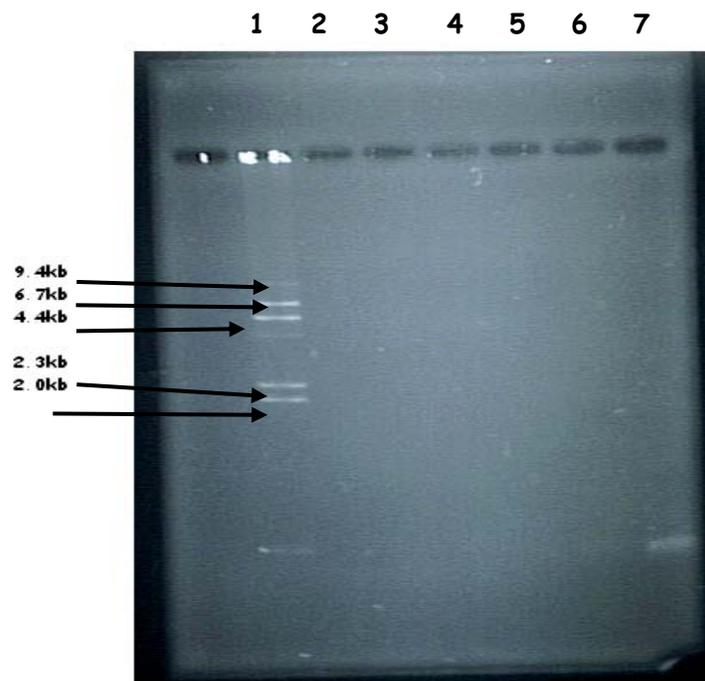
Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Figura 14. Gel con productos de amplificación de DNA total.



En la figura 14 se presentan los productos de PCR de DNA total, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Cepa 8M (1). 3) Cepa 12M (2). 4) Cepa 15M (1). 5) Cepa 16M (1). 6) Cepa 8E.

Figura 15. Gel con productos de amplificación de DNA plasmídico.

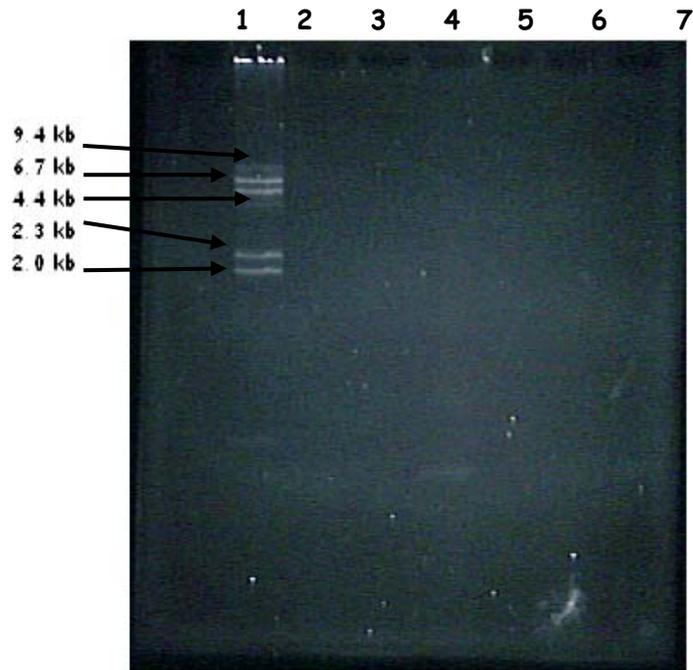


En la figura 15 se presentan los productos de PCR de DNA plasmídico, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Cepa 24R. 3) Cepa 9M (1). 4) Cepa 4M (1). 5) Cepa 22R. 6) Cepa 6E. 7) Cepa 7R.



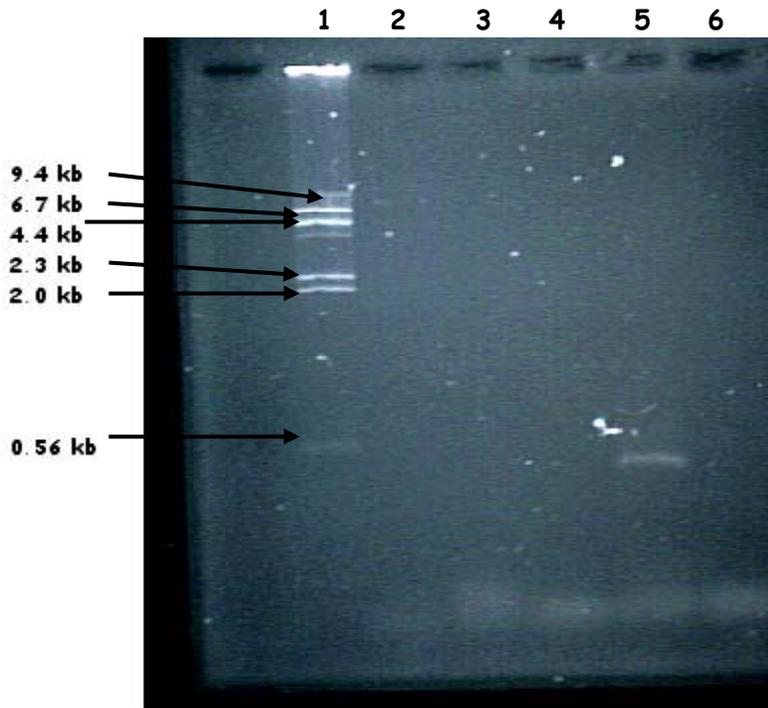
Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Figura 16. Gel con productos de amplificación de DNA plasmídico.



En la figura 16 se presentan los productos de PCR de DNA plasmídico, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Cepa 1E. 3) Cepa 4E. 4) Cepa 8E. 5) Cepa 6R. 6) Cepa 11R. 7) Cepa 12R.

Figura 17. Gel con productos de amplificación de DNA plasmídico.



En la figura 17 se presentan los productos de PCR de DNA plasmídico, de las muestras: Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares λ . 2) Cepa 18R. 3) Cepa 20R. 4) Cepa 21R. 5) Cepa 2E. 6) Cepa 3E.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Se pudieron observar una serie de bandas en los distintos geles con los resultados de la amplificación de DNA total. En algunos casos se obtuvo más de una banda en una sola muestra, aunque algunas de esas bandas eran más tenues que otras, como en el caso de la cepa 1E (presente en la figura 13, carril 3) donde hay 6 bandas que podrían indicar una posible presencia de integrones tipo 1 de distintos tamaños en una sola cepa. Cuando se presentan bandas muy tenues casi a la misma distancia en las diferentes amplificaciones, se consideraron como una amplificación inespecífica de la enzima Taq polimerasa, ya que puede existir una secuencia muy parecida que complementa parcialmente a los *primers* utilizados en la muestra de DNA y que esta enzima polimerizó; una vez determinado esto, solo se consideraron como bandas que sugieren la presencia de integrón tipo 1, aquellas bien definidas que se distinguían perfectamente y que además al calcular su peso molecular, éste fuese diferente entre ambas bandas.

Para determinar el tamaño del DNA de cada una de las bandas presentes en las diferentes cepas, se realizó en primer lugar, la medición de las distancias de migración de cada uno de los fragmentos del fago λ , cortado con Hind III, que fue usado como marcador de pesos moleculares, esta medida se realiza desde la parte baja del pocillo hasta el borde inferior de la banda correspondiente; con este dato se realizó una gráfica semilogarítmica del peso molecular vs la distancia de migración de la banda y con ayuda de una regresión, se interpolaron los datos de las distancias recorridas por cada uno de los fragmentos presentes en las cepas correspondientes, obteniéndose el peso molecular de la(s) banda(s) de interés.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Para ilustrar este procedimiento, se tomará parte de uno de los geles, y se señalarán en la figura 18 cada uno de las medidas que se utiliza de éste.

Figura 18. Mediciones de un gel para determinar el peso molecular de una muestra

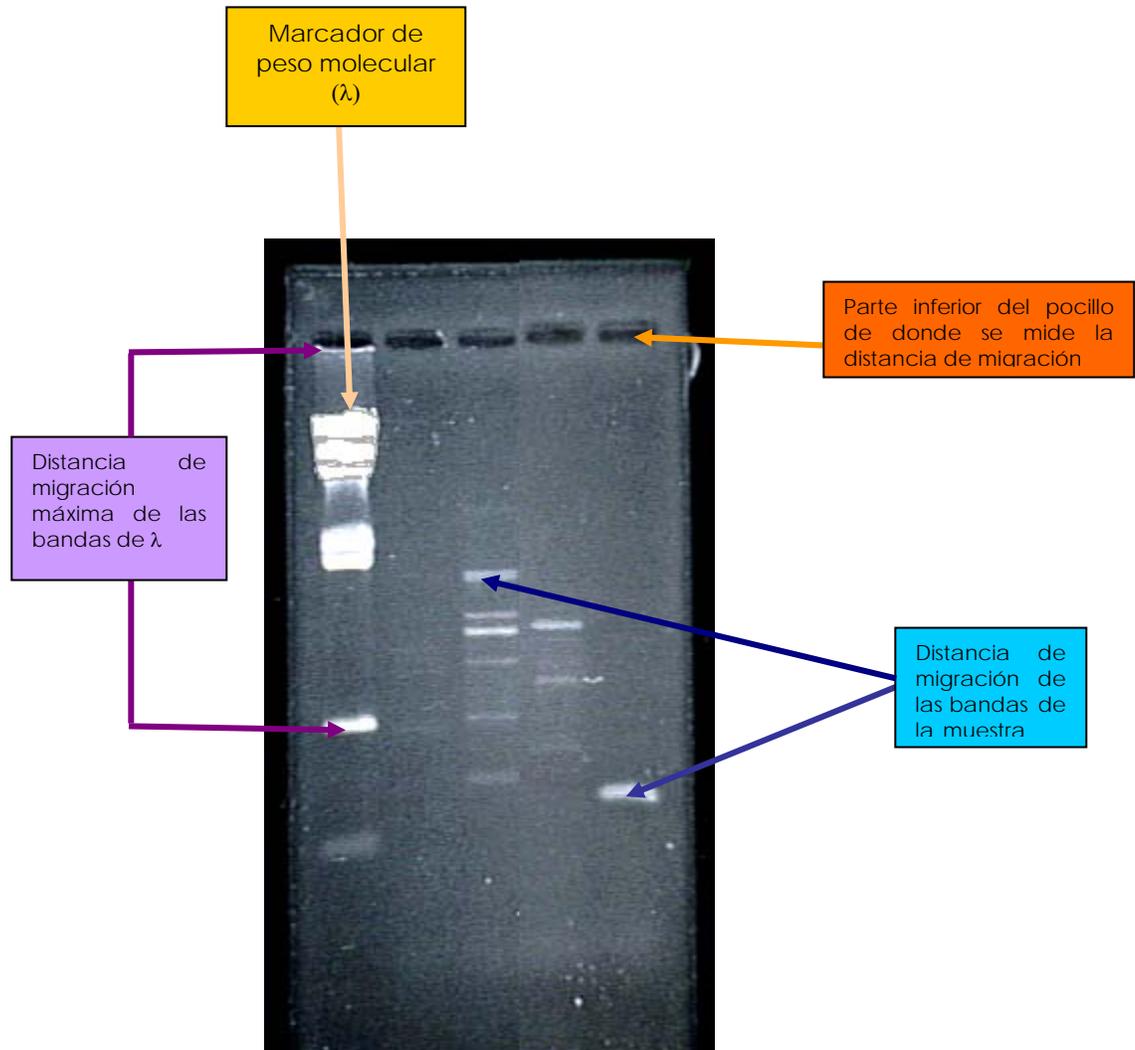


Figura 18. Ejemplo de los puntos de donde se toman las mediciones de un gel de PCR para la determinación del peso molecular de un producto de PCR.

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Y usando como ejemplo para cálculos la figura 12, se tienen los siguientes datos*:

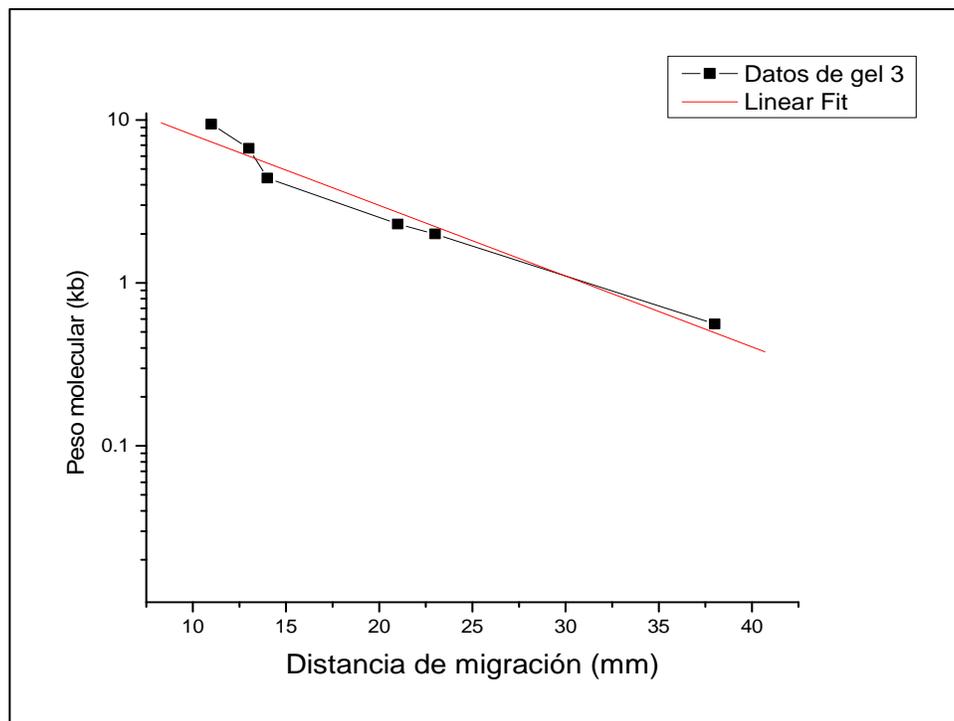
Tabla 13. Datos de la figura 12

Peso molecular de λ (kb)	Distancia de migración de λ (mm)
9.4	11
6.7	13
4.4	14
2.3	21
2.0	23
0.56	38

Distancia de migración del colorante 51 mm

Graficando estos datos con ayuda del programa Origin 7.5 se obtiene la siguiente gráfica:

Figura 19. Gráfica de Peso molecular vs. Distancia de migración



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

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

El tamaño de los productos del PCR obtenidos con los *primers* int-F y sul1-B presentes en los diferentes geles se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 14. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 12.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
53	302
42	694
39	870
32	1477

Tabla 15. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 13.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
39	262
37	325
35	402
34	448
32	555
27	947
25	1173
23	1452
20	2002



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 16. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 14.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
41	368
32	902
30	1102
24	2005

Tabla 17. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 15.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
46	240
33	872

Tabla 18. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 16.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
42	297
35	671
33	847

Tabla 19. Pesos moleculares de las bandas presentes en la Figura 19.

Distancia de migración (mm)	Tamaño del amplicón (pb)
40	385

En la tabla 20 se enlistan las cepas multiresistentes aisladas junto con los amplicones presentes en el DNA cromosómico de cada uno de ellos, es decir el tamaño y número de amplicones obtenidos en cada una.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 20. Relación de los pesos moleculares de los productos de PCR obtenidos del DNA cromosómico

CEPA	Distancia de migración (mm)	PM de la banda (pb)
1E	20	2002
	25	1173
	27	947
	32	555
	35	402
	39	262
2E	24	2005
	30	1102
	32	902
	41	368
3E	20	2002
	23	1452
	37	325
4E	20	2002
	25	1173
	27	947
5E	20	2002
	23	1452
	37	325
6E	30	1102
	32	902
	41	368
7E	NO TUVO BANDAS	
8E	NO TUVO BANDAS	
4R	39	870
	42	694
	53	302
6R	27	947
	34	448
9R	39	262
11R	46	240

CEPA	Distancia de migración (mm)	PM de la banda (pb)
16R	24	2005
	30	1102
	32	902
	41	368
18R	30	1102
	32	902
	41	368
19R	32	902
	41	368
20R	30	1102
	32	902
	41	368
21R	24	2005
	30	1102
	32	902
	41	368
22R	39	870
	42	694
	53	302
23R	33	872
24R	33	872
4M(1)	39	870
	42	694
	53	302
5M(1)	42	694
	53	302
8M(1)	42	297
9M(1)	32	1472
	39	870
	42	694
	53	302

(continúa)



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 20. Relación de los pesos moleculares de los productos de PCR obtenidos del DNA cromosómico (continuación)

CEPA	Distancia de migración (mm)	PM de la banda (pb)
12R	24	2005
	30	1102
	32	902
	41	368
13R	24	2005
	41	368
15R	24	2005
	30	1102
	32	902
	41	368

CEPA	Distancia de migración (mm)	PM de la banda (pb)
11M(1)	46	240
15M(1)	35	671
	42	297
16M(1)	33	847
	35	671
	42	297
12M(2)	33	847
	35	671
	42	297

Tabla 20. En esta tabla se muestran los tamaños y cantidades de todos los amplicones identificados en cada una de las 31 cepas multiresistentes. Los colores en las celdas indican aquellos amplicones que tuvieron pesos moleculares similares.

El resultado del PCR observado en los geles corridos es de un total de 29 cepas aparentemente portadoras de integrón tipo 1 en el DNA total cromosómico. El tamaño de los amplicones va desde 2005 hasta 240 pb, pudiéndose identificar de esta manera 23 secuencias diferentes, pero como algunos de ellos tienen pesos moleculares similares se promediaron los pesos de los amplicones que se parecían entre sí. De esta manera se determinó tentativamente que solo hay presentes en las cepas de *Aeromonas* spp. 9 integrones diferentes, mostrándose en la tabla 21 como se agruparon estos integrones, así como los tamaños de sus secuencias amplificadas.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 21. Pesos moleculares de las secuencias de integrones ya agrupados

Peso molecular de los 21 integrones (pb)	Peso molecular de las secuencias de integrones, ya agrupados (pb)
240 264 297 303	276
325 368 384 402	370
448	448
555	555
671 694	682
847 871 872	863
903 947	925
1102 1173	1137
1452 1478	1465
2002 2005	2003

Con estos resultados se estableció que la posible distribución de los integrones en las distintas cepas fue:

- la mayor cantidad aparente de integrones lo tuvo la cepa **1E**, ya que presenta **5 distintos amplicones**
- las cepas **2E, 12R, 15R, 16R y 21R** tuvieron la misma cantidad de integrones (**4**), así como el mismo tamaño de cada uno (2003, 1137, 863 y 370 pb). La cepa **9 M(1)** también tiene la misma cantidad de integrones, pero difieren en el tamaño tres de ellos (1465, 863, 682 y 276 pb).
- las cepas **3E y 5E** aparentemente tiene **3 integrones** diferentes (2003, 1465 y 276 pb), al igual que la cepa **4E**, difiriendo en dos amplicones (2003, 1137 y



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

863 pb); **6E**, **18R** y **20R** poseen la misma cantidad de integrones (1137, 863 y 370 pb); por último, las cepas **4R**, **22R**, **4M(1)**, **16M(1)** y **12M(2)** parecen portar también 3 integrones distintos (863, 682 y 276 pb).

- En **6R**, **13R**, **19R**, **5M(1)**, y **15M(1)** fueron identificados **2 integrones** diferentes, contenidos en su DNA cromosómico con los siguientes pesos: 863 y 448 pb; 2003 y 370 pb; 863 y 370 pb; 682 y 276 pb, respectivamente.
- El mínimo de integrones identificados dentro de una cepa fue de **uno**, siendo estas cepas: **9R**, **11R**, **8M(1)** y **11M(1)**, con posibles amplicones de 276 pb, además de **23R** y **24R** con amplicones de 863 pb.

Solo una de las 17 cepas elegidas al azar, a las que se les realizó extracción de DNA plasmídico mostró ser portadora de integrón tipo 1 en plásmido. Dicha cepa es la 2E y el tamaño del aparente integrón es de 370 pb.



VIII. D I S C U S I Ó N

Las muestras de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*) que fueron adquiridas en la tienda de autoservicio Wal-Mart para este estudio provienen, al igual que la mayoría del pescado fresco destinado para consumo en el Distrito Federal, del Golfo de México. El pescado llega desde las costas a centros de distribución como el mercado de la Viga y de aquí es llevado a mercados populares, supermercados, etc., por lo que es necesario mantenerlo bajo refrigeración para conservarlo durante su transportación y almacenamiento. El tiempo que transcurre desde la captura, adquisición y consumo del pescado puede ser mayor a una semana, tiempo en el que sus características organolépticas deben conservarse. Es por ello que se cree probable que se haga uso de antibióticos (desde el lugar de captura) para eliminar o controlar el crecimiento de las bacterias que pudieran alterar la calidad del producto.

No se puede afirmar que se haga uso de algún antibiótico para la preservación del pescado en nuestro país, ya que la normatividad que regula la calidad del pescado, específicamente para este estudio la Norma Oficial Mexicana NOM-027-SSA1-1993 referente a pescados frescos-refrigerados y congelados, no hace mención de algún límite o especificación para algún antibiótico. Las definiciones que podría ser de interés para este estudio son, en primer lugar, la definición de pescado: Pescado fresco-refrigerado, producto alimenticio de especies

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

comestibles, sometido previamente a limpieza, con o sin evisceración, cuyo tratamiento de conservación es la refrigeración o el enhielado para mantener sus características sensoriales; otra definición de interés es la de aditivo: Aditivo para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación. Los aditivos alimentarios permitidos para los pescados congelados, son los siguientes:

- Antioxidantes: ascorbato de potasio y ascorbato de sodio en una cantidad no mayor de 1g/kg expresado como el ácido.
- Retenedores de humedad: fosfato tribásico de calcio, polifosfato tetrapotásico, pirofosfato tetrasódico, polifosfato de sodio, fosfato monopotásico, fosfato monosódico, trifosfato pentapotásico y trifosfato de sodio; en una cantidad no mayor de 5 g/kg expresado como P₂O₅ (pentóxido de fósforo).

Como bien se puede observar, en las definiciones que maneja la Norma Mexicana, jamás se hace uso del concepto de antibiótico, lo que sugeriría que no se hace uso de antimicrobianos en el pescado capturado y distribuido para consumo en nuestro país, aunque existe cierta incertidumbre respecto a esto ya que no se especifica la forma de limpieza del pescado, es decir, si se aplica algún limpiador o algún método de limpieza para la eliminación de bacterias y/o suciedad; además de que solo se presentan los conservadores permitidos en el pescado congelado pero no para la conservación del pescado fresco. Aunado a estos puntos se tienen datos de que en países como Estados Unidos y Canadá se permite el uso de antimicrobianos en este alimento y como bien se sabe muchas de las normas de



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

salud que se manejan en nuestro país, desafortunadamente son copias y/o adaptaciones de normas o regulaciones de otros países, que llegan a ser mal adaptadas, por lo que ciertos puntos potencialmente críticos son omitidos o bien eliminados.

Es por todo esto que muy probable que exista el uso de antibióticos en el pescado consumido en nuestro país y específicamente en el pescado que se consume en el Distrito Federal y ello no se encuentra regulado.

En este estudio se encontró que un porcentaje importante de bacterias presentes en muestras de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*), más de una cuarta parte de las colonias aisladas, eran multiresistentes a antibióticos, aunque es importante mencionar que todas las cepas aisladas de este alimento fueron resistentes a por lo menos un antimicrobiano, lo que puede ser un indicativo de que algunos microorganismos que se encuentran en la carne de pescado (como en este caso) tienen una resistencia intrínseca a determinados antibióticos.

Aunque no se determinó el porcentaje de resistencia intermedia que presentaron las cepas probadas, el hecho de que se tuviera dicha respuesta a cierto(s) antibiótico(s) puede ser un indicativo de que estos microorganismos pueden llegar a alcanzar una resistencia "completa" a esos antimicrobianos, como consecuencia de ciertos factores que lo favorezcan, como la presencia constante del antibiótico en su medio de desarrollo o por algún cambio genético en estas bacterias. Esto las puede convertir en un peligro potencial para la salud en caso de ingesta, por lo



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

que no hay que minimizar la resistencia intermedia que pudiesen presentar las bacterias.

Al revisar a qué antibióticos fueron multiresistentes las bacterias de trabajo, se pudo determinar que el mayor porcentaje de resistencia se observó en antibióticos que actúan a nivel de pared celular y al nivel ribosomal; aunque caben destacar algunas diferencias importantes en los antibióticos a los que fueron resistentes ciertas cepas; por ejemplo, dos de las 31 cepas fueron resistentes a tetraciclina (6R y 12R); y cinco a cloranfenicol (12R, 13R, 15R, 18R y 20R). Estas diferencias son de especial interés porque la tetraciclina y el cloranfenicol son antimicrobianos usados en la conservación del pescado, además la amoxicilina, ampicilina y lincomicina son antibióticos que forman parte de la lista de antimicrobianos usados en la acuicultura mundial, para prevenir enfermedades en los peces y con esto evitar pérdidas económicas.

Estos resultados nos hablan de que el pescado contiene este tipo de bacterias resistentes a los antibióticos mencionados, debido a una "presión selectiva" ejercida por la presencia de antimicrobianos en el ambiente en el cual se están desarrollando estos microorganismos. La presencia de antimicrobianos en el mar que pueden inducir y causar la resistencia microbiana a los antibióticos en el pescado puede ser resultado de varios factores. Uno de ellos se refiere al intenso desecho de "basura farmacéutica" hacia el mar que lleva al surgimiento y mantenimiento de bacterias resistentes a antibióticos en aguas costeras, reportado por algunos autores (Peele *et al.*, 1981; Grimes *et al.*, 1984), posiblemente por



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

cambios genéticos y que podrían encontrarse en el pescado dirigido al consumo humano. Es muy probable que esto pueda ocurrir pues, como todos sabemos, al mar llega o llegaba agua proveniente de zonas urbanas, de uso casero, industrial, etc., por lo que esta hipótesis es realista.

Otra fuente por la cual las bacterias del pescado podrían estar en una constante presencia de antibióticos y producirse una selección de aquellas que sean resistentes, es dentro de los barcos pesqueros pues el constante contacto del pescado capturado en las diferentes superficies donde es colocado, ya sea para transporte, almacenamiento, etc., como cajas, recipientes, cubiertas, bodegas e incluso los mismos pescadores, se contaminan con grandes cantidades de microorganismos procedentes del mucílago del pescado, los cuales podrían transmitirse durante las operaciones de limpieza, manipulación y demás procesos dentro del barco. Todo esto haría persistente el contacto de las bacterias que han contaminado las superficies del barco y del propio pescado con los antibióticos usados para conservar el producto, llevando a la selección de bacterias farmacoresistentes que serán transmitidas de las superficies al pescado y viceversa. Esto es solo una suposición pues existe duda acerca del uso de antimicrobianos en la preservación del pescado fresco en nuestro país.

Otro posible factor que puede contribuir a la presencia de bacterias multiresistentes en la carne de pescado consumido de la pesca de alta mar es que en la acuicultura, es decir la crianza controlada de peces, se usan antibióticos para controlar las enfermedades que pudieran contraer los peces. Durante las dos fases



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

de crianza se hace uso de los antibióticos, pero en la segunda etapa cuando los peces son llevados al mar, la cantidad y tipos de antibióticos usados es mayor, por lo que esos antibióticos están en contacto, no solo con los peces de crianza, sino con el agua de mar. Esta idea se deriva de que, en la fase marina una de las formas en las que se administran los fármacos es en forma oral, es decir se administra el antibiótico en el alimento de los peces, por lo que esos antimicrobianos están en contacto con el agua marina dando como consecuencia la posible dispersión de estos compuestos más allá de las zonas determinadas para la acuicultura por efecto de las corrientes marinas. Esto puede provocar una selección de microorganismos resistentes a esos antimicrobianos dentro del mar dando como consecuencia bacterias farmacoresistentes que pueden colonizar a peces "nativos" que se encontraban exentos de este tipo de bacterias.

Los resultados y las suposiciones formuladas, basados en lo reportado en la bibliografía, pueden ser un indicativo de un mal uso que se da a este tipo de compuestos que, a pesar de usarse como medida de seguridad en algunos casos, representan un peligro debido al surgimiento y selección de cepas multiresistentes las cuales pueden llegar hasta los consumidores de estos productos y provocar en caso de enfermedad una complicación en el tratamiento antiinfeccioso.

Pero, ¿cómo se puede determinar que las bacterias aisladas en este trabajo provienen de la flora del pescado y no son bacterias provenientes del ambiente? La respuesta a este cuestionamiento es que el género presuntamente



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

identificado de todas las cepas es *Aeromonas*, género que forma parte de la flora normal del pescado, además de ser un microorganismo autóctono de ambientes acuáticos; así como un agente etiológico de enfermedades de varias especies de peces. Estas referencias acerca de este género microbiano pueden servir como evidencia para apoyar la hipótesis de la presión selectiva ejercida por los antibióticos presentes en el ambiente donde se desarrolla una bacteria pues al ser *Aeromonas* un género propio de ambientes acuáticos estaría en constante presencia de antimicrobianos que inducirían y seleccionarían cepas resistentes a ellos. Asimismo, se mantendrían esas características de resistencia, haciendo posible la transferencia de esta resistencia a otras bacterias.

La importancia que tiene la presencia de *Aeromonas* en los alimentos, específicamente en el caso de la carne de pescado, es que a pesar de ser un microorganismo reconocido principalmente como un agente causal de enfermedades en peces, recientemente se han presentado problemas de salud pública relacionados con este género bacteriano. Es por ello que en los últimos años se ha considerado como un agente patógeno importante, causante de infecciones cutáneas y diseminadas en los humanos, aunque es de mayor relevancia la relación que se ha encontrado de este microorganismo con infecciones intestinales y extra-intestinal en humanos (incluyendo bacteriemia), tanto en niños como en adultos, debidas a la presencia de *Aeromonas* en diversas fuentes alimenticias como leche, carne, productos cárnicos, pollo, queso y vegetales, siendo estos alimentos un importante vector en la diseminación de este



patógeno (Peres *et al.*, 2006; Radu *et al.*, 2003). En México, las bacterias que se involucran con mayor frecuencia con diarreas son *Salmonella*, *Shigella*, algunos serotipos de *E. coli* y *Campylobacter jejuni*, aunque los avances en técnicas de identificación bacteriana en nuestro país han agragado a esta lista al género *Aeromonas* (Castro-Escarpulli, 2002).

Los estudios para determinar la incidencia de *Aeromonas* en México, son escasos, aunque investigadores como Rebollo y Escamilla han aislado *Aeromonas* con una frecuencia del 7.7 % en casos de diarrea aguda en niños menores de dos años y en un 7 % en adultos; en estudios posteriores realizados por ellos mismos, demostraron que el 5.7 % de los aislamientos que procedían de niños menores de cinco años con diarrea de larga evolución pertenecía a *Aeromonas* (Rebollo y Escamilla, 1984; Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2001).

Los datos obtenidos en este trabajo son una muestra del peligro que constituye, no sólo la presencia de esta bacteria en un alimento, sino la multiresistencia a antibióticos que presentaron ciertas cepas de este género bacteriano; lo cual pudiera causar problemas durante un tratamiento en caso de presentarse una infección debida a este microorganismo, pues se requeriría de un tratamiento posiblemente más prolongado, lo que podría desencadenar una serie de consecuencias para el paciente, no solo de salud sino económicas.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Un punto más que se puede discutir sobre la resistencia que presentaron las cepas aisladas es la diferencia entre una y otra cepa respecto a la cantidad de antibióticos a los que es resistente, la cual varía considerablemente, y no solo en el número, sino en el tipo de antimicrobiano al que se presenta dicha resistencia. Esto se puede observar en la tabla 9 pues ningún antibiograma es igual a otro; existen semejanzas y concordancias entre algunas cepas pero siempre se halla una diferencia entre ellas a pesar de que todas las cepas aisladas pertenecen al mismo género bacteriano, *Aeromonas*.

Este contraste en la resistencia al número y tipo de antibiótico puede ser debida a varias razones, una de las cuales constituye uno de los objetivos de este trabajo, la presencia del integrón tipo 1 el cual, en la mayoría de las cepas multiresistentes, se encuentra presente (29 de 31); confirmado esto por las bandas observadas en los distintos geles con los productos de PCR. Esto es de suma importancia ya que nos habla de la adquisición de este elemento por un intercambio de información genética con alguna bacteria portadora de este elemento pues, como se mencionó al principio de este trabajo, los integrones son elementos genéticos dinámicos que, por un mecanismo de conjugación o recombinación puede llegar a darse un intercambio de genes que les confieran a las bacterias resistencia. Este intercambio de genes pudo darse desde alguna bacteria que formara parte de la flora propia del pescado y tuviera como parte de su DNA este integrón pasándolo a otros microorganismos presentes en el pescado o bien, por algún contacto con



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

bacterias ajenas que se encontraran en el ambiente y que transfirieron esta información a las bacterias de la flora del pescado.

Todo esto se puede sustentar con los resultados de la amplificación del DNA total, donde se observaron una serie de bandas que sugieren la presencia de varios integrones diferentes en las distintas bacterias. Se infiere que los fragmentos amplificados corresponden a un integrón tipo 1 porque se planeó que con los *primers* usados, la amplificación ocurriera desde parte de la secuencia del gen de la integrasa, hasta el gene de resistencia a sulfonamidas; todo ésto para poder amplificar la mayor zona posible y que se pudiera observar la presencia de material sugestivo de portar genes de resistencia en la región central del integrón, que es en donde se integran los cassettes de resistencia.

Los resultados obtenidos de la presencia y tamaño de las distintas secuencias presentes en los integrones tipo 1 identificados en las cepas aisladas, sugieren que es posible que cada uno de ellos confiera resistencia a un número distinto de antibióticos, dependiendo de los genes presentes en los amplicones observados.

Esta suposición se basa en varios trabajos donde se reporta la presencia de integrones que contienen diferentes cassettes de resistencia de distintos tamaños, por ejemplo el cassette de resistencia a aminoglucósidos (*aadA*) o el cassette de resistencia a trimetoprim (*dfpA15*), etc. (Dalsgaard *et al.*, 1999; 2000 (1); 2000(2); 2001; Henning *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2001).



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Esto conduciría a preguntarse ¿cómo se puede saber a qué tipo y número de antibióticos confieren resistencia los integrones hallados en las cepas de trabajo? En realidad esto no se puede determinar en este trabajo ya que con los *primers* usados se amplificó la mayor parte de integrón (y no específicamente la zona variable en la que se insertan los cassettes), lo que permitió determinar que existen integrados cassettes de resistencia en los integrones de las bacterias aisladas, pero para poder saber el tipo de antimicrobianos a los que confieren resistencia estos integrones sería necesario usar y probar otro tipo de *primers*, con los que se obtuvieran amplicones de secuencias conocidas de determinados genes de resistencia.

En la figura 20 se presenta un ejemplo de los primers usados para identificar ciertos cassettes de resistencia insertados en un integrón clase 1.

Figura 20. Sitio de acción de distintos *primers*

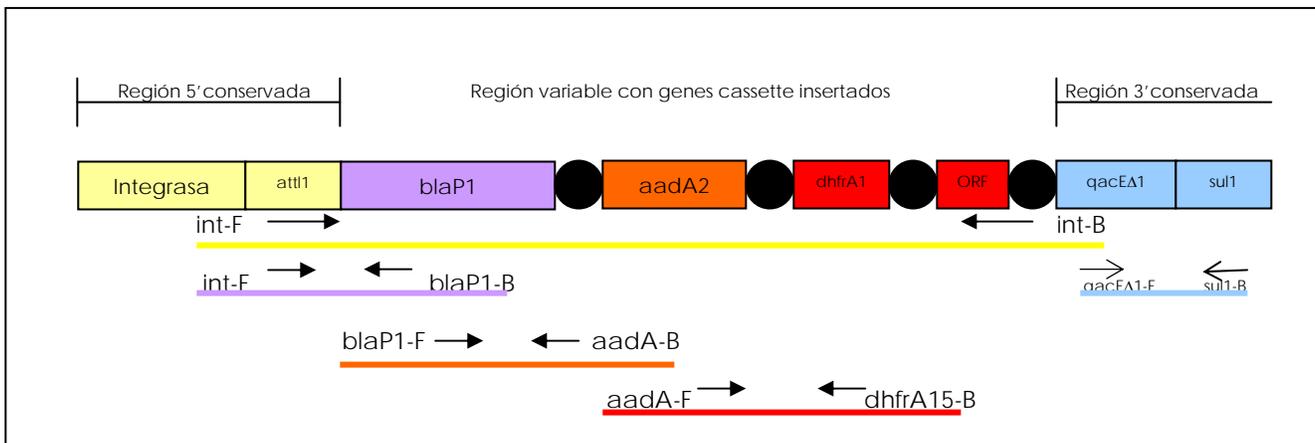


Figura 20. Estructura de un integrón tipo 1 con 3 cassettes de resistencia y la posición del recorrido de algunos primers que pudiesen emplearse para su identificación (Modificado de Dalsgaard A. *et al.*, 2000)

Los círculos negros representan el sitio de recombinación (59pb); *blaP1* gen cassette que codifica para la β -lactamasa; *aadA2* gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina; *dhfrA1* gen de resistencia a trimetoprim (dihidrofulato reductasa); *qacEΔ1* y *sul1* codifican la resistencia a desinfectantes y sulfonamidas respectivamente.

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Alternativamente, mediante la clonación y estudios de secuenciación de los amplicones generados también se podría determinar el tipo preciso de secuencia de DNA presentes en dichos integrones.

El número de antibióticos al que los 9 integrones identificados confieren resistencia tampoco se pueden determinar apoyándose solo en el tamaño del los amplicones pues, se podría pensar que los integrones de mayor tamaño 2003, 1465 y 1137 pb pudiesen contener más de un cassette integrado y por tanto, conferir resistencia a las bacterias a casi todos los antibióticos probados, pero esto sería una idea equivocada debido a que existen cassettes de resistencia que tienen un tamaño de más de 1000pb; por ejemplo los cassettes blaP1 o dfrA1, que son los de mayor tamaño reportados en la bibliografía, tienen un tamaño de 1197 y 1237 pb respectivamente y estos solo codifican cada uno para una proteína. También podría pensarse que esos integrones grandes tuvieran integrados 2 cassettes de resistencia, o bien un cassette de resistencia con marco de lectura abierta (como el caso del cassette de resistencia a trimetoprim) u otros genes que no codificaran para resistencia, etc. De cualquier manera, es razonable suponer que las cepas que tienen más de un integrón de un tamaño mayor a 700 pb, sean resistentes a un mayor número de antibióticos, en relación a la cantidad de amplicones identificados en cada una de ellas.

Lo único que se puede afirmar sobre el tamaño de los integrones que contienen las cepas de *Aeromonas* spp. es que, aquellos que tienen un tamaño menor a 700pb



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

podrían no contienen genes que confieren resistencia, ya que en la literatura solo se han reportado cassettes de resistencia de un tamaño mayor a 740pb.

Se podría especular sobre algunos de los genes de resistencia a antibióticos presentes en los integrones identificados, basándose en el tamaño de los amplicones así como en los porcentajes de resistencia obtenidos a cada antibiótico. Por ejemplo, podría encontrarse el gen *bla* **PI**, que tiene un tamaño de 1197 pb, así como el gen *aadA* que es el gen de resistencia a aminoglucósidos con un tamaño de 1009 pb, pues como se menciona en los resultados, unos de los antibióticos a los que se presentó mayor frecuencia de resistencia fue a aquellos que pertenecen a los aminoglucósidos, cefalosporinas y penicilinas; aunque esto es meramente especulativo.

Es importante señalar que, respecto a la presencia de integrones en las cepas aisladas que, estos elementos genéticos identificados dentro del DNA total de las bacterias también podrían no proporcionar resistencia a todos los antimicrobianos a los que *Aeromonas* spp. fue resistente, pero si se puede sugerir que aquellos que tienen un tamaño mayor a 700pb la proporciona a por lo menos uno de ellos.

En el caso de la amplificación de DNA plasmídico, aparentemente sólo se identificó la presencia de un integrón tipo 1 en la cepa 2E, aunque el tamaño del amplicón es muy pequeño para considerar que confiere algún tipo de resistencia, ya que es de 370 pb. Por lo tanto se determinó que el integrón tipo 1 que contienen



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

cassettes de resistencia a antibióticos y por lo tanto podría conferir farmacoresistencia a las bacterias aisladas, sólo se encuentra localizado dentro del DNA cromosómico.

La resistencia a algunos de los antibióticos usados también puede explicarse por los mecanismos fisiológicos propios de las bacterias, que no deben de ser ignorados; o bien, podría ser debida a la presencia de plásmidos no portadores de integrones ya que en algunas cepas estos elementos genéticos fueron identificados durante la extracción de DNA plasmídico. Las cepas que contienen plásmidos son 2E, 3E, 6E, 16R, 18R, 20R, 21R, 22R y 23R. Esos plásmidos podrían contribuir a a la resistencia de algunos de los antimicrobianos probados pues, como bien se sabe, también pueden contener genes que codifiquen resistencia a ciertos fármacos.



IX. CONCLUSIONES

La presencia y cantidad de bacterias resistentes a antibióticos en las muestras de filete de sierra (*Scomberomorus maculatus*) adquiridas en una tienda de autoservicio, pertenecientes al género *Aeromonas* spp., bacteria de importancia clínica relacionada con infecciones gastrointestinales humanas, es un indicativo importante del uso inadecuado e inapropiado que se les da a los antibióticos en el pescado, ya que se está promoviendo el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos en el pescado proveniente de la pesca de alta mar, y que es consumido en el Distrito Federal. Ello representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores de este alimento en nuestra ciudad, por las posibles complicaciones que pueden surgir durante el tratamiento médico de infecciones por este tipo de bacterias. Esto lleva a señalar la importancia que tiene la cuidadosa regulación del uso de estos compuestos en nuestro país, pues podría estar haciéndose uso de ciertos antibióticos en el pescado sin que autoridades ni consumidores estén informados de ello.

También se concluye que efectivamente existen bacterias multiresistentes a antibióticos en la carne de pescado, conteniendo en su mayoría integrones del tipo 1, los cuales se relacionan fuertemente con la resistencia presentada por parte de las cepas aisladas.

Por último se concluye que el pescado que se adquiere en tiendas de autoservicio no se encuentra libre de este tipo de microorganismos (multiresistentes), como bien



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

se pudo determinar en este trabajo y que pueden afectar a la salud de las personas que lo consumen, ya que la mayoría de los consumidores entienden como sinónimo de seguridad y confianza el adquirir este tipo de alimentos en tiendas de renombre, considerando que los alimentos provenientes de estos lugares se encuentran exentos de muchos tipos de riesgo.



X. SUGERENCIAS

Para dar continuidad al presente trabajo, se sugiere:

- a) Emplear otros medios de cultivo que permitan aislar una mayor cantidad de bacterias, desde aquellas que formen parte de la flora característica del pescado, hasta aquellas bacterias que puedan proceder de fuentes externas (ambiental, humana, etc.) ampliando, así, la posibilidad de identificar microorganismos que pudieran ser resistentes a antibióticos y que no solo pertenezcan al género *Aeromonas*.
- b) Ampliar la galería de pruebas metabólicas y/o serológicas, que permitan confirmar al 100% la presencia de este microorganismo.
- c) Realizar más estudios con el fin de determinar que no haya otro tipo de microorganismos en este producto.
- d) Recomendar a las autoridades competentes, vigilar el uso de antibióticos en los alimentos ya que no solo pueden causar problemas de resistencia hacia ellos por parte de los microorganismos presentes, sino que surge la posibilidad de afectar a los consumidores que puedan ser alérgicos a algún antibiótico usado en los alimentos y que sin saberlo existan trazas de esos compuestos, ingiriéndolos junto con los alimentos.
- e) Finalmente se puede recomendar dar seguimiento a investigaciones sobre la resistencia a antibióticos, en nuestro país, y no solo en el pescado sino en los



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

diversos alimentos destinados al consumo humano ya que la escasa información sobre el tema indica la falta de conciencia sobre la importancia que tiene el surgimiento de este tipo de bacterias, que pueden ser considerados como inofensivas para el hombre y que muy por el contrario, representan un peligro potencial para la salud humana.



XI. A N E X O S



ANEXO 1 DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA A ESTUDIAR

Para determinar que muestra de pescado se utilizaría en el presente trabajo, se realizó una pequeña encuesta con las personas que atienden las áreas de pescados y mariscos en dos supermercados del sur de la Ciudad de México (Wal-mart y Comercial Mexicana), cercanos al área de trabajo (Cd. Universitaria), acerca de las especies de pescado entero que la gente consume con mayor preferencia, además de la presentación en la que se ofrece; obteniéndose los siguientes resultados:

Especies más vendidas:

- o mojarra tilapia o mojarra roja (*Oreochromis niloticus*), eviscerado desde el lugar de origen
- o sierra (*Scomberomorus maculatus*), con vísceras
- o huachinango (*Lutjanus campechanus*), con vísceras

Otras especies que se venden en estos lugares son; trucha plateada (*Cyoscion nothus*), bandera americana (*Jordanella floridae*), lisa blanca (*Mugil curema*), jurelito (*Caranx caninus*) y boquilla (*Diapterus rhombeus*).

Todos los pescados provienen del Golfo de México y son obtenidos del mercado de La Viga. En las tiendas se mantienen a la venta aproximadamente de 4 a 5 días, o bien hasta que el pescado se ve "amarillento".



ANEXO 2. MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS USADOS EN LA ETAPA FINAL

Algodón

Antibiograma rápido para enterobacterias Rapid ATB-G

Asas de siembra

Bata, cubre boca, cofia y guantes estériles.

Bolsas para Stomacher

Bolsas de polietileno estériles

Cajas Petri estériles

Cerillos o encendedor

Cuchillo, previamente esterilizado en autoclave

Discos BBL™ Sensi-Disc™ para pruebas de susceptibilidad microbiana

Espátula, previamente esterilizado en autoclave

Gel de agarosa al 1%

Composición: Buffer tris-boratos 5x2 mL
Agua destilada estéril18 mL
Agarosa0.2 g

Gradillas

Hielera de poliestireno o de otro material aislante

Hielo

Hisopos estériles

Mechero

Micropipetas de 1000, 200 y 20 μ l (Scorex)

Microtubos eppendorf

Multidiscos MRBioRad

Papel estraza

Perlas de vidrio



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Pinzas, previamente esterilizadas en autoclave

Pipetas graduadas de 10 y 1 mL con tapón de algodón

Puntas para micropipeta

Tubos eppendorf

Tubos de vidrio de 16 x 150 mm

Tubos para centrifuga de 30 mL

EQUIPOS:

Autoclave equipada con termómetro de mercurio (temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$).

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

Cámara de electroforesis SIGMA Chemical modelo E0638 250 VCD

Centrifuga Dynac™ 211466

Homogeneizador peristáltico (Stomacher)

Incubadora con agitación New Brunswick Scientific Co, INC

Incubadora Thermolyne Type 41900

Microcentrifuga eppendorf Centrifuge 5415R

Microscopio

Transiluminador de luz ultravioleta SIGMA T 1202

Vórtex

REACTIVOS:

Aceite mineral

Acetato de sodio 3M

Agua desionizada estéril

Agua destilada

Agua destilada estéril



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Alfa-naftol

Bromofenol (Buffer de corrida)

Buffer de carga

Buffer de lisis

Composición: EDTA100 mM
Tris base pH 7.5 10 mM
SDS 1%

Cloroformo

Estuche de reactivos para PCR *Supermix IN VITROGEN*

Etanol absoluto

Etanol al 70%

Fenol equilibrado

Fenol equilibrado / cloroformo (1:1)

Fenol equilibrado / cloroformo (1:1) saturado con TE

Hidróxido de potasio al 40%

Indicador rojo de metilo

Isopropanol

Peróxido de hidrógeno

Primers sul1 B e int F

Reactivo de Ehrlich

Reactivos de Gram

Cristal violeta
Lugol
Alcohol-acetona
Safranina

Reactivo de Griess

Sol. A (alfa naftilamina)
Sol. B (ácido sulfanílico)

Reactivo de Kovacs para prueba de oxidasa

Diclorohidrato de tetrametil-*p*-fenilandiametina (TPD) al 1%



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Solución de bromuro de etidio (1mg/ml)

Soluciones para extracción de DNA plasmídico:

Solución I

Composición: Sacarosa 15%
Tris HCl pH 8 25 mM
EDTA 10 mM

Solución II

Composición: NaOH 0.2 N
SDS 1%

Solución III

Composición: Acetato de potasio 5M 60 mL
Ácido acético concentrado 11.5 mL
H₂O 28.5 mL

Solución Tris-Boratos 5x

Composición: Tris base pH 8 54 g
Ácido bórico 27.5 g
EDTA 3.72 g
H₂O 1000 mL

Solución Tris-Boratos 0.5x (Diluido 10 veces de la solución Tris-boratos 5x)



ANEXO 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO USADOS

Agar Baird-Parker

Fórmula por litro:

- Peptona de caseína 10.0 g
- Extracto de carne 5.0 g
- Extracto de levadura 1.0 g
- Cloruro de litio 5.0 g
- Agar 17.0 g
- *Glicina 12.0 g
- Piruvato de sodio 10.0 g

pH final 6.8 ± 0.2

Agar citrato de Simmons

Fórmula por litro:

- Fosfato dihidrogenado de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)..... 1.0 g
- Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 1.0 g
- Citrato de sodio 2.0g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)..... 0.20 g
- Agar 15.0 g
- Azul de bromotimol 0.8 g

pH final 7.0 ± 0.2

Agar eosina y azul de metileno-lactosa (EMB)

Fórmula por litro:

- Peptona de carne 10.0 g
- Lactosa 10.0 g
- Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 2.0 g
- Agar 13.5 g
- *Eosina Y, amarillenta 0.4 g
- *Azul de metileno 0.065 g

pH final 7.1 ± 0.2

Agar ENDO

Fórmula por litro:

- Triptosa 10.0 g
- Peptona de carne 5.0 g
- Peptona de caseína 5.0 g
- Extracto de levadura 1.5 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)..... 3.5 g
- Agar 15.0 g



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

- Lactosa 12.5 g
- Desoxicolato de sodio 0.1 g
- Laurilsulfato de sodio 0.05 g
- Sulfito de sodio 2.1 g
- Fucsina básica 1.05 g

pH final 7.4 ± 0.2

ESTE MEDIO NO SE ESTERILIZA EN AUTOCLAVE

Agar hierro peptonado (SIM)

Fórmula por litro:

- Extracto de carne 3.0 g
- Peptona de carne 30.0 g
- Hierro peptonizado 0.2 g
- Tiosulfato de sodio 0.025 g
- Agar 3.0 g

pH final 7.0 ± 0.2

Agar de hierro de Kligler

Fórmula por litro:

- Extracto de carne 3.0 g
- Extracto de levadura 3.0 g
- Peptona de carne 15.0 g
- *Proteosa peptona 5.0 g
- Lactosa 10.0 g
- Glucosa 1.0 g
- Sulfato ferroso 0.2 g
- Cloruro de sodio 5.0g
- Tiosulfato de sodio 0.5 g
- Agar 12.0 g
- Rojo de fenol 0.024 g

pH final 7.4 ± 0.1

Agar infusión cerebro-corazón (BHI-agar)

Fórmula por litro:

- Infusión de cerebro de ternera 12.5 g
- Infusión de corazón de res 5.0 g
- Proteosa peptona 10.0 g
- Glucosa 2.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Fosfato monobásico de sodio 2.5 g
- *Agar 15.0 g

pH final 7.04 ± 0.2



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Agar KF

Fórmula por litro:

- Peptona proteosa 10.0 g
 - Extracto de levadura 10.0 g
 - Cloruro de sodio 5.0 g
 - Glicerofosfato de sodio 10.0 g
 - Maltosa 20.0 g
 - Lactosa 1.0 g
 - Sodio azida 0.4 g
 - Púrpura de bromocresol 0.015 g
 - Agar 15.0 g
 - Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio 0.1 g
- pH final 7.2 ± 0.2

Esterilizar en autoclave por 10 minutos a 121° C cuando se requiera de total selectividad, de no ser así, hervir durante 5 minutos. No sobrecalentar.

Cuando el medio se encuentre a unos 50° C, adicionar 10 mL de una solución a 1% de TTC y mezclar.

Agar luria

Fórmula por litro:

- Triptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- *Agar 18.0 g

Agar Mac Conkey

Fórmula por litro:

- Peptona de caseína 17.0 g
 - Peptona de carne 3.0 g
 - Cloruro de sodio 5.0 g
 - Lactosa 10.0 g
 - Mezcla de sales biliares 1.5 g
 - Rojo neutro 0.03 g
 - Cristal violeta 0.001 g
 - Agar 13.5 g
- pH final 7.1 ± 0.1

Agar Muller-Hinton

Fórmula por litro:

- Infusión de carne de res 300.0g
 - Peptona de caseína ácida 17.5 g
 - Almidón 1.5 g
 - Agar 17.0g
- pH final 7.4 ± 0.2



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Agar sangre (Base)

Fórmula por litro:

- Extracto de carne 20.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Agar 15.0 g
- Sangre 50-80 mL

pH 6.8 ± 0.2

Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis

Fórmula por litro:

- Extracto de levadura 3.0 g
- Peptona de gelatina 7.0 g
- Mezcla de sales biliares 1.5 g
- Lactosa 10.0 g
- Cloruro de sodio 10.0 g
- Agar 5.0 g
- Rojo neutro 0.03 g
- Cristal violeta 0.02 g

pH final 7.4 ± 0.2

Agua peptonada al 1%

- Peptona de carne o caseína 1 g
- Agua destilada 1000 mL

Caldo base rojo de fenol para observar fermentación de carbohidratos

Fórmula por litro:

- Peptona de carne (caseína) 10.0 g
- Extracto de carne 1.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Rojo de fenol 0.018 g
- Carbohidratos a fermentar; dextrina, galactosa, inositol, maltosa, manitol, sacarosa, salicina, sorbitol y xilosa 7.0 g

pH final 7.04 ± 0.1

Caldo GN

Fórmula por litro:

- Triptosa (peptona) 20.0 g
- D(+)glucosa 1.0 g
- D(-)manitol 2.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Citrato de sodio 5.0 g
- Deoxicolato de sodio 0.5 g



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

- Fosfato monobásico de potasio1.5 g
- Fosfato dipotásico (K₂HPO₄) 4.0 g

Caldo infusión cerebro corazón (BHI-caldo)

Fórmula por litro:

- Infusión de cerebro de ternera 12.5 g
 - Infusión de corazón de res 5.0 g
 - Proteosa peptona 10.0 g
 - Glucosa 2.0 g
 - Cloruro de sodio 5.0 g
 - Fosfato monobásico de sodio 2.5 g
- pH final 7.04 ± 0.2

Caldo Luria

Fórmula por litro:

- Triptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g

Caldo Luria con 1% de glicerina

Fórmula por litro:

- Triptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Glicerina 1.0 g

Caldo nitratos

Fórmula por litro:

- Extracto de carne 3.0 g
- *Peptona de carne 5.0 g
- Nitrato de potasio 1.0 g

Caldo RM/VP

Fórmula por litro:

- Glucosa 5.0 g
 - Peptona de carne 5.0 g
 - Fosfato dipotásico (K₂HPO₄) 5.0 g
- pH final 7.0 ± 0.2



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Caldo triptofano

Fórmula por litro:

- Triptona 10.0 g
- pH final 7.0

Caldo urea

Fórmula por litro:

- Urea 20.0 g
 - Extracto de levadura 0.1 g
 - Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 9.1 g
 - Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 9.5 g
 - Rojo de fenol 0.01 g
- pH final 6.8 ± 0.2

Medio de cultivo para el ensayo de oxidación-fermentación según Hugh y Leifson

Fórmula por litro:

- *Glucosa 10.0 g
 - *Peptona de caseína 2.0 g
 - Extracto de levadura 1.0 g
 - Cloruro de sodio 5.0 g
 - Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0.2 g
 - Azul de bromotimol 0.08 g
- pH final 7.1



ANEXO 4. RESULTADOS DE LAS PRIMERAS 5 ETAPAS REALIZADAS A MUESTRAS DE PESCADO

1ª ETAPA

En la primera extracción realizada a 5g de contenido intestinal de sierra, no se registro crecimiento de ninguna colonia al sembrar las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Al no observarse crecimiento de ninguna colonia después de las 24 horas de incubación, se procedió a verificar si los medios sostenían crecimiento bacteriano, inoculando cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp. y *Micrococcus* spp., por agotamiento. Las cajas fueron incubadas nuevamente por 24 horas a 37 ± 2 °C.

Pasado el tiempo de incubación necesario se observó crecimiento de las 4 cepas sembradas, teniendo las características morfológicas de cada una. Con esto se comprobó que los medios eran eficaces y por lo tanto habría que repetir la técnica.

2ª ETAPA

En la segunda extracción realizada a 5 g de músculo y piel de mojarra, así como a 5g de contenido intestinal, músculo y piel de sierra, se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la tabla 22.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 22. Número de colonias observadas en los medios ENDO y Baird-Parker

MUESTRAS	Promedio de las colonias presentes en los distintos medios usados		Morfología macroscópica de las colonias desarrolladas	
	Agar ENDO	Agar Baird-Parker	Agar ENDO	Agar Baird-Parker
Piel de sierra	23	31	Se observaron distintas morfologías: colonias rosas, colonias rojas, cremosas; colonias blancas con centro rojo, todas de un 1mm aprox.	Colonias de aprox. 1mm de diámetro completamente negras, brillosas y planas.
Músculo sierra	8	5	Colonias blancas con centro rosa-rojo planas, brillantes, bien definidas de aproximadamente 1mm de diámetro.	Colonias de aprox. 1mm de diámetro completamente negras, brillosas y planas.
Contenido intestinal	6	27	Colonias rosas con "halo" blanco, de textura cremosa y de 1mm de diámetro aproximadamente.	Colonias de distintos diámetros de 1cm a 3mm, algunas opacas, otras brillosas, algunas presentan forma ovoide y solo una tienen un halo negro
Piel mojarra	11	43	Colonias rosas, viscosas, en relieve, brillosas de in diámetro de 2mm aproximadamente	Colonias de aprox. 1mm de diámetro completamente negras, brillosas y planas.
Músculo mojarra	6	27	Colonias blancas con centro rosa-rojo planas, brillantes, bien definidas de aproximadamente 1mm de diámetro.	Colonias de aprox. 1mm de diámetro completamente negras, brillosas y planas.

La morfología microscópica fue determinada tomando tres colonias de cada muestra en el medio ENDO, la morfología de estas cepas fue:

- Contenido intestinal sierra, bacilos cortos, algunos eran largos, redondos, gram-negativos, algunos se encontraban en agrupaciones de 5 o más bacilos, la mayoría no estaban agrupados.
- Músculo sierra, bacilos rectos, cortos y largos, gram-negativos, se encontraban agrupados en pares, en grupos de 10 o más bacilos, muy pocos se encontraban aislados.
- Piel sierra, bacilos cortos redondos, gram negativos, sin agrupación.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

- Músculo mojarra, bacilos redondos, cortos y largos, gram-negativos, sin agrupación definida, la mayoría se encontraban aislados.

- Piel mojarra, bacilos cortos redondos, gram negativos, sin agrupación.

En el medio Baird-Parker se observo que todas las colonias eran cocos gram-positivos, la mayoría se encontraba en una agrupación de racimo (estafilococos), algunos aislados y otros se encontraban como diplococos, muy raro eran los cocos agrupados en tetradas.

3ª ETAPA

En una tercera extracción realizada a 5 g de contenido intestinal, músculo y piel de sierra, adquirida en un local de un mercado popular se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la tabla 23.

Tabla 23. Número de colonias observadas en los medios RVBA y Baird-Parker

MUESTRAS	Promedio de las colonias presentes en los distintos medios usados		Morfología macroscópica de las colonias desarrolladas	
	Agar RVB	Agar Baird-Parker	Agar RVB	Agar Baird-Parker
Piel de sierra	53	131	Se observaron distintas morfologías: colonias rosas, colonias rojas, cremosas; colonias rojas; colonias blancas con centro rojo, algunas puntiformes y otras de un 1mm aprox.	Colonias negras, de diámetros que van desde 0.1 hasta 3mm y aproximadamente 17 colonias tenían alrededor un halo negro
Músculo sierra	----	11	/	Colonias de aprox. 0.1mm de diámetro completamente negras, brillosas y planas.
Contenido intestinal	2	----	Habían dos tipos de colonias unas eran rosas, circulares y viscosas; otras eran rosas con "halo" blanco, de textura cremosa.	/



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

No se realizaron observaciones microscópicas pues la cantidad de bacterias era mínima y las que crecieron en el medio Baird-Parker seguramente provenían del ambiente, por lo que se continuó con extracciones.

4ª ETAPA

En la cuarta extracción realizada a 5 g de contenido intestinal y piel de sierra, adquirida en la tienda de autoservicio Comercial Mexicana; para comparar la cantidad y tipo de bacterias que se obtienen en cada uno se tuvieron los siguientes resultados, mostrados en la tabla 24.

Tabla 24. Número de colonias observadas en los medios RVBA y Baird-Parker

MUESTRAS	Promedio de las colonias presentes en los distintos medios usados		Morfología macroscópica de las colonias desarrolladas	
	Agar RVB	Agar Baird-Parker	Agar RVB	Agar Baird-Parker
Piel de sierra	incontables	incontables	Al parecer había tres colonias distintas, algunas eran rojas brillantes y otras del mismo color pero opacas, los diámetros de ambas eran variados, desde 1mm hasta casi 1cm; el otro tipo de colonias eran puntiformes, de menos de 1mm de diámetro, algunas son de forma ovalada.	La mayoría de las colonias eran del mismo diámetro, aprox. 1mm de diámetro, todas las colonias eran negras, opacas; algunas colonias presentaban una capa blanca sobre ellas.
Contenido intestinal	12	33	En su mayoría se presentaron colonias rojas, de forma cóncava, brillosas, de unos 2mm de diámetro, había otras colonias puntiformes que no se contabilizaron, eran de color rojo.	Se observaron diferentes morfologías, algunas colonias eran de 1cm de diámetro mientras que otras solo eran de unos 3mm; algunas tenían forma ovoide, algunas brillosa, otras opacas y unas pocas tenían un halo negro alrededor.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

La morfología microscópica fue determinada tomando colonias de cada morfología en los dos medios. Las observaciones microscópicas fueron:

- Todas las colonias tomadas del medio RVBA tuvieron la misma morfología, eran bacilos redondos, gram-negativos, cortos y algunos cuantos eran largos, la mayoría no tenían agrupación, los demás se encontraban en parejas o en grupos de 5 bacilos.
- Las colonias desarrolladas en el medio Baird-Parker eran cocos gram-positivos, la mayoría se encontraba en una agrupación de racimo (estafilococos), algunos estaban aislados y otros se encontraban como diplococos.

Haciendo este comparativo entre la cantidad de bacterias de piel y contenido intestinal, se decidió revisar la cantidad de bacterias contenidas en el músculo, por lo que se realizó una extracción más.

5ª ETAPA

Después del tiempo de incubación se revisaron las cajas con los dos medios usados en esta extracción de la muestra de músculo de sierra, obtenido de filete de sierra. En ninguna caja con medio ENDO se presentó crecimiento, de después de 48 horas, en ninguna de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Se sembró *E. coli* en una caja con este medio para verificar su viabilidad, después de 24 horas se obtuvo crecimiento de esta bacteria con características típicas de este microorganismo, por lo que se determinó que no había bacterias en la muestra que pudieran crecer en este medio.

En el medio Luria se observó crecimiento de dos colonias diferentes, una era de color crema de aproximadamente 5mm de diámetro, el otro tipo de colonia era de color blanco de unos 2mm de diámetro.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Se realizó una tinción de Gram para determinar la morfología microscópica de los 2 tipos de colonias observados en el medio Luria. Se tomaron 3 muestras de cada una de las colonias y se observaron cocobacilos, gram-negativos, redondos sin agrupación, en todas las muestras.

Al término de esta extracción se determinó que la cantidad de bacterias obtenidas en cada una de las extracciones era demasiado bajo por lo que se revisaron los artículos encontrados y relacionados con la presencia de bacterias farmacoresistentes en el pescado, con lo que se determinó que hacía falta el uso de un medio de enriquecimiento antes de pasar a las bacterias a medios selectivos.



ANEXO 5. INFORMACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA

Ácido clavulánico. Antibiótico producido por *Streptomyces clavuligerus*. Inhibidor de β -lactamasas. Uso terapéutico: antibacteriano.

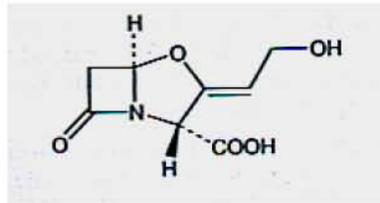


Figura 21. Estructura del ácido clavulánico

Amikacina. Este es un antibiótico perteneciente a la familia de los aminoglucósidos, es semisintético derivado de la kanamicina A. Uso terapéutico: antibacteriano.

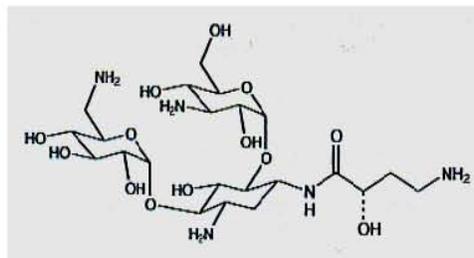


Figura 22. Estructura de la amikacina

Amoxicilina. Es un antibiótico semi-sintético relacionado con la penicilina, de amplio espectro. Uso terapéutico: antibacteriano.

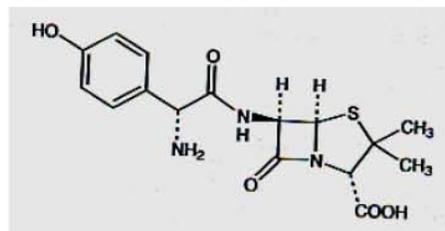


Figura 23. Estructura del amoxicilina

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Ampicilina. Antibiótico semi-sintético relacionado estructuralmente con la penicilina. Oralmente activo. De amplio espectro. Uso terapéutico: antibacteriano.

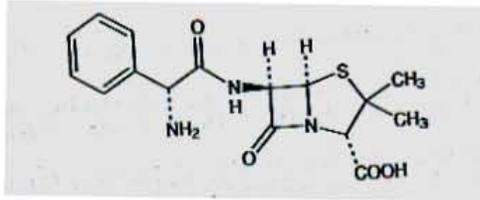


Figura 24. Estructura de la ampicilina

Azitromicina. Antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos, semi-sintético, relacionado con la eritromicina. Uso terapéutico: antibacterial.

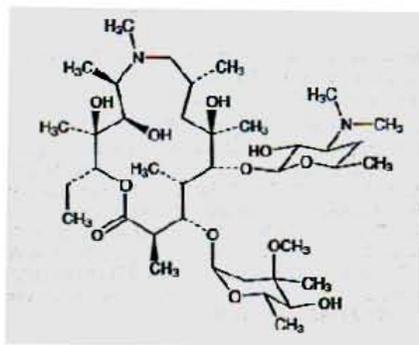


Figura 25. Estructura de la azitromicina

Aztreonam. Es el primer antibiótico β -lactámico monocíclico totalmente sintético. Tiene un alto grado de resistencia a las β -lactamasas y muestra actividad específica por bacilos aerobios gram- negativos. Uso terapéutico: antibacterial.

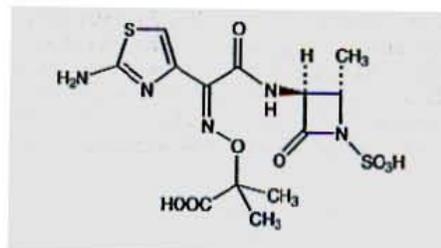


Figura 26. Estructura del aztreonam

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Bacitracina. Este antibiótico es un complejo polipeptídico producido por *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*; es una mezcla de 9 bacitracinas en donde la bacitracina A es el componente mayoritario; se descompone en compuestos peptídicos y aminoácidos. Actúa inhibiendo la segunda etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Uso terapéutico: antibacteriano.

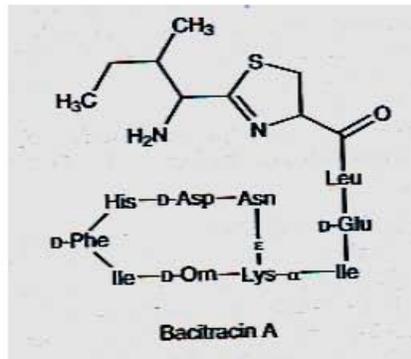


Figura 27. Estructura de la bacitracina A

Carbenicilina. Es un antibiótico semi-sintético relacionado con la penicilina. Uso terapéutico: antibacteriano.

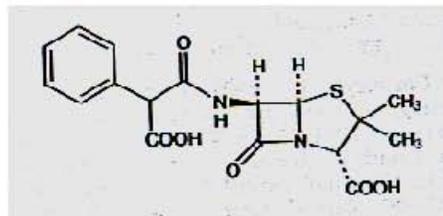


Figura 28. Estructura de la carbenicilina

Cefalotina. Antibiótico perteneciente a las cefalosporinas, es semisintética. Uso terapéutico: antibacteriano.

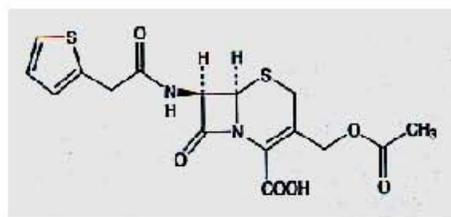


Figura 29. Estructura de la cefalotina

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Cefazolina. Antibiótico semi-sintético, derivado del ácido 7-aminocefalosporánico. Uso terapéutico: antibacteriano.

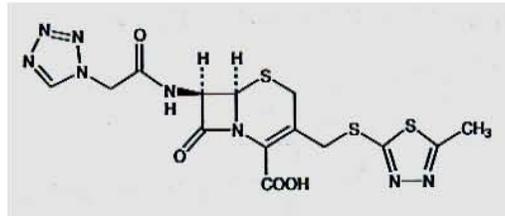


Figura 30. Estructura de la cefazolina

Cefoperazona. Antibiótico perteneciente a la familia de las cefalosporinas, de tercera generación. Es de amplio espectro. Uso terapéutico: antibacteriano.

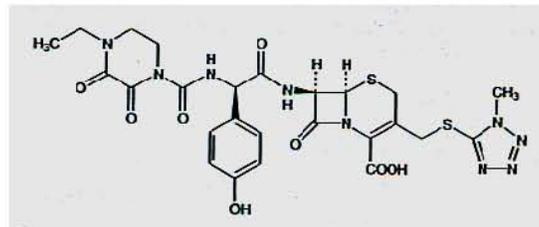


Figura 31. Estructura de la cefoperazona

Cefotaxima. Cefalosporina de tercera generación, de amplio espectro. El nombre cefotaxima se aplica al isómero que tiene un grupo *sin*-metoximino. Uso terapéutico: antibacteriano.

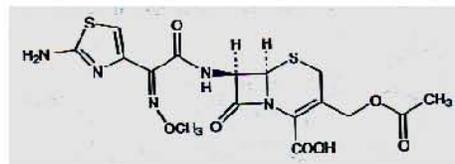


Figura 32. Estructura de la cefotaxima

Ceftazidima. Cefalosporina de tercera generación. Uso terapéutico: antibacteriano.

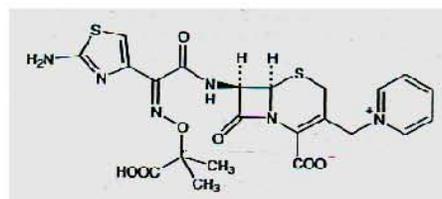


Figura 33. Estructura de la ceftazidima

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Ceftriaxona. Cefalosporina de tercera generación; antibiótico parenteral. Uso terapéutico: antibacteriano.

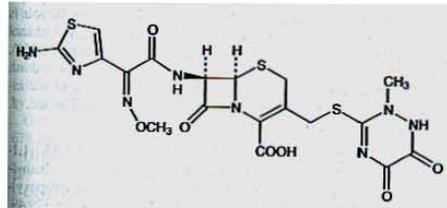


Figura 34. Estructura de la ceftriaxona

Cloranfenicol. Antibiótico de amplio espectro, obtenido de cultivos bacterianos de suelo de *Streptomyces venezuelae*. Uso terapéutico: antibacterial y antirickettsial.

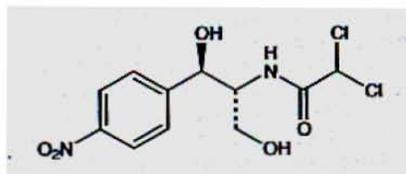


Figura 35. Estructura del cloranfenicol

Cotrimoxazol. Es una mezcla de sulfametoxazol y trimetoprim. Uso terapéutico: antibacterial, antineumocístico.

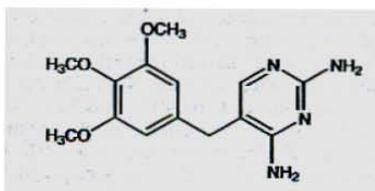


Figura 36. Estructura del trimetoprim

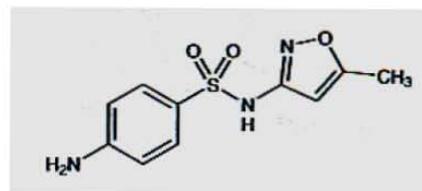


Figura 37. Estructura del sulfametoxazol

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Gentamicina. Consiste de tres componentes cercanamente relacionados, gentamicinas C₁, C₂, C_{1a} y también gentamicina A, que se diferencia de los otros miembros del complejo porque es similar a la kanamicina C. La estructura de las series de gentamicina C contiene a la 2-deoxistreptamina ligada a dos unidades de sacáridos, estas son la garosamina y la purpurosamina. Uso terapéutico: antibacteriano.

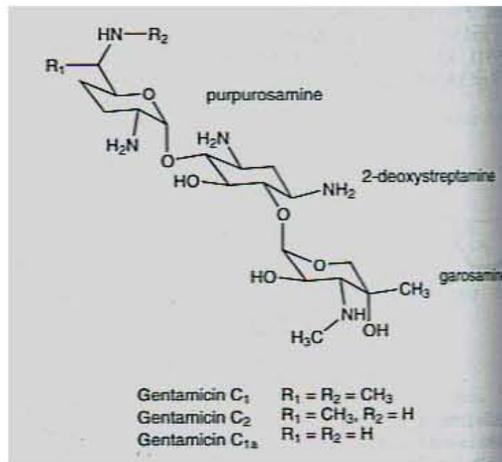


Figura 38. Estructura de las gentamicinas C

Imipenem. Antibiótico semi-sintético, de muy amplio espectro. Es el primer derivado estable de la tienamicina. Uso terapéutico: antibacteriano.

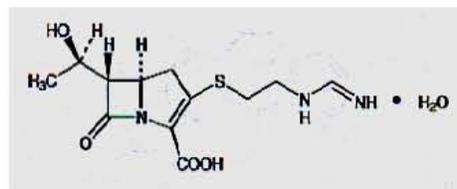


Figura 39. Estructura del imipenem

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Kanamicina. Es un antibiótico complejo producido por *Streptomyces kanamiticus*. Compuesto de tres componentes, kanamicina A, el mayor componente (usualmente designado como kanamicina) y las kanamicinas B y C. Uso terapéutico: antibacteriano.

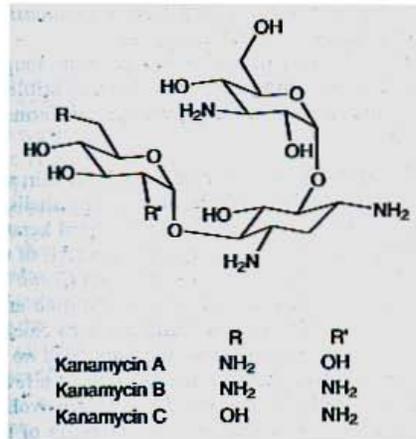


Figura 40. Estructura de la kanamicina

Lincomicina. Antibiótico producido por *Streptomyces lincolnensis* var. Lincolnensis. Uso terapéutico: antibacteriano.

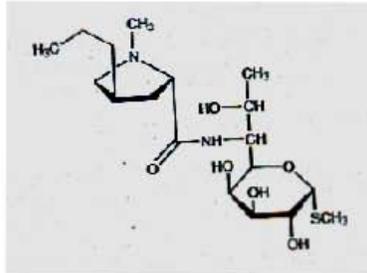


Figura 41. Estructura de la lincomicina

Netilmicina. Aminoglucósido semi-sintético de amplio espectro, relacionado con la sisomicina. Uso terapéutico: antibacteriano.

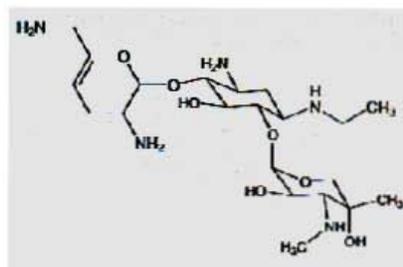


Figura 42. Estructura de la netilmicina



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Nitrofurantoina. Antibiótico preparado de sulfato 1-aminofurantoina y 5-nitro-2-furaldeído diacetato. Uso terapéutico: antibacteriano.

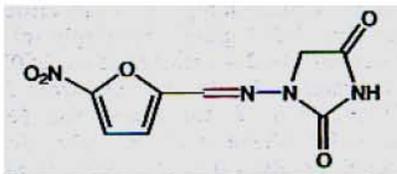


Figura 43. Estructura de la nitrofurantoina

Pefloxacina. Es una quinolona fluorada, análoga de la norfloxacin. Uso terapéutico: antibacteriano.

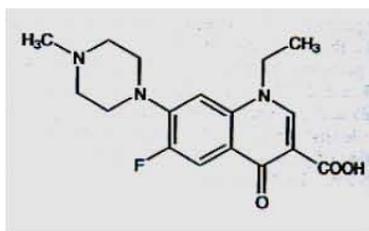


Figura 44. Estructura de la pefloxacin

Penicilina. Existen diferentes tipos de penicilina, G, N, O y V; todas ellas se diferencian en el grupo unido al amino del biciclo que conforma a la penicilina, además del microorganismo que las produce, es decir, Penicilina G, es producida por *Penicillium* spp; Penicilina N, producida por *Cephalosporium* spp. encontrado en alcantarillas; Penicilina O, producido por *Penicillium chrysogenum*, Penicilina V es obtenida por la adición de 2-fenoxietanol al cultivo de *Penicillium*, usando levadura que se autolisa como fuente de nitrógeno. Uso terapéutico: antibacteriano.

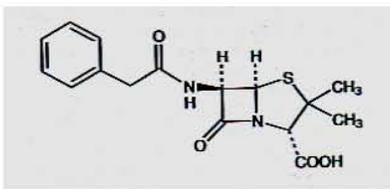


Figura 45. Estructura de la Penicilina G

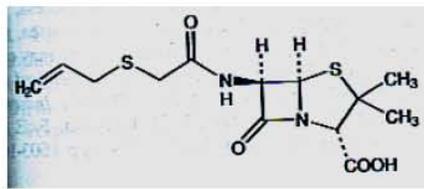


Figura 46. Estructura de la Penicilina O

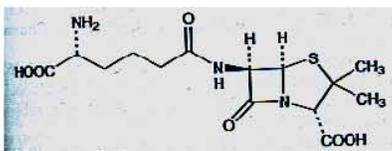


Figura 47. Estructura de la Penicilina N

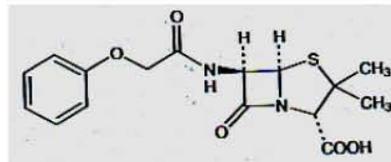


Figura 48. Estructura de la Penicilina V

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Sulfametoxazol. Uso terapéutico: antibacterial, antineumocístico.

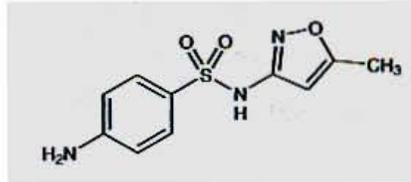


Figura 49. Estructura del sulfametoxazol

Tetraciclina. Antibiótico producido por *Streptomyces* spp. Uso terapéutico: antiamebico, antibacterial y antirickettsial.

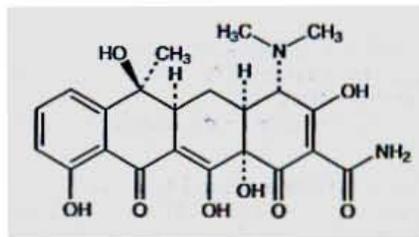


Figura 50. Estructura de la tetraciclina

Ticarcilina. Antibiótico de amplio espectro semi-sintético, relacionado con la penicilina. Uso terapéutico: antibacteriano.

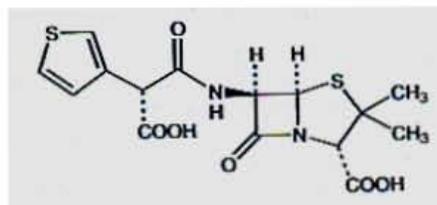


Figura 51. Estructura de la ticarcilina

Tobramicina. Antibiótico perteneciente a la familia de los aminoglicósidos, componente de la nebramicina que es un complejo producido por *Streptomyces tenebrarius*. Uso terapéutico: antibacteriano.

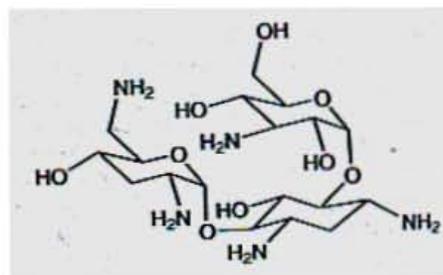


Figura 52. Estructura de la tobramicina

ANEXO 6 ANTIBIÓTICOS USADOS EN PESCADO

Aureomicina. La aureomicina es uno de los nombres comerciales que se les da a la clorotetraciclina, así como, acronizina, aureocina, biomitina, etc. La clorotetraciclina es una sustancia antibiótica aislada de el substrato de *Streptomyces aureofaciens*. Su uso terapéutico es como antibacterial y antiaméxico.

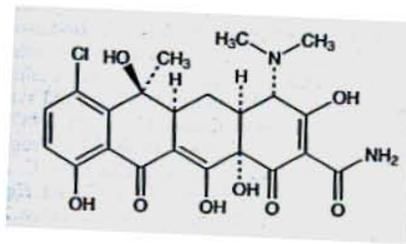


Figura 53. Estructura de la clorotetraciclina (derivado de la tetraciclina)

Doxiciclina. Conocida comercialmente como jenaciclina, supraciclina y vibramicina. Esta relacionado estructuralmente con la tetraciclina. Uso terapéutico: antibacterial.

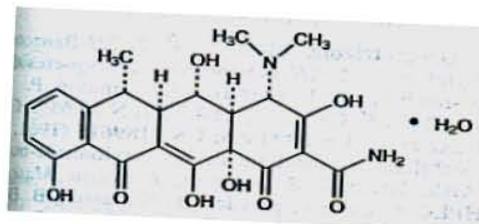


Figura 54. Estructura de la doxiciclina

Florfenicol. Antibiótico de uso antibacterial, es un derivado fluorado del tiamfenicol. Nombres comerciales: fluorotiamfenicol y aquafen. Uso: su uso es como antibacterial pero es de uso veterinario.

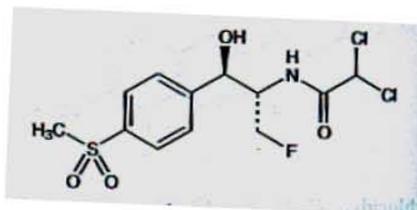


Figura 55. Estructura del florfenicol (derivado del cloranfenicol)

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Hidroxitetraciclina. Al igual que la aureomicina, la hidroxitetraciclina es uno de los nombres comerciales de la oxitetraciclina, así como gломicina y riomitsina. La oxitetraciclina es una sustancia antibiótica aislada de la elaboración de antibióticos de el actinomiceto *Streptomyces rimosus*, que crece en un medio adecuado. Uso terapéutico: antibacterial.

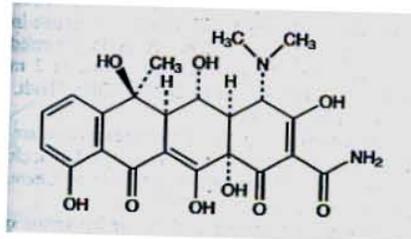


Figura 56. Estructura de la oxitetraciclina

Tiamfenicol. Relacionado estructuralmente con el cloranfenicol. Nombres comerciales: hyrazina, igralina, neomysona, rigelon, tiamcol, tionicol, urfamicina, urofenil. Uso terapéutico; antibacterial en su forma D; en veterinaria su forma DL es usada en el control del cólera.

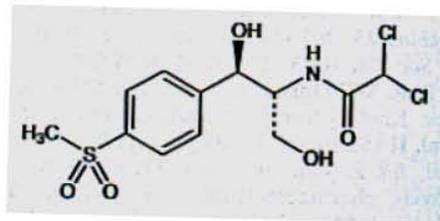


Figura 57. Estructura del tiamfeicol



ANEXO 7. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO AEROMONAS

Género: *Aeromonas*

Bacilos gramnegativos con extremos redondeados que se aproximan a la forma esférica; dispuestos en pares o en cadenas cortas.

No formadores de esporas.

Anaerobios facultativos

Catalasa positivos

No encapsulados

Movilidad variable; por lo general positiva: flagelo polar único; en medios sólidos pueden formarse flagelos peritricos. Excepción: *A. media* (-) y *A. salmonicida* (-).

Oxidasa positivos

O/F de glucosa: F (fermentativos) y O (oxidativos)

Temperatura óptima de crecimiento: 22-28°C; sin embargo, la mayoría de las cepas crecen bien a 37°C.

22 especies: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophilia* subespecie *anaerogenes*, *A. hydrophilia* subespecie *hydrophilia*, *A. ichthiosmia*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. punctata* subespecie *caviae*, *A. punctata* subespecie *punctata*, *A. salmonicida* subespecie *achromogenes*, *A. salmonicida* subespecie *masoucida*, *A. salmonicida* subespecie *salmonicida*, *A. salmonicida* subespecie *smithia*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. veronii*.

El género *Aeromonas* consta de varias especies que con frecuencia se encuentran en las muestras del tracto gastrointestinal, entre estas especies están *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*, *A. sabria*, *A. veronii* y *A. hydrophilia*. En las especies de *A. caviae* y *A. hydrophilia* se ha identificado una enterotoxina, y las demás especies citadas se relacionan con la diarrea.

Normalmente, las *Aeromonas* son formas acuáticas que con frecuencia están relacionadas con la diarrea, pero no se conoce del todo su papel en la etiología del síndrome gastrointestinal.

La especie *A. hydrophilia* ha sido la más estudiada, por lo que se mencionan algunos datos importantes sobre esta especie. *A. hydrophilia* es una bacteria acuática que se encuentra en las aguas saladas más que en las aguas dulces. Es un importante patógeno para peces, tortugas, ranas, caracoles y caimanes y patógeno para el hombre, de modo especial en hospedadores inmunocomprometidos. *A. hydrophilia* produce diarrea, endocarditis, meningitis, infecciones de tejidos blandos y bacteriemia.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Las cepas virulentas de *A. hydrophilia* producen un único polipéptido de 52 kda que posee actividades enterotóxica, citotóxica y hemolítica. Esta molécula multifuncional presenta reactividad inmunológica cruzada con la toxina colérica.

La mayoría de las cepas enterotoxigénicas son VP positivas, hemolisina positivas y arabinosa positivas. (James, 1994).

En la tabla 24 se presentan las reacciones de algunas especies de *Aeromonas* a diferentes pruebas bioquímicas usadas para su diferenciación.

Tabla 24. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de las especies de *Aeromonas* aisladas con más frecuencia

PRUEBA	<i>A. caviae</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. rmedia</i>	<i>A. salmonicida</i> subesp. achromogenes	<i>A. salmonicida</i> subesp. masoucida	<i>A. salmonicida</i> subesp. salmonicida	<i>A. salmonicida</i> subesp. smithali	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ → NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	+
H ₂ S	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Movilidad	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Pigmento soluble castaño	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Hidratos de carbono											
Glucosa	A	A	A	A	A	A	A	V ⁺	-	-	A
Lactosa	V	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Arabinosa	A	A	A	A	-	A	A	NR	-	-	-
Celobiosa	V ⁺	A	-	A	-	-	-	-	-	V	V
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Galactosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A
Glicerol	V	A	A	V	V	V	V	V ⁻	V	V	A
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A
Manitol	A	A	A	A	-	A	A	-	-	V	A
Manosa	V	A	V ⁺	A	A	A	A	NR	A	A	A
Melibiosa	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Salicina	A	A	A	v	V	V	V	NR	-	-	A
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	V ⁻	-	V	-
Sacarosa	A	V	A	A	A	A	A	V	-	V	A
Trhealosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	V	A
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continúa)



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Tabla 24. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de las especies de *Aeromonas* aisladas con más frecuencia (continuación)

PRUEBA	A. caviae	A. eucrenophila	A. hydrophila	A. rmedia	A. salmonicida subesp. achromogenes	A. salmonicida subesp.	A. salmonicida subesp.	A. salmonicida subesp. smithai	A. schubertii	A. sobria	A. veronii
Hidratos de carbono											
Glucosa	A	A	A	A	A	A	A	V+	-	-	A
Lactosa	V	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Arabinosa	A	A	A	A	-	A	A	NR	-	-	-
Celobiosa	V+	A	-	A	-	-	-	-	-	V	V
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Galactosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A
Glicerol	V	A	A	V	V	V	V	V	V	V	A
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A
Manitol	A	A	A	A	-	A	A	-	-	V	A
Manosa	V	A	V+	A	A	A	A	NR	A	A	A
Melibiosa	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
Salicina	A	A	A	v	V	V	V	NR	-	-	A
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	-
Sacarosa	A	V	A	A	A	A	-	V	-	V	A
Trhealosa	A	A	A	A	A	A	A	-	A	V	A
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	V	+	+	-	-	-	+	+
DNasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato (Christensen)	V	-	-	-	-	-	-	NR	+	-	+
Citrato (Simmons)	V	-	V	V	-	-	-	-	V	-	+
Hidrólisi de la esculina	+	+	+	V	-	+	+	-	-	-	+
Arginina deshidrolasa	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-
Lisina descarboxilasa	-	-	V	-	V	V	V	-	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Licuefacción de la gelatina, 22°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V+
KCN	G	G	G	G	NG	NG	NG	NG	NG	NG	V
Lipasa	+	-	V	V	+	+	+	-	+	-	+
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-
ONPG	+	V	+	V+	V	V	V	+	+	-	V+
Fenilalanina desaminasa	-	V	-	V	-	-	-	-	V	+	V+
Rojo de metilo (MR)	+	V	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Voges-Proskauer (VP)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	V+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensibilidad: 0/129	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	R	R	R

Tabla 24. Las claves colocadas como respuesta a cada prueba significa: V, reacciones variables; V+, variable, por lo general positivo; V-, variable, por lo general negativo; G, crecimiento (growth); NG, sin crecimiento; NR, no se dispone de resultados; A, producción de ácido (+); 0/129, agente vibriostático, 2,4-diamino-6,7-disopropilpteridina. Las pruebas marcadas de color son los ensayos realizados a las cepas aisladas en este trabajo



ANEXO 8. GRÁFICOS DE CADA UNO DE LOS GELES DE PCR

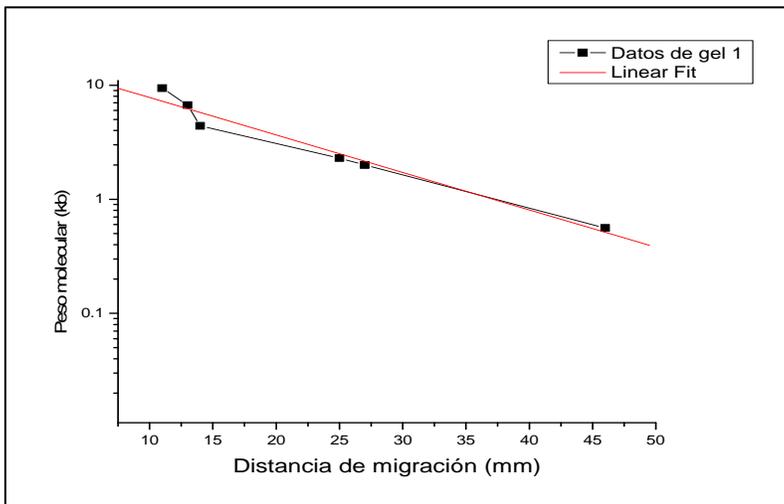
Datos y gráfica de la Figura 10

Distancia de migración	PM λ (kb)
11	9.4
13	6.7
14	4.4
25	2.3
27	2
46	0.5

Distancia de migración del colorante 60 mm

[26/06/2007 09:47 "/Graph1" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.21899	0.07741
B	-0.0328	0.00301



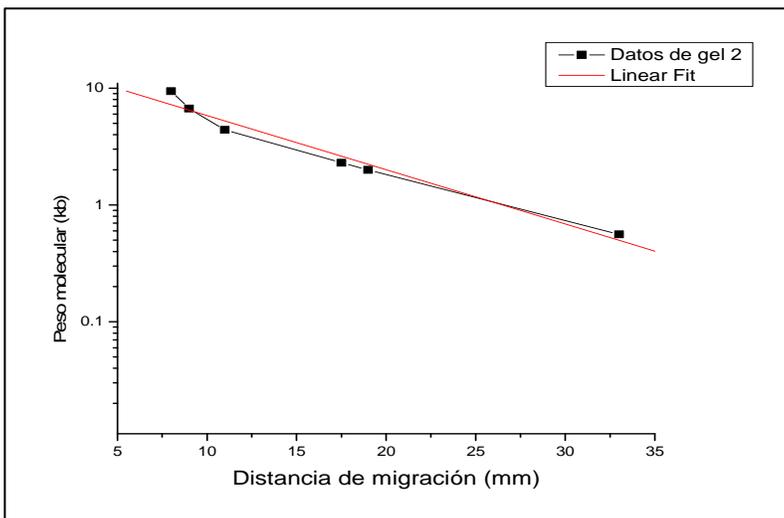
Datos y gráfica de la Figura 11

Distancia de migración	PM λ (kb)
8	9.4
9	6.7
11	4.4
17.5	2.3
19	2
33	0.5

Distancia de migración del colorante 53 mm

[26/06/2007 09:51 "/Graph2" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.23019	0.07195
B	-0.04644	0.00392



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

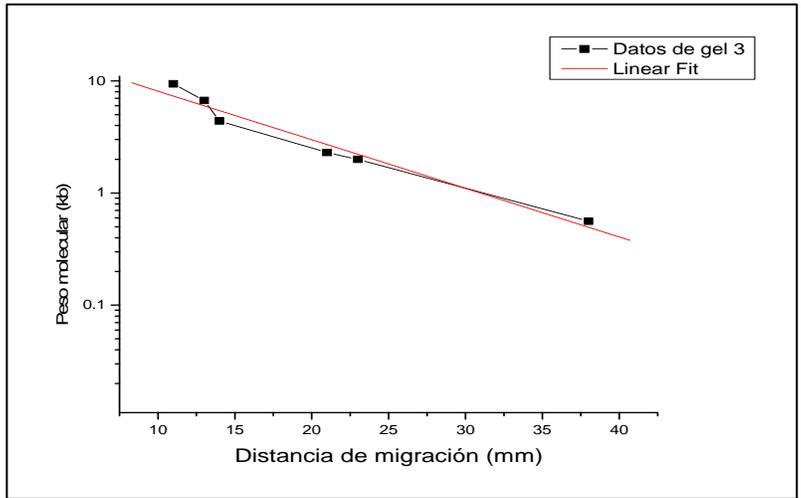
Datos y gráfica de la Figura 12

Distancia de migración	PM λ (kb)
11	9.4
13	6.7
14	4.4
21	2.3
23	2
38	0.5

Distancia de migración del colorante 51 mm

[26/06/2007 09:54 "/Graph3" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.34237	0.08794
B	-0.04334	0.004



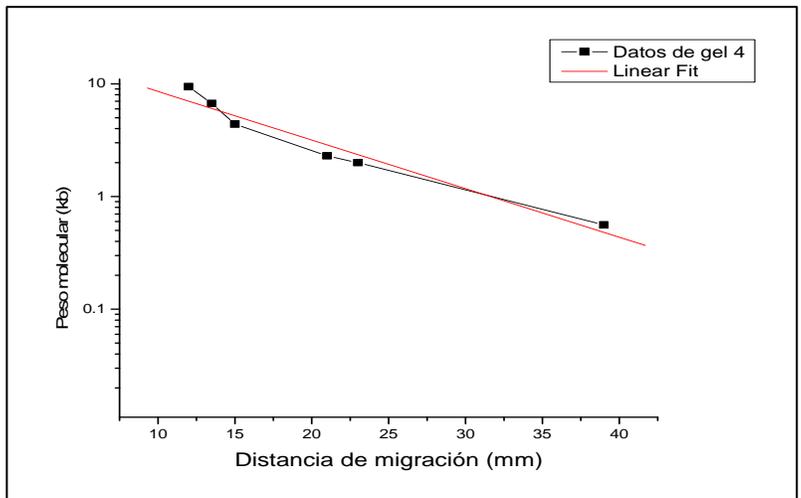
Datos y gráfica de la Figura 13

Distancia de migración	PM λ (kb)
12	9.4
13	6.7
15	4.4
21	2.3
23	2
39	0.5

Distancia de migración del colorante 48 mm

[26/06/2007 09:57 "/Graph4" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.36262	0.10338
B	-0.04309	0.00459



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

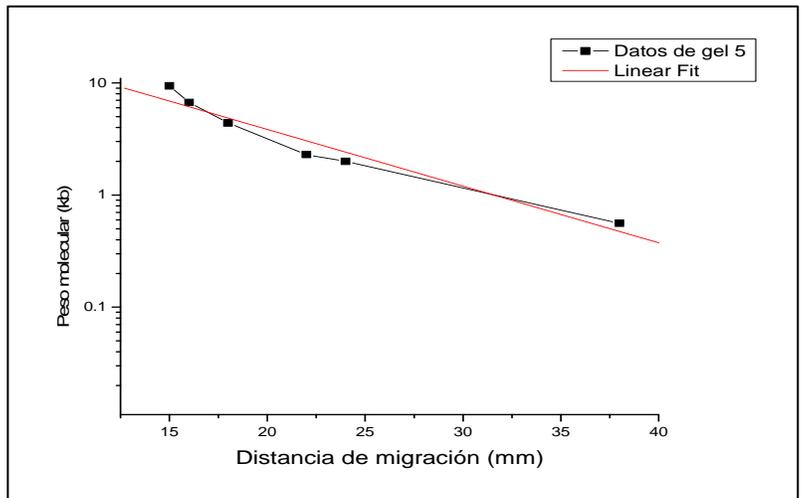
Datos y gráfica de la Figura 14

Distancia de migración	PM λ (kb)
15	9.4
16	6.7
18	4.4
22	2.3
24	2
38	0.5

Distancia de migración del colorante 47 mm

[26/06/2007 10:23 "/Graph5" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.59641	0.13629
B	-0.05056	0.0058



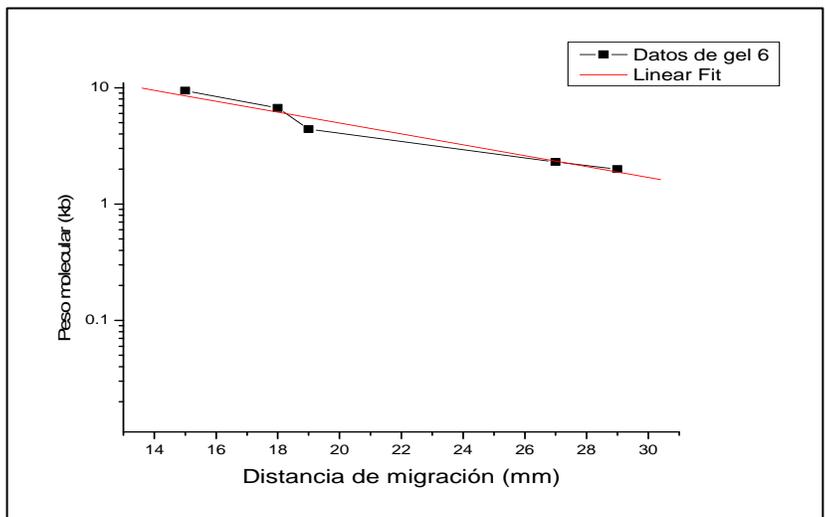
Datos y gráfica de la Figura 15

Distancia de migración	PM λ (kb)
15	9.4
18	6.7
19	4.4
27	2.3
29	2

Distancia de migración del colorante 48 mm

[26/06/2007 10:26 "/Graph6" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.6319	0.12447
B	-0.0468	0.00559



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

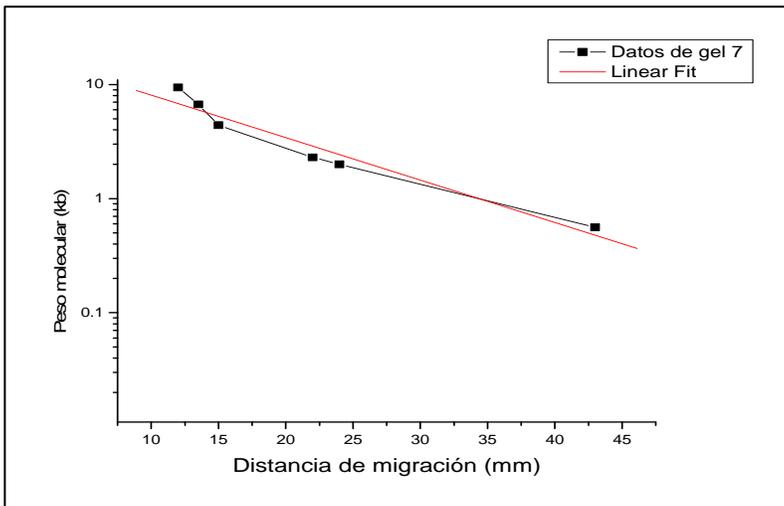
Datos y gráfica de la Figura 16

Distancia de migración	PM λ (kb)
12	9.4
13.5	6.7
15	4.4
22	2.3
24	2
43	0.5

Distancia de migración del colorante 47 mm

[26/06/2007 10:28 "/Graph7" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.27877	0.10405
B	-0.03721	0.00433



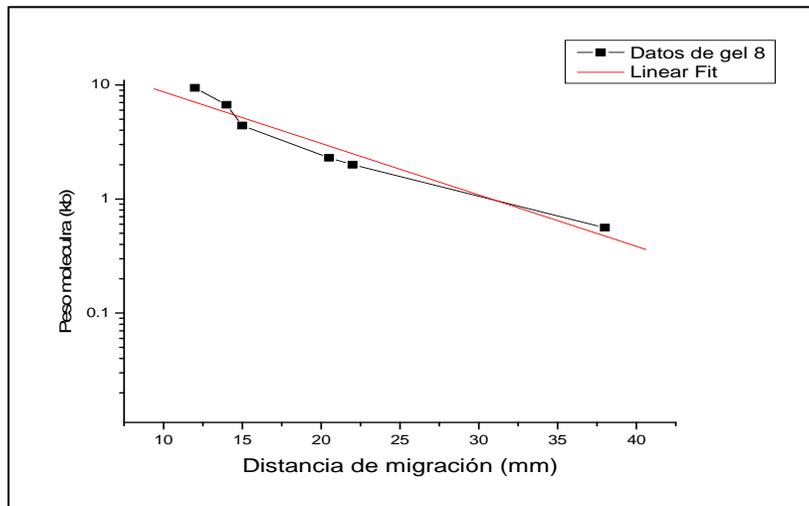
Datos y gráfica de la Figura 17

Distancia de migración	PM λ (kb)
12	9.4
14	6.7
15	4.4
20.5	2.3
22	2
38	0.5

Distancia de migración del colorante 55 mm

[05/07/2007 10:30 "/Graph8" (2454286)]
 Linear Fit for Data1_B on linearized scales.
 $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$
 where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.38875	0.11601
B	-0.04509	0.00526



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Para calcular el peso molecular de los amplicones presentes en los geles se presenta un ejemplo, usando los datos de la figura 10.

El programa usado (Origin 7.5) arroja los siguientes valores:

[26/06/2007 09:47 "/Graph1" (2454286)]

Linear Fit for Data1_B on linearized scales.

$yscale(Y) = A + B * xscale(X)$

where scale() is the current axis scale function.

Parameter	Value	Error
A	1.21899	0.07741
B	-0.0328	0.00301

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

$$y = -0.0328x + 1.21899$$

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

$$PM = 10^{(-0.0328x + 1.21899)}$$

en este caso, las bandas presentes en la figura 12 tienen una distancia de migración de; 53, 42, 39 y 32 mm. Para calcular el peso molecular de estas bandas la fórmula sería

$$PM = 10^{((-0.0328 * 53) + 1.21899)}$$

el tamaño de los amplicones en este gel fueron 302, 694, 870 y 1477 pb, respectivamente.



XII. REFERENCIAS

1. Aarestrup F. M., "Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from foods animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark", *APMIS* 1998; **106**: 606-622.
2. Adams M. R. and Moss M. O., *Microbiología de los alimentos*, Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1997, pp. 149-156.
3. Alderman. D. J., "Trends in Therapy and Prophylaxis 1991-2001", *Bulletin Eur. Association Fish Pathology*, 2002; **22**(2): 117-125.
4. Alderman D. J. and C. Michel, Chemotherapy in aquaculture today. En: *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizooties; 1992, pp 3-24.
5. Álvarez Fernández M., Rodríguez Sousa T., Brey Fernández E., López Meléndez C., Piñeiro L., "Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*", *Revista Española de Quimioterapia* 2003; **16** (4): 394-397.
6. Amabile Cuevas C. F., Chicurel M. E., "Bacterial plasmids and gene flux", *Cell* 1992; **70**: 189-99.
7. Aquatic Health, "Situación actual de residuos de fármacos y posibles puntos críticos a abordar". En: Seminario. Nuevas perspectivas para la prevención de enfermedades de salmonídeos en Chile, Novartis, 2004.
8. Ausina V., Arnal J., Principales grupos de seres vivos con capacidad patógena para el hombre. *Medicina interna*, 14ª edición, Madrid: Harcourt; 2000, pp. 2489-2497.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

9. Avellaneda Mariscal J. M., Pecho Galarza E., TESIS: "Estudio de la resistencia a los antimicrobianos en el Centro Naval de enero a diciembre del 2000", Lima: Universidad Nacional Mayor de San Carlos (Universidad del Perú DECANA DE AMERICA) Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2002, pp. 1-72.
10. Azanza J. R., Sádaba B., Mediavilla A., Quinolonas, Sulfamidas, Trimetroprima, Cotrimoxazol, Nitrofurantoina, Farmacología Humana 3ª edición, Barcelona: Masson; 2000, pp. 1145-1157.
11. Barry A., Thornsberry C., Susceptibility tests. Diffusion test procedures. En: Lennette, Manual of Clinical Microbiology 4ª edición, Washington D. C.: American Society for Microbiology; 1985, pp 978-987.
12. Barie P. S., "Modern surgical antibiotic prophylaxis and therapy-less is more", *Surg Infect (Larchmt)* 2000; **1**(1): 23-29.
13. Bissonnette L., Roy P. H., "Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria", *Journal of Bacteriology* 1992; **174**: 1248-57.
14. Bosu W. K., Ofori-Adejei D., "Survey of antibiotic prescribing pattern in government health facilities of the Wassa west district of Ghana", *East Afr Medical Journal* 1997; **74**: 138-142.
15. Bourgeois C. M., Mescle J. F., Zucca J., Microbiología Alimentaria. Volumen II "Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria", Zaragoza: Editorial Acribia S. a., 1994, pp. 263-275.
16. Branthwaite A., Pechére J.C., "Pan-European survey of patients' attitudes to antibiotics and antibiotic use", *Journal Int Med Res* 1996; **24**: 229-238.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

17. Bravo S., Revisión de los Medicamentos Utilizados para el Control de las Enfermedades de Peces en Chile 2ª edición, Chile: Monografía editada por Laboratorio de Veterquímica, 1998.
18. Bravo S., Dözl H., Silva M. T., Lagos C., Millanao A., Urbina M., "PROYECTO N° 2003-28. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura", Puerto Montt: Universidad Austral de Chile, Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura, 2005; 1-255.
19. Books G. F., Morse S. A., Butel J. S., Microbiología médica de Jawet, Melnick y Adellderg, México: El Manual Moderno; 1998, pp. 113-116, 184-185.
20. Burdon Kennet L., Williams, Robert P., Microbiología, 8° reimpresión, México: Publicaciones Culturales, 1985, pp. 216.
21. Butler C. C., "Understanding the culture of prescribing: qualitative study of general practitioners' and patients' perceptions of antibiotics for sore throats", *BJM* 1998; **317**: 637-642.
22. Carattoli A., "Importance of integrons in the diffusion of resistance", *Vet Res* 2001; **32**: 243-59.
23. Carrillo L., Microbiología Agrícola. Capítulo 1 "Microorganismos", Universidad Nacional de Salta, 2003, pp. 1-20. En: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri.pdf> Consultado en octubre 2007.
24. Castro Escarpulli G., Figueras M.J., Aguilera-Arreola G., Soler L., Fernández-Rendón E., O. G. Aparicio, Guarro J., R. Chacón M., "Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México", *International Journal of Food Microbiology* 2003; **84**: 41-49.
25. Castro Escarpulli G., Aguilera-Arreola M. G., Cerezo Silvia G., Hernández-Rodríguez C. H., Rodríguez Chacón M., Soler Falgás L., Ozores Gerardo A., Figueras Salvat M., "El

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2002; **22** (4): 206-216.

26. Cesur S., "Topical antibiotics and clinical use", *Microbiology Bulletin* 2002; **36**(4): 353-361.
27. Chambers Henri F. and Sande Merle A., "Fármacos antimicrobianos. Consideraciones generales". En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9ª edición, México: McGraw-Hill Interamericana, 1996, pp. 1096.
28. Clowes Royston C., "Molecular Structure of Bacterial Plasmids", *Bacteriological Reviews* 1972; **36**(3): 361-405.
29. Collis C. M., Grammaticopoulos G., Briton J., Stokes H.W., Hall R.M., "Site-specific insertion gene cassettes into integrons", *Mol Microbiol* 1993; **9**: 41-52.
30. Collis C., Hall R. M., "Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integron", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; **39**: 155-62.
31. Dalsgaard A., Forslund A., Tam N. V., Vinh D. X., Cam P. D., "Cholera in Vietnam: Changes in genotypes and emergence of class 1 integrons containing Aminoglycoside Resistance Gene Cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from 1979 to 1996", *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**(3): 734-741.
32. Dalsgaard A., Forslund A., Serichantalergs Oralak and Sandvang D., "Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-Serotype strains isolated in Thailand", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000 (1); **44**(5): 1315-1321.
33. Dalsgaard A., Forslund A., Petersen A., Brown D. J., Dias F., Monteiro S., Molbak K., Aaby P., Rodrigues A. and Sandström A., "Class 1 Integron-Borne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae*



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

O1 stains isolated in Guinea-Bissau", *Journal of microbiology* 2000 (2); **38**(10): 3774-3779.

34. Dalsgaard A., Forslund A., Sandvang D., Arntzen L. And Keddy K., "*Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the aadA2 gene located an class 1 integrons", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; **48**: 827-838.
35. Davis B. D., Tratado de Microbiología, 3ª edición, Barcelona: Salvat Editores S.A., 1984; pp. 104-105, 177, 180-181.
36. Diggins F. W., "The true history of the discovery of penicillin, whit refutation of the misinformation in the literature", *Br. J. Biomed Sci* 1999; **56** (2): 83-89.
37. Diggins F. W., "The discovery of penicillin: so many get it wrong", *Biologist* 2000; **47** (3): 115-119.
38. Duarte E. A., "Resistencia de las bacterias a los antibióticos", Argentina: Colegio Nacional San Isidro, 2004. En: <http://www.monografias.com> Consultado en abril 2007.
39. Dupont H. L., Stele J. H., "Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health", *Rev Infect Dis*, 1987; **9**: 447-460.
40. Ernst M. E., Ernst E. J., Klepser M. E., "Levofloxacin and trovafloxacin: ¿the next generation of fluoroquinolones?", *Am J Health Syst Pham* 1998; **54**(22): 2569-2584.
41. Escolar M., Azanza J. R., Sádaba B., Honorato J., "Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina", *Medicine* 1998; **7**(76): 3524-3532.
42. Facultad de Ciencias, Área de Edafología y Química Agrícola, Edafología. Ciencias Ambientale. Lección 6. "El suelo como hábitat. Microorganismos del suelo.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

Actinomicetos", 2003. En: <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL6MAntinomicetos.htm>
Consultado en octubre 2007

43. FDI Commission, L. P. Samaranayake, Hong Kong, RoC, N. W. Johnson, London Uk, "Guidelines for the use of antimicrobial agents to minimise development of resistance", *International Dental Journal* 1999; **49**: 189-195.
44. Fidler D. P., "Legal issues associated with antimicrobial drug resistance", *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 169-177.
45. Frazier W. C. and Westhoff D. C., *Microbiología de los Alimentos* 4ª edición, Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 2003, pp. 325-339.
46. Fuentes J., "Resistencia bacteriana", *IATREIA* 1993; **6** (1): 46-50.
47. Fundación Farmaindustria, *La aportación de los antibióticos a la salud. El valor del medicamento*, Madrid: Health Outcomes Research Europe; 2001, pp 3-25.
48. Gallego C., Montero M., Cuadrado P., Jurado A., "Clasificación clínica de las enfermedades infecciosas", *Medicine* 2000; **8**(61): 3231-3240.
49. García Loba J. M., "Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos", *Actualidad SEM* 2000; **28**: 18-22.
50. Giles M., Ortegón A., Palao M., *Técnicas microbiológicas de aplicación en el control de calidad de alimentos*, México: Departamento de Biología, Facultad de Química UNAM, 1998, pp. 176-221.
51. Gleckman R. A., Czachor J. S., "Antibiotic Side Effects", *Semin Respir Crit Care Med* 2000; **21** (1): 53-60.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

52. Goldsworthy P. D., McFarlen A. C., "Howard Florey, Alexander Fleming and the fairy tale of penicillin", *Med J Aust* 2002; **176**(4):176-178.
53. González R. Gerardo, Mella M. Sergio, Zemelman Z. R., Bello T. H., Domínguez Y. M., "Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos", *Revista médica de Chile* 2004; **132**(5): 619-626.
54. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica 9ª edición, vol II, México: McGraw-Hill Interamericana, 1996, 1095-1098.
55. Grimes D. J., Singleton F. L., Colwell R. R., "Allogenic succession of marine bacterial communities in response to pharmaceuticals waste", *Journal of Applied Bacteriology* 1984; **57**: 247-261.
56. Guillemot D., "Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*", *JAMA* 1998; **279**: 365-370.
57. Gutiérrez-Lugo M. T. y Mata Essayag R., "El género *Actinomyces* como una fuente de principios biodinámicos de interés medicinal y agroquímico", 2007. En: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap14/> Consultado en octubre 2007.
58. Haak H. "Pharmaceuticals in two Brazilian village: lay practices and perceptions", *Soc Sci Med* 1988; **27**: 1415-1427.
59. Hall R. M., Stokes H. W., "Integrins: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination", *Genetica* 1993; **90**: 115-132.
60. Hammerum A. M., Jensen L. B., Aaerstrup F. M., "Detection of the *satA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals", *FEMS Microbiology Letter* 1998; **168**: 145-151.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

61. Harbath S., "Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effects on surgical site infections and microbial resistance", *Circulation* 2000; **101**: 2916-2921.
62. Hayes J. and Wolf C., " Molecular mechanism of drug resistance", *Biochem J* 1990; **272** (2): 281-295.
63. Hernández Gómez L., Luna Millán B., Mejía Chávez A., Muggenburg Rodríguez I., Ramírez Gama R. M., Tsuzuki Reyes G., Velázquez Madrazo O., Vierna García L., Manual de prácticas de Microbiología General 3ª edición, México: Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química UNAM, 1998, pp.176-221.
64. Hospital de la Universidad de Wisconsin, "Sulfonamidas". En: Antimicrobial use guidelines, 8ª edición, Universidad de Wisconsin, 1996.
65. Huertas Sáez F., 2000, Determinación de antibióticos en alimentos, En: <http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/joan.march/1www/QUIMCLI/temes0405/antibiotics.ppt> Consultado en febrero 2007.
66. Jane F., "Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades". En: Velazquez Farmacología 16ª edición, Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1993, pp. 919-922.
67. Jay J. M., Microbiología Moderna de los Alimentos 3ª edición, Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1994, pp. 773-775
68. Jones M. E., Peters E., Weersink A. M., Fluit A., Verhoef J., "Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria", *Lancet* 1997; **349**: 1742-1743.
69. Jurado A., "Manejo clínico en el diagnóstico del paciente infectado", *Medicine* 2000; **8**: 3241-3254.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

70. Kindelán J. M., Giménez R., Natera C., Vidal E., "Estrategias terapéuticas frente a las infecciones", *Medicine* 2002; **8** (61): 3231-3240.
71. KorolKovas A., Burckhalter J. H., Compendio esencial de química farmacéutica, Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1979, pp. 625-628.
72. Kunin C. M., "Social, behavioral and practical factors affecting antibiotic use worldwide: report of Task Force 4", *Rev Infect Dis* 1987; **9**(Supply 3): S270-S285.
73. Mac Faddin Jean F., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ª edición, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003, pp. 54-71, 73-91, 92-97, 192-205, 206-216, 223-235, 326-338, 344-353, 354-36 y 411-421.
74. Macfarlane J. T., Holmes W. F., Macfarlane R. M., "Influence of patients' expectations on antibiotic management of acute lower respiratory tract illness in general practice: questionnaire study", *BMJ*, 1997, **315**:1211-1214.
75. Macfarlane J. T., Holmes W. F., Macfarlane R. M., "Reducing consultations for acute lower respiratory tract illness with an information leaflet: a randomized controlled study of patients in primary care", *Br J Gen Pract*, 1997, **47**:719-722.
76. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J., Brock: Biology of microorganisms 8ª edición, New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp. 1064.
77. Martín S. J., Meyer J. M., Chuck S. K., Jung R., Messick C. R., "Levofloxacin and sparfloxacin: new quinolone antibiotics" *Ann Pharmacother* 1998; **32**(3): 320-336.
78. Martínez Freijo P., Fluit A. C., Schmitz F. J., Grek V. S., Verhoef J., Jones M. E., "Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; **42**: 689-696.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

79. Martínez Freijo P., Fluit A. C., Schmitz F. J., Verhoef J., Jones M. E., "Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe", *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1999; **43**: 686-689.
80. Mazel D., "Integrons and the origin of antibiotic resistance gene cassettes", *ASM News* 2004; **70** (11): 520-532.
81. Mazodier P., and Davies J., "Gene transfer between distantly related bacteria", *Annual Review of Genetics* 1991; **25**: 147-171.
82. Mellon M., Benbrook C., Benbrook K. L., "Hogging it; estimates of antimicrobial abuse in livestock", Cambridge, Mass; Union of Concerned Scientists, 2001.
83. Merck & Co., INC., The Merck Index and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 30ª edición, New Jersey: Merck Research Laboratories, 2001, pp. 1-1818.
84. Mediavilla A., Flórez J., García-Lobo J. M., Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos, Farmacología Humana, 3ª edición, Barcelona: Masson; 2000, pp. 1059-1083.
85. Miranda C. D., Zemelman R., "Antibiotic resistant bacteria in fish from the Conception Bay, Chile", *Marine Pollution Bulletin* 2001; **42** (11): 1096-1102.
86. Negrete Redondo P., Romero Jarero J., Arredondo Figueroa J. L., "Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*", *Veterinaria México* 2004; **1**(35): 1-10.
87. Nesvera J., Hochmannova J., Patek M., "An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*", *FEMS Microbiol Lett* 1998; **169**: 391-5.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

88. Neu H. C., "The emergence of bacterial resistance and its influence on empiric therapy", *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 9-20.
89. Nicolle L., "Infection control programmes to contain antimicrobial resistance", Genova, World Health Organisation, 2001. WHO/CDS/CSR/2001.7.
90. Norma Oficial Mexicana NOM-027-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.
91. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
92. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
93. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
94. Organización Mundial de la Salud, "Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos", Suiza: OMS; 2001, pp. 1-104.
95. Palomino J., Pachón J., "Aminoglucósidos", *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 2003; **21**: 105-115.
96. Palumbi S., Martín A., Romano S., McMillan Wo, Stice L., The simple fool's guide to PCR, University of Hawaii Honolulu, Department of Zoology. Kewalo Marine Laboratory, 1991.
97. Pascuzzo Lima C., "Introducción a la Farmacología de los Betalactámicos. Penicilinas" En: http://www.geocities.com/carminepascuzzolima/Beta_Lact1.pdf Consultado en mayo 2007.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

98. Paulsen I. T., Littlejohn T. G., Radström P., "The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants", *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1997; **37**: 761-768.
99. Peele E. R., Singleton F. L., Deming J. W., Cavari B., Colwell R. R., "Effects of pharmaceutical wastes on microbial populations in surface waters at the Puerto Rico dump site in the Atlantic Ocean", *Applied and Environmental Microbiology* 1981; **41**: 873-879.
100. Pelczar M. J. Jr., E. C. S. Chan, N. R., Krieg, *Microbiology concepts and application*, México: McGraw Hill, 1993, pp. 120.
101. Peres Palú A., Martins Gomes L., Lemos M. M. A., Teruzkin Balassiano I., Penna Queiroz M. L., Correa Freitas-Almeida A., Soares de Oliveira S., "Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates", *Food Microbiology* 2006; **23**:504-509
102. Petersdorf R., Root R., Disorders caused by biologic and environmental agents, *Principles of Internal Medicine*, Vol. 1, 11ª edición, México: Editorial McGraw Hill; 1987, pp. 455-459
103. Petersen A., Dalsgaard A., "Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand", *Aquaculture* 2003; **219**: 71-82
104. Pillay T. V. R., "Planning aquaculture. Development and introductory guide Fishing", Oxford:News. Book, 1977.
105. Poschl J. M., Hellstern G., Dertlioglou N., Ruef P., Meyburg J., Beedgen B., "Six day antibiomatic therapy for early-onset group B streptococcal infection in near-term neonates", *Scand Infect Dis* 2003; **35**(5): 302-305.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

106. Quick J. D., Management Sciences for Health. Managing for rational drug use. En: *Managing drug supply*, 2ª edición, USA: Kumarian Press, 1997, pp. 422-429.
107. Radu Son, Ahmad Noorlis, Foo Hooi Ling, Reezal Abdul, "Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia", *International Journal of Food Microbiology* 2003; **81**: 261-266
108. Rebollo B. y Escamilla A. E., "Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. Y *Plesiomonas shigelloides* como causa de diarrea en humanos", INNSZ, 1984. Memorias Congreso Nacional Mexicano, Veracruz.
109. Recchia G. D., Hall R. M., "Origins of mobile gene cassettes found in integrons", *Trends Microbiol* 1997; **5**: 389-94.
110. Rodríguez M. A., Gundián J., Barreto J., Lim N., Areu A., Pardo A., "Tetraciclinas", *Acta Médica* 1998; **8**(1): 75-79.
111. Sabaté M. and Prats G., "Estructura y Función de los Integrones", *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 2002; **20**(7): 341-345.
112. Sádaba B., Azanza J. R., García E., Honorato J., "Glicopéptidos: vancomicina y teicoplanina", *Medicine* 1998; **7**(72): 3329-3336.
113. Sallen B., Rahojarison A., Desvarenne S., Mabilat C., Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of entebacteriaceae", *Microb Drug Resist* 1995; **1**: 195-202.
114. Schmidt Anja S., Bruun Morten S., Larsen Jens L. and Dalsgaard Ingen, "Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; **47**: 735-743.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

115. Schnick R. A., Alderman D. J., Armstrong R., Le Gouvello R., Ishihara S., Lacierda E. C., Percival S., Roth M., "World aquaculture drug and vaccine registration progress", *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 1997; **17**(6): 251- 260.
116. Sherwood L., Gorbach M. D., "Antimicrobial use in animal feed – Time to stop", *The New England Journal of Medicine* 2001; **345** (16): 1202-1203.
117. Silliker J. H., Elliott R. P., Baird-Parker A. C., Bryan F. L., Cristian J. H. B., Clark D. S., Olson J. S., Roberts T. A., *Ecología Microbiana de los Alimentos. Volumen II "Productos Alimenticios"*, Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1985, pp. 573-595.
118. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, México D. F., Secretaría de Salud 2001; 18 semana 52.
119. Sorensen T. L., Blom M., Monnet D., Frimodt-Moller N., Poulsen R. L. and Espersen F., "Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus Faecium* from chicken and pork", *The New England Journal of Medicine* 2001; **345** (16): 1161-1166.
120. Sorum H., M. Trine., Lund L'Abée, Solberg A. and Wold A., "Integron-Containing IncU R Plasmids pRAS1 and pAr-32 from the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; **47**(4):1285-1290.
121. Stainer R. Y., Adelberg E. A., Ingraham J. L., *Microbiología, Versión española actualizada de la 4ª edición*, México D. F.: Ediciones REPLA S. A., 1989, pp. 120-127.
122. Torres L., Benítez M., Domínguez M., Torres O., Gagliotta V., Calvo A., Rodríguez N., Ardila J., Pedroza R., "Detección de integrones clase 1 en cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV y CTX-M grupo 2", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, 2005. En: <http://www.caibco.ucv.ve> Consultado en junio 2007.



Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

123. Tran J. H., Jacoby G. A., "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance", *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 5638-42
124. Velasco Martín A., Fernández P. L., Serrano Molina J. F., Andres-Telles F., Velazquez Farmacología 16ª edición, Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1993, pp. 918-931
125. Vuckovic N., Nichter M., "Changing patterns of pharmaceutical practice in the United States", *Soc Sci Med* 1997; **44**: 1285-1302.
126. Waites M., "Integrones", Universidad de San Diego Illinois, Colegio de Ciencias, 2000. En: <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topic/transposons/integrans/integrans.html> Consultado en junio 2007.
127. Wegener H. C., "Antibiotics in animals feed and their role in resistance development", *Current Opinion in Microbiology* 2003; **6**: 439-445.
128. White D. G, Zhao Shaohua, Sudler R., Ayers S., Friedman, Sheng Chen, McDermott P. F., McDermott S., Wagner D. D. and Jianghong M., "The isolation of antibiotic-resistant Salmonella from retail ground meats", *The New England Journal of Medicine* 2001; **345**: 1147-1154
129. Williams R., Resistance as a worldwide problem In: *Bacterial resistance to antimicrobials*. Marcel Dekker Inc., 2001 (in press)
130. White P. A., McIver C. J., Rawlinson W. D., "Integrans and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*", *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-61.
131. World Health Organization. World Health Assembly (fifty-first). *Emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance*. WHA51.17, 1998, agenda item 21.3
132. World Health Organization. *WHO report on infectious diseases: Removing obstacles to healthy development*. Geneva, 1999. WHO/CDS/99.1

Presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en carne de pescado portadoras de integrón tipo 1

133. World Health Organization. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals: Report of a WHO meeting, Berlin, Alemania, 13-17 Octubre 1997. WHO/EMC/ZOO/97.4.
134. Yu V. L., "Macrolides are ideal for empiric therapy of community acquires pneumonia in the inmunocompetent host", *Semin Respir Infect* 1997; **12**(4). 322-328.

