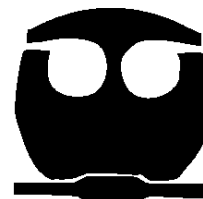


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



**CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella spp.* Y OTRAS
ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS
AISLADAS DE CARNE DE POLLO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ARIADNA BERENICE ROMO RUIZ



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. JORGE SOTO SORIA

VOCAL PROF. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SECRETARIO PROF. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO

1er. SUPLENTE PROFA. NORMA ANGELICA CASTELLANOS CHAVEZ

2do. SUPLENTE PROFA. NORMA TREJO MEDINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Microbiología Molecular (Anexo del Laboratorio 1A y 1D)

Departamento de Biología

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR

DR. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SUSTENTANTE

ARIADNA BERENICE ROMO RUIZ

Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea; la palabra imposible no tiene significado. Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

Quiero agradecer a Dios por darme salud, amor y fuerza para terminar esta etapa de mi vida y agradecer que siempre he estado acompañada de mis seres más queridos.

Gracias Montse por haber llegado a mi vida, ya que has sido el motor que le ha dado un mejor sentido a mi vida y sobre todo por que me has dado la fortaleza para salir siempre adelante por ti.

Quiero agradecer a mis padres por todo el amor y comprensión en todo momento, ya que sin su apoyo no habría podido superar esta etapa de mi vida; por todos los valores que me inculcaron y que estoy segura podré transmitirlos a Montse para que pueda llegar a admirarme como yo los admiro; al mismo tiempo quiero que sepan, que me siento orgullosa de ser su hija.

Mama, gracias por darme siempre la fortaleza en tus palabras mágicas y en tus sabios consejos. Por ser mí amiga, consejera, compañera y confidente, pero lo más importante MI MADRE.

Gracias Papa por que me has dado tanto y es por eso que con el fin de esta etapa, quiero devolverte y compartirte aunque sea un poquito de esos gratos momentos que tú me has regalado.

A mi hermano Adrián, gracias por los buenos momentos que me has hecho pasar, los ejemplos y consejos que me has dado, por que de ellos he aprendido mucho para llegar al fin de esta etapa.

A mi hermano Daniel[†], por que sé, que donde estés, me cuidas y me apoyas en mis decisiones.

A mi Claris, te quiero agradecer por echarme ánimos, aconsejarme y apoyarme siempre.

Gracias Mario por todo tu apoyo, amor y comprensión en todo momento que me has brindado ya que has sido y serás siempre un gran soporte en mi vida.

Agradezco a todos mis amigos por haber hecho más agradable la estancia en esta facultad que me dio los pilares para ser una profesionalista con ética y valores.

A todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular por el apoyo brindado para la realización de esta meta. Gracias Dra. Biserka[†], por haberme apoyado siempre en la realización de este tema.

Por último quiero agradecer a todos mis amigos que han venido compartiendo conmigo todos mis triunfos y derrotas por que siempre he sentido su apoyo y cariño (Ale, Mario, Roberto).

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| OBJETIVOS | 8 |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES | |
| • ANTIBIÓTICOS | 10 |
| • MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS | 15 |
| • RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS | 17 |
| ○ RESISTENCIA NATURAL | 17 |
| ○ RESISTENCIA ADQUIRIDA | 19 |
| • BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA | 29 |
| • CAUSAS QUE DESENCADENAN LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS | 31 |
| CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | |
| 2.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS | 34 |
| 2.2 AISLAMIENTO DE <i>Salmonella spp.</i> Y OTRAS ENTEROBACTERIAS PRESENTES EN CARNE DE POLLO DE VENTA | 34 |

| | |
|--|----|
| AL MENUDEO | |
| 2.3 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS | 37 |
| 2.4 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS | 45 |
| 2.5 DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS | 49 |

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|---|----|
| 3.1 AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS | 52 |
| 3.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS | |
| • IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA PRESUNTIVA | 52 |
| • IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS | 54 |
| • RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZANDO EQUIPO AUTOMATIZADO (bioMérieux VITEK, INC) | 56 |
| • SEROLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE <i>Salmonella</i> | 64 |
| 3.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA | |
| • DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS | 68 |

| | |
|--|------------|
| MICROORGANISMOS AISLADOS A LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE BAUER-KIRBY | |
| • SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZANDO EL EQUIPO AUTOMATIZADO (bioMérieux VITEK, INC) | 79 |
| 3.4 DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS | 91 |
| CAPITULO IV. CONCLUSIONES | 96 |
| PERSPECTIVAS | 99 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 102 |
| APÉNDICE | 106 |

RESUMEN

De acuerdo con la OMS, de los más de 50 millones de personas que mueren en el mundo cada año, 17 millones fallecen por enfermedades infecciosas. Además, se ha producido un aumento en la incidencia de algunas infecciones clasificadas como emergentes, las cuales muestran resistencia a los antibióticos ⁴⁶.

El Comité del Consejo Nacional de Investigación (NCR) de los E.E.U.U. afirma que "la resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha acelerado abrumadoramente en las últimas décadas tanto en animales como en los humanos". De igual manera, en la Conferencia de la Unión Europea llevada a cabo en Copenhagen (Dinamarca) en septiembre de 1998, se advierte que en Europa han aumentado los casos de resistencia producidos por *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae* a nivel hospitalario, y entre la comunidad *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Salmonella* y *Neisseria*. Además, ha reaparecido como patógeno importante *Mycobacterium tuberculosis* el cual está presentando resistencia creciente a los antibióticos que antes eran efectivos ⁴⁶.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se caracterizó la resistencia a diferentes antibióticos en *Salmonella spp.* y otras enterobacterias aisladas de carne de pollo de diferente procedencia. De las tres muestras procesadas se aislaron diferentes cepas, por estriado en cuadrante radial, en medios selectivos (agar xilosa-lisina-desoxicolato, agar sulfito de bismuto y agar Hecktoen); posteriormente se utilizaron pruebas bioquímicas (presuntiva y complementarias) y el equipo automatizado (bioMérieux VITEK) para su identificación. Para evaluar la resistencia a los antibióticos, se utilizó el método de difusión en discos (Bauer-Kirby ⁸) y el equipo automatizado (bioMérieux VITEK). Para determinar la presencia de plásmidos se utilizó el protocolo propuesto por Birnboim y Doly ⁶.

INTRODUCCIÓN

Durante las décadas pasadas, las bacterias causantes de enfermedades en humanos han desarrollado resistencia a muchos de los antibióticos comúnmente usados para los tratamientos. Entre los microorganismos patógenos usualmente encontrados en hospitales y resistentes a antibióticos, se pueden mencionar las Mycobacterias, Pneumococos y los que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*³⁹.

La resistencia a los antibióticos puede surgir debido a mutaciones en el genoma de las bacterias o por la adquisición de genes que codifican dicha resistencia. Estos cambios genéticos alteran las funciones de defensa de las bacterias de varias maneras: cambiando el blanco de acción del fármaco, por detoxificación, expulsando el antibiótico o desarrollando una vía metabólica alterna a la ruta bloqueada por el fármaco³⁹.

La evolución de la resistencia a los antibióticos es facilitada por la presencia de genes de resistencia en elementos genéticos transferibles y por el uso de antibióticos de manera que permite que estos actúen como agentes selectivos. En los hospitales, la

combinación concentrada de bacterias adaptadas a este ambiente, de pacientes propensos a infecciones y el uso de antibióticos, ofrecen una principal oportunidad de desarrollar y transferir la resistencia a los antibióticos³⁹.

Por otra parte, el uso de los antibióticos como profilácticos, quimioterapéuticos y/o como promotores de crecimiento utilizados en alimentos para animales, han contribuido también a la aparición de microorganismos multirresistentes a antibióticos.

Una mayor cantidad de antibióticos son utilizados con este propósito en comparación con los utilizados en aplicaciones médicas. En 1994 en Dinamarca, 24Kg del glucopéptido vancomicina, fueron utilizados para terapia humana, mientras que 24 000Kg de un glicopéptido similar, avoparcina, fueron utilizados en la alimentación animal. Anualmente de 1992 a 1996, Australia importó un promedio de 582Kg de vancomicina para propósitos médicos y 62 642Kg de avoparcina para la agricultura animal. La vancomicina y la avoparcina tienen el mismo modo de acción; la resistencia a uno puede conferir resistencia al otro.

La resistencia a los antibióticos puede surgir durante la cría de los animales, afecta a microorganismos patógenos zoonóticos, tales como: *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, estando ambos asociados con enfermedades diarreicas; así como a comensales humanos y animales como es el caso de *Escherichia coli* y enterococos. Debido a que los ecosistemas microbianos humano y animal se entrelazan inseparablemente, la resistencia microbiana a los antibióticos, cruza los límites rápidamente.

De esa manera los antibióticos administrados a los animales y los utilizados en la terapia humana, han estado ejerciendo durante décadas una presión selectiva en las bacterias ^{37, 39}.

En 1969, el comité Swann del Reino Unido, concluyó que los antibióticos usados en quimioterapia humana o aquellos que promueven la resistencia, no deben ser usados como promotores de crecimiento en animales. Desde entonces han existido continuos debates sobre hasta que punto el uso de los antibióticos, como promotores de crecimiento en los alimentos de animales, promueven la resistencia en bacterias que infectan a los seres humanos ¹⁸.

Un trabajo realizado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 1997 sobre el impacto médico del uso de fármacos antimicrobianos en alimentación animal, reforzó las recomendaciones del comité Swann¹⁸.

El efecto de promoción del crecimiento de los antibióticos es especialmente ventajoso cuando el rendimiento del animal es bajo. Por consiguiente, las modificaciones del procedimiento pueden disminuir el uso de antibióticos sin sacrificar su producción ³⁹.

Las diferencias mundiales en el uso y autorización de los antibióticos como promotores de crecimiento son numerosas. Aunque su regulación en los países de la Unión Europea incluyendo las recomendaciones del comité Swann es estricta, por lo que el uso de avoparcina fue prohibida en 1997, la tilosina y la virginiamicina están todavía en

uso, a pesar de que ambos fármacos causan resistencia cruzada con otros antibióticos de la misma clase usados en la terapia humana ³⁹.

La consecuencia de utilizar antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, para tratamiento profiláctico o terapéutico, producen una selección de cepas resistentes de origen animal que pueden llegar al hombre a través de la cadena alimentaria, haciendo que las bacterias patógenas de origen animal resistentes a antibióticos adquiridas por el hombre, puedan dar lugar a infecciones que dificultarán su tratamiento; y además estas bacterias resistentes de origen animal pueden intercambiar sus genes de resistencia con bacterias del ecosistema microbiano del hombre, las que se convertirán en reservorios de genes de resistencia para patógenos que puedan aparecer en un futuro ³⁹.

Por tal motivo el propósito del presente trabajo es estudiar la resistencia a los antibióticos de enterobacterias presentes en carne de pollo de diferente procedencia y determinar, en caso de presentarse resistencia, si ésta podría asociarse a la presencia de plásmidos. La elección de estas muestras es debida a que este alimento es de fácil acceso para los comensales mexicanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar microorganismos aislados de carne de pollo de diferente procedencia y determinar la resistencia a diferentes antibióticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar *Salmonella spp.* y otras enterobacterias de muestras de carne de pollo de diferente procedencia
- Determinar la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos
- Relacionar la resistencia a los antibióticos con la presencia de plásmidos.

CAPITULO I
ANTECEDENTES

ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por organismos vivos (hongos, bacterias o plantas superiores) que inhiben el crecimiento (efecto bacteriostático) o matan (efecto bactericida) a otros microorganismos³⁶.

Los antibióticos no sólo se emplean como agentes terapéuticos en humanos, sino también se han empleado como ^{21, 36}:

- Agentes profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades infecciosas en veterinaria, reduciendo la mortalidad y morbilidad debidas a infecciones clínicas
- Promotores del crecimiento animal favoreciendo el control de la flora bacteriana del animal, lo que se traduce en un mayor aprovechamiento de los nutrientes y en un aumento considerable de peso
- Para reducir la incidencia de diarrea en los animales jóvenes
- Para reducir las pérdidas por enterotoxemia y las muertes de los corderos que reciben raciones ricas en granos
- Para reducir la incidencia de absceso hepático en los bovinos que consumen raciones con mucho grano
- Utilizada como sustancia ergotrópica (mantiene la calidad del alimento animal y mejora la calidad de los productos de origen animal)

- Conservar alimentos empleados junto con temperaturas de almacenamiento de 0 a 3 °C
- Regular los procesos de fabricación
- Mejorar la producción de huevo o la capacidad de incubar.

Para su mejor comprensión, los antibióticos se organizan en los siguientes grupos ³¹ :

I. Penicilinas (β -lactámicos). Interfieren en la síntesis de la pared celular bacteriana. Actúan inhibiendo las enzimas D-alanil-D-alanincarboxipeptidasas (PBPS), responsables de la síntesis de la pared celular, provocando adelgazamiento de la pared y lisis celular.

A. Ácido lábiles

1. Cristalina G
2. Procaínica
3. Benzatina
4. Meticilina

B. Ácido estables

1. Sensibles a la β -lactamasa
 - a. fenoximetilpenicilina
 - b. fenoxietilpenicilina
 - c. amplio espectro

ampicilina

cloxacilina

naftilina

II. Cefalosporinas (derivados β -lactámicos). Interfieren con la síntesis de la pared celular.

Cefalotina

Cefalexina

Ceforanida

Cefotaxima

Ceftazidima

Cefaloridina

Cedamandol

Cefotixina

Cefitoxim

III. Macrólidos. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30S, bloqueando la translocación e impidiendo la extensión de la cadena polipeptídica.

Eritromicina y Azitromicina

IV. Aminoglucósidos. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30S.

Estreptomicina, amikacina, kanamicina, gentamicina, neomicina y netilmicina

- V. Tetraciclinas. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ARN ribosomal 30S.
Tetraciclina, clortetraciclina, doxicilina y oxitetraciclina
- VI. Quinolonas. Inhiben enzimas involucradas en la replicación de ADN.
Ácido nalidíxico, ciprofloxacino y ácido oxolínico
- VII. Sulfonamidas y Trimetoprim. Inhiben la síntesis de ADN al interferir con la síntesis de ácido tetrahidrofólico.
Trimetoprim-sulfametoxazol
- VIII. Nitrofuranos. Inhiben la síntesis de tetrahidrofolato.
Nitrofurantoína, furazolidona, nitrofurazona y furaltadona
- IX. Fenicoles. Inhiben la síntesis de proteínas.
Cloranfenicol
- X. Rifampicina. Inhibe a la transcripción por su unión a la ARN polimerasa.
- XI. Glicopéptidos. Interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana.
Vancomicina
- XII. Péptidos.
Bacitracina, polimixina B y polimixina E

XIII. Oxazolidinonas (estreptograminas)

Eperezolidona, linezolidona, quinupristina y dalfopristina

XIV. Lincosaminas.

Clindamicina y lincomicina

El empleo de antibióticos como aditivos en los alimentos para animales no deben perjudicar de ninguna manera la calidad de los productos animales, así como tampoco poner en peligro la salud de las personas consumidoras de alimentos de origen animal. La autorización para el empleo de los antibióticos exige un control teórico muy estricto; como aditivos deben tomarse en consideración y cumplirse en primer lugar las siguientes indicaciones: a) No deben poner en peligro la salud del hombre; sólo se considerarán como ergotrópicos aquellos antibióticos que no sean prescritos en medicina humana. b) A este respecto debe quedar excluido que los antibióticos utilizados en alimentación animal no interfieran con la acción de otros productos terapéuticos, ni provoquen resistencia cruzada. c) Únicamente se utilizaran antibióticos con acción en el tracto digestivo, que no sean absorbidos en el intestino y que como consecuencia, no dejen en las canales residuos de su empleo.¹⁷

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción ⁵:

- Antibióticos que actúan sobre la membrana plasmática; ya que la membrana cumple con funciones importantes para la vitalidad de la bacteria. Los antibióticos pueden alterar la permeabilidad actuando como detergentes catiónicos y provocando la salida de sustancias del interior de la célula. Por ejemplo; la anfotericina B y la nistatina se unen al esterol presente en la membrana de ciertos microorganismos.
- Antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared celular. La pared protege a la célula contra los cambios osmóticos y contiene elementos patogénicos característicos de cada especie; el basamento químico de la pared (mucopéptidos) lo constituye la unión tridimensional de péptidos, acetilglucosamina y acetilmurámico. El proceso formativo de la pared bacteriana está integrado por numerosos pasos sucesivos en cada uno de los cuales puede actuar un antibiótico.
- Antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de proteínas. La síntesis de proteínas es fundamental para la vida bacteriana y los diferentes pasos químicos para obtenerla pueden ser interferidos por los antibióticos. Un grupo de estos inhibe por diversos mecanismos la síntesis de las cadenas polipeptídicas (inhibición de la traducción), mientras que los aminoglucósidos producen anomalías en la lectura del código genético, originando proteínas erróneas.

- Antibióticos que actúan a nivel de la replicación de ADN. Bloquean la síntesis del ADN
- Antibióticos que actúan a nivel de la transcripción. Interfieren en la síntesis de ARN bloqueando la transcripción del ARNm.
- Antibióticos que actúan como antagonistas metabólicos. Inhiben la síntesis de ADN al interferir con la síntesis de ácido tetrahidrofólico.

RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antibióticos, por que su comprobación implica el fracaso del tratamiento terapéutico. Las bacterias naturalmente resistentes frente a determinados fármacos son conocidas desde la producción misma del fármaco, pero es motivo de distinta interpretación la resistencia adquirida en el curso de los años o aún en poco tiempo por ciertas bacterias.

Anteriormente se creía que la resistencia a los antibióticos era el resultado de la clásica selección Darwiniana. En este aspecto, muchas ideas aceptadas anteriormente son ahora desplazadas por interesantes comprobaciones obtenidas de la investigación, que marcan una nueva etapa interpretativa de los hechos clínicos y experimentales. En la actualidad el origen de la resistencia a los antibióticos se puede clasificar de la siguiente manera ²² :

Resistencia Natural

- **Resistencia Intrínseca.** Cada miembro de una especie bacteriana es resistente a los antibióticos sin ninguna alteración genética adicional. Un ejemplo lo presenta *P. aeruginosa*, la cual muestra una baja susceptibilidad a los antibióticos hidrofóbicos como macrólidos, debido a que estos antibióticos tienen dificultad para penetrar la membrana externa de estas bacterias (Fig 1.1-B). Este tipo de resistencia es debida

a la permeabilidad que presenta la membrana externa de algunas bacterias, en las cuales existen bombas de expulsión de los fármacos. Estas bombas constan de un transportador en la membrana interna, un canal de proteína y otras proteínas unidas a membrana y periplásmicas. La resistencia es frecuentemente causada por un incremento en la síntesis de las proteínas que constituyen la bomba de expulsión (Ver Fig 1.1-A)^{22, 27}.

- **Biopelículas;** este tipo de resistencia sólo es expresada durante ciertas condiciones de crecimiento. Un ejemplo claro es el que presenta la bacteria patógena oportunista *P. aeruginosa* que se ha observado puede formar biopelículas en infecciones pulmonares en individuos con fibrosis cística. Las razones por las cuales se cree que esta biopelícula confiere resistencia ante los antibióticos es que la bacteria se encuentra con poca actividad metabólica y es rica en células persistentes²².
- **Localización;** la localización de la bacteria durante la infección en algunas ocasiones puede impedir que el antibiótico alcance concentraciones apropiadas donde la bacteria está creciendo²².
- **Células especializadas persistentes;** este tipo de resistencia se muestra temporalmente a cualquier antibiótico. Se presenta sólo en la fase lag y en la fase estacionaria, ya que en la fase exponencial las células persistentes disminuyen drásticamente. La persistencia es un fenómeno reversible²³.

Resistencia Adquirida

Este tipo de resistencia evoluciona por medio de alteraciones genéticas en el genoma de las bacterias o por transferencia horizontal de genes de resistencia localizados en varios elementos de ADN móviles. Dentro de los elementos de ADN que frecuentemente transmiten genes de resistencia se pueden mencionar: plásmidos, profagos, transposones, integrones e islas de resistencia ²² .

Los mecanismos de resistencia adquirida incluyen:

- **Expulsión aumentada de los antibióticos.** Se han descrito varios sistemas de expulsión o bombeo en los que participan distintas proteínas de membrana especializadas (ver Fig. 1.1-A). En condiciones normales y en ausencia de antibióticos, estas proteínas tienen una función fisiológica de detoxificación y eliminación de sustancias metabólicas. Algunos de estos sistemas producen resistencia que afectan a distintas clases de antimicrobianos, como β -lactámicos, quinolononas, tetraciclinas, cloranfenicol e incluso compuestos de amonio cuaternario como antisépticos y desinfectantes. El modelo de bomba de expulsión más conocido es el mexA-mexB-OprM, descubierto en *P. aeruginosa* y que confiere resistencia a las tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas y a algunos β -lactámicos. Los determinantes genéticos de estos sistemas de expulsión activa pueden localizarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano ¹¹ .

- **Inactivación del antibiótico.** Se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico. Son ejemplo de esta la producción de β -lactamasa, β -lactamasa de amplio espectro, eritromicina estearasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (Ver figura 1.1 C)¹¹.
- **Modificación del antibiótico.** Este es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos. Entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetil transferasa (AAC), fosfatidil transferasa (APH) y adenil transferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglucósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30s ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas.
- **Modificación del sitio de acción del antibiótico.** La mayoría de los antibióticos ejercen su acción al unirse específicamente a diferentes proteínas que forman parte de procesos esenciales para la supervivencia de la bacteria. La modificación de estas proteínas puede afectar a su afinidad por el antibiótico pero sin interferir con su funcionalidad (Ver figura 1.1 D). Es suficiente un solo cambio de un aminoácido en la proteína para que se produzca este efecto. Las proteínas que se pueden modificar son las proteínas ribosómicas, la alteración de los precursores de la pared celular y la modificación de enzimas esenciales. La modificación de las proteínas ribosómicas confiere resistencia a los aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas, por lo que se impide la acción de todos estos antimicrobianos como inhibidores de la síntesis de proteínas. Existen mutantes que son resistentes y dependientes a la vez de un antibiótico determinado y que sólo son capaces de desarrollarse en presencia del antibiótico ¹¹.

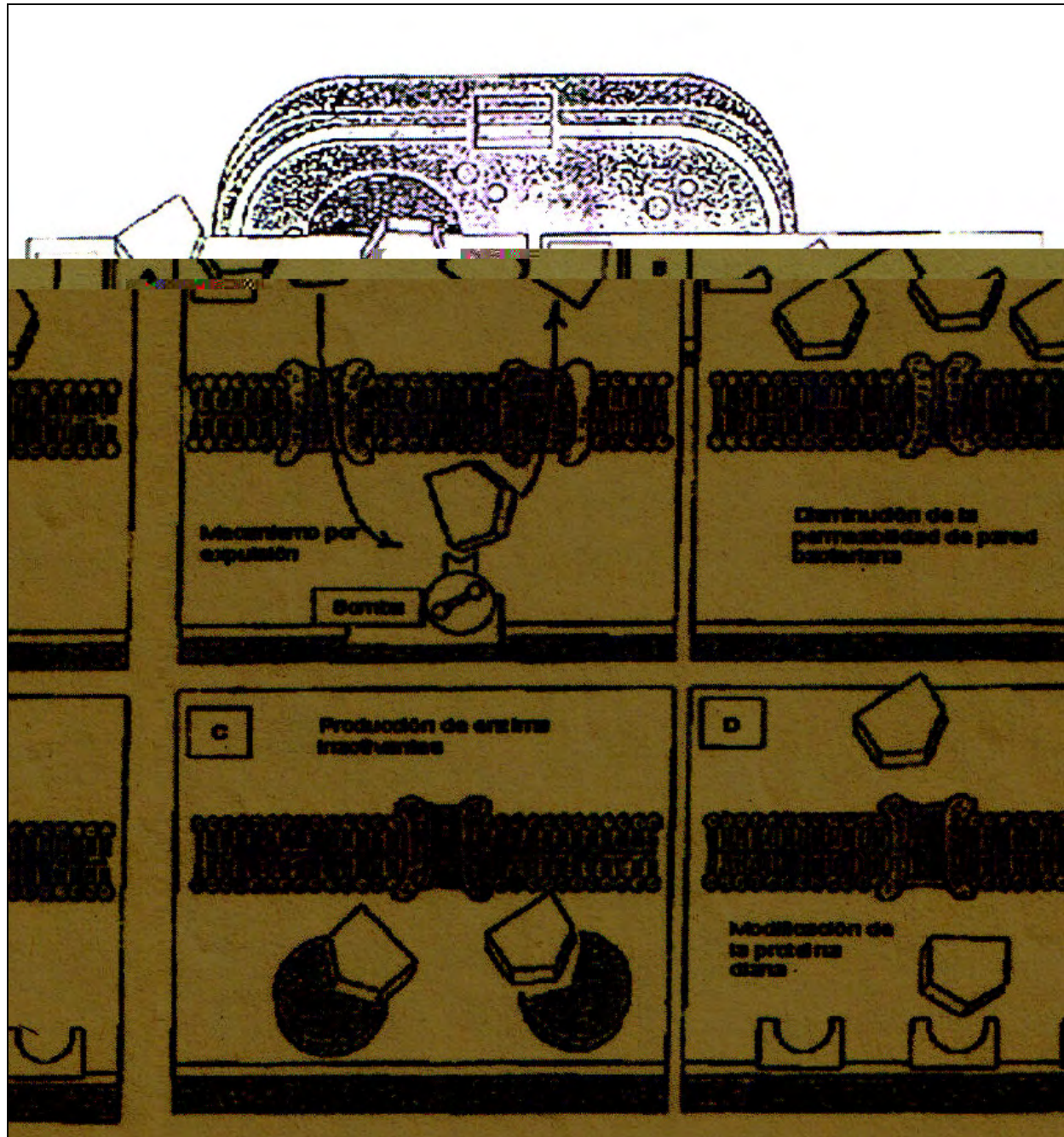


Imagen de Fernández F.

Fig 1.1 Mecanismo de resistencia a los antibióticos. A) Bomba de expulsión; B) Permeabilidad disminuida de la pared bacteriana; C) Inactivación del antibiótico y D) Modificación del sitio de acción del antibiótico

Así mismo, existen diversos tipos de resistencia adquirida que pueden ser mejor entendidos estudiando los mecanismos mediante los cuales se establecen. Así, existen dos tipos básicos: Resistencia Cromosómica y Resistencia Extracromosómica.

RESISTENCIA CROMOSÓMICA

La resistencia cromosómica se origina por **mutaciones espontáneas**. En una primera etapa aparecen pocas bacterias resistentes, pero en la medida que el antibiótico actúa como selector, favorece el desarrollo de células resistentes hasta transformarse en un cultivo antibiótico-resistente. Este modo de adquirir resistencia se califica como espontáneo y discontinuo, con frecuencia notoriamente menor que la resistencia de origen extracromosómico, ya que no hay propagación a especies diferentes. La mutación espontánea puede acelerarse por acción de sustancias químicas o agentes físicos mutágenos ⁵.

RESISTENCIA EXTRACROMOSÓMICA

La resistencia adquirida extracromosómica se obtiene por incorporación de material genético extracromosomal. Se denomina también resistencia transferida o resistencia mediada por plásmidos. El ingreso de material transferido puede realizarse por mecanismos distintos cuya nominación responde al dispositivo empleado en esta acción bacteriana^{5, 34}.

- **Conjugación:** La conjugación es el principal proceso por el cual se transfieren los genes de resistencia a antibióticos entre poblaciones bacterianas. En la conjugación los genes de resistencia se encuentran en plásmidos, los cuales son transferidos horizontalmente¹⁹. Durante la conjugación se requiere contacto de célula a célula a través de pelos sexuales. Se forma un puente citoplasmático entre bacterias de distintos géneros y especies como *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* para poder transmitir el **factor R**. Aquellos plásmidos que portan uno ó más genes de resistencia reciben el nombre de *factores R*. La resistencia así obtenida, se extiende con rapidez porque cada célula recién infectada se transforma en donante de genes de resistencia (Ver figura 1.2). Esta operación ocurre en el plazo de segundos, tanto en el intestino como en el tracto urinario en el caso de los humanos. El uso de antibióticos crea un ambiente que favorece la supervivencia de cepas que poseen factores R. Estas cepas actúan entonces como reservorio para la transferencia de los factores R a otras cepas cualesquiera (incluyendo cepas patógenas) ^{5, 28}.

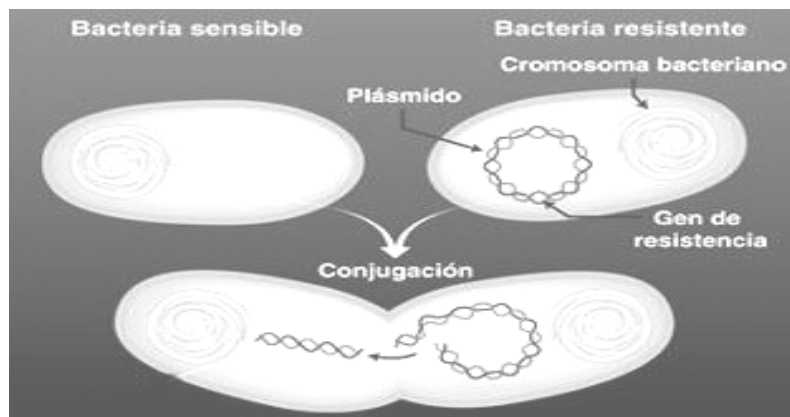


Fig 1.2 Conjugación Imagen de Gold.H.⁴⁸

- Transducción.** La transducción es otro mecanismo de intercambio genético. Se puede definir como el proceso de transferencia genética desde una célula donadora a otra receptora mediante bacteriófagos que contienen ADN genómico de la célula donadora. El fago puede transportar varios genes de resistencia simultáneamente porque el ADN pasa íntegramente de una bacteria a otra. En la transducción podemos distinguir dos etapas diferenciadas: **a) Formación de la partícula fágica transductora:** un trozo de material genético de la célula donadora se introduce en el interior de la cabeza de la cápsida de un fago. Las partículas transductoras son en cierta manera “subproductos” extraños del ciclo normal del fago. **b) La partícula transductora inyecta de forma habitual el ADN que porta a la célula receptora,** donde este ADN puede eventualmente recombinarse y expresar su información (Figura 1.3) ^{5, 28} .

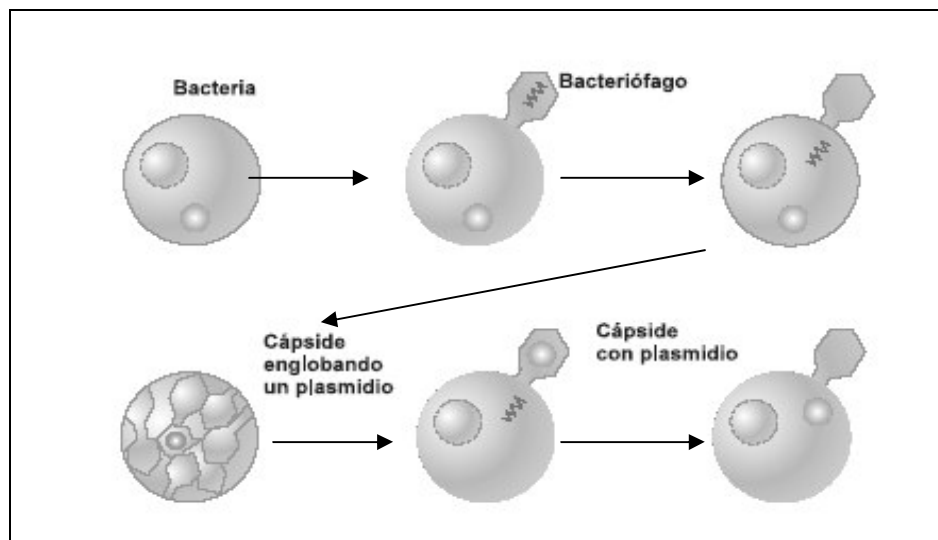


Imagen de Prescott²⁸

Fig 1.3 Transducción

- **Transformación.** La transformación se realiza entre bacterias homologas y es el paso de material genético desnudo de una bacteria resistente a otra bacteria sensible. Este proceso consta de numerosos pasos que se pueden dividir en dos categorías principales: **1)** La entrada de ADN en la célula receptora y **2)** la recombinación del ADN donante con la región homologa del cromosoma receptor. En el proceso de entrada, una de las dos cadenas de ADN invasora se digiere por nucleasas, dejando sólo una cadena que es la que participa en la transformación. La cadena de ADN no digerida se alinea entonces con la región complementaria del cromosoma bacteriano. Este segmento de ADN es escindido y degradado. Para que la recombinación se detecte, el ADN transformante debe provenir de una cepa bacteriana diferente, con algunas variaciones genéticas. Una vez integrada en el cromosoma, la región recombinante tiene una cadena ADN del cromosoma bacteriano y otra del ADN transformante. Después de una ronda de replicación, uno de los cromosomas adquiere la configuración original, idéntica a la de la célula receptora, y el otro contiene el gen transformado. Después de la división celular, se producen una célula huésped original y una célula transformada (Figura 1.4)^{5, 28}.

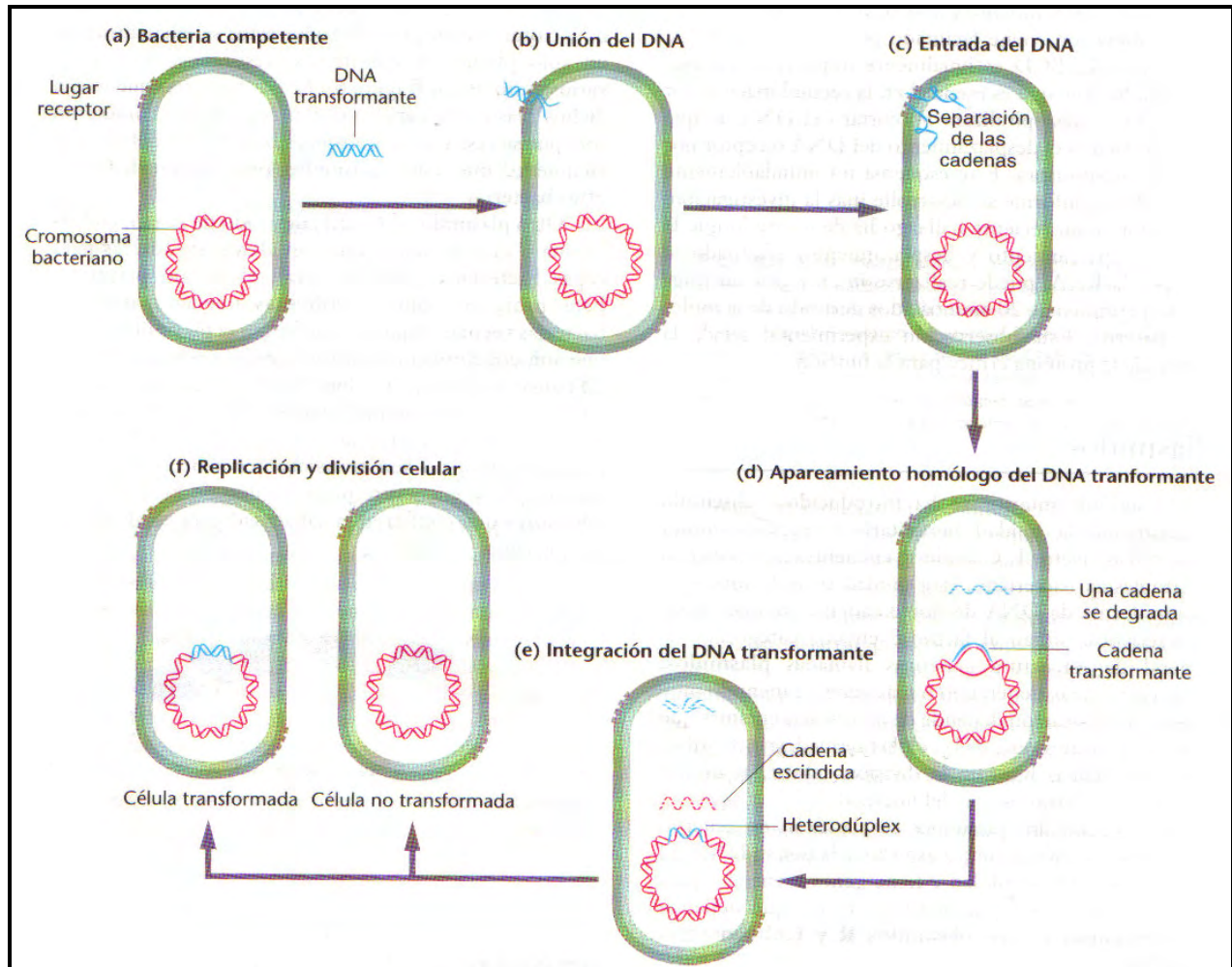


Imagen obtenida de Cummings

Fig 1.4 Transformación

- **Transposición.** La transposición permite el intercambio entre plásmidos o de un plásmido hacia un cromosoma o hacia un fago sin necesidad de similitud entre el donador y el receptor. Los elementos así actuantes se denominan **transposones**, capaces de decidir su propio sitio de inserción. Los transposones son segmentos de ADN que pueden pasar de la posición de un genoma a otra posición en el mismo genoma ó hacia un genoma diferente. Los transposones pueden portar un **integrón**, los

cuales son observados principalmente en las bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteraceae* y al género *Pseudomonas*. Los transposones pueden ser contruidos por inserción al azar de una secuencia de inserción en cada sitio de cualquier gene o grupo de genes^{5, 28, 32}.

Integrón: Los integrones son elementos genéticos que, mediante un mecanismo de recombinación específico, incorporan genes denominados *cassettes* que confieren resistencia a los antibióticos; por lo general se localizan en plásmidos conjugables, aunque también se pueden encontrar en el cromosoma. Para la actividad de los integrones se requiere un gen que codifique una **integrasa**; esta enzima cataliza la recombinación sitio-especifica entre dos secuencias cortas de ADN que pueden ser de dos clases: attI o attC, que son los sitios primarios de reconocimiento de la integrasa. Estructuralmente se suele hablar de tres regiones en un integrón: una región constante 5' que contiene básicamente el gen de la integrasa que se transcribe de derecha a izquierda. En el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales situados a la derecha. A continuación se encuentra una región central variable en la que se localizan los genes estructurales del integrón en un número variable que suele oscilar de uno a cuatro. Las regiones constantes 5' y central variable están separadas por la secuencia attI, unos de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes constitutivos en la región

central están separados unos de otros por secuencias *attC* (Figura 1.5). 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 I es la más frecuente ^{1, 24, 32}.

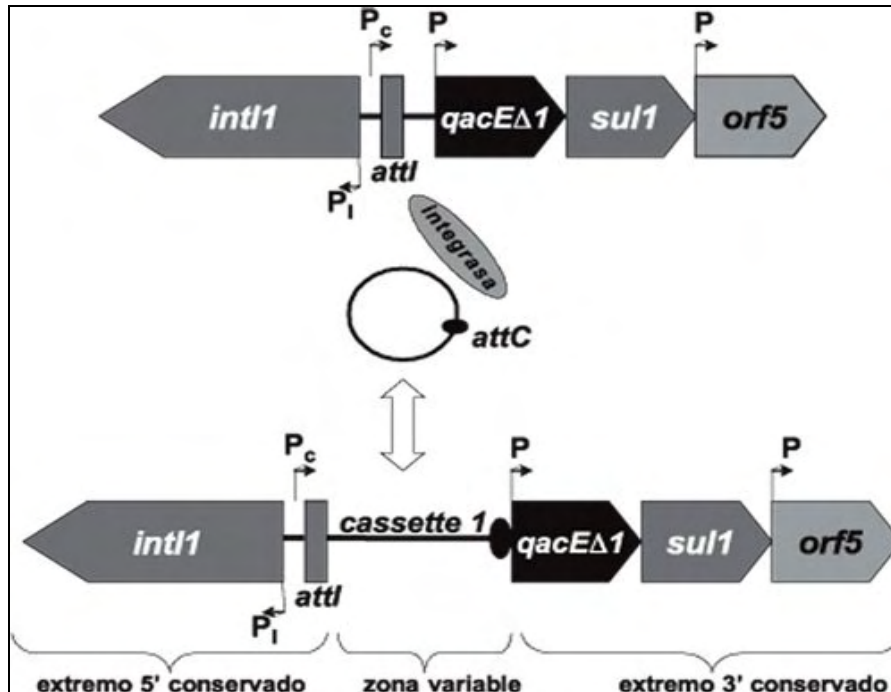


Imagen de Gonzalez G.

Fig 1.5 Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *int1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (esquema no dibujado a escala).

BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA

- **β -Lactámicos.** Las enzimas responsables de proporcionar resistencia contra estos antibióticos son las **β -lactamasas**, que hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico, produciendo derivados ácidos (ácido penicilóico), sin propiedades antibacterianas. En las β -lactamasas, la serina juega un papel importante en la catálisis, al participar en la formación del complejo acil-enzima al contacto con el antibiótico ⁵.
- **Aminoglucósidos.** La resistencia puede ser de tipo cromosómico o plasmídico. Los aminoglucósidos pueden ser inactivados por enzimas que acetilan los grupos amino o por fosforilación o la adenilación de grupos hidroxilo. Las bacterias inactivan sintetizando enzimas modificadoras codificadas en plásmidos. Sin embargo, es más frecuente este tipo de resistencia adquirida por plásmidos que promuevan a las bacterias para segregar enzimas capaces de inactivar el antibiótico. Predominan dos tipos de modificación: N-acetilación de grupos amino y O-fosforilación de grupos hidroxilo, para los cuales los cofactores donadores son acetil-CoA y ATP, respectivamente. Entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación de aminoglucósidos, están la acetil transferasa (AAC), fosfatidil transferasa (APH) y adenil transferasa (ANT ó AAD). El factor más importante de la modificación, es la afinidad de la enzima modificadora por su sustrato. Existen asimismo otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos, como el bloqueo del transporte del antibiótico al sitio de acción, modificación de ribosomas y permeabilidad. Un ejemplo de resistencia

cromosómica es el caso de la estreptomicina que se fija a un ribosoma provocando desórdenes en la síntesis protéica, pero toda mutación que suprima o modifique este lugar de fijación dará origen a cepas resistentes ^{10, 40} .

- **Cloranfenicol.** Las bacterias resistentes al cloranfenicol poseen factor R, que en presencia de acetilcoenzima A, transforma el cloranfenicol en derivados acetilados inactivos.
- **Eritromicina.** La inactivación de la eritromicina se realiza por una alteración del punto de ataque al ribosoma o por destrucción enzimática. La producción de eritromicina estearasa, cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico.
- **Tetraciclinas.** La resistencia está mediada por plásmidos que intervienen en la permeabilidad de la célula bacteriana. Este tipo de resistencia puede estar organizada por transposición.
- **Sulfonamidas.** Resistencia mediada por plásmidos, que codifican enzimas evasivas que eluden el bloqueo metabólico efectuado por sulfamidas o trimetoprim.
- **Quinolonas.** Se lleva a cabo por medio de la alteración de la DNA girasa ó por alteración de los componentes de la pared externa de bacterias gram negativas.
- **Glicopéptidos (Vancomicina).** Los enterococos desarrollan resistencia a vancomicina alterando sus precursores peptidoglucanos, a los cuales los antibióticos glucopéptidos ya no se pueden unir ^{35, 40} .

CAUSAS QUE DESENCADENAN LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las causas que desencadenan este tipo de sucesos son ¹⁵ :

- Automedicación. Causa por la que personas sin conocimiento ni indicación médica, toman libremente un tratamiento antibiótico.
- Falta de cumplimiento de la indicación médica. Interrupción de un tratamiento antes del tiempo marcado por el médico.
- Contacto de las bacterias con el ambiente hospitalario. La presencia de bacterias en los hospitales y en uso continuo de fármacos.
- Uso abusivo de antibióticos.
- Prescripción facultativa incorrecta. Utilización de un determinado fármaco en una patología que no lo requiere.
- Dosis inapropiadas del fármaco. Toma de antibióticos a dosis que no son efectivas.
- La presencia de ciertas enfermedades como el SIDA. Enfermedades que hacen que un sujeto sea más vulnerable a ciertas patologías, las cuales requieren de más tiempo y mayores dosis en su tratamiento, ejemplo: la resistencia generada por la tuberculosis, derivada de los cuadros aparecidos en los enfermos de SIDA.
- El uso de antibióticos en los alimentos de animales con fines de promoción de crecimiento. El uso incontrolado e inapropiado de antibióticos en los animales ejerce una presión selectiva sobre las bacterias del entorno natural, es decir, favorece la supervivencia de las bacterias resistentes frente a las sensibles.

CAPITULO II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La parte experimental de esta tesis se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología y Microbiología Molecular (Laboratorio 1-A anexo, 1-D anexo), ubicados en el Edificio "A" de la Facultad de Química y en el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, U.N.A.M.

El trabajo del laboratorio comprende: Aislamiento de bacterias presentes en carne de pollo de venta al menudeo, identificación de las cepas aisladas, determinación de su susceptibilidad a los antibióticos y detección de la presencia o ausencia de plásmidos relacionados con la resistencia a los antibióticos.

2.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS

Para este trabajo se utilizaron muestras de carne molida de pollo, recolectadas de tres sitios diferentes: la primera muestra se obtuvo de un supermercado, la segunda de un mercado popular (al oriente de la ciudad) y la tercera de un tianguis (al oriente de la ciudad).

2.2 AISLAMIENTO DE SALMONELLA SPP Y OTRAS ENTEROBACTERIAS PRESENTES EN CARNE DE POLLO DE VENTA AL MENUDEO

Para el aislamiento de *Salmonella spp.* y otras enterobacterias presentes en carne de pollo, se utilizó la técnica señalada en la norma NOM-SSA1-114-1994⁴³. El procedimiento incluye: pre-enriquecimiento en caldo lactosado, enriquecimiento en caldo tetracionato y caldo selenito cistina; y finalmente el aislamiento en medios selectivos: xilosa-lisina-desoxicolato, agar sulfito de bismuto y agar Hecktoen.

2.2.1 PRE-ENRIQUECIMIENTO:

Para llevar a cabo el pre-enriquecimiento se pesaron aproximadamente 25 g de carne molida (± 0.5 g) en condiciones asépticas, y se agregó dicha cantidad a 225 mL de caldo lactosado con el fin de aumentar la cantidad de los microorganismos presentes en la muestra y recuperarlos del estrés causado por la exposición a condiciones adversas durante el proceso de manipulación y almacenamiento a bajas temperaturas. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 35° C.

2.2.2 ENRIQUECIMIENTO:

A partir del caldo lactosado se inocularon: 1 mL en caldo selenito cistina y en caldo tetracionato. Se incubaron a 35° C durante 24 h. El objetivo de la inoculación en estos medios de cultivo, selectivos para enterobacterias, fue inhibir la proliferación de microorganismos no deseados para nuestro estudio.

2.2.3 AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS:

Para el aislamiento de los microorganismos a partir del caldo tetracionato y caldo selenito cistina se utilizaron los medios selectivos: agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato), agar sulfito de bismuto (BIS) y agar Hecktoen. Las placas se inocularon con una asada por estriado en cuadrante radial e incubaron a 35° C durante 24 h.

De los medios selectivos se seleccionaron 70 colonias, basándose en sus características coloniales descritas en la tabla 2.1:

TABLA 2.1 CARACTERÍSTICAS COLONIALES DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS EN LOS MEDIOS SELECTIVOS

| MEDIOS SELECTIVOS | COLONIAS | MICROORGANISMOS |
|--|--|--|
| Agar sulfito de bismuto (BIS) | Centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias | <i>Salmonella</i> , con excepción de <i>S. paratyphi A</i> ₁ y <i>S. pullorum</i> |
| | Pequeñas, verdes hasta pardas, a veces mucosas | Bacterias coliformes, <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> y otras |
| Agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato) | Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas; halo de precipitación | <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Aeromonas</i> |
| | Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas, mucosas, halo de precipitación | <i>Klebsiella</i> |
| | Amarillas con zona amarilla alrededor opacas, a veces con centro negro | <i>Citrobacter</i> |
| | Amarillas con zona amarilla alrededor. Opacas | <i>Serratia</i> , <i>Hafnia</i> |
| | Amarillas, con zona amarilla alrededor, transparentes, centro negro | <i>Proteus vulgaris</i> , la mayoría de <i>Proteus mirabilis</i> |
| | Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes, a veces, con el centro negro | <i>Salmonella</i> |
| | Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes. | <i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> |
| | Anaranjadas, ligeramente opacas | <i>Salmonella typhi</i> |
| Agar Hecktoen | Verde-azulada, con o sin centro negro | <i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> |
| | Verde hasta azulada, planas, borde irregular | <i>Pseudomonas</i> |
| | Color salmón, con halo de precipitado | Coliformes |

De las 70 colonias aisladas sólo se seleccionaron 29 para estudios posteriores, ya que el resto de las colonias presentaban las mismas características morfológicas. La selección de las colonias se basó en su morfología colonial, ya que presentaban la morfología característica de *Salmonella spp.* y de otras enterobacterias de interés. Las cepas aisladas se inocularon en placas de agar luria e incubaron durante 24 h a 37° C para su posterior identificación. Se les realizó tinción de Gram a cada una de las colonias aisladas.

2.3 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales (presuntivas y complementarias) y el empleo de equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC).

2.3.1 PRUEBA BIOQUÍMICA PRESUNTIVA:

La prueba bioquímica presuntiva incluye:

- KIA (agar hierro de Kligler)

2.3.2 PRUEBAS BIOQUIMICAS COMPLEMENTARIAS

Las pruebas bioquímicas complementarias utilizadas fueron ⁴⁴ :

- Manitol
- Citrato
- Voges Proskauer
- Rojo de metilo
- Urea
- Sacarosa
- Malonato
- Indol
- Movilidad

2.3.3 IDENTIFICACIÓN UTILIZANDO EQUIPO AUTOMATIZADO **(bioMérieux VITEK, INC):**

Para la identificación de los microorganismos aislados, mediante el empleo de equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC) son necesarias las tarjetas VITEK para microorganismos Gram-negativos , ya que estas tarjetas están diseñadas para usarse conjuntamente con el sistema VITEK para la identificación automatizada de las

bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y un grupo seleccionado de bacterias gram-negativas no fermentadoras de glucosa y miembros de la familia *Vibrionaceae*. La tarjeta se compone de 30 pocillos, de los cuales 28 contienen medios específicos para la identificación mediante pruebas bioquímicas, uno contiene caldo control negativo y el otro caldo control de crecimiento. La tarjeta para identificación de microorganismos gram-negativos realiza una serie de pruebas bioquímicas convencionales tales como: glucosa (oxidativo) y glucosa (fermentativo), acetamida, esculina, urea, citrato, malonato, triptofano, polimixina B, lactosa, maltosa, manitol, xilosa, rafinosa, sorbitol, sacarosa inositol, adonitol, H₂S, ONPG*, ramnosa, L-arabinosa, arginina, lisina, ornitina, oxidasa, DP-300** y plant indican***, que han sido adaptadas al sistema VITEK. Se utilizan tres pruebas no convencionales para complementar las identificaciones. El concepto miniaturizado de la tarjeta para identificación de microorganismos Gram-negativos proporciona las condiciones aerobias y microaerobias para cada prueba que las requiera.

La interpretación de las pruebas bioquímicas de las tarjetas de identificación se realiza por medio del procesador, el cual permite una identificación automática de los microorganismos en su base de datos, los cuales se encuentran especificados en el inserto correspondiente. No requiere de la adición de reactivos reveladores y ocasionalmente requiere de alguna prueba en forma externa.

* *fermentación O-nitrofenil-β-D-galacto-piranósido*

** *2,4,4-tricloro 2-hidroxi-difenileter*

*** *Indoxil-beta-D-glucosido*

La tarjeta para la identificación de gram-negativos se basa en los métodos bioquímicos establecidos por Edwards¹⁹ y Ewing⁷, Gilardi²⁰ y Oberhofer¹⁶ y Rowen²⁰.

La metodología para la preparación de la muestra se describe a continuación:

- 1) Para comprobar la pureza de las cepas, las mismas se inocularon mediante la técnica de agotamiento en agar MacConkey. Las placas se incubaron durante 24 h a 37° C.
- 2) A cada una de las cepas aisladas se realizó la prueba de hemólisis. Para la determinación de hemólisis se inocularon las cepas en placas de gelosa sangre de carnero e incubaron durante 24 h a 37° C.
- 3) Posteriormente se realizó la prueba de la oxidasa a cada una de las cepas aisladas. Para esta prueba se utilizó el reactivo de TMPD. En el caso de que la prueba de la oxidasa resultara positiva, se ennegreció con marcador indeleble la depresión circular situada en el ángulo superior izquierdo de la tarjeta. Ninguna marca en la depresión circular indica que la reacción de la oxidasa es negativa.
- 4) De las colonias aisladas del medio MacConkey, se tomó una asada e inoculó en tubos con agar soya tripticaseína inclinado e incubaron durante 24 h a 37° C.
- 5) Al término de la incubación se preparó una suspensión bacteriana equivalente a un patrón No. 1 de McFarland (zona azul 67-77%T en el colorímetro Vitek), utilizando cada una de las cepas aisladas

- a) Para la preparación de la suspensión se marcaron tubos estériles de 12 x 175mm y se les agregó 1.8 mL de solución salina estéril al 0.45%.
 - b) Con un palillo aplicador estéril se recogieron las colonias aisladas de las placas de agar soya tripticaseína
 - c) Se introdujeron dentro del tubo que contenía la solución salina y se agitó hasta conseguir una suspensión uniforme.
 - d) Se comprobó que la suspensión fuera equivalente a la zona azul 67-77%T del colorímetro Vitek. En el caso de que no se consiguiera la cantidad correcta, se repitieron los pasos anteriores b) y c) para agregar más inóculo o diluyente
- 6) Al término de la preparación de la suspensión se colocaron los tubos en el soporte de llenado del equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC)
 - 7) Siguiendo un procedimiento aséptico, se sujetaron los tubos de transferencia y se introdujeron firmemente en el orificio de entrada de la tarjeta con la punta del tubo dirigida hacia las muescas de la tarjeta. Manteniendo la presión de inserción, se giró el tubo a 180° de tal manera que apuntara en dirección contraria a las muescas y hacia el extremo inferior de la tarjeta.
 - 8) Las tarjetas con el tubo de transferencia se colocaron en el soporte de llenado en la gradilla y se introdujo en el módulo de llenado. Se sometieron las tarjetas al ciclo de llenado.
 - 9) Posteriormente se verificó que el llenado fuera correcto y se prosiguió al sellado de la tarjeta. Para el sellado se utilizó un obturador, el cual cortó el tubo de transferencia y selló las tarjetas. Los tubos de transferencia se desecharon

como materiales contaminados conforme a los procedimientos aceptables para eliminar materiales potencialmente biopeligrosos.

10) Finalmente se colocaron las tarjetas dentro de la gradilla del lector/incubador y se siguió el procedimiento indicado en el manual del Operario VITEK.

11) Las placas se incubaron aproximadamente durante 18 horas.

2.3.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Salmonella* MEDIANTE PRUEBAS SEROLÓGICAS

Para la identificación de la especie se utilizaron sólo las cepas aisladas de *Salmonella spp.* y se realizó mediante el empleo de pruebas serológicas; se determinó la presencia del antígeno somático "O" y el antígeno flagelar "H".

- DETECCIÓN DEL ANTÍGENO "O"

La determinación del antígeno "O" se realizó con el antisuero polivalente A-I y Vi, posteriormente se probaron los antisueros factor 1, 2, 4 y 5.

Se inocularon las cepas del género *Salmonella* en agar soya tripticaseína semisólido para observar movilidad.

Se inocularon las cepas en agar soya tripticaseína, cultivo utilizado posteriormente para determinar la presencia del antígeno somático. La incubación se realizó a 35 ° C durante 24 horas.

En un portaobjetos limpio, se colocó una pequeña gota de solución salina 0.9 % y se resuspendió una asada de las cepas inoculadas en agar soya tripticaseína. Se agregó una pequeña gota del anti-suero polivalente A-I y Vi. Se observó la aglutinación

- DETECCIÓN DEL ANTÍGENO “H” FLAGELAR

Para realizar la determinación del antígeno flagelar “H” se utilizaron los sueros fase 1 y fase 2 contra antígenos flagelares Spicer-Edwards y posteriormente se probaron los sueros para el complejo G.

Se inocularon las cepas del género *Salmonella* en agar soya tripticaseína semisólido.

Se tomó una asada, se inoculó en medio BHI líquido y se incubó 24 horas a 37°C.

Al terminó de la incubación se agregó 10mL de formalina para inactivar las células. Se dejó reposar durante 1 hora.

En placas serológicas se colocaron en cada pozo, 20µL de suero contra antígenos flagelares Spicer-Edwards y 100µL de la solución de *Salmonella* formalizada.

Se incubó durante 2 horas a 50°C. Al término de la incubación se observaron las aglutinaciones.

Se probaron los sueros fase 1 y fase 2 :

Fase 1: 1, 2, 3, 4

Fase 2: LN: EN, I

Se probaron los sueros para el **complejo G:**

m; t; p; µ; s; r; g; q; g,p

2.4 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

La resistencia a los diferentes antibióticos fue determinada mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en discos por medio del uso de sensidiscos y el empleo de equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC).

2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE BAWER-KIRBY

La susceptibilidad a los antibióticos se determinó mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en discos (Bauer-Kirby)⁸ utilizando multidiscos combinados “*Sanofi Diagnostics Pasteur*” los cuales son útiles para el estudio “in vitro” de la sensibilidad bacteriana a 12 antibióticos.

1. Se inoculó por asada en caldo luria cada una de las cepas, las cuales se incubaron durante 8h a 37° C
2. Al término de la incubación se tomó una alícuota de 0.1mL y se resuspendió en 10 mL de medio para antibióticos (agar).
3. Se vertió el medio en cajas que contenían 10 mL de medio para antibióticos. Se homogeneizaron e incubaron durante 24 h a 37° C

4. Se midieron los halos de inhibición y se interpretaron los resultados obtenidos como S (sensible) y R (resistente) dependiendo del diámetro del halo de inhibición (Tabla 3.2).

TABLA 2.2 DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN EN MM

| ANTIBIÓTICO | CONCENTRACIÓN | R | S |
|--------------------|----------------------|----------|----------|
| Amikacina | 30µg | ≤ 14 | ≥ 17 |
| Ampicilina | 10µg | ≤ 11 | ≥ 14 |
| Carbenicilina | 100µg | ≤ 17 | ≥ 23 |
| Cefalotina | 30µg | ≤ 14 | ≥ 18 |
| Cefotaxima | 30µg | ≤ 14 | ≥ 23 |
| Ceftriaxona | 30µg | ≤ 13 | ≥ 21 |
| Cloranfenicol | 30µg | ≤ 12 | ≥ 18 |
| Gentamicina | 10µg | ≤ 12 | ≥ 15 |
| Netilmicina | 30µg | ≤ 12 | ≥ 15 |
| Nitrofurantoína | 30µg | ≤ 14 | ≥ 17 |
| Pefloxacina | 5µg | ≤ 14 | ≥ 23 |
| Trimeto-Sulfa | 25µg | ≤ 10 | ≥ 16 |

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

UTILIZANDO EL EQUIPO VITEK

El equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC) utiliza tarjetas de susceptibilidad. El lector lee, interpreta y registra la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, expresado por el grado de turbidez detectado cada hora en cada uno de los pocillos que conforma una tarjeta tomando como base un pocillo control (propio para cada tarjeta) y así se determina la concentración mínima inhibitoria para cada uno de los antibióticos que contiene la tarjeta para la cepa bacteriana probada.

El sistema VITEK tiene una amplia variedad de tarjetas de susceptibilidad a los antibióticos que satisfacen las necesidades de diferentes laboratorios, tanto a nivel particular como institucional (laboratorios particulares y/o laboratorios de hospitales). Existen diferentes tipos de tarjetas, las tarjetas que se utilizaron fueron GNS-604 (tarjeta de susceptibilidad especial de 45 pocillos).

El procedimiento para la preparación de las tarjetas fue el siguiente:

- 1) Para la preparación de las tarjetas de identificación se preparó una suspensión bacteriana equivalente a un patrón No. 1 de McFarland (zona azul 67-77%T en el colorímetro Vitek), utilizando cada una de las cepas aisladas. Se tomaron 50 μL y se añadieron a un tubo estéril que contenía 1.8 mL de solución salina 0.45 % estéril.

- 2) Al término de la preparación de la suspensión se colocaron los tubos en el soporte de llenado del equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC)
- 3) Siguiendo un procedimiento aséptico, se sujetaron los tubos de transferencia por la curva y se introdujeron firmemente en el orificio de entrada de la tarjeta con la punta del tubo dirigida hacia las muescas de la tarjeta. Manteniendo la presión de inserción, se giró el tubo 180° de tal manera que el tubo apuntara en dirección contraria a las muescas y hacia el extremo inferior de la tarjeta.
- 4) Las tarjetas con el tubo de transferencia se colocaron en el soporte de llenado en la gradilla y se introdujo en el modulo de llenado. Se sometieron las tarjetas al ciclo de llenado.
- 5) Posteriormente se verificó que el llenado se haya realizado correctamente y se prosiguió al sellado de la tarjeta. Para el sellado se utilizó un obturador, el cual cortó el tubo de transferencia y selló las tarjetas. Los tubos de transferencia se desecharon como materiales contaminados conforme a los procedimientos aceptables para eliminar materiales potencialmente biopeligrosos.
- 6) Finalmente se colocaron las tarjetas dentro de la gradilla del lector/incubador y se siguió el procedimiento indicado en el manual del Operario VITEK.
- 7) Las placas se incubaron aproximadamente durante 18 horas.

2.5 DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS

2.5.1 PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

La obtención del DNA plasmídico se realizó mediante la técnica de *Birnboim y Doly*⁶ la cual se realiza de la siguiente manera:

1. Crecer 5 mL de bacterias durante toda la noche en medio Luria
2. Tomar 1.5mL del cultivo anterior, pasarlo a un tubo eppendorf y centrifugar a 6000 rpm durante 1 minuto
3. Decantar dejando el pellet lo más seco posible
4. Resuspender las células en 100 µL de solución I fría (ver apéndice).
5. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente
6. Agregar 200µL de solución II fresca(ver apéndice). Mezclar por inversión (no usar vortex)
7. Mantener 10 minutos en hielo
8. Agregar 150µL de solución III fría (ver apéndice). Mezclar por inmersión y mantener 15 minutos en hielo
9. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos
10. Recuperar el sobrenadante y centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos
11. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1) saturado con buffer TE (ver apéndice). Mezclar vigorosamente. Centrifugar a 6000 rpm durante 30 segundos

12. Recuperar la fase acuosa y agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
Enfriar a -70°C por 5 minutos
13. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos
14. Decantar, lavar el pellet con $100\mu\text{L}$ de etanol al 70%
15. Resuspender el pellet en $20\mu\text{L}$ de agua

2.5.2 ELECTROFORESIS (GEL DE AGAROSA)

La separación de los plásmidos se realizó en gel de agarosa al 0.8 %. Las muestras se prepararon con $5\mu\text{L}$ de la muestra de DNA extraído con anterioridad, $1\mu\text{L}$ de solución buffer de carga y $4\mu\text{L}$ de agua destilada estéril. Como control positivo se utilizó una cepa de *E. coli* y como marcador de pesos se utilizó λ DNA / Hind III. El gel se corrió a 120 mV durante 90 minutos y se reveló en una solución de bromuro de etidio al 0.1%

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS

Las bacterias aisladas de cada muestra de pollo de diferente procedencia, se seleccionaron de acuerdo a las características coloniales que presentaban, las cuales están descritas en la tabla 2.1, p.36.

En total se seleccionaron 70 colonias aisladas de los medios agar XLD, agar sulfito de bismuto (BIS) y agar Hecktoen; de las cuales sólo se escogieron 29 para estudios posteriores, ya que el resto presentaban las mismas características coloniales.

3.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

3.2.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUIMICA PRESUNTIVA

(KIA)

Para la identificación de las enterobacterias aisladas se utilizaron: la prueba bioquímica presuntiva (KIA) y las pruebas bioquímicas complementarias.

En el medio de Kligler se observó la capacidad de los microorganismos para utilizar a la lactosa y la glucosa, además se observó la producción de gas y se determinó la producción de H₂S en las cepas analizadas.

Los resultados de la identificación presuntiva se muestran en la tabla 3.1, en la cual se observa que el 100% de las cepas son glucosa positivas, sólo el 79.3% son lactosa negativas, el 58.6% son productoras de H₂S y el 86.2% producen gas; con lo cual podemos decir que la mayor parte de las cepas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, ya que los microorganismos que pertenecen a ésta, fermentan glucosa y otros carbohidratos con la producción visible de ácido y gas ⁴⁴.

TABLA 3 . 1 Resultado de la identificación bioquímica presuntiva (KIA)

| PROCEDENCIA | CEPA | Glucosa | Lactosa | H ₂ S | Gas |
|-------------------------|------|---------|---------|------------------|-----|
| Muestra de Tianguis | 1T | + | - | - | - |
| | 2T | + | + | - | - |
| | 3T | + | - | + | + |
| | 4T | + | - | + | + |
| | 5T | + | - | - | + |
| | 6T | + | + | - | + |
| | 7T | + | - | + | + |
| | 8T | + | - | + | + |
| | 9T | + | - | + | + |
| | 10T | + | - | + | + |
| | 11T | + | + | - | + |
| | 12T | + | + | - | + |
| | 13T | + | - | - | + |
| | 14T | + | - | + | + |
| Muestra de Mercado | 1M | + | - | + | + |
| | 2M | + | - | + | + |
| | 3M | + | - | + | + |
| | 4M | + | - | + | + |
| | 5M | + | - | + | + |
| | 6M | + | - | + | + |
| | 7M | + | - | + | + |
| | 8M | + | - | + | + |
| | 9M | + | + | + | + |
| | 10M | + | - | - | - |
| | 11M | + | - | - | - |
| | 12M | + | + | + | + |
| Muestra de Supermercado | 1S | + | - | - | + |
| | 2S | + | - | - | + |
| | 3S | + | - | - | + |

3.2.2 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS

Las pruebas bioquímicas complementarias fueron: manitol, citrato, sacarosa, Voges-Proskauer, rojo de metilo, urea, malonato, indol y movilidad.

La identificación mediante pruebas bioquímicas complementarias se realizó empleando tubos de ensayo de 13 x 100. La incubación se realizó durante 24 horas a 37 ° C. Al término de la incubación se procedió a la interpretación de dichas pruebas utilizando los siguientes reactivos: α -naftol y KOH al 40% para la prueba de Voges-Proskauer y el reactivo de Ehrlich para la prueba de Indol. Los resultados se encuentran descritos en la tabla 3.2, la cual muestra que el 65.5% de las cepas son manitol positivas, el 48.3% utilizan el citrato como única fuente de carbono, el 27.6% producen acetilmetilcarbinol (acetoína), el 58.6% son rojo de metilo positivos, indicando así la producción y mantenimiento de los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa; el 34.5% tienen la capacidad de desdoblar la urea en dos moléculas de amoníaco (NH₃), apoyándonos así para diferenciar al género *Proteus* de otros miembros de la familia *Enterobacteraceae*, ya que solo *Proteus* es urea positivo; sólo el 10.3% es sacarosa positiva; el 31% utilizan el malonato de sodio como única fuente de carbono; únicamente el 1% pueden desdoblar el indol de la molécula de triptófano; por último el 86.2% presentan flagelos, ya que la prueba de motilidad fue positiva para 25 cepas (Tabla 3.2).

De la muestra de tianguis se aislaron 14 cepas. Los resultados de las pruebas bioquímicas indican que 2 de las cepas (correspondientes al 14.3% del total de cepas aisladas de la muestra de tianguis) pertenecen a *Pseudomonas aeruginosa*, 2 cepas

(14.3%) a *Proteus mirabilis*, 4 cepas (28.6%) a *Enterobacter hafniae*; 1 cepa (7.1%) a *Escherichia coli* y 4 cepas (28.6%) a *Salmonella spp.*. De la muestra de mercado se aislaron 12 cepas, las cuales se identificaron como: 8 cepas (66.6%) de *Proteus mirabilis*; 2 cepas (16.7%) de *Citrobacter freundii* y 2 cepas (16.7%) de *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente de la muestra de supermercado se aislaron 3 cepas las cuales fueron identificadas como *Enterobacter hafniae* (Tabla 3.2).

TABLA 3.2 Identificación mediante pruebas bioquímicas complementarias

| Procedencia | Cepa | Manitol | Citrato | V.P.* | R.M.** | Urea | Sacarosa | Malonato | Indol | Movilidad | Identificación |
|-------------------------|------|---------|---------|-------|--------|------|----------|----------|-------|-----------|------------------------|
| Muestra de Tianguis | 1T | + | + | - | - | - | - | + | - | - | <i>P. aeruginosa</i> |
| | 2T | + | + | - | - | - | - | + | - | - | <i>P. aeruginosa</i> |
| | 3T | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 4T | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 5T | + | + | + | - | - | + | + | - | + | <i>E. cloacae niae</i> |
| | 6T | + | + | + | - | - | - | + | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 7T | + | - | - | + | - | - | - | + | + | <i>E. coli</i> |
| | 8T | + | - | - | + | - | - | - | - | + | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 9T | + | - | - | + | - | - | - | - | + | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 10T | + | + | - | + | - | - | - | - | + | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 11T | + | + | + | - | - | - | + | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 12T | + | + | + | - | - | - | + | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 13T | + | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 14T | + | + | - | + | - | - | - | - | + | <i>Salmonella spp.</i> |
| Muestra de Mercado | 1M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 2M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 3M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 4M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 5M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 6M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 7M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 8M | - | - | - | + | + | - | - | - | + | <i>P. mirabilis</i> |
| | 9M | + | + | - | + | - | + | - | - | + | <i>C. freundii</i> |
| | 10M | + | + | - | - | - | - | + | - | - | <i>P. aeruginosa</i> |
| | 11M | + | + | - | - | - | - | + | - | - | <i>P. aeruginosa</i> |
| | 12M | + | + | - | + | - | + | - | - | + | <i>C. freundii</i> |
| Muestra de Supermercado | 1S | + | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 2S | + | - | + | - | - | - | - | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 3S | + | - | + | - | - | - | - | - | + | <i>Hafnia alvei</i> |

*Voges Proskauer

**Rojo de Metilo

3.2.3 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS UTILIZANDO EQUIPO AUTOMATIZADO
(bioMérieux VITEK, INC)

La identificación de las enterobacterias se realizó también utilizando el equipo automatizado (bioMerieux VITEK, INC).

Los ensayos bioquímicos de la tarjeta de identificación fueron analizados y guardados automáticamente por el sistema de información VITEK. Al término del ciclo de incubación se imprimió en el lector/incubador un informe para cada tarjeta.

Los resultados mostrados en la tabla 3.3, fueron obtenidos de acuerdo al patrón de reacciones bioquímicas establecidas por el ordenador VITEK, pasando la información al procesador del mismo para su interpretación dentro de la base de datos.

La tabla 3.3 muestra los resultados para cada prueba bioquímica realizada en las tarjetas de identificación de microorganismos Gram negativos, resultando positivas para las siguientes pruebas: 89.7% para glucosa , 20.7% lactosa; 27.6% malonato; el 31% urea; 48.3% citrato; 17.2% oxidasa; 62.1% producen H₂S; 10.3% sacarosa; 34.5% lisina; 27.6% sorbitol; acetamida 13.8%; Plant indican 3.5%, triptofano 3.5%; polimixina 37.9%; maltosa 44.8%; manitol 65.5%; xilosa 89.7%; rafinosa 24.1%; adonitol 6.7%; ONPG 24.1%; L-arabinosa 48.3%; rammosa 55.2%; arginina 17.2%; oritina 86.2%. El 100% de las cepas aisladas son esculina e inositol negativas

Los resultados obtenidos del equipo automatizado (bioMerieux VITEK, INC) presentaron una considerable diferencia en la identificación de los microorganismos aislados, a los obtenidos mediante pruebas bioquímicas (presuntiva y

complementarias), esto puede explicarse debido a que éstas últimas son técnicas cualitativas, ya que la cantidad de microorganismos inoculados no fue cuantificada por este método. Por otra parte, el equipo automatizado es una técnica cuantitativa; en este equipo las tarjetas utilizadas fueron inoculadas con una cantidad conocida de cada cepa.

La identificación final se encuentra descrita en la tabla 3.4, en la cual podemos observar que se aislaron 2 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* tanto en la muestra de tianguis como en la muestra de mercado; 8 cepas de *Proteus mirabilis* en la muestra de mercado y sólo 2 cepas en la muestra de tianguis; además se aislaron 4 cepas de *Salmonella spp.* únicamente en la muestra tianguis; también se aislaron 4 cepas de *Hafnia alvei* en la muestra de tianguis y 3 cepas en la muestra de supermercado; así mismo se aislaron 2 cepas de *Citrobacter braakii* sólo en la muestra de mercado y por último del total de cepas aisladas solo se encontró 1 cepa de *Enterobacter cloacae* y una cepa de *Escherichia coli* únicamente en la muestra de tianguis.

De las 29 cepas aisladas el 48.3% pertenecen a la muestra de tianguis, el 41.4% pertenece a la muestra de mercado y sólo el 10.3% pertenece a la muestra de supermercado.

En otro estudio realizado con muestras clínicas por el Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM, se aislaron 669 cepas resistentes a antibióticos, de las cuales se detectaron 19 géneros bacterianos como son: *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Citrobacter*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Xantomonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Flavobaterium* y *Shigella* ⁴.

TABLA 3.3 Resultados de las pruebas bioquímicas empleando el equipo automatizado VITEK (Tarjeta VITEK para microorganismos Gram

| | Muestra de Tianguis | | | | | | | | | | | | | | Muestra de Mercado | | | | | | | | | | | | Muestra de Supermercado | | |
|----------------------|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------------------------|----|----|
| | 1T | 2T | 3T | 4T | 5T | 6T | 7T | 8T | 9T | 10T | 11T | 12T | 13T | 14T | 1M | 2M | 3M | 4M | 5M | 6M | 7M | 8M | 9M | 10M | 11M | 12M | 1S | 2S | 3S |
| D300 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | |
| Glucosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Control de Acetamida | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Esculina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Plant Urea | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urea | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Citrato | + | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - |
| Malonato | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Triptofano | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Polimixina B | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Lactosa | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Maltosa | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + |
| Manitol | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Xilosa | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Rafinosa | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Sucrosa | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| H ₂ S | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - |
| ONPG | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Rammosa | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + |
| L-arabinosa | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + |
| Glucosa | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Arginina | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Lisina | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| Ornitina | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Oxidasa | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |

TABLA 3.4 Identificación final

TABLA 3.4 Identificación final

| Procedencia | Cepa | Identificación |
|--------------------------------|------|-------------------------------|
| Muestra de Tianguis | 1T | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 2T | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 3T | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 4T | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 5T | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| | 6T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 7T | <i>Escherichia coli</i> |
| | 8T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 9T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 10T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 11T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 12T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 13T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 14T | <i>Salmonella spp.</i> |
| Muestra de Mercado | 1M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 2M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 3M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 4M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 5M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 6M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 7M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 8M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 9M | <i>Citrobacter braakii</i> |
| | 10M | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 11M | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 12M | <i>Citrobacter braakii</i> |
| Muestra de Supermercado | 1S | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 2S | <i>Hafnia alvei</i> |

| | | |
|--|----|---------------------|
| | 3S | <i>Hafnia alvei</i> |
|--|----|---------------------|

TABLA 3.4 Identificación final

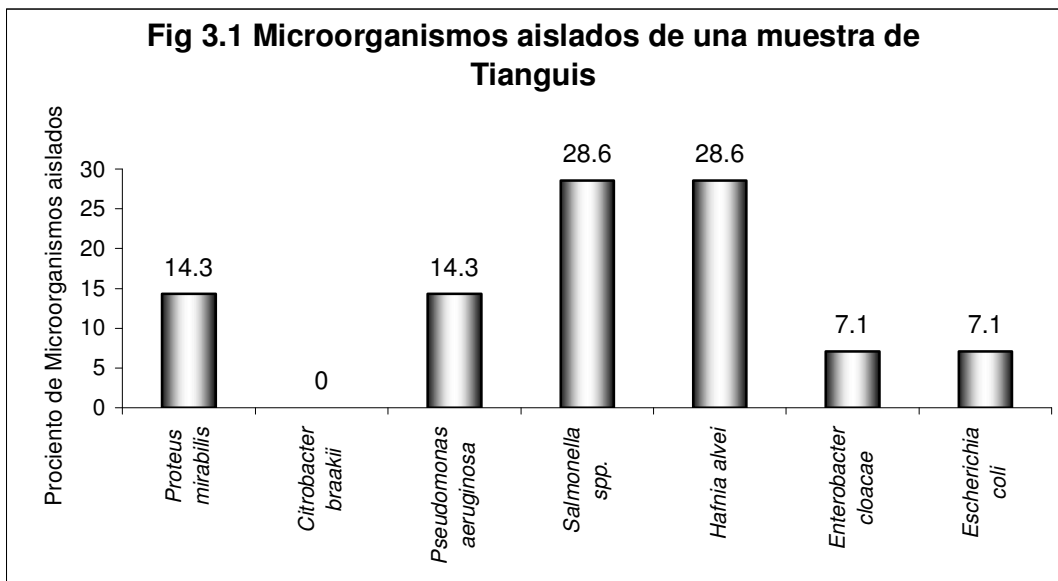
TABLA 3.4 Identificación final

| Procedencia | Cepa | Identificación |
|--------------------------------|------|-------------------------------|
| Muestra de Tianguis | 1T | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 2T | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 3T | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 4T | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 5T | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| | 6T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 7T | <i>Escherichia coli</i> |
| | 8T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 9T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 10T | <i>Salmonella spp.</i> |
| | 11T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 12T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 13T | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 14T | <i>Salmonella spp.</i> |
| Muestra de Mercado | 1M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 2M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 3M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 4M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 5M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 6M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 7M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 8M | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | 9M | <i>Citrobacter braakii</i> |
| | 10M | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 11M | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | 12M | <i>Citrobacter braakii</i> |
| Muestra de Supermercado | 1S | <i>Hafnia alvei</i> |
| | 2S | <i>Hafnia alvei</i> |

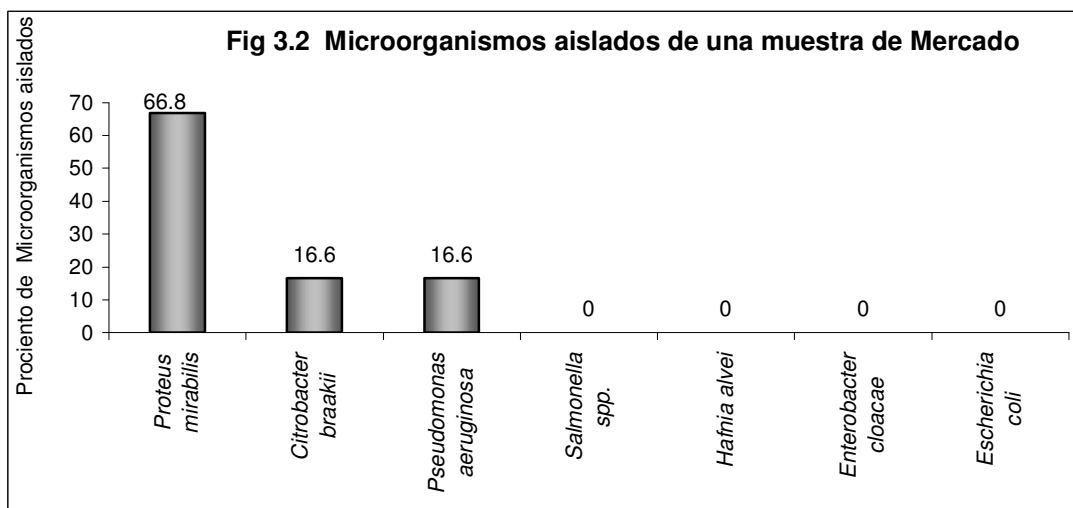
| | | |
|--|----|---------------------|
| | 3S | <i>Hafnia alvei</i> |
|--|----|---------------------|

La tabla 3.2 y 3.4 muestran los resultados de la identificación de cada una de las cepas mediante el uso de pruebas bioquímicas (presuntiva y complementarias) y mediante la empleo del equipo automatizado (bioMerieux VITEK, INC) respectivamente. Los resultados obtenidos en ambas tablas no son iguales para las cepas 9M y 12M procedentes de una muestra de pollo de un mercado, ya que en el caso de las pruebas bioquímicas presuntiva y complementarias el microorganismo identificado es *Citrobacter freundii* y en la otra identificación es *Citrobacter braakii*, la variación en este resultado puede deberse a la interpretación de la pruebas bioquímicas, ya que depende de la referencia bibliográfica utilizada para la identificación de dicho microorganismo^{19, 7, 20, 16, 44}.

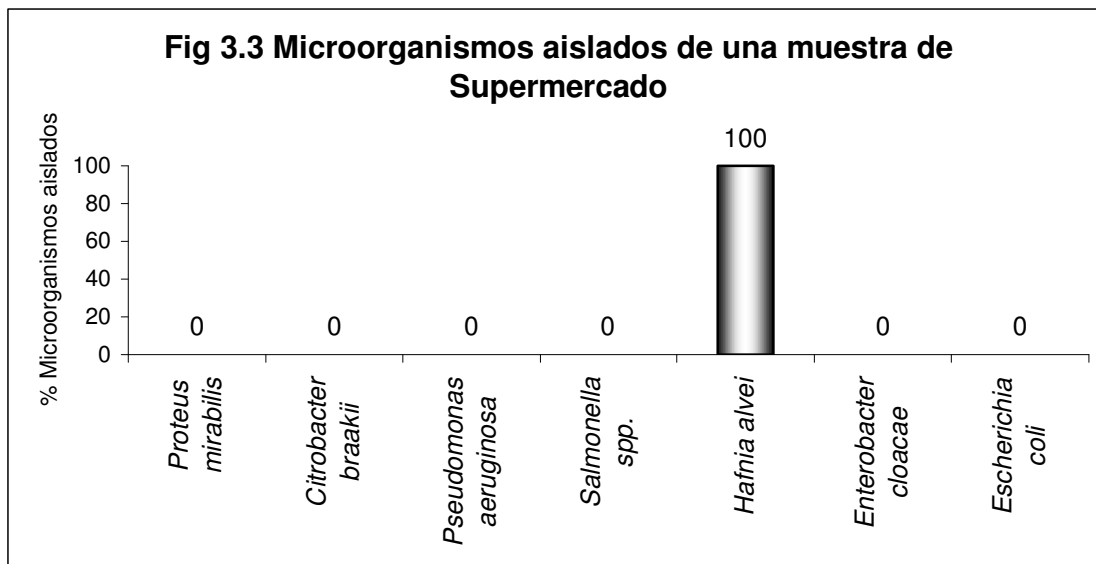
De la muestra del tianguis se aislaron 4 cepas (28.6%) de *Salmonella spp.*; 4 cepas (28.6%) de *Hafnia alvei*; 2 cepas (14.3%) de *Pseudomonas aeruginosa*; 2 cepas (14.3%) de *Proteus mirabilis*; 1 cepa (7.1%) de *Escherichia coli* y una cepa (7.1%) de *Enterobacter cloacae* (Fig 3.1).



De la muestra de mercado se aislaron 8 cepas (66.8%) identificadas como *Proteus mirabilis*; 2 cepas (16.6%) identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* y 2 cepas (16.6%) como *Citrobacter braakii* (Fig 3.2).

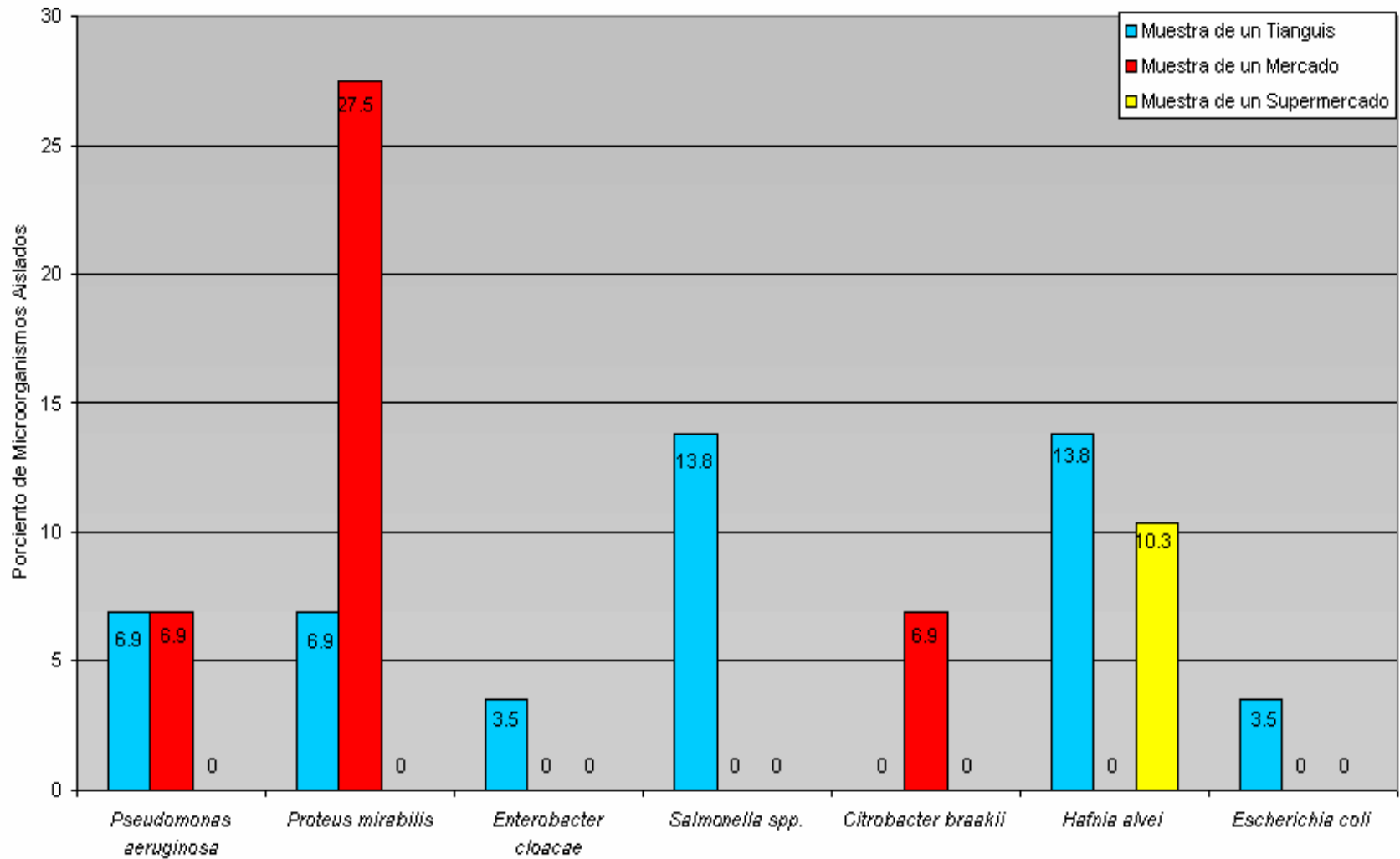


De la muestra de supermercado únicamente se aislaron 3 cepas (100%) las cuales pertenecen al microorganismo *Hafnia alvei* (Fig 3.3).



En la figura **3.4** se puede observar la relación del porcentaje de microorganismos aislados de carne de pollo de diferente procedencia. En la muestra obtenida de un tianguis se aislaron 4 cepas de *Salmonella spp.* que corresponden al 13.8%, 4 cepas de *Hafnia alvei* correspondientes al 13.8%, 2 cepas de *P. aeruginosa* que conforman el 6.9%, 2 cepas de *P. mirabilis* (6.9%) y únicamente una cepa de *E. cloacae* y *E. coli* que pertenecen cada una al 3.5% del total de cepas aisladas. Por otra parte en la muestra procedente de un mercado se aislaron 8 cepas de *P. mirabilis* pertenecientes al 27.5% , 2 cepas de *P. aeruginosa* y 2 cepas de *C. braakii* corresponden cada una al 6.9% del total de cepas aisladas. Por último la muestra de un supermercado sólo presentó 3 cepas de *Hafnia alvei* que corresponden al 10.3%.

Fig 3.4 Relación del Porcentaje de Microorganismos aislados de carne de pollo de diferente procedencia



3.2.4 SEROLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE
DE *Salmonella* sp.

La identificación de la especie de *Salmonella* (cepas 8T, 9T, 10T y 14T) se realizó empleando pruebas serológicas mediante la detección del antígeno somático “O” y la detección del antígeno flagelar “H”.

↳ **Detección del Antígeno Somático “O”**

En la detección del antígeno somático “O” se probaron los sueros polivalentes de *Salmonella* A-I y los antisueros factor 1, 2, 4 y 5.

Al probar los sueros polivalentes de *Salmonella* A-I, se observó aglutinación de las cuatro cepas para los 10 sueros polivalentes (Tabla 3.5).

TABLA 3.5 Resultados de la aglutinación con suero polivalente de *Salmonella* A-I

| Cepa | Sueros | | | | | | | | | |
|------|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | Vi |
| 8T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 14T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Los resultados de la aglutinación con los antisueros factor 1, 2, 4 y 5 son los siguientes: para el factor 1 no hubo aglutinación en ninguna cepa; para el factor 2 todas las cepas aglutinaron, con el factor 4 y 5 no hubo aglutinación de ninguna cepa (Tabla 3.6).

TABLA 3.6 Resultados de la aglutinación con los antisueros factor 1, 2, 4 y 5

| | FACTOR | | | |
|------------|---------------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 |
| 8T | - | + | - | - |
| 9T | - | + | - | - |
| 10T | - | + | - | - |
| 14T | - | + | - | - |

↳ **Antígeno Flagelar "H"**

Para la detección del antígeno flagelar "H", se utilizaron los sueros fase 1 y fase 2 contra antígenos flagelares Spicer-Edwards y los sueros para el complejo G.

De los sueros de Fase 1 las cuatro cepas sólo aglutinaron con el suero 1 y 4 y no se presentó aglutinación con el suero 2 y 3. Con los sueros de fase 2, las cuatro cepas sólo aglutinaron con el suero LN y ninguna cepa aglutinó con los sueros EN e I (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Resultados de la aglutinación con los sueros de Fase 1 y Fase 2

| | SUEROS DE FASE 1 | | | | SUEROS DE FASE 2 | | |
|------------|-------------------------|----------|----------|----------|-------------------------|-----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | LN | EN | I |
| 8T | + | - | - | + | + | - | - |
| 9T | + | - | - | + | + | - | - |
| 10T | + | - | - | + | + | - | - |
| 14T | + | - | - | + | + | - | - |

Con respecto a los resultados de la aglutinación con el complejo G; las cuatro cepas probadas solo aglutinaron con los sueros M, g y g,p; para los demás sueros no hubo aglutinación (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Resultados de la aglutinación con el **complejo G**

| | Sueros | | | | | | | | |
|------------|--------|---|---|---|---|---|---|-----|---|
| | M | t | p | μ | s | g | q | g,p | r |
| 8T | + | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 9T | + | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 10T | + | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 14T | + | - | - | - | - | + | - | + | - |

La tabla 3.9 nos muestra la identificación del serotipo de *Salmonella* como resultado de las pruebas serológicas antes mencionadas.

TABLA 3.9 Resultado de la serotipificación de *Salmonella*

| | 02 | 12 | g | m | Fase 2 | Identificación |
|------------|----|----|---|---|--------|-----------------|
| 8T | + | + | + | + | - | <i>S. nitra</i> |
| 9T | + | + | + | + | - | <i>S. nitra</i> |
| 10T | + | + | + | + | - | <i>S. nitra</i> |
| 14T | + | + | + | + | - | <i>S. nitra</i> |

Las cuatro cepas aisladas del genero *Salmonella* fueron identificadas como: *Salmonella enterica* serotipo *nitra*. Un estudio realizado en la División de Microbiología Animal y Alimentaria en E.U., demostró que es frecuente encontrar en la carne picada vendida en los supermercados estadounidenses cepas aisladas

de *Salmonella* resistentes a los antibióticos; en dicho estudio se identificaron 13 serotipos de los cuales los más comunes fueron *Salmonella enterica* serotipo *estambul* y *S. enterica* serotipo *agona*³⁸.

Duffy y colaboradores examinaron 180 muestras de carne y encontraron que el 17.22% estaban contaminadas con *Salmonella*. Los serotipos identificados fueron *S. bredeney*, *S. kentucky*, *S. enteritidis*, *S. london*, *S. schwartzangram* y *S. typhimurium*¹³. En el presente estudio sólo se aislaron cepas de *Salmonella enterica* serotipo *nitra* de la muestra de tianguis, que pertenecen al 28.6% de las cepas aisladas de esta muestra. Estos datos son importantes, ya que *Salmonella* es un microorganismo patógeno para humanos que puede causar fiebre entérica, gastroenteritis y septicemia.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS A LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Para determinar la resistencia de los microorganismos aislados a los antibióticos se utilizó la técnica de Bauer-Kirby, descrita en el capítulo II.

Las cepas se clasificaron en resistentes (**R**) o sensibles (**S**), dependiendo del halo de inhibición, según la tabla 3.2.

De acuerdo con estas indicaciones en la tabla 3.10 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los multidiscos para microorganismos Gram negativos. Se probaron 12 antibióticos de los cuales los microorganismos aislados presentan resistencia al menos a 4 antibióticos. Las cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentan resistencia a 8 antibióticos; dos cepas de *Salmonella nitra* presentan resistencia a 9 antibióticos, las otras dos cepas de *Salmonella nitra* presentan resistencia a 7 y 10 antibióticos respectivamente; las cepas de *Proteus mirabilis* presentan resistencia al menos a 5 antibióticos y máximo a 11 antibióticos; las cepas de *Hafnia alvei* presentan resistencia al menos a 6 antibióticos y máximo a 9 antibióticos; *Citrobacter braakii* es resistente a 4 y 7 antibióticos; *Enterobacter cloacae* presenta resistencia a 8 antibióticos y *Escherichia coli* es resistente a 10 antibióticos (Tabla 3.10).

TABLA 3.10 Resultados de la susceptibilidad utilizando sensibilizadores

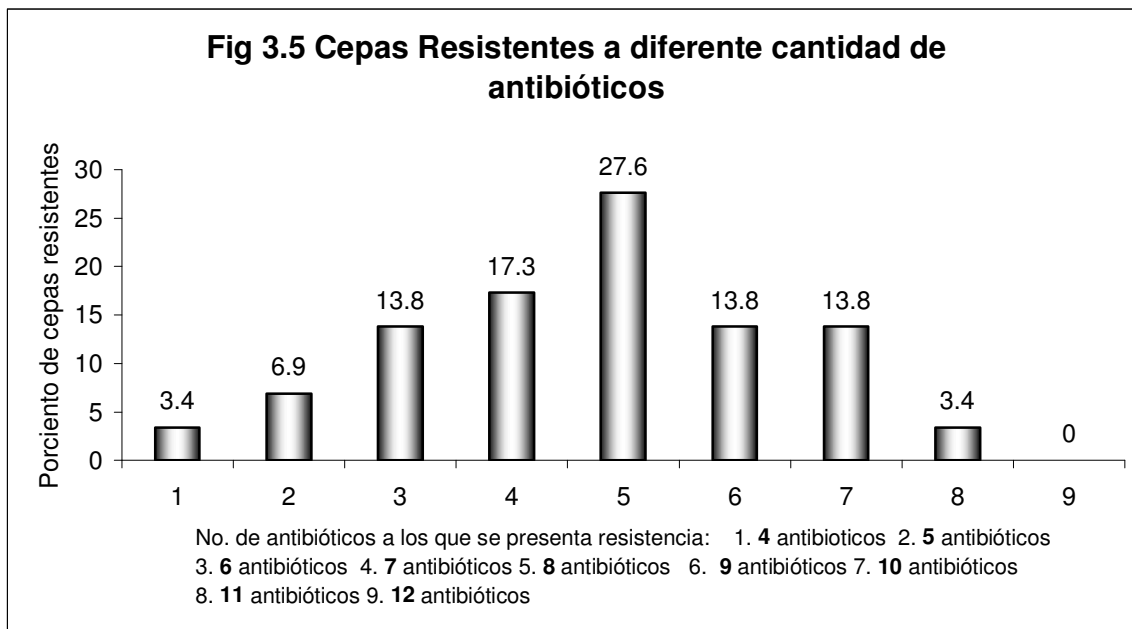
| Procedencia | Cepa | AK | AM | CB | CF | CTX | CRO | CL | GE | NET | NF | STX | PEF | Resistente a : |
|--------------------------|------|----|----|----|----|-----|-----|----|----|-----|----|-----|-----|----------------|
| Muestras de Tianguis | 1T | R | R | R | R | MS | MS | R | I | S | R | R | R | 8 |
| | 2T | R | R | R | R | S | I | R | I | S | R | R | R | 8 |
| | 3T | R | R | R | R | R | S | S | R | S | R | R | R | 9 |
| | 4T | R | S | S | S | S | S | S | R | R | R | R | R | 6 |
| | 5T | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | S | I | 8 |
| | 6T | S | R | R | R | R | MS | S | S | R | S | S | I | 5 |
| | 7T | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | 10 |
| | 8T | R | R | R | R | R | S | S | R | I | R | R | R | 9 |
| | 9T | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | 9 |
| | 10T | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | 10 |
| | 11T | R | R | R | R | R | MS | S | R | R | S | S | I | 7 |
| | 12T | R | R | R | R | R | MS | S | R | S | S | S | I | 6 |
| | 13T | R | R | R | R | R | MS | S | R | S | S | R | S | 6 |
| | 14T | R | R | R | R | R | S | S | S | S | I | R | R | 7 |
| Muestras de Mercado | 1M | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R | 11 |
| | 2M | R | R | R | R | R | MS | R | R | I | R | R | R | 10 |
| | 3M | I | R | R | R | MS | S | R | R | S | R | R | R | 8 |
| | 4M | R | R | R | R | R | S | R | R | I | R | R | R | 10 |
| | 5M | R | S | R | S | S | S | S | R | R | S | S | R | 5 |
| | 6M | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | R | S | 6 |
| | 7M | R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | R | R | 8 |
| | 8M | R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | R | R | 8 |
| | 9M | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | I | I | 7 |
| | 10M | S | R | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | 8 |
| | 11M | S | R | R | R | S | S | R | R | I | R | R | R | 8 |
| | 12M | R | I | R | R | S | S | S | R | S | S | S | S | 4 |
| Muestras de Supermercado | 1S | R | R | R | R | R | MS | S | R | R | S | S | I | 7 |
| | 2S | R | R | R | R | R | MS | I | R | I | S | I | R | 7 |
| | 3S | R | R | R | R | R | MS | S | R | I | R | R | R | 9 |

Antibióticos: AK, amikacina, AM, ampicilina, CB, carbenicilina, CF, cefalotina, CTX, cefotaxima, CRO, ceftriaxona, CL, cloranfenicol, GE, gentamicina, NET, netilmicina, NF, nitrofurantoína, STX, trimetoprim-sulfametoxazol, PEF, pefloxacina
R: resistente, S: sensible MS: moderadamente sensible I: intermedia

Aunque las cepas 8T, 9T, 10T y 14T son *Salmonella enterica* serotipo *nitra*, no presentan el mismo patrón de resistencia, debido a que no necesariamente tienen los mismos genes que confieren la resistencia a los antibióticos.

En la figura 3.5 se observa que el 27.6% de las cepas aisladas presentan resistencia al menos a 8 antibióticos, el 17.3% a 7 antibióticos, el 13.8% presenta a 5, 9 y 10 antibióticos; el 6.9% es resistente a 5 antibióticos y sólo el 3.4% resistente al menos a 4 y 11 antibióticos; con lo cual podemos decir que de nuestras cepas, las bacterias con menor resistencia a los antibióticos fueron resistentes a 4 de los antibióticos probados.

Un estudio realizado por Meng y colaboradores demuestra que de 125 cepas que aislaron de animales, alimentos y humanos, el 24% era resistente a por lo menos 1 antibiótico y el 19% fue resistente a 3 o más antibióticos. Además reportaron que la resistencia más frecuente fue a la estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina²⁵. Por otra parte Radu y colaboradores aislaron 28 cepas de alimentos y determinaron la susceptibilidad a 14 antibióticos, encontrando que todas las cepas fueron resistentes a 2 o más antibióticos²⁹.



La tabla 3.11 muestra el porcentaje de resistencia que presentaron los microorganismos aislados de acuerdo al tipo de antibiótico utilizado. De la familia de los aminoglucósidos se determinó la resistencia a amikacina, gentamicina y netilmicina, de los cuales las cepas aisladas presentaron una resistencia del 86.2%, 75.9% y 48.3% respectivamente. La resistencia más alta (89.7%) se presentó a dos β -lactámicos (ampicilina y carbenicilina) en las tres muestras analizadas. De la familia de las cefalosporinas se probaron cefalotina, cefotaxima y ceftriaxona, las cepas aisladas presentaron resistencia del 82.8%, 65.5% y 0% respectivamente. Las bacterias aisladas presentaron 34.5% de resistencia al cloranfenicol, el 62.1% presentó resistencia a nitrofurantoína, el 70% a trimetoprim-sulfametoxazol y el 70% presentó resistencia a pefloxacina.

TABLA 3.11 Resistencia de los microorganismos aislados de diferente procedencia por antibiótico

| | Ag | | | BI | | Ce | | | Fe | Ni | Su | Qu |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| | AK | GE | NET | AM | CB | CF | CTX | CRO | CL | NF | STX | PEF |
| Ps | 2 | 1 | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Sa | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 |
| Eb | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Es | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Hf | 6 | 6 | 3 | 7 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| Ct | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pt | 9 | 10 | 6 | 8 | 7 | 5 | 4 | 0 | 6 | 8 | 9 | 9 |
| Total Cepas Resistentes | 25 | 22 | 14 | 26 | 26 | 24 | 19 | 0 | 10 | 18 | 20 | 20 |
| % de Cepas Resistentes | 86.2 | 75.9 | 48.3 | 89.7 | 89.7 | 82.8 | 65.5 | 0 | 34.5 | 62.1 | 70 | 70 |

Grupo de antibióticos: Ag, aminoglucósidos; BI, β -Lactámicos; Ce, cefalosporinas; Fe, fenicoles; Ni, nitrofuranos; Su, sulfonamidas; Qu, quinolonas

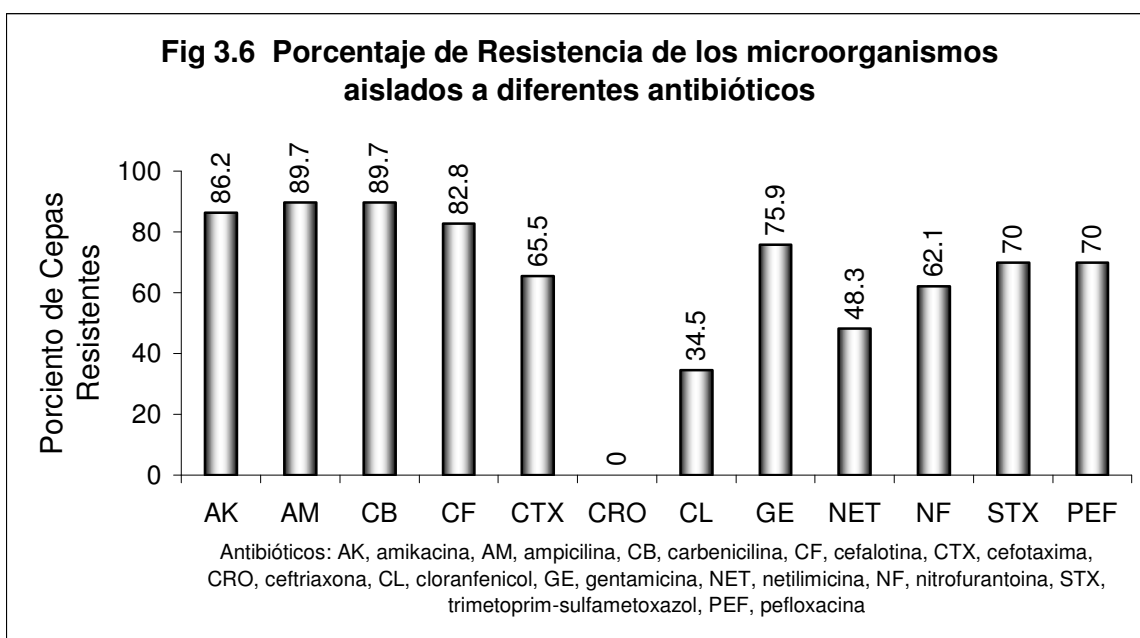
Antibióticos: AK, amikacina, AM, ampicilina, CB, carbenicilina, CF, cefalotina, CTX, cefotaxima, CRO, ceftriaxona, CL, cloranfenicol, GE, gentamicina, NET, netilmicina, NF, nitrofurantoina, STX, trimetoprim-sulfametoxazol, PEF, pefloxacina

Microorganismos: *Ps*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Sa*, *Salmonetra nitra*; *Eb*, *Enterobacter cloacae*; *Es*, *escherichia coli*; *Hf*, *Hafnia alvei*; *Ct*, *Citrobacter braakii*; *Pt*, *Proteus mirabilis*

Al analizar la resistencia por antibiótico, fueron 7 los antibióticos responsables del 70% de la resistencia observada en las cepas aisladas: amikacina (AK), gentamicina (GE), ampicilina (AM), carbenicilina (CB), cefalotina (CF), trimetoprim-sulfametoxazol (STX) y pefloxacina (PEF). El grupo de antibióticos a los que las cepas aisladas presentaron mayor resistencia fueron a los β -lactámicos, seguido de los aminoglucósidos y continuando en orden decreciente de resistencia: sulfamidas, quinolonas, cefalosporinas, nitrofuranos y por último los fenicoles. Un estudio de bacterias nosocomiales realizado por el Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X, encontraron que el 80% de las cepas que aislaron de muestras clínicas presentaron resistencia a los antibióticos: gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina, amikacina, cefalotina, piperacilina y trimetoprim-sulfametoxazol ⁴. Los valores de resistencia relativamente altos a la gentamicina

(75.9%), ampicilina (89.7%), cefalotina (82.8%) y trimetoprim-sulfametoxazol (70%) son comparables a los reportados por otros autores (Benavides, P.)⁴.

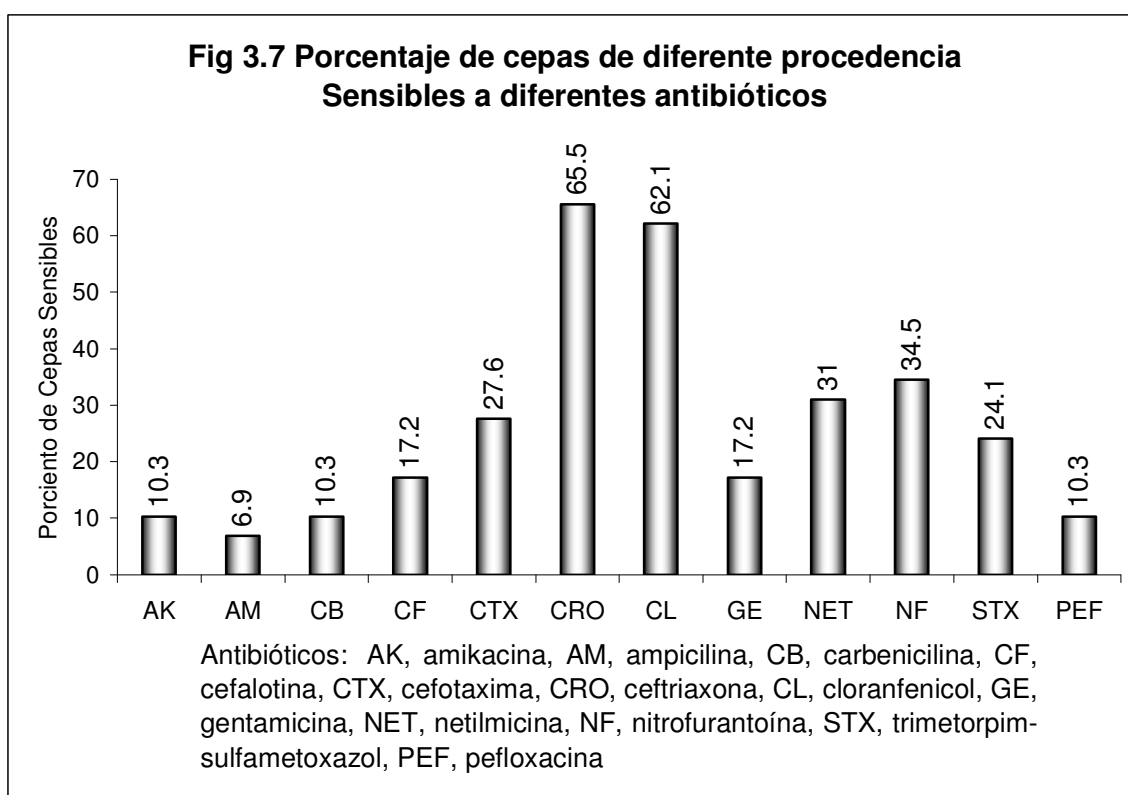
En la figura 3.6 se puede observar que del total de las cepas aisladas de diferente procedencia, el 89.7% de las cepas presentan resistencia a ampicilina y carbenicilina; el 86.2% a amikacina; el 82.8% a cefalotina, el 75.9% a gentamicina; el 70% a trimetoprim-sulfametoxazol y pefloxacina; el 65.5% a cefotaxima, el 62.1% a nitrofurantoína, el 48.3% a netilmicina, el 34.5% a cloranfenicol y ninguna cepa es resistente a ceftriaxona.



La figura 3.7 muestra el porcentaje de cepas aisladas que son sensibles a diferentes antibióticos, el 65.5% de las cepas son sensibles a ceftriaxona, el 62.1% a cloranfenicol, el 34.5% a nitrofurantoína, el 31% a netilmicina, 27.6% a

cefotaxima, 24.1% a trimetoprim-sufametoxazol, el 17.2% son sensibles a cefalotina y a gentamicina; el 10.3% a amikacina, carbenicilina y pefloxacina; y sólo el 6.3% es sensible a ampicilina.

El 31% fue moderadamente sensible a ceftriaxona y el 3.5% presentó resistencia intermedia a dicho antibiótico.



En la figura 3.8 se muestra el porcentaje de cepas resistentes a diferentes antibióticos. En la muestra de supermercado se observa que el 100% de las cepas aisladas presentan resistencia a amikacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima y gentamicina; el 66.7% es resistente sólo a pefloxacina y el 33.3%

resistente a netilmicina, nitrofurantoína y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas aisladas del mercado presentan el 91.7% de resistencia a gentamicina, el 83.3% a ampicilina y carbenicilina; el 75% a amikacina, trimetoprim-sulfametoxazol y pefloxacina; el 66.7% a cefalotina, cloranfenicol y nitrofurantoína; el 50% a netilmicina y el 41.7% a cefotaxima. Por último las cepas aisladas de la muestra obtenida de un tianguis presenta resistencia del 92.9% a amikacina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina; el 78.6% a cefotaxima, el 71.4% a trimetoprim-sulfametoxazol, el 64.3% a nitrofurantoína y pefloxacina; el 57.1% a gentamicina; el 50% a netilmicina y el 14.3% a cloranfenicol.

Las cefalosporinas de tercera generación (tales como ceftriaxona) son comúnmente utilizadas en el tratamiento de niños con infecciones causadas por *Salmonella*, debido a sus propiedades farmacodinámicas y baja prevalencia de resistencia a estos antibióticos. En nuestro estudio ninguna cepas presentó resistencia a ceftriaxona; sin embargo un estudio realizado en Nebraska en infecciones causadas por *Salmonella* No *Typhi* se demostró un incremento en la resistencia a ceftriaxona del 0.1% en 1996 al 2% en el 2001 ³.

En la figura 3.9 se observa el porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos. En la muestra de supermercado el 66.7% de las cepas aisladas muestran sensibilidad a cloranfenicol y nitrofurantoína; y el 33.3% a trimetoprim-sulfametoxazol. Para la muestra de mercado se observa que el 91.7% de las cepas aisladas son sensibles a ceftriaxona, el 50% a cefotaxima, el 33.3% a cefalotina, cloranfenicol y nitrofurantoína; el 25% a netilmicina, el 16.7% a

amikacina, carbenicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y pefloxacina; y por último el 8.3% a ampicilina y a gentamicina. Finalmente para la muestra de tianguis el 85.7% de las cepas aisladas son sensibles a cloranfenicol, el 57.1% a ceftriaxona, el 42.9% a netilmicina, el 28.6% a gentamicina, nitrofurantoína y trimetoprim-sulfametoxazol; el 14.3% a cefotaxima y el 7.1% a amikacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina y pefloxacina.

Fig 3.8 Porcentaje de cepas de diferente procedencia Resistentes a diferentes antibióticos

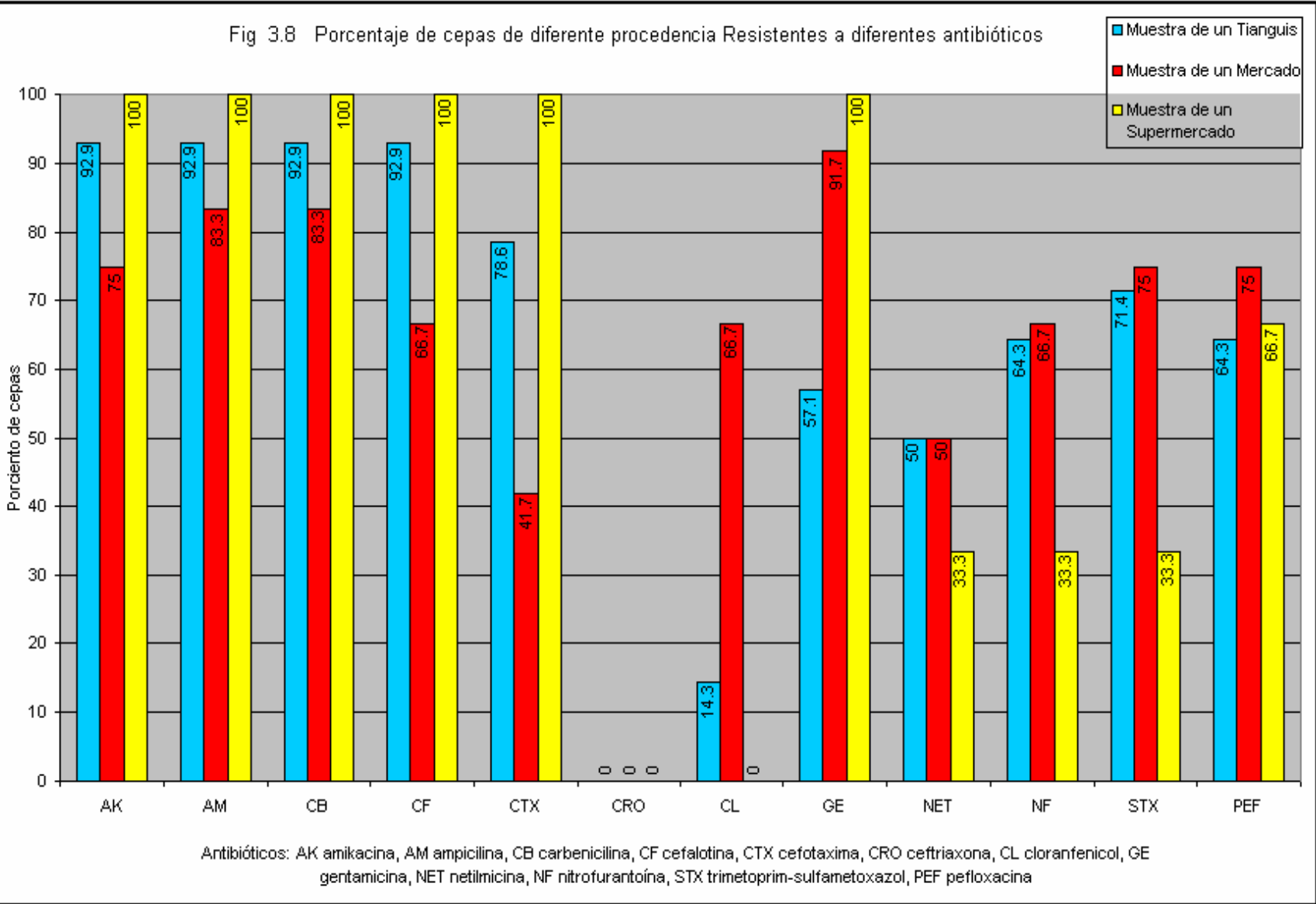
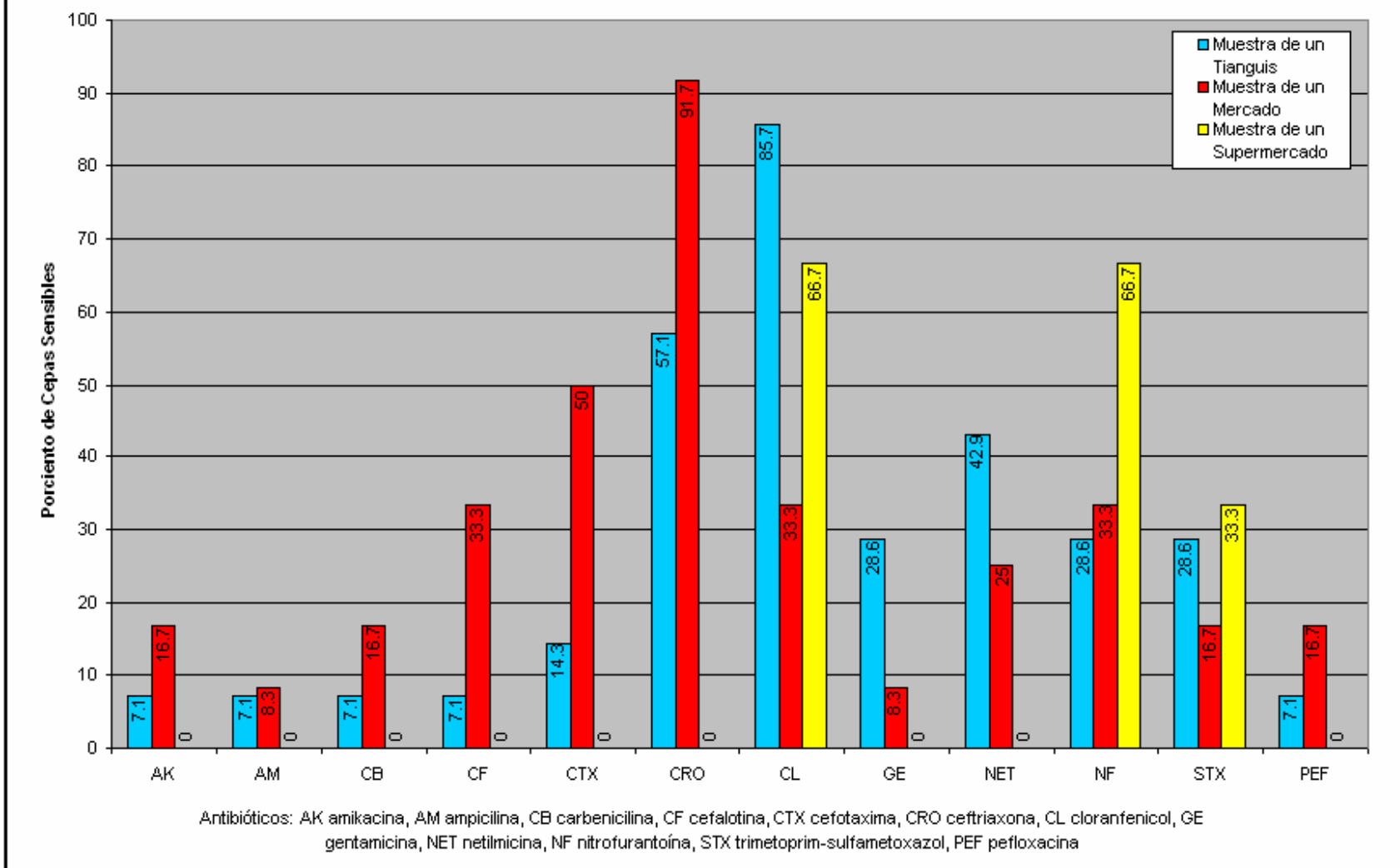


Fig 3.9 Porcentaje de cepas Sensibles a diferentes antibióticos



3.3.2 SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZANDO EL EQUIPO AUTOMATIZADO (bioMérieux VITEK, INC)

Para determinar la resistencia de los microorganismos aislados a los antibióticos también se utilizó el equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC).

Se interpretó y se registró la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano expresado por el grado de turbidez detectado en cada uno de los pocillos que conforman la tarjeta. Se tomó como base un pocillo control que contiene la tarjeta GNS-604 para cada cepa bacteriana probada.

Los resultados se encuentran enlistados en la tabla **3.12**, en la cual se observa que las cepas de *Salmonella nitra* son resistentes a 2 y 1 antibióticos, posteriormente las cepas de *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Citrobacter braakii* son resistentes a 2 antibióticos, las cepas de *Proteus mirabilis* son resistentes a 4,5 y 6 antibióticos; por último, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son la que presentan la mayor resistencia a 7 y 9 antibióticos.

En un estudio realizado en la División de Microbiología Animal y Alimentaria en los Estados Unidos se encontró que el 84% de las cepas aisladas de muestras de carne vendida en los supermercados eran resistentes a uno o más antibióticos; en el 53% se comprobó resistencia a 3 antibióticos o a más. Entre las cepas aisladas multirresistentes se comprobó con mayor frecuencia resistencia a estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclina. Cinco cepas aisladas de *S. enterica* serotipo *agona* fueron resistentes a 9 antibióticos, incluyendo ceftriaxona³⁸.

Las cepas aisladas en este estudio presentaron mayor resistencia a la familia de las sulfamidas (58.6% de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol). Posteriormente, se presentó mayor resistencia a la familia de las quinolonas en comparación con el resto de los antibióticos probados, ya que la resistencia a los antibióticos ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina fue del: 51.7%, 48.3% y 48.3% respectivamente. De la familia de los aminoglucósidos sólo se presentó resistencia a la gentamicina (31%), ya que para el antibiótico amikacina no se presentó resistencia. Con respecto a la familia de los β -lactámicos sólo se presentó resistencia a la amoxicilina/ácido clavulínico (44.8%), sin embargo para los antibióticos piperacilina y ticarcilina/ácido clavulínico no se presentó resistencia. De la familia de las cefalosporinas se probaron 6 antibióticos, de los cuales: cefazolina, cefuroxima acetil y cefuroxima sodio presentaron 44.8%, 13.8% y 13.8% de resistencia respectivamente, sin embargo para los antibióticos cefepima, ceftazidima y ceftriaxona no se presentó resistencia. De la familia de los nitrofuranos sólo se probó la nitrofurantoína a la cual se presentó 37.9% de resistencia. Finalmente, a la familia de las carbapenemas ninguna cepa presentó resistencia (Tabla 3.13).

En el presente estudio ninguna cepa de *Salmonella nitra* presentó resistencia a los antibióticos de la familia de las quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina), pero en otro estudio realizado por O. Alvseike y colaboradores se encontró que en el Reino Unido el porcentaje de cepas aisladas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* aumentó del 0.6% en 1994 al 13% en 1997. Estos estudios fueron realizados con personas infectadas con este microorganismo ².

TABLA 3.12 Determinación de la resistencia a diferentes antibióticos utilizando el equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC)

| Procedencia | Muestra | AK | AMO | CFZ | CFP | CTZ | CRO | CFA | CFS | CPR | GE | MER | NF | NOR | OFL | PIP | TRC | STX | Resistente |
|-------------------------|---------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| Muestra de Tianguis | 1T | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | 7 |
| | 2T | S | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | 9 |
| | 3T | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | S | S | R | 6 |
| | 4T | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | I | R | R | S | S | R | 5 |
| | 5T | S | R | R | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 6T | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 7T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | 2 |
| | 8T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | 2 |
| | 9T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | 1 |
| | 10T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | 1 |
| | 11T | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 12T | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 13T | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 14T | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | R | 1 |
| Muestra de Mercado | 1M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | S | S | R | 6 |
| | 2M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | S | S | R | 6 |
| | 3M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | I | R | R | S | S | R | 5 |
| | 4M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | R | R | S | S | R | 5 |
| | 5M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | R | S | S | S | 4 |
| | 6M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | R | R | S | S | R | 5 |
| | 7M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | I | R | R | S | S | R | 5 |
| | 8M | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | S | S | R | 6 |
| | 9M | S | R | R | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 10M | S | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | 9 |
| | 11M | S | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | 9 |
| | 12M | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| Muestra de supermercado | 1S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 2S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |
| | 3S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 2 |

R: Resistente S: Sensible I: Intermedia

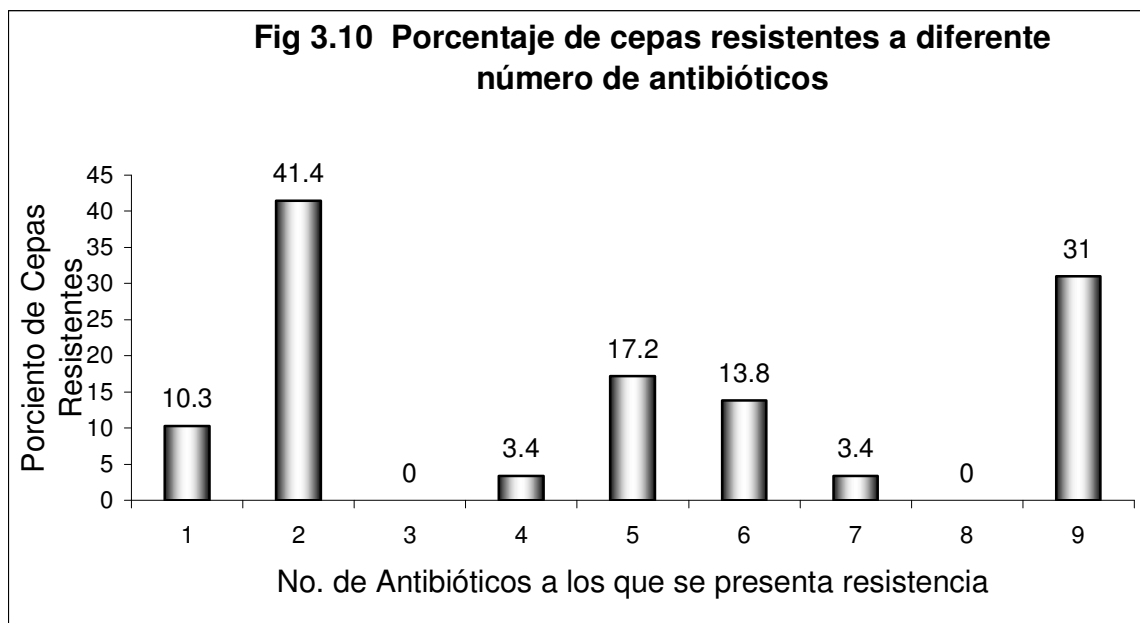
TABLA 3.13 Resistencia de los microorganismos aislados de diferente procedencia por antibiótico

| | Ag | | BI | | | Ce | | | | | | Qu | | | Ni | Ca | Su |
|-------------------------------|----------|-----------|-------------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|
| | AK | GE | AMO | PIP | TRC | CFZ | CFP | CTZ | CRO | CFA | CFS | CPR | NOR | OFL | NF | MER | STX |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 |
| <i>Salmonella nitra</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Hafnia alvei</i> | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter braakii</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 4 | 0 | 9 |
| Total de cepas R | 0 | 9 | 13 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 15 | 14 | 14 | 11 | 0 | 17 |
| % de cepas resistentes | 0 | 31 | 44.8 | 0 | 0 | 44.8 | 0 | 0 | 0 | 13.8 | 13.8 | 51.7 | 48.3 | 48.3 | 37.9 | 0 | 58.6 |

Grupo de antibióticos: Ag, aminoglucósidos; BI, β -Lactámicos; Ce, cefalosporinas; Qu, quinolonas; Ni, nitrofuranos; Su, sulfonamidas; Ca, carbapenemas

Antibióticos: AK, amikacina, GE, gentamicina, AMO, amoxicilina/ácido clavulínico, CFZ, cefazolina, CFP, cefepima, CTZ, ceftazidima, CRO, ceftriaxona, CFA, cefuroxima acetil, CFS, cefuroxima sodio, CPR, ciprofloxacino, GE, gentamicina, NOR, norfloxacino, NF, nitrofurantoina, MER, meropenem, OFL, ofloxacino, PIP, piperacilina, TRC, ticarcilina/ácido clavulínico, STX, trimetoprim-sulfametoxazol

El 41.4% de las cepas aislada presentaron resistencia a 2 antibióticos, el 31% fueron resistentes a 9 antibióticos, el 17.2% presentaron resistencia a 5 antibióticos, mientras que el 13.8% fue resistente a 6 antibióticos, el 10.3% fue resistente a sólo un antibiótico y finalmente el 3.4% fue resistente a 4 y 7 antibióticos respectivamente (Fig 3.10).



En la figura 3.11 se puede observar el porcentaje de cepas resistente a diferentes antibióticos por muestra: La muestra de supermercado presenta resistencia del 100% para amoxicilina/ácido clavulínico y cefazolina. Para la muestra de mercado el 91.7% son resistentes a ciprofloxacina; para norfloxacina y ofloxacina el 83.3% de las cepas presentaron resistencia a ambos antibióticos; el 75% fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, el 41.7% a nitrofurantoína, 33.3% a amoxicilina y a cefazolina, el 16.7% a cefuroxima acetil y cefuroxima sodio. En la muestra de tianguis el 57.1 % de las cepas aisladas fueron resistentes a

trimetoprim-sulfametoxazol, el 42.9% a amoxicilina, nitrofurantoína y cefazolina; el 28.6% fue resistente a ofloxacin, norfloxacin y ciprofloxacina; finalmente para los antibióticos cefuroxima acetil, cefuroxima sodio y gentamicina, el 14.3% de las cepas presentaron resistencia a cada uno de estos.

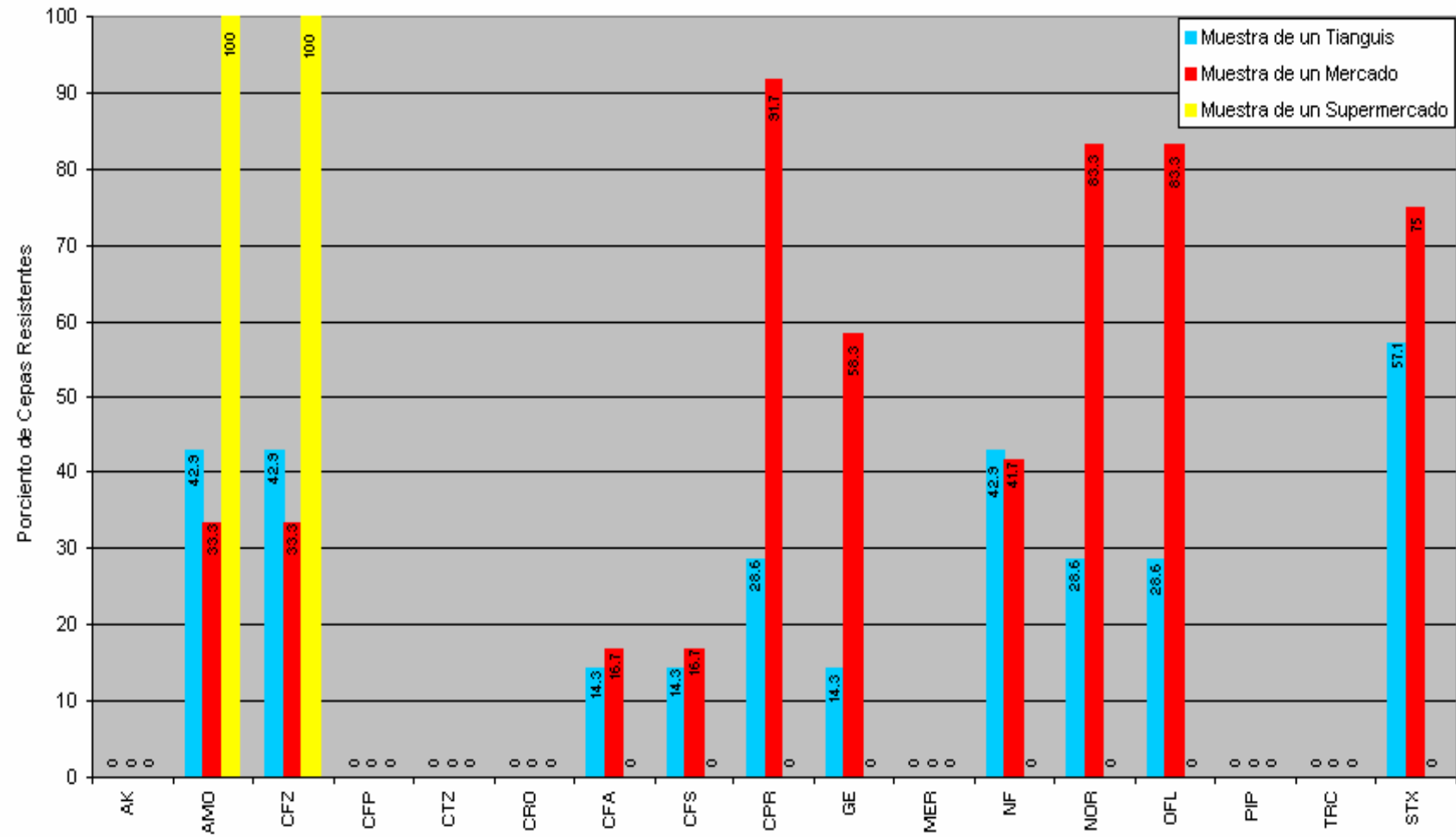
La figura 3.12 nos muestra el porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos para cada muestra. En la muestra de supermercado el 100% de las cepas fueron sensibles a amikacina, cefepima, ceftriaxona, ceforima acetil y cefuroxima sodio, ciprofloxacina, norfloxacin, nitrofurantoína, meropenem, ofloxacin, piperacilina, ticarcilina/ácido clavulínico y trimetoprim-sulfametoxazol. Para la muestra de mercado el 100% de las cepas fueron sensibles a amikacina, cefepima, cefazolina, ceftriaxona, meropenem, piperacilina, ticarcilina/ácido clavulínico; el 83.3% sensible a cefuroxima acetil y cefuroxima sodio; el 66.7% a amoxicilina/ácido clavulínico y cefazolina; el 41.7% sensible a gentamicina y nitrofurantoína; el 25 a trimetoprim-sulfametoxazol; el 16.7% a ofloxacin y norfloxacin y por último el 8.3% presentó sensibilidad a ciprofloxacina. Finalmente el 100% de las cepas aislada de la muestra de tianguis fueron sensibles a amikacina, cefepima, cefazolina, ceftriaxona, meropenem, piperacilina y ticarcilina/ácido clavulínico, el 85.7% fueron sensibles a gentamicina y cefuroxima sodio; el 78.6% a cefuroxima acetil, el 71.4 a ciprofloxacina, norfloxacin y ofloxacin; el 57.1 fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulínico y cefazolina; por último el 42.9% fueron sensibles nitrofurantoína y trimetoprim-sulfametoxazol.

En este estudio sólo se aisló una cepa de *Escherichia coli* de una muestra de tianguis, la cual presentó resistencia a amikacina, gentamicina, netilmicina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, nitrofurantoína, pefloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol. Sin embargo, en un estudio realizado en Grecia en el cual se aisló *Escherichia coli* 0157:H7 de alimentos, se demostró que las cepas aisladas fueron susceptibles a 8 de los antibióticos probados (8/8): ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico, norfloxacina, estreptomina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina ¹². Por lo tanto, sólo los antibióticos ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol son comparables a los reportados por el autor Dontorou ¹².

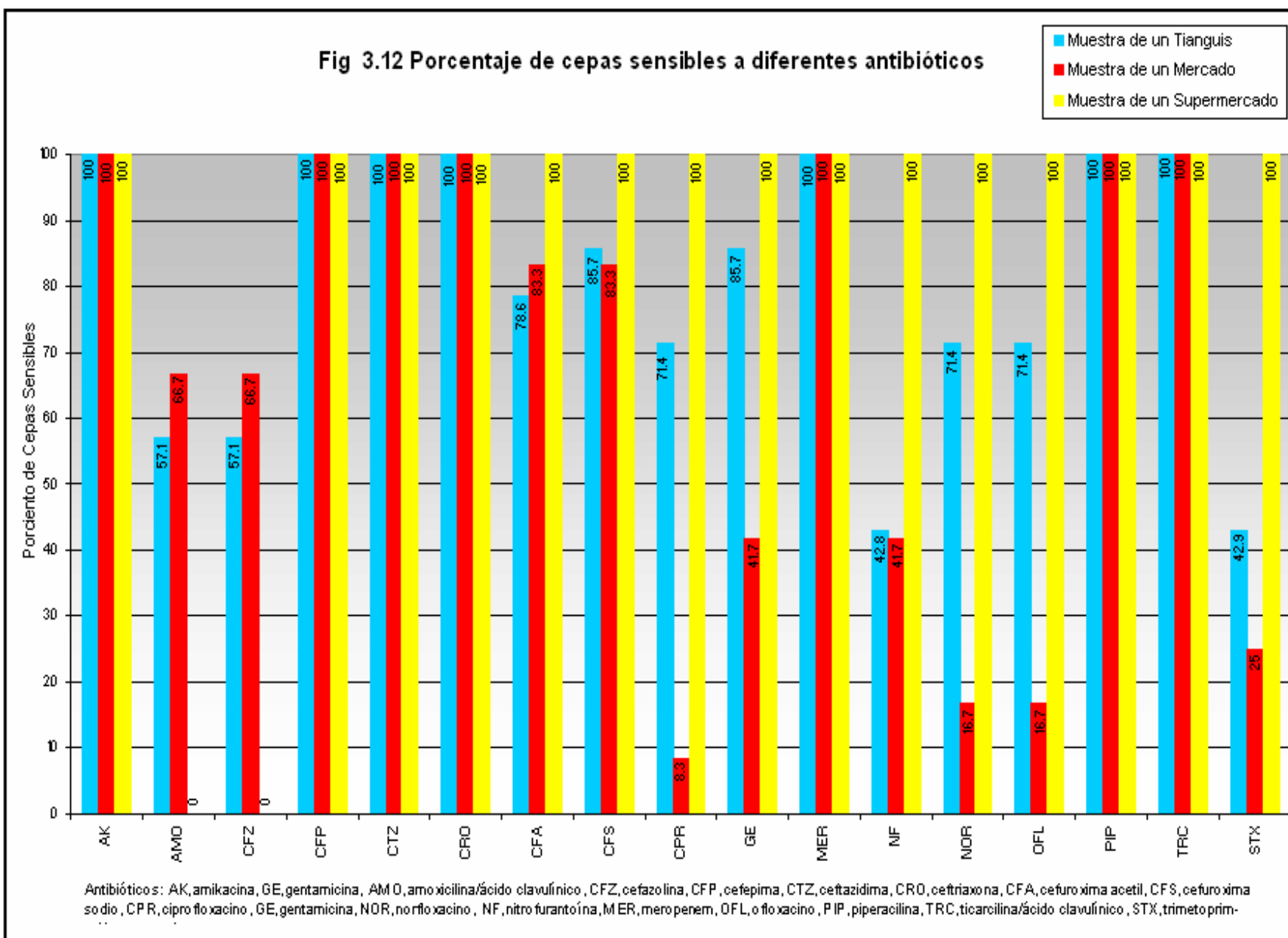
Un trabajo realizado por el laboratorio de Genética y Biología Molecular en Venezuela, mostró que las cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras clínicas, presentan resistencia al antibiótico cefalotina (62.5%); sin embargo, el valor es menor a los obtenidos en el presente estudio (82.8%) ⁴⁵.

You y colaboradores ⁴⁷ evaluaron la resistencia a los antibióticos encontrando que de 45 cepas aisladas, el 71% (32 cepas) fueron resistentes a por lo menos un antibiótico; además encontraron que todas las cepas aisladas fueron resistentes a estreptomina y fueron sensibles a amikacina, imipenem, cefoperazona y cefazolina. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que el 10.3% de las cepas aisladas es resistente a por lo menos un antibiótico; 16 cepas (55.2%) son sensibles a cefazolina y el 100% es sensible a amikacina.

Fig 3.11 Porcentaje de Cepas Resistentes a diferentes antibióticos



Antibióticos: AK, amikacina, GE, gentamicina, AMD, amoxicilina/ácido clavulánico, CFZ, cefazolina, CFP, cefepima, CTZ, ceftazidima, CRO, ceftriaxona, CFA, cefuroxima acetil, CFS, cefuroxima sodio, CPR, ciprofloxacino, GE, gentamicina, NOR, norfloxacino, NF, nitrofurantoína, MER, meropenem, OFL, ofloxacino, PIP, piperacilina, TRC, ticarcilina/ácido clavulánico, STX, trimetoprim-sulfametoxazol



De 1995 al 2000 se reportaron en Dinamarca 13334 casos de infecciones causadas por *S. enteritidis*. Para monitorear la resistencia a los antibióticos se estudiaron 2564 microorganismos aislados; de los cuales 3.2% (82 cepas) fueron resistentes a ácido nalidíxico. Estos datos muestran que la resistencia a las quinolonas ha incrementado de 0.8% (3 cepas de 384 aisladas) en 1995 a 8.5% (31 cepas de 366 aisladas) en el 2000, lo cual es un problema de salud pública debido a que las fluoroquinolonas son la principal línea de fármacos para el tratamiento de salmonelosis en humanos ²⁶.

Para comparar la resistencia obtenida mediante la utilización de ambos métodos (sensidiscos y equipo automatizado VITEK) la tabla 3.14 muestra las concentraciones utilizadas para cada antibiótico empleado; así como el porcentaje de cepas aisladas que presentaron resistencia a cada antibiótico.

De la tabla 3.14 cabe destacar los antibióticos: amikacina, ceftriaxona, gentamicina, nitrofurantoína y trimetoprim-sulfametoxazol; ya que dichos antibióticos son utilizados en ambos métodos (sensidiscos y equipo automatizado VITEK), por lo tanto sobre estos antibióticos se hará la comparación de los métodos utilizados. Los antibióticos amoxicilina/acido clavulínico, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima acetil, cefuroxima sodio, ciprofloxacina, cloranfenicol, meropenem, netilmicina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, piperacilina y ticarcilina/ácido clavulínico no son utilizados en ambos métodos.

Tabla 3.14 Comparación entre los métodos utilizados para determinar la resistencia a los antibióticos.

| ANTIBIÓTICOS | Métodos para determinar la resistencia a diferentes antibióticos | | | |
|-----------------------------------|--|---------------------|---|---------------------|
| | Sensidiscos | | Equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC) | |
| | Concentración µg/mL | % Cepas Resistentes | Concentración µg/mL | % Cepas Resistentes |
| Amikacina | 30 | 86.2 % | 8 | 0 % |
| Amoxicilina/Ácido clavulínico | ---- | ---- | 32 | 44.8 % |
| Ampicilina | 10 | 89.7 % | ---- | ---- |
| Carbenicilina | 100 | 89.7 % | ---- | ---- |
| Cefalotina | 30 | 82.8 % | ---- | ---- |
| Cefazolina | ---- | ---- | 32 | 44.8 % |
| Cefepima | ---- | ---- | 4 | 0 % |
| Cefotaxima | 30 | 65.5 % | ---- | ---- |
| Ceftazidima | ---- | ---- | 8 | 0 % |
| Ceftriaxona | 30 | 0% | 16 | 0 % |
| Cefuroxima acetil | ---- | ---- | 32 | 13.8 % |
| Cefuroxima sodio | ---- | ---- | 32 | 13.8 % |
| Ciprofloxacina | ---- | ---- | 4 | 51.7 % |
| Cloranfenicol | 30 | 34.5 % | ---- | ---- |
| Gentamicina | 10 | 75.9 % | 8 | 31 % |
| Meropenem | ---- | ---- | 8 | 0 |
| Netilmicina | 30 | 48.3 % | ---- | ---- |
| Nitrofurantoína | 300 | 62.1 % | 32 | 37.9 % |
| Norfloxacin | ---- | ---- | 8 | 48.3 % |
| Ofloxacin | ---- | ---- | 10 | 48.3 % |
| Pefloxacin | 5 | 70 % | ---- | ---- |
| Piperacilina | ---- | ---- | 64 | 0 |
| Ticarcilina/Ácido clavulínico | ---- | ---- | 64/2 | 0 |
| Trimetoprim/Sulfametoxazol | 25 | 70 % | 40 | 58.6 % |

---- Valores no disponibles para determinado método; ya que algunos antibióticos utilizados en los sensidiscos no se encuentran en las tarjetas utilizadas en el equipo automatizado VITEK y viceversa.

Teóricamente, al tener una mayor concentración del antibiótico, la resistencia del microorganismo a éste debe ser menor, pero los datos obtenidos experimentalmente demuestran lo contrario para los antibióticos: amikacina, gentamicina y nitrofurantoína, ya que la concentración del antibiótico en los sensidiscos es mayor en comparación con la concentración utilizada en el equipo automatizado VITEK, y el porcentaje de cepas aisladas resistentes a dichos antibióticos es mayor en los sensidiscos.

Una propuesta para justificar estos datos es que en el método para determinar la resistencia a los antibióticos por medio de sensidiscos la cantidad de microorganismos inoculada en el medio no es conocida, en cambio la concentración utilizada en el equipo automatizado VITEK es establecida de acuerdo al patrón No. 1 de Mc Farland (zona azul 67-77% T en el colorímetro VITEK), por lo tanto no es posible comparar dichos métodos entre sí, ya que las variables críticas para poder comparar ambos métodos y que se deben de tomar en cuenta son la concentración del microorganismo, concentración del antibiótico y el método de lectura de los resultados.

Lo correcto para poder comparar ambos métodos entre sí será **estandarizar** las concentraciones de los antibióticos utilizados, así como la cantidad de inóculo utilizado, el tiempo de incubación y el método de lectura.

3.4 DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS

De las 29 cepas aisladas se seleccionaron 4 cepas para determinar la posible presencia de plásmidos, detectándose en 3 de ellas plásmidos tanto de alto como de relativo bajo peso molecular (Fig 3.13).

Dichas cepas se seleccionaron de acuerdo al número de antibióticos a los que presentaron resistencia, según se determinó al utilizar la prueba de Bauer-Kirby (sensidiscos).

La cepa 1M pertenece a *Proteus mirabilis* aislada de la muestra de mercado. La cepa 5T es *Enterobacter cloacae*, la cepa 7T es *Escherichia coli* y la cepa 10T es *Salmonella nitra*. Las tres cepas (5T, 7T y 10T) se aislaron de la muestra de tianguis.

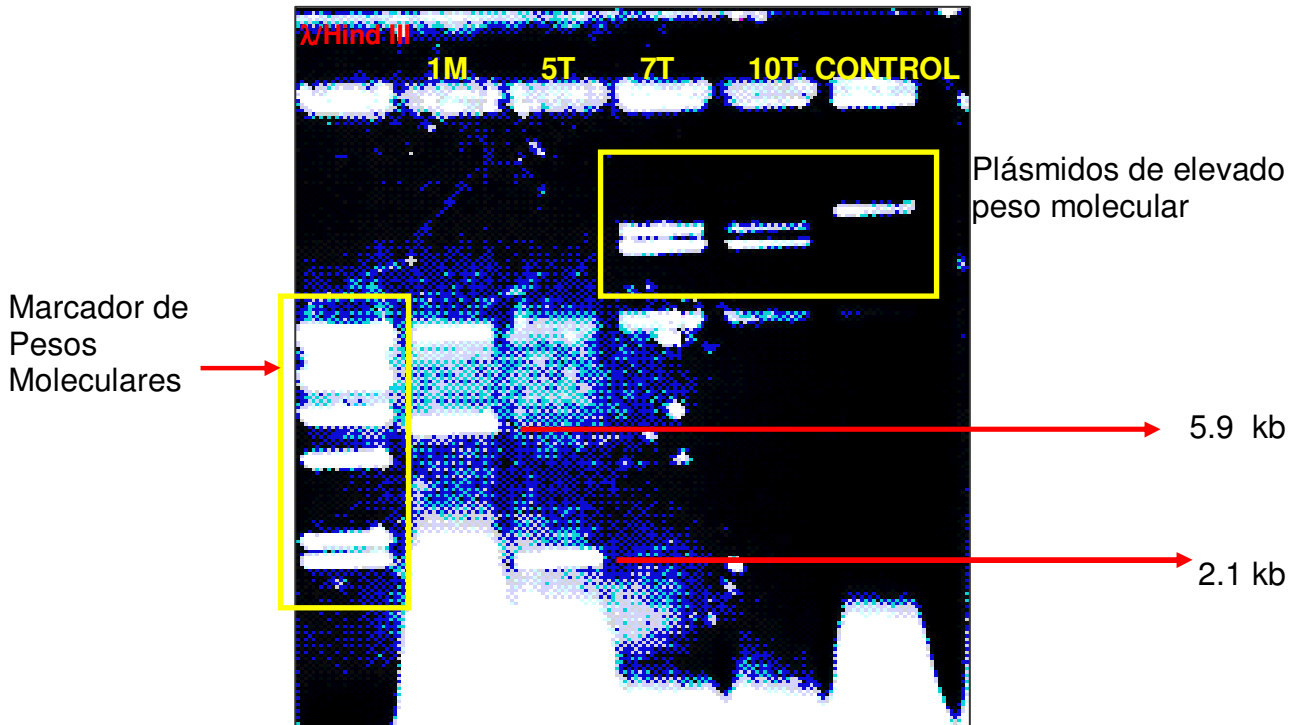
El número de antibióticos a los que presentan resistencia utilizando la técnica de Bauer-Kirby es la siguiente:

- Cepa 1M fue resistente a 11 antibióticos
- Cepa 5T fue resistente a 8 antibióticos
- Cepa 7T fue resistente a 10 antibióticos
- Cepa 10T fue resistente a 10 antibióticos

El número de antibióticos a los que presentan resistencia, de acuerdo a los resultados obtenidos, utilizando el equipo automatizado VITEK para cada una de las cepas seleccionadas es la siguiente:

- Cepa 1M fue resistente a 6 antibióticos
- Cepa 5T fue resistente a 2 antibióticos
- Cepa 7T fue resistente a 2 antibióticos
- Cepa 10T fue resistente a 1 antibiótico.

Fig 3. 13 Gel de agarosa



En la figura 3.13 puede observarse que la cepa 1M (*P. mirabilis*) presente en el carril 1M parece presentar, además del ADN genómico, una banda plasmídica de unas 5.9 kilobases de longitud. Si bien no es común que las cepas silvestres porten plásmidos de longitudes tan cortas como éste, tampoco es nada

excepcional^{55, 56}. Por su parte, en el carril 5T se localiza el ADN de *E. cloacae*. Nótese que la banda correspondiente a una longitud de 2.1 kb (por arriba del material ribonucleico degradado) no es material plasmídico sino que corresponde al ARN ribosomal 23S. Esta cepa no parece portar a ningún plásmido.

En los carriles 7T y 10T está el ADN de *E. coli* y *S. nitra*, dos enterobacterias portadoras, ambas, de dos plásmidos diferentes de alto peso molecular y que migraron por arriba del ADN genómico y cerca de la banda plasmídica control localizada en el carril denominado “control”. Nuevamente, hay múltiples reportes en la literatura de cepas portadores de varios plásmidos simultáneamente. Obviamente que, en estos casos, los plásmidos en cuestión deben de pertenecer a grupos de incompatibilidad diferentes para poder coexistir en la misma célula. Narváez y colaboradores⁴⁵, por ejemplo, determinaron el perfil plasmídico de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras clínicas, observándose en el 75% de las cepas analizadas, entre 1 y 4 bandas plasmídicas de tamaños variables (3.1 Kb – 30.4 Kb), caso contrario a lo encontrado en el presente trabajo, ya que aquí se encontraron dos bandas de elevado peso molecular para la cepa de *Escherichia coli*.

Por otra parte, un estudio realizado por White y colaboradores encontraron que 18 de 27 cepas aisladas poseían integrones con genes que conferían resistencia a los antibióticos: aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim y β -lactámicos³⁸. En el presente trabajo no se estudió la posible presencia de dichos determinantes genéticos.

Una de las recomendaciones para trabajos a futuro sería: realizar pruebas de recombinación por medio de conjugación entre bacterias, para así poder determinar si los plásmidos de las bacterias multirresistentes a antibióticos, pueden transferir los genes de resistencia a otras bacterias sensibles.

CAPITULO IV
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Los resultados de la identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas son muy similares a los obtenidos de la identificación utilizando el equipo automatizado VITEK (bioMérieux VITEK, INC).
- De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, el 28.6% de los microorganismos aislados de la muestra de pollo de tianguis pertenecen al microorganismo *Salmonella spp.*, el 14.3% a *Pseudomonas aeruginosa* y el 57.1% pertenece a enterobacterias (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter hafniae*, *Enterobacter cloacae*).
- Todas las cepas aisladas fueron resistentes al menos a 5 antibióticos. Las cepas de *Salmonella spp.* (8T, 9T, 10T y 14T) fueron resistentes a 10, 9, 9 y 7 antibióticos respectivamente.
- Los microorganismos aislados de la muestra de pollo de mercado se identificaron como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentando un máximo de resistencia a 11 antibióticos y un mínimo a 4 antibióticos.
- Los microorganismos aislados de la muestra de pollo de supermercado fueron identificados como *Hafnia alvei* (1S, 2S y 3S) los cuales presentaron resistencia a 7, 7 y 9 antibióticos respectivamente.
- Por medio del equipo automatizado VITEK los resultados de la identificación fueron: El 28.6% de los microorganismos aislados de la muestra de pollo de

tianguis pertenecen al microorganismo *Salmonella entérica* serotipo *nitra*, el 14.3% a *Pseudomonas aeruginosa* y el 57.1% pertenece a enterobacterias (*Proteus mirabilis*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*). Todas las cepas aisladas fueron resistentes al menos a 1 antibiótico. Las cepas de *Salmonella entérica* serotipo *nitra* fueron resistentes a 1 y 2 antibióticos.

- Los microorganismos aislados de la muestra de pollo de mercado se identificaron como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter braakii* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentando un máximo de resistencia a 9 antibióticos y un mínimo a 2 antibióticos.
- Los microorganismos aislados de la muestra de pollo de supermercado fueron identificados como *Hafnia alvei* y presentaron resistencia a 2 antibióticos.
- Los resultados de la resistencia a los antibióticos empleando la técnica de Bauer-Kirby son diferentes a los obtenidos mediante el equipo automatizado VITEK (bioMérieux VITEK, INC).
- De los resultados obtenidos al utilizar la técnica de BAUER-KIRBY se observó que el 27.6% de las cepas aisladas presentaron resistencia al menos a 8 antibióticos y sólo el 3.4% fue resistente al menos a 4 y 11 antibióticos; con lo cual se puede decir que las cepas estudiadas presentan multirresistencia a los antibióticos de por lo menos a 4 antibióticos.
- Al utilizar el equipo automatizado (bioMérieux VITEK, INC) se observó que el 41.4% de las cepas aislada presentaron resistencia a 2 antibióticos y el 31% fueron resistentes a 9 antibióticos.

- De las 4 cepas seleccionadas para determinar la presencia de plásmidos, en las cuatro cepas se detectaron plásmidos que presentaron los siguientes tamaños: *Escherichia coli* 32Kb, *Salmonella nitra* 35Kb, *Proteus mirabilis* 23.1Kb y 5.9Kb; y finalmente *Enterobacter cloacae* 2.1Kb.

PERSPECTIVAS

Resulta indispensable desarrollar nuevos antibióticos para asegurar la disponibilidad de tratamientos eficaces contra infecciones bacterianas agresivas. Del mismo modo, también es esencial que estos nuevos medicamentos en concreto, al igual que los anteriores, se usen de una manera más restringida y siempre apoyada en sólidos conocimientos médicos.

Además, muchos antibióticos son compuestos químicos estables que no se catabolizan en el cuerpo y que permanecen activos después de su excreción. En la actualidad, los antibióticos contribuyen considerablemente al creciente problema de las sustancias médicas activas presentes en el ambiente ¹⁵.

La nueva estrategia se centra en:

- **Nuevas clases de medicamentos anti-infecciosos**

En los últimos años no se ha descubierto prácticamente ninguna clase nueva de antibióticos. En la actualidad, el precio medio del desarrollo de un nuevo medicamento es de unos 500 millones de € y los incentivos industriales parecen no bastar para superar esta barrera con suficiente velocidad como para asegurar la continua disponibilidad de medicamentos antiinfecciosos nuevos y eficaces. Es posible que las

aplicaciones de la ingeniería genética nos aporten nuevas generaciones de medicamentos con mayor rapidez y a un menor precio ¹⁵.

- **Test de diagnóstico**

La prescripción correcta de los antibióticos adecuados se logra tan sólo si los médicos tienen a su disposición test de diagnóstico rápidos para identificar a los agentes patógenos y sus propiedades de resistencia. La moderna tecnología de ADN es esencial para acelerar el desarrollo de nuevos test de diagnóstico más precisos que, una vez disponibles, garanticen la creación de los incentivos adecuado para fomentar su uso ⁴¹.

- **Desarrollo de vacunas**

El control de la infección mediante la vacunación es un modo indirecto muy eficaz y rentable para reducir la necesidad de antibióticos en primera instancia. En este sentido, la ingeniería genética abre un nuevo y prometedor camino para el desarrollo de vacunas ¹⁵.

- **Vigilancia**

La vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antibióticos en patógenos humanos y animales es un componente esencial de esta estrategia. Se ha de realizar un seguimiento del consumo de antibióticos y establecer un vínculo entre las conclusiones proporcionadas por los datos sobre resistencia y los resultados clínicos ³⁰.

- **Un único problema con muchas facetas**

El problema de la resistencia a los antibióticos tiene sin duda muchas facetas y conlleva una amplia gama de consecuencias socioeconómicas y políticas. En él, se tratan muchos aspectos de la economía de la sociedad y de la salud como, por ejemplo, los hábitos de prescripción y la formación de los médicos, los reembolsos de gastos médicos y las expectativas de la opinión pública. Incluso va más allá de la medicina y se adentra en la higiene animal, la agricultura y la industria de los alimentos y asuntos medioambientales. Para que el nuevo planteamiento tenga éxito, es necesario tener en cuenta toda esta serie de factores ^{30, 41}.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Álvarez, F., Rodríguez S., 2003. Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. Rev Esp Quimioterap. 16 : 394-397.
2. Alvseike O., 2002. Tendencia de las infecciones por *Salmonella Typhimurium* multirresistente en Noruega. Euro Surveill. European Communicable Disease Bulletin. 7: 5-7.
3. Anderson, A., 2003. Public Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Food Animals in the United States. Microbial Drug Resistance. 9 : 373-379.
4. Benavides, P., Aldama, O., Vazquez, H., 2005. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. Salud pública de México. 47: 219-226.
5. Bergoglio, R., "Antibióticos" Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 5ª edición pp 3-12. 1993.
6. Birnboim, H., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7 : 1513-1523.
7. Brenner, D., 1978. Taxonomic and Nomenclature Changes in *Enterobacteriaceae*. HEW Publication No. (CDC) 78-8356, U.S. Department of health, Education and Welfare, Atlanta, GA.
8. Cerezo, G., 1983. Prueba de Bauer-Kirby para la susceptibilidad a los antimicrobianos. Infectología III. 3: 325.
9. Davies, B., "Microbiology". Ed. Harper & Row publishers, Inc., Hagerstown, MD. 3rd ed. 1980.
10. Davies, J., Wright, G., 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends in Microbiology. 5: 234-240.
11. Departamento de Biología Molecular. 1998. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública Mexicana. 36: 428-438.
12. Dontorou, C., Papadopoulou, C., 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Intern J Food Microbiol. 82: 273-279.
13. Duffy, G., 1996. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella spp.* on Irish retail meat products. Food Microbiol. 16: 623-631.
14. Edwards, P.R. 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*, 3rd es. Burgess Publishing Co., MN.
15. Embid, A., 1999. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. Revista de Medicinas Complementarias. Medicina holística. 53 : 45-55.

16. Ewing, W., 1973. Differentiation of *Enterobacteriaceae* by Biochemical Reactions, revised. DHEW publication No. (CDC) 75-8270, Atlanta.
17. Fehlhaver, K. "Higiene Veterinaria de los alimentos" Ed. Aeribia. Zaragoza España pp 100-102. 1995.
18. Feinman, S., 1998. Antibiotics in Animal Feed-Drug Resistance Revisited. The news magazine of the American Society for Microbiology. 64 : 24-30.
19. Finegold, S.M. Diagnostic Microbiology, 6th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis
20. Giraldi, G.L. 1978. Glucose Non-fermenting Gram-negative Bacteria in Clinical Microbiology. CRC Press, Inc., West Palm Beach, FL.
21. Grande, C., 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. Cienc. Tecnol. Aliment.3: 39-47.
22. Henriques, B., Normark, S., 2002. Evolution and Spread of antibiotic resistance. J Internal Med 252: 91-106.
23. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K., 2004. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186 : 8172-8180.
24. Leverstein-van, M., Blok H., Donders A. 2003. Multidrug Resistance among *Enterobacteriaceae* Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. The J Infect Diseases. 187: 251-259.
25. Meng, J., Zhao, S., 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* 0157:H7 and 0157:NM isolated from animals, food and humans. J. Food Prot. 61: 1511-1514.
26. Molbak, K., Gerner-Smidt P., Wegener H., 2002. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*. Emerging Infectious Diseases. 8 : 514-515.
27. Poole, K., 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Current Opinion Microbiol. 4 : 500-508.
28. Presscot, J., "Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine" Ed. Iowa State University Press. 3^a ed. pp 27-49. 2000.
29. Radu, S., Ling, O., 2001. Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFG analyses. J. Microbiol. Methods. 46 : 131-139.
30. Rahal, J., 1999. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. JAMA. 280 : 1233-1237.
31. Romero, R., "Microbiología y Parasitología Humana" Ed. Panamericana. España 41-49. 1993.
32. Rowe, D., Mazel D., 1992. Resistance gene capture. Current Opinion Microbiol. 2 : 483-488
33. Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. Current Opinion Microbiol. 4 : 496-499.
34. Thompson, R., 1986. A plasmid transfer. J. Antimicrob Chemother. 18: 13.

35. Trish, P., 1999. La amenaza de la resistencia a la Vancomicina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 19 : 239-251.
36. Trolloenier, H., "Antibióticos en Medicina Veterinaria" Ed Aeribia Zaragoza España pp 13-40. 1994.
37. Wegener, H., 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion Microbiol*. 6 : 439-445.
38. White, D., Zhao, S., 2001. The Isolation of Antibiotic-Resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med*. 345 : 1147-1154.
39. Witte, W., 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*. 279 : 996-997.
40. Wright, G., 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion Chemical Biol*. 7: 563-569.
41. Yates, R., 1999. New intervention strategies for reducing antibiotic resistance. *Chest*. 115 : 243-275.
42. Zhao, C., 2001. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Applied and Environ Microbiol*. 67: 5431-5436.
43. NOM- SSA1-114-1994 Bienes y servicios. Método para la determinación de *salmonella* en alimentos.
44. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 9^a ed. pp 175. 1994
45. Narváez, E., Álvarez, M., 2005. Susceptibilidad a antibióticos y metales pesados y Perfil plasmídico en *Escherichi coli*. *Bol Centro Invest Biol*. 39 : 55-66
46. The Copenhagen Recommendations. 1998. Report from the invitational EU conference on The Microbial Threat. Copenhagen, Denmark. Sept. 9 – 10
47. You, J., Moon, B., Baek, B., Li, L., 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* 0157 from cattle in Korea. *Intern J Food Microbiol*. 106: 74-78.
48. Gold, H., 1996. Antimicrobial-drug resistance. *New England Journal of Medicine*. 335: 1445-1453.
49. Government Official Reports, no. 132. Antimicrobial Feed Additives, Stockholm, Sweden, 1997
50. F.C. Tenover and J.E. McGowan, 1996. A Global Theme Issue: Bibliography of References *Am. Journal Med. Sci*. 311, 9
51. J. Davies, 1994. Harnessing the Power of the Genome in the Search for New Antibiotics *Science* 264, 375
52. Mulvey MA. Schilling JD, Hultgren SJ., 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 69: 4572-9.
53. Whiteley M. Bangera MG. Bumgarner RE et al., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 413: 860-4

54. Spoering AL. Lewis L. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have a similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 183: 6746-51.
55. Macrina F.L. Kopecko DJ. 1978. A Multiple Plasmid-Containing *Escherichia coli* Strain: Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules. *Plasmid* 1: 417-420
56. Cozzarelli NR. Kelly RB. And Kornberg A. 1968. A minute circular DNA from *Escherichia coli* 105. *Biochemistry.* 60: 992-999

APENDICE

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Medio Luria

NaCl 5 g
Tryptona 10 g
Extracto de Levadura 5 g
Agar 12 g
H₂O destilada 1 L

Esterilizar en Autoclave

Medio L

NaCl 10 g
Caseína 10 g
Extracto de Levadura 10 g
H₂O destilada 1 L

Esterilizar en Autoclave

Buffer TE

Tris- HCL 0.01 M pH 7.5
EDTA 0.01 M
H₂O destilada 100 mL
Esterilizar en Autoclave

Solución I

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

Solución II

NaOH 0.2N
SDS 1.0 %

Solución III

Acetato de Potasio 5M
Ácido Acético 11.5 mL
H₂O destilada 28.5 mL