



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BACTERIAS MULTIRESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS AISLADAS DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO  
FRENTE A AGENTES NATURALES CON EFECTO BIOCIDA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**TANYA PAULINA TREJO MUÑÚZURI**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dr. Carmen Giral Barnes

VOCAL: Q.F.B. María Elsa Escudero García

SECRETARIO: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

1er SUPLENTE: Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa

2do SUPLENTE: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre\_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:** M. en C. Raquel Ortega Muñoz\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** Tanya Paulina Trejo Muñúzuri \_\_\_\_\_

# *Dedicatoria.*

*A mis padres:*

*M.C. Hilda Lourdes Muñúzuri Arana.  
Dr. Angel Gerardo Trejo Castillo.*

*Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.*

*Hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, les agradezco el ser un ejemplo de constante superación académica, su cariño, sus sabios consejos y la paciencia para verme culminar este proyecto con éxito.*

*Este es el fruto de un esfuerzo y sacrificios mutuos.*

*¡Los amo!*

# *Agradecimientos.*

*A mi asesor el Dr. Fernando Montiel Aguirre, una de las personas que más admiro y respeto, quien se encargó de dirigir este proyecto y a quien reconozco como mi mejor guía.*

*A la M.C. Raquel Ortega Muñoz, por su gran ayuda a lo largo del proyecto, por sus consejos y opiniones que sin duda contribuyeron a que este trabajo se realizara de la mejor manera.*

*A la Profra. Norma Castellanos, por su valioso apoyo durante el proyecto para la caracterización de las cepas aisladas, muchas gracias por su tiempo y paciencia.*

*A mi familia, a mi hermano, a mi cuñada, a mi pequeña Andy, a mis tíos, primos y a las pequeñas sobrinas Garibo, que, sin darse cuenta, han dado constantemente alegría y motivación a mi vida.*

*A mi abuelo, por su apoyo, paciencia y preocupaciones a lo largo de mi estancia en esta ciudad, por ser mi acompañante en esta nueva etapa de mi vida.*

*A mi familia del representativo de fútbol rápido de la UNAM. A Capi, Abril, Ale Montero, Thalia, Lilo, Brenda, China, Mau, Dany, Rudy, Gene, Alis, Tehas, Isa, Ana “duende”...por ser amigas, compañeras, hermanas y por estar conmigo y compartir las derrotas y triunfos deportivos. Es turno de compartir con ustedes este triunfo académico. Gracias a todas y cada una de mis compañeras, sin excluir a nadie, las que están ahora y las que estuvieron en algún momento, todas han dejado una huella muy importante en mi formación universitaria y han contribuido en gran medida a que esta ciclo académico llegue a su fin de manera exitosa.*

*A Juan Carlos Jiménez Castellanos por su apoyo y valiosa contribución en este trabajo, pero sobre todo, por su amistad incondicional. ¡Te quiero hermano!*

*A mis compañeros del laboratorio Nare, Paty, Moni, Angélica, Nacho, David, Rafa, Josué, Sra. Paty, ya que todos han contribuido con un excelente ambiente de trabajo y, de gran manera, a mi formación académica.*

*A mis amigos y compañeros en la Facultad de Química, Gaby Pineda, “Bob”, Rodrigo Fadrique, y todos aquellos que han compartido conmigo equipos, clases, desvelos y fiestas, gracias por haber sido parte de mi totalmente placentera vida universitaria.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y, en particular a la Facultad de Química, por ser mi hogar durante este tiempo, por darme todas las armas académicas necesarias para poder continuar por este camino, por enseñarme los valores y compromisos de un verdadero universitario, por enseñarme el amor y respeto a esta institución. ¡Por mi raza hablará el espíritu!*

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO 1 Introducción.**

1.1. Antibióticos	
1.1.1. Generalidades.....	7
1.1.2. Historia.....	8
1.1.3. Mecanismos de acción.....	11
1.2. Uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano.....	18
1.2.1. Efectos de los antibióticos en la eficiencia del crecimiento animal.....	22
1.3. Resistencia a los antibióticos.....	25
1.3.1. Desarrollo de resistencia.....	26
1.3.2. Origen de los genes de resistencia.....	30
1.3.3. Elementos genéticos móviles.....	31
1.3.4. Alternativas para el desarrollo de resistencia.....	40
1.4. Propiedades y uso de <i>Allium sativum</i> .....	50
1.4.1. Historia.....	51
1.4.2. Propiedades antimicrobianas.....	53
1.4.3. Química y mecanismo de acción.....	54

## **CAPÍTULO 2**

2.1. Objetivo general.....	57
2.2. Objetivos particulares.....	57
2.3. Hipótesis.....	58
2.4. Justificación.....	58

### **CAPÍTULO 3 Materiales y métodos.**

3.1. Aislamiento.....	61
3.2. Purificación.....	61
3.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	62
3.4. Caracterización e identificación bioquímica.....	63
3.5. Preparación del extracto acuoso de ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	67
3.6. Pruebas para determinar la sensibilidad al extracto acuoso de ajo ( <i>Allium sativum</i> )	68
3.7. Extracción de ADN total y ADN plasmídico.....	70
3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	73

### **CAPÍTULO 4 Resultados.**

4.1. Aislamiento y purificación.....	75
4.2. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	80
4.3. Caracterización e identificación bioquímica.....	81
4.4. Pruebas para determinar la sensibilidad al extracto acuoso de ajo ( <i>Allium sativum</i> )	83
4.5. Extracción de ADN total y ADN plasmídico.....	90
4.6. Observación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	92

### **CAPÍTULO 5 Discusión.....**

### **CAPÍTULO 6 Conclusiones.....**

### **REFERENCIAS.....**

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antibióticos

### 1.1.1. Generalidades

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos) ó sintetizados por métodos de laboratorio, cuya función es inhibir el crecimiento o destruir a otros microorganismos.

Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano.

Los términos antimicrobiano y quimioterapéutico han sido utilizados de manera indistinta, para designar sustancias químicas definidas, con actividad contra microorganismos específicos (Patiño, D., 2003).

El término antibiótico fue propuesto para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. El término significó, durante algún tiempo, sustancia extraída de seres vivos, ya fueren bacterias, hongos o algas, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos. Su origen viene del griego *anti* (“contra”) y *bios* (“vida”). Los agentes quimioterapéuticos son sustancias con actividad antimicrobiana (microbicida o microbiostática) con toxicidad suficientemente baja como para poder ser administrados a un organismo por la vía adecuada, hasta alcanzar y mantener concentraciones eficaces en los tejidos. Los antibióticos constituyen una clase especial de agentes quimioterapéuticos (Lanosa, R., 1997).

La acción de un antibiótico se mide en términos de espectro bacteriano. Se observa que algunos antibióticos actúan en un sector restringido (en grupos selectos de microorganismos), por esta razón se les denomina “de espectro limitado”. Otros antibióticos lo hacen en muchos grupos de microorganismos por eso se les denomina “de amplio espectro”. Algunos antibióticos actúan en un



sector muy limitado (en un solo grupo de microorganismos) a estos se les llama “de espectro selectivo” (Norby, S., 1991).

Según el efecto de los antibióticos sobre la bacteria, se han clasificado en bacteriostáticos, a aquellos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento; y bactericidas, a los que poseen la propiedad de destruir a la bacteria, su acción es irreversible (Madigan, M., 2000).

### **1.1.2. Historia**

Es un poco difícil definir cuándo comienza la historia de los antibióticos. Sin embargo, es posible citar que en los primeros años del siglo XX, cuando Paul Ehrlich anunció la eficacia del *salvarsán* para el tratamiento de la sífilis, muchos pensaron que la lucha contra las enfermedades infecciosas había sido ganada. Lo promisorio de este hallazgo, sin embargo, no sirvió como estimulante de la investigación y el descubrimiento, ya que, en el año 1914 estalla la primera guerra mundial y, durante seis largos años, las urgencias impiden que se piense en desarrollos futuros.

Después de 1920, nuevamente se inicia el proceso creador y surgen novedades en el terreno de los protozoodicidas como la *atebrina* para el tratamiento del paludismo, o de la *triparsamida* para el combate de la enfermedad del sueño (Dámaso, D., 1990).

En 1936, los diarios estadounidenses atraían al lector con una noticia: Franklin Delano Roosevelt Jr., (hijo del 32º presidente estadounidense, Franklin Roosevelt), estaba muy enfermo, infectado. Pero había muchas esperanzas, dado que se disponía de un medicamento capaz de matar microorganismos dentro de la corriente sanguínea. Finalmente, el joven se salvó. Así el público conoció el *Prontosyl*, la primera sulfamida. En 1935 Domagk ya había presentado su primera monografía sobre eficacia del *Prontosyl* (Errecalde, J., 2004).

Se pensó que probablemente, el siglo XX iba a ser conocido como el siglo de las sulfamidas. Ocurre que se ignoraba lo que desde hacía tiempo estaba ocurriendo en el Hospital St. Mary de Londres. Ahí, Alexander Fleming trabajaba intensamente, multiplicando diversas variedades de gérmenes causantes de infecciones supuradas. En el curso de su investigación, una fortuita observación, analizada con espíritu crítico y enorme base científica, produjo el inicio de un proceso que culminó con la obtención de la *penicilina* (Young, L., 1994).

En el año 1939 se produce un nuevo descubrimiento, René Dubos de la Fundación Rockefeller, investigando los gérmenes del suelo, descubre la *tirotricina*. Era un producto del metabolismo del *Bacillus brevis*. Esta droga era extremadamente eficaz, pero muy tóxica. Solamente se la podía utilizar en tratamientos locales. Se trata de un hallazgo al que la historia no le dedica la enorme importancia que realmente tiene (Errecalde, J., 2004).

Howard Florey, un investigador australiano que trabajaba en Oxford, retomó el trabajo de desarrollo de la *penicilina*. Demostrar nuevamente la eficacia, y además la inocuidad de la *penicilina* fue la primera tarea, que fue muy compleja, especialmente por las pequeñas cantidades de antimicrobiano de que se disponía y la poca pureza en que se encontraba. Los primeros éxitos clínicos fueron asombrosos, pese a algún fracaso inicial por falta de medicamento para completar el tratamiento.

Dada la gran limitante de las bajas cantidades de *penicilina*, se debió pasar a la etapa de elaboración del fármaco a escala industrial. En los primeros años de la década del 40, los investigadores descubrieron una nueva variedad del hongo que se podía cultivar en profundidad y eso permitió la utilización de grandes tanques de fermentación. La revolución de los antibióticos había comenzado (Appleton, A., 2001).

**Tabla 1. Historia de los antibióticos (Patiño, D., 2003).**

Año	Descubrimiento
1900-1915	Ehrlich utiliza compuestos químicos como “balas mágicas” selectivas hacia microorganismos, pero inofensivas para las personas o animales superiores. En 1909 descubre que el “salvarsán” es efectivo contra la sífilis.
1929	Fleming descubre la penicilina, el primer antibiótico natural, pero fracasa en su intento de purificarlo.
1932-1935	Dogmagk sigue con los estudios de Ehrlich, descubre la acción del rojo de prontosilo (primera sulfamida).
1940	Woods descubre el mecanismo de acción de las sulfamidas.
1944	Waksman en estudios con microorganismos del suelo descubre la estreptomicina. Comienza la época dorada de los antibióticos (quimioterapéuticos naturales).

En los años siguientes, comenzaron a descubrirse nuevos antimicrobianos. Se transcriben algunos de los hallazgos más trascendentes: En la década del 40, *estreptomicina*, *cloranfenicol* y *clortetraciclina*. En la década del 50 *eritromicina* y *vancomicina*. En la del 60, *gentamicina*, *ampicilina*, *cefalotina* y *amikacina*. En la del 70, *cefalexina*, *carbenicilina*, *cefoxitina* y *cefaclor*. En la del 80, *cefotaxima*, *moxalactam*, combinación *ácido clavulónico-amoxicilina*, combinación *imipenem-cilastatina*, *aztreonam*. En los 90 aparecen las *fluoroquinolonas*, nuevos *macrólidos*, y nuevas *cefalosporinas* y agentes antivirales más efectivos. Luego del 2000 se registra la aparición de *quinolonas* de amplio espectro (Errecalde, J., 2004).

Las enormes diferencias que existen entre las células bacterianas y las células de los mamíferos, hacen que, en muchas oportunidades los blancos de los antimicrobianos en una bacteria, no existan en las células del hospedero o, en todo caso, que esos blancos sean suficientemente distintos como para que las diferencias en afinidad sean tan marcadas que expliquen la acción selectiva sobre la bacteria. La célula bacteriana es procariota (carece de núcleo desarrollado), a diferencia de los protozoarios, hongos o las células de animales superiores. La penicilina es, quizás, el más claro ejemplo de acción quimioterápica, dado que actúa sobre una estructura de la bacteria que no se encuentra en las células

animales: la pared celular. Otros antimicrobianos, por su parte, no son tan perfectos en su actividad quimioterápica, dado que actúan sobre estructuras presentes en bacterias y animales superiores, aunque con mayor afinidad sobre los receptores bacterianos. Esto ocasiona que, en estos casos, dosis elevadas del agente quimioterápico, generen algún tipo de toxicidad en el hospedero (Madigan, M., 2000).

### **1.1.3. Mecanismos de acción.**

Para que un antibiótico ejerza su acción frente a un determinado microorganismo, tiene que penetrar en la barrera superficial de la bacteria para luego ir a localizarse en el punto diana de acción del mismo. En este contexto, los mecanismos moleculares que permiten la acción directa de un antibiótico sobre la estructura bacteriana son muy complejos y se resumen fundamentalmente a cinco (Nuñez, B.):

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
2. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.
3. Inhibidores de la síntesis proteica.
4. Inactivación funcional de la membrana citoplasmática.
5. Inhibición de las enzimas inactivadoras de antimicrobianos.

#### **1.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.**

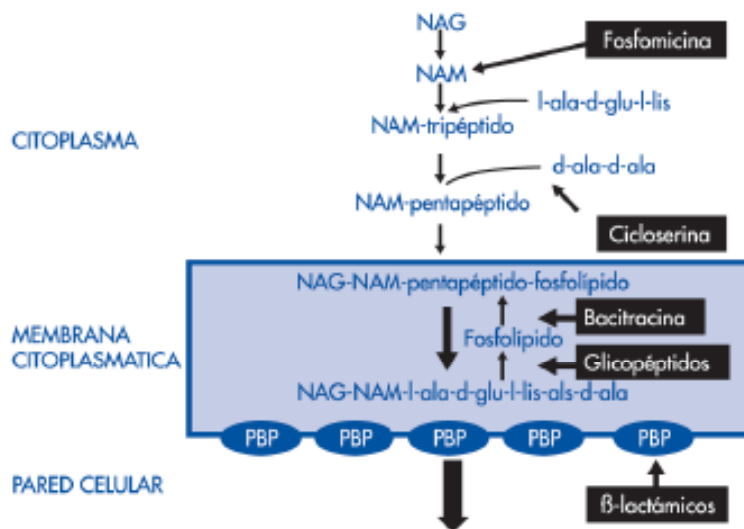
Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular bloquean la síntesis del péptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento. Estos agentes son considerados bactericidas (Cavallieri, S., 2005).

Actúan inhibiendo cualquiera de los tres mecanismos de la biosíntesis de la pared celular:

a. Inhibición de la fase citoplasmática. Actúan en el citoplasma bacteriano inhibiendo la síntesis de los precursores del pentapéptido N-acetil-murámico. En este proceso actúa la fosfomicina, la daptomicina, y la cicloserina (Cordiés, L., et al., 1998).

b. Inhibición de la fase de transporte de precursores. Este mecanismo actúa dentro de la membrana citoplasmática impidiendo la d-fosforilación de sus precursores. La bacitracina es uno de los antibióticos que actúan en esta fase (Cordiés, L., et al., 1998).

c. Inhibición de la organización estructural del péptidoglicano. Mediante este mecanismo se bloquea selectivamente la transferencia del polímero lineal a la pared celular existente, interfiriendo la organización estructural definitiva del péptidoglicano, evitando su polimerización al ligarse a las Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP), como lo hacen todos los beta-lactámicos. En tanto que los glucopéptidos evitan la polimerización del péptidoglicano en la proximidad de la membrana citoplasmática bacteriana (Allen, N.E., Nicas. T.I., 2003).



**Figura 1.** Inhibición de la síntesis de pared celular (Nuñez, B.).

En las bacterias Gram-negativas, los antimicrobianos beta-lactámicos entran a la célula a través de los canales porínicos de la membrana externa. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las proteínas de unión de

penicilina (PBPs) que son enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, ubicadas en la superficie de la membrana citoplásmica, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a lisis celular y muerte.

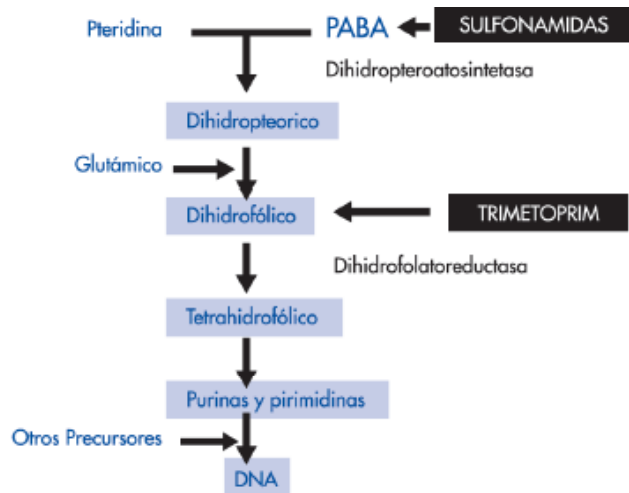
Puesto que las bacterias Gram-positivas no poseen una membrana externa, los antimicrobianos beta-lactámicos se difunden a través de la pared celular. Los siguientes pasos son similares a aquellos para las bacterias Gram-negativas. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las PBPs, lo que resulta en paredes celulares debilitadas y lisis celular (Cavallieri, S., 2005).

## 2.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

Los antibióticos que actúan en la transcripción y replicación del ADN, ejecutan su acción en varias fases de los complejos procesos en los que intervienen enzimas, sustratos activados y un molde de ADN sobre el que se originan cadenas complementarias de ARN o ADN (Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009). De esta manera tenemos:

a. Inhibidores de la síntesis de precursores. Lo hacen interfiriendo con la síntesis del ácido fólico con la consecuente inhibición de la síntesis de las bases púricas y pirimidínicas. Con este mecanismo actúan las sulfonamidas y el trimetoprim.

Para muchos organismos el ácido para-amino benzoico (PABA) es un metabolito esencial y está involucrado en la síntesis de ácido fólico, un importante precursor para la síntesis de ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son estructuras análogas del PABA y compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato-sintetasa. El trimetoprim actúa en la ruta de síntesis del ácido fólico en un punto posterior al de las sulfonamidas. Este inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa. El trimetoprim y las sulfonamidas se pueden usar por separado o en conjunto. Cuando se usan en conjunto producen un bloqueo secuencial de la ruta de síntesis del ácido fólico y tienen un efecto sinérgico. Tanto el trimetoprim como las sulfonamidas son bacteriostáticas (Masters, P.A., et al., 2003).



**Figura 2.** *Inhibición de la síntesis de precursores de ácidos nucleicos (Nuñez, B.).*

b. Inhibidores de la replicación del ADN bacteriano. Mediante este mecanismo de acción, las quinolonas se fijan con mayor afinidad a la subunidad A de la ADN girasa o topoisomerasa II.

La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar al ADN durante su replicación. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que le permiten desenrollarse. Las quinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular (Cavallieri, S., 2005).

c. Inhibidores de la transcripción del ADN bacteriano. Actúan inhibiendo el crecimiento bacteriano al bloquear la síntesis del RNA mensajero y ribosómico mediante la unión a la ARN polimerasa ADN dependiente, lo que bloquea la síntesis de ARN y resulta en la muerte de la célula. Las Rifamicinas como la rifampicina ejercen su acción mediante este mecanismo (Villain-Guillot, P., et al., 2007).

d. Inhibidores de la polimerización de los ácidos nucleicos. Mediante este mecanismo, antibióticos como la actinomicina D se fijan al ADN impidiéndole ejercer su función como molde; y otros como los nitroimidazoles, alteran la

estructura nativa del ADN provocando escisiones, puentes covalentes intercatenarios, o rupturas intracatenarias (Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009).

### 3. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA

Los antibióticos actúan en cualquiera de las cuatro fases secuenciales de la síntesis proteica bacteriana (Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M., 2007):

a. Inhibidores de la activación. Solo actúan en bacterias Gram-positivas. La mupirocina es un bacteriostático que inhibe la isoleucil-ARNt sintetasa (Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009).

b. Inhibidores de la activación y formación del complejo inicial. Los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomicina) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros. Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida (Cavallieri, S., 2005).

c. Inhibidores de la fijación del complejo aminoacil-ARN-t al ribosoma. Por medio de este mecanismo, las tetraciclinas intervienen con la fijación del complejo aminoacil-ARN-t sobre el sitio aceptor A en el ribosoma. Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida. La acción de las tetraciclinas es bacteriostática (Shlaes, D.M., 2006).

d. Inhibidores de la transpeptidación. Mediante este mecanismo el cloranfenicol se fija en la subunidad ribosómica 50S e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento.



Los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas de esta forma son bacteriostáticos (Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009).

e. Inhibidores de la Translocación. Por este mecanismo, los macrólidos (eritromicina, azitromicina y claritromicina) y las lincosamidas (clindamicina) se adhieren a la subunidad ribosómica 50S en el sitio P, provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos (Retsema, J., Fu, W., 2001).

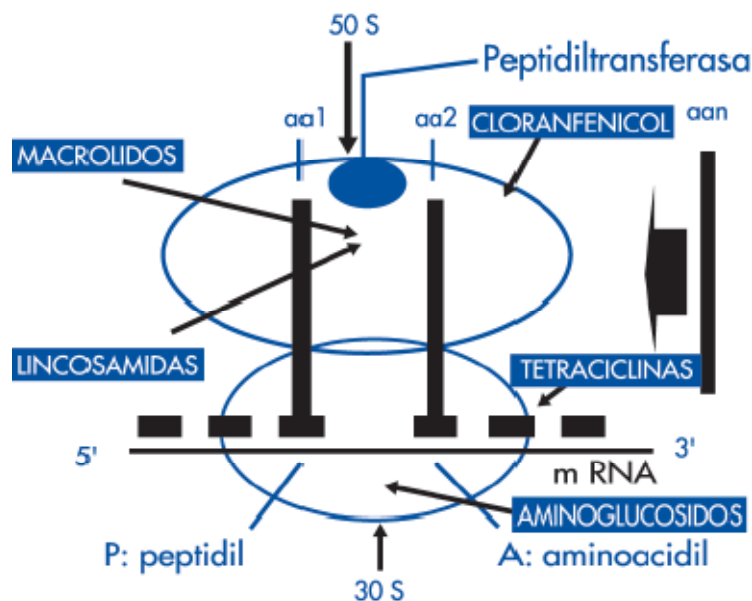


Figura 3. Inhibidores de la síntesis proteica (Nuñez, B.).

#### 4. INACTIVACIÓN FUNCIONAL DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

Los antibióticos de este grupo tienen efecto bactericida, pero no debe olvidarse que también tienen gran toxicidad sobre las células eucariotas. Actúan con diversos mecanismos sobre la membrana citoplasmática bacteriana:

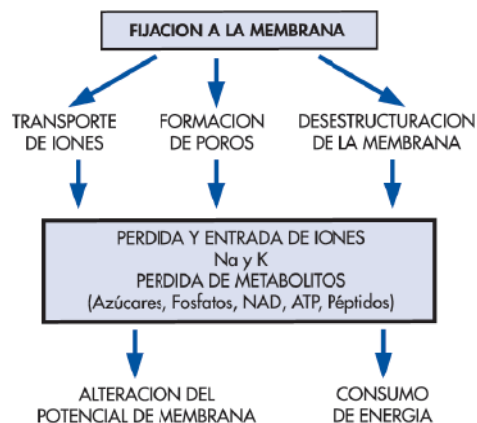
a. Ionóforos. Son antibióticos polipeptídicos cíclicos como la valinomina o las tirocidinas A y B. Estos compuestos tienen una estructura circular peculiar, es hidrofóbica en el exterior e hidrofílica en el interior. Los ionóforos incorporan cationes monovalentes en su interior, permitiéndoles cruzar la bicapa lipídica. La

penetración elevada de iones potasio altera el potencial eléctrico y el gradiente químico existente en la membrana, alterando su función (Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009).

b. Formadores de Poros. Los antibióticos de este grupo, como la gramicidina y polimixina, provocan el paso selectivo de moléculas a través del canal abierto por ellos.

Se difunden a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles hacia la membrana citoplásmica. Estas se unen a la membrana citoplásmica, la alteran y desestabilizan. Esto causa el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula lo que resulta en muerte celular (Cavallieri, S., 2005).

c. Desestructuración de la membrana citoplasmática. Mediante este mecanismo los antifúngicos poliénicos se fijan a los esteroides de los hongos; por ejemplo, la daptomicina ejerce un efecto sobre la membrana que determina una pérdida del  $K^+$  intracelular (Kanafani, Z.A., Corey, G.R., 2007).



**Figura 4.** *Inactivadores funcionales de la membrana celular bacteriana (Nuñez, B.).*

## 5. INHIBICIÓN DE ENZIMAS INACTIVADORAS DE ANTIMICROBIANOS

Existe un grupo de fármacos que en sí mismo no tiene un efecto antibiótico, estos son los inhibidores de las beta-lactamasas como el sulbactam, el ácido clavulónico y el tazobactam. Estas sustancias actúan como moléculas suicidas que se fijan a

las beta-lactamasas formadas por las bacterias, actuando de forma competitiva con los beta-lactámicos por su analogía estructural, permitiendo a éstos ejercer su mecanismo de acción ligándose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y de esta manera inhibiendo la formación de la pared celular (Georgopapadaku, N.H., 2004).

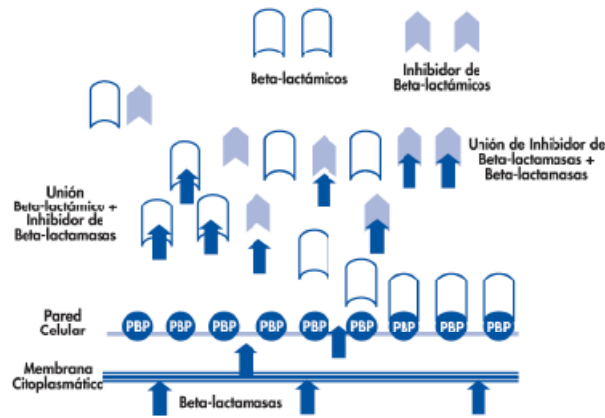


Figura 5. Inhibidores de beta-lactamasas (Nuñez, B.).

## 1.2. Uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano.

La utilización de antimicrobianos y anti-infecciosos en medicina veterinaria tiene tanta antigüedad como su uso en medicina humana.

En medicina veterinaria, en la década del 50, los antibióticos comenzaron a ser utilizados para tratamiento de animales enfermos, y cuando eso era considerado necesario, tratar animales asintomáticos que convivían con los enfermos, esto es, tratamientos grupales profilácticos (Errecalde, J., 2004).

En esa época, alimentando cerdos con desechos de fermentación de tetraciclinas, se descubrió que esos cerdos crecían más que los que recibían otros alimentos. Al asociarse la respuesta lograda con el origen del alimento, se estaba descubriendo la capacidad de los antibióticos de contribuir al crecimiento de los animales, mejorando los índices de conversión, esto es, crecer más con la misma cantidad

de alimento. Este es el inicio histórico del uso de antibióticos como promotores del crecimiento cuando son adicionados en cantidades subterapéuticas a los alimentos (Errecalde, J., 2004). Los grupos de antibióticos que, en general se utilizaban para este fin eran penicilinas y tetraciclinas.

El uso de antimicrobianos en relación con los animales tiene tres formas: como agentes terapéuticos, como agentes profilácticos y como promotores del crecimiento.

### Agentes terapéuticos

Son medicamentos que se utilizan para controlar las enfermedades infecciosas (microorganismos patógenos, ecto y endo-parásitos y hongos) en la granja y animales domésticos. Las dosis terapéuticas utilizadas tienen el objetivo de librar al animal del agente que causa la enfermedad sin atender contra su salud a largo plazo. Los medicamentos suelen administrarse a los animales por inyección o, alternativamente, cuando grandes grupos de animales se ven afectados pueden ser administradas por vía oral como un aditivo para piensos (agua de beber, o la alimentación animal) o agua potable. Sin embargo, esta última vía no ofrece ningún tipo de control sobre las dosis administradas y sin duda es menos efectiva (Watson, D.H., 2001).

### Agentes profilácticos

Como la intensificación de la producción animal sigue en aumento, también ha aumentado la selección genética de los animales más adecuados para estos sistemas de producción junto con el uso profiláctico de fármacos como medida de precaución contra la infección.

Los medicamentos se administran con el fin de prevenir brotes de enfermedades y control de infecciones parasitarias, por ejemplo, en un momento determinado del año. Aunque los productores son a menudo acusados de utilizar el tratamiento profiláctico de fármacos como sustituto para una buena cría, incluida la salud y

bienestar animal, cabe señalar que el desarrollo de los sistemas de producción animal intensivos no habría sido posible sin el uso profiláctico de estos fármacos. Los medios más eficaces de administración son en los piensos o por inmersión de los animales. Sin embargo, el principal inconveniente de estos métodos de administración es la dificultad en el control de la cantidad de fármaco recibida por cada animal.

Como resultado de esto, se tiene un mayor potencial de creación de problemas con residuos de medicamentos en los tejidos comestibles de los animales (Watson, D.H., 2001).

### Promotores de crecimiento

Se dividen en dos clases: los antibióticos y agentes anabolizantes. Los compuestos antimicrobianos se mezclan con los piensos en concentraciones sub-terapéuticas que están destinadas a alterar la flora microbiana en el intestino de los animales al suprimir la actividad de algunas de las bacterias de origen natural presentes en el tracto intestinal del animal. La intención es aumentar los nutrientes disponibles para la alimentación animal y no para las bacterias intestinales. Esto conduce a un aumento en las tasas de conversión alimenticia en los animales que resulta en una ganancia de peso más rápidamente.

Sin embargo, existe una creciente preocupación por el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados de esta manera y las consecuencias para la salud humana en caso de que la resistencia a los medicamentos utilizados en la producción animal pueda ser transferida a los medicamentos utilizados en medicina humana (Watson, D.H., 2001).

En respuesta a la evidencia científica de apoyo a estas preocupaciones, la Unión Europea ha prohibido recientemente el uso de varios antibióticos aditivos para la alimentación animal (bacitracina, espiramicina, fosfato de tilocina, virginamicina) y hará la revisión de la utilización de otros compuestos similares (OMS, 2003).

El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la producción agrícola animal se ha practicado durante unos 50 años en los Estados Unidos y otros países (Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005).

Existen pruebas de que la resistencia a los antibióticos y los genes involucrados pueden ser transmitidos de la microbiota del animal al humano. El seguimiento y la identificación de mecanismos de resistencia y su difusión en la cadena alimentaria han sido recientemente revisados por Roe y Pillai (2003). Desde la década de 1980 han surgido en todo el mundo bacterias patógenas resistentes a una serie de agentes antimicrobianos. Tan pronto estas fueron detectadas se publicaron varios informes recomendando la prohibición de empleo de antimicrobianos en los alimentos animales como medida de precaución (Aarestrup, 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe sobre el impacto médico del uso de antimicrobianos en los alimentos animales que sugieren un vínculo entre los dos con una base epidemiológica. Este informe (OMS, 2000) recomienda, por motivos cautelares, que los gobiernos nacionales adopten una actitud proactiva enfocada a reducir la necesidad de empleo de antimicrobianos en animales y establecer vigilancia en el uso y resistencia a los antimicrobianos.

Con respecto a la utilización de promotores de crecimiento antimicrobianos que pertenecen a clases que también se utilizan en seres humanos, la OMS sugiere que su uso sea concluido o rápidamente eliminado, por la legislación si es necesario, a menos que y hasta que las evaluaciones del riesgo se lleven a cabo. La organización también sugiere que la gestión de la salud animal debe ser practicada de manera rutinaria para evitar el uso de antimicrobianos como profilaxis en medida de lo posible, y la disponibilidad de antimicrobianos debe limitarse a su uso terapéutico por prescripción. Las recomendaciones se toman como medida de precaución, basadas en el potencial para crear un reservorio de una población bacteriana resistente a antibióticos en los animales, que podría transferirse a los seres humanos.

La primera prohibición de un antimicrobiano usado como promotor del crecimiento fue en Dinamarca en el año de 1995. La prohibición de avoparcina fue en respuesta a las preocupaciones de que su uso pudiera haber creado una reserva de enterococos resistentes a glicopéptidos en los animales y esto representaba un riesgo potencial para la salud pública (OMS, 2003).

Dinamarca ha limitado el uso de antimicrobianos para uso terapéutico, por prescripción, desde enero de 2000 (Cervantes, H., 2004).

### **1.2.1. Efectos de los antibióticos en la eficiencia del crecimiento animal.**

La ingestión de antibióticos por vía oral, promueve el crecimiento y la eficiencia de aves de corral y otros animales. El mecanismo de acción debe centrarse en el intestino ya que algunos de estos antibióticos no se absorben.

Existen demostraciones que indican que los antibióticos orales no tienen efectos de promoción de crecimiento en animales libres de gérmenes, los estudios del mecanismo para la promoción del crecimiento se han centrado en las interacciones entre los antibióticos y la microbiota intestinal (Coates, M.E., et al., 1963).

Por lo tanto, los efectos directos de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en la microflora se pueden utilizar para explicar el decremento en la competencia por los nutrientes y la reducción de metabolitos microbianos que deprimen el crecimiento. Efectos adicionales de los agentes APC que también se producen en los animales libres de gérmenes incluyen la reducción tamaño intestinal, además de un adelgazamiento en las vellosidades intestinales y la pared intestinal total. Esto puede deberse, en parte, a la pérdida de la proliferación de células de la mucosa en la ausencia de ácidos grasos luminales de cadena corta derivados de la fermentación microbiana. Las reducciones de la pared intestinal y vellosidades en la lámina propia de la mucosa se han utilizado para explicar el aumento de digestibilidad de nutrientes observado con APC (Vissek, W.J., 1978).

El uso de APC también ha sido vinculado a la reducción de los patógenos oportunistas e infecciones sub-clínicas (Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005).

#### Beneficios y Costos Asociados con la microflora.

Está claro que la microflora proporciona beneficios a los animales. Por ejemplo, la microflora proporciona nutrición y protección a los animales, mediante formación de productos de fermentación y prevención de la colonización por agentes patógenos, respectivamente. Sin embargo, estos beneficios tienen un costo. La microflora gastrointestinal compite con el hospedero por otros nutrientes, estimula el recambio rápido de las células epiteliales de absorción, exige un aumento de la tasa de secreción de moco intestinal por células calciformes, y estimula el desarrollo del sistema inmunológico y las respuestas inflamatorias (Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005).

Todos estos efectos vienen a expensas del rendimiento en el crecimiento del animal. Por ejemplo, los tejidos gastrointestinales en cerdos representan sólo alrededor del 5% del peso corporal, pero requieren de 15 a 35% de todo el oxígeno que consume el organismo y recambio de proteínas debido a tasas relativamente altas de recambio de células epiteliales y metabolismo celular. Además, el 90% del contenido total de proteínas sintetizadas por el tracto gastrointestinal se pierde debido a la secreción de moco y desprendimiento de células epiteliales (Gaskins, H.R., 2001).

Las bacterias de la flora intestinal compiten con el hospedero por la captación de aminoácidos, de este modo, reducen la utilización de nitrógeno por parte del animal. Los aminoácidos pueden ser incorporados en proteínas bacterianas, de manera alternativa, algunas bacterias fermentan los aminoácidos produciendo catabolitos tóxicos que tienen impacto en el recambio de células intestinales y en el rendimiento del crecimiento animal. Algunos ejemplos de dichos catabolitos son: amonio, variedades de aminos, fenoles e indoles. Con relación a lo anterior, existe evidencia científica que indica que grandes concentraciones de amonio deprimen



el crecimiento animal; por otra parte, el incremento en la producción de aminas está relacionado con diarrea en algunos cerdos; y de igual manera, altas concentraciones de fenoles e indoles tienen un impacto negativo en el crecimiento, así como en las características sensoriales de la carne (Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005).

La microflora también decrementa la digestibilidad de las grasas. Los ácidos biliares y sus sales son requeridos para la adecuada digestión y absorción de las grasas. Una vez que estos son secretados al intestino, pueden ser catabolizados por gran variedad de especies bacterianas residentes, dando como resultado productos de degradación que son tóxicos y que impiden el buen crecimiento del animal (Eyssen, H., 1973).

**Tabla 2.** Beneficios y costos asociados a la microflora intestinal.

<b>Beneficios</b>	<b>Costos</b>
Resistencia a la colonización por microorganismos patógenos ( <i>“Exclusión competitiva”</i> ).	Competencia con el hospedero por los nutrientes disponibles ( <i>Producción de catabolitos de aminoácidos tóxicos</i> ).
Estimulación del desarrollo del sistema inmune intestinal del hospedero ( <i>Combate de patógenos y control del sobrecrecimiento de micro-flora normal</i> ).	Disminución de la digestibilidad de las grasas ( <i>Muchos ácidos y sales biliares necesarios son catabolizados por la micro-flora</i> ).
Disposición para el hospedero de nutrientes secretados ( <i>Productos del metabolismo microbiano</i> ).	Requiere grandes aumentos en la secreción de moco intestinal y gran recambio de células epiteliales ( <i>Pérdida de proteína y alto gasto de energía metabólica</i> ).

Se ha propuesto que la reducción de los catabolitos de aminoácidos y la prevención del catabolismo de la bilis se encuentran entre los principales mecanismos por los cuales los antibióticos mejoran el desempeño en el crecimiento animal (Visek, W.J., 1978).

### Manipulación de la microflora.

Con respecto a la producción animal, un objetivo importante es determinar su microflora óptima (beneficios máximos con costos mínimos) y, a continuación ser capaces de manipular la microflora a través de la dieta, suplementos, etc., para obtener la microflora deseada.

En donde la ley no lo ha restringido, el uso de antibióticos es la intervención dietética más común para modular la microflora intestinal. El rendimiento de beneficios de los antibióticos ha sido demostrado en todas las principales especies de ganado (Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005).

### **1.3. Resistencia a los antibióticos.**

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir, inhibir o revertir los efectos de un antibiótico. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas al azar, pero también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población microbiana. Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitirse los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por diversos procesos de intercambio de material genético (Cordiés, L., et al., 1998).

La historia de la resistencia a los antibióticos es de origen reciente, se identificó tempranamente luego de la introducción de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos, así como de sus aplicaciones no-humanas (agricultura, cría de animales y acuicultura) durante la segunda mitad del último siglo.

Las formas por las que los microorganismos se han vuelto resistentes son esencialmente debidas a la extraordinaria flexibilidad genética presente en las bacterias (Mazel, D., Davies, J, 1999).

### **1.3.1. Desarrollo de resistencia.**

Las poblaciones microbianas desarrollan resistencia a los antibióticos principalmente a través de dos mecanismos genéticos: la mutación y la adquisición de genes.

La velocidad con la que un gen individual muta para expresar un fenotipo de resistencia es un fenómeno complejo en el que, la fisiología, el entorno celular, la genética bacteriana y la dinámica de la población juegan papeles importantes. Además, para que se produzca una resistencia total, las mutaciones deben ocurrir en varios genes, debido a la redundancia genética en los blancos de los antimicrobianos (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003). No es de sorprenderse que el principal proceso por el cual una bacteria se haga resistente a un determinado antibiótico sea la adquisición de genes (Mazel, D., Davies, J, 1999).

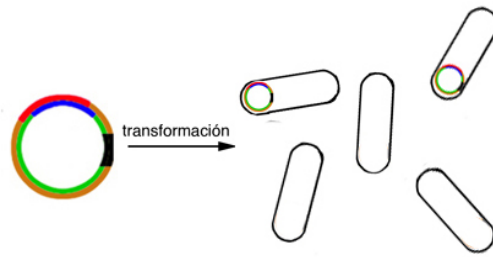
Las células bacterianas pueden adquirir secuencias genéticas de otros organismos a través de diversos procesos:

#### **I. Transformación.**

Se refiere a un cambio genético estable que se produce al incorporar ADN desnudo directamente del entorno inmediato. La frecuencia con la que las bacterias adquieren ADN del medio ambiente depende de varios factores, entre ellos, la estructura de la pared celular. Las células bacterianas tienen que ser “competentes” para la adquisición de ADN extraño por medio de la transformación. Cuando una bacteria es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se dice que es “competente”. Sólo algunas cepas son transformables, sugiriendo que puede ser una característica heredable. La transformación natural ocurre en bacterias Gram negativas y Gram positivas.

La transformación natural de alta eficiencia se encuentra en pocos géneros, es por ello que se desarrolló la transformación artificial en la que se induce competencia

en bacterias a partir de un tratamiento con calcio y baja temperatura. Esta técnica es muy utilizada en biología molecular (Elkins, C., et al., 1991).



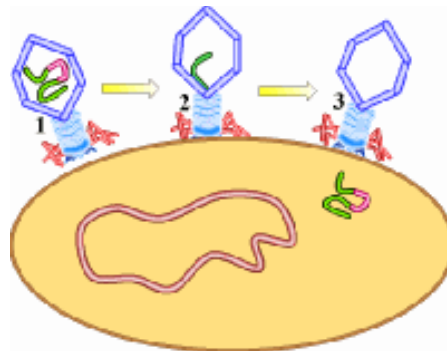
**Figura 6.** *Transformación bacteriana.*

## II. Transducción

Es la introducción de material genético a una bacteria a través de un bacteriófago. En este método, el virus se sujeta e inyecta sus propios ácidos nucleicos a la célula bacteriana, y, en algunos casos, facilitando la introducción de nuevos genes al genoma bacteriano.

La transducción puede ser generalizada o especializada. En la transducción generalizada, un ADN bacteriano, tanto cromosómico como plasmídico, pasa a formar parte del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma del virus. En la transducción especializada, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del virus. La partícula viral transductora es defectuosa como virus, ya que genes virales necesarios fueron reemplazados por genes bacterianos.

Este concepto fue utilizado durante algún tiempo en clonación molecular con la introducción de vectores de ADN que incluían la resistencia a antimicrobianos a través del bacteriófago  $\lambda$  (Sambrook et al., 1989).

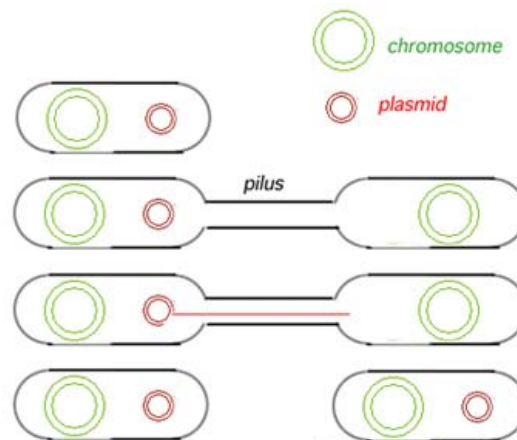


**Figura 7.** *Transducción bacteriana.*

### III. Conjugación

Es el proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos, que portan un conjunto de genes cuyos productos participan en el proceso. En este proceso se requiere contacto directo entre ambas células, con intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas (pilis sexuales en los Gram negativos, y contacto íntimo en los Gram positivos).

Los genes que regulan la transferencia están situados en una región del plásmido llamada *tra*. Algunos genes de la región *tra* están relacionados con la síntesis del pili. Los pili permiten el apareamiento específico entre ambas bacterias dando lugar a la formación de un puente de conjugación a través del cual pasa el ADN de una bacteria a otra. El ADN a transferir es el plásmido conjugativo, pero a veces también pueden ser movilizados ADN de otros plásmidos no conjugativos e inclusive el cromosoma bacteriano (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003).



**Figura 8.** Conjugación bacteriana.

Por otra parte, se pueden identificar tres mecanismos básicos mediante los cuales las bacterias ejercen la resistencia a los antibióticos: a) por inactivación del antibiótico; b) por alteración del sitio blanco del antibiótico; y, c) por disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula (Fuchs, L.Y., et al., 1994).

Estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente en un microorganismo. Asimismo, puede manifestarse un solo mecanismo para conferir resistencia a diferentes clases de antibióticos.

<b>Mecanismos de resistencia</b>					
Antibióticos	Mecanismo de acción	Blanco de acción	Mecanismo de resistencia	Resistencia debida a	Base genética
B-lactámicos penicilinas, cefalosporinas	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas unidoras de penicilinas (PBPs)	a) Hidrólisis del anillo B-lactámico del antibiótico b) Alteración del blanco c) Permeabilidad cambios en las proteínas de membrana externa	B-lactamasas PBPs modificada OmpF sustituida por OmpC	Plásmido y cromosoma Cromosoma Cromosoma
Macrólidos y lincocinamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	a) Metilación del rRNA ribosomal 23S b) Hidrólisis de la lactona de eritromicina y oleandomicina	Metilasas Eritromicin-esterasas	Plásmido y cromosoma Plásmido
Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando su unión al ribosoma	Cloranfenicol-acetil transferasa (CAT)	Plásmido
Aminoglicósidos estreptomina, kanamicina, gentamicina, neomicina, etc	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	a) Modificación del antibiótico impidiendo su transporte b) Modificación del rRNA 16S de la subunidad 30S del ribosoma c) Bajo potencial de membrana y transporte de electrones inadecuado, cambios en el LPS	Acetil transferasa, fosfatidil transferasa, adenil transferasa metilasas LPS alterado	Plásmido y cromosoma Plásmido Cromosoma
Estreptomina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 30S del ribosoma	Modificación de proteínas ribosomales	Proteínas S12 de la subunidad 30S ribosomal	Cromosoma
Fluoroquinolonas y ácido nalidixico	Inhibición de replicación, transcripción recombinación, superenrollamiento de DNA	DNA girasa	a) Mutación sobre DNA girasa b) Disminución de la permeabilidad c) Eflujo	DNA girasa modificada mutación NalB NorA	Cromosoma Cromosoma Cromosoma
Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Proteína de la subunidad ribosomal 30S	Interferencia con el transporte de la droga, aumento de eflujo	Proteínas Tet inducibles	Plásmido

**Figura 9.** Antibióticos y los principales mecanismos de resistencia bacteriana (Fuchs, L.Y., et al., 1994).

### **1.3.2. Origen de los genes de resistencia a antibióticos.**

En años recientes se ha discutido mucho acerca del rol de las llamadas islas de patogenicidad (PAIs) en el incremento de la virulencia de las bacterias.

Las islas de patogenicidad son grupos de genes que proveen los componentes necesarios para el establecimiento y sobrevivencia de un patógeno dentro del ambiente de su hospedero. De manera similar, los genes de resistencia a antibióticos se encuentran en grupos que engloban diferentes determinantes de diferentes orígenes en pequeños sitios del cromosoma bacteriano. Dicho agrupamiento ha sido identificado desde hace mucho tiempo y probablemente refleja el rol de los transposones, integrones y plásmidos como vehículos de transporte para los genes de resistencia (Lee, C., 1996).

La realidad es que muchos de los genes de resistencia son de origen externo a sus portadores actuales bacterianos y la pregunta obvia al respecto es ¿de dónde provienen?

Se han propuesto varias posibles fuentes de estos determinantes de resistencia, entre ellas:

- 1) Genes que se han mantenido (p. ej. para degradar sustratos alternativos, mutación para reconocimiento de nuevos sustratos).
- 2) Microorganismos productores de antibióticos (tienen mecanismos para su propia protección).
- 3) Genes de resistencia “naturales” en comunidades microbianas del suelo.

Sin embargo, en lo que se ha coincidido es que definitivamente estos genes no tienen un origen único. Solamente en algunos pocos casos ha sido posible establecer una relación directa entre los genes de resistencia identificados de aislamientos en clínica y sus supuestos organismos de origen (Mazel, D., Davies, J., 1999).

### 1.3.3. Elementos genéticos móviles.

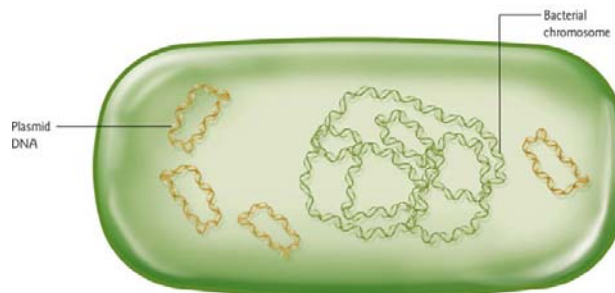
La mayoría de los genes de resistencia son portados por plásmidos, transposones y otros elementos genéticos con capacidad de movilidad inter-genérica e inter-específica (Mazel, D., Davies, J., 1999).

#### ✓ Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula (Thomas, C., 2000).

Las moléculas de ADN plasmídico, adoptan una conformación tipo doble hélice al igual que el ADN de los cromosomas, aunque, por definición, se encuentran fuera de los mismos. Se han encontrado plásmidos en casi todas las bacterias. A diferencia del ADN cromosomal, los plásmidos no tienen proteínas asociadas (Orman, B., 2006).

Muchos de ellos poseen información genética importante para las bacterias. Por ejemplo, los genes que codifican para las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos están frecuentemente en plásmidos.



**Figura 10.** Plásmidos dentro de una célula bacteriana.

Hay algunos plásmidos integrativos, es decir, que tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano. Estos rompen momentáneamente el cromosoma y se sitúan en su interior, con lo cual, automáticamente la maquinaria



celular también reproduce el plásmido. Cuando ese plásmido se ha insertado se le da el nombre de *episoma*. Dentro de este grupo de plásmidos se encuentran los factores de fertilidad o plásmidos F, que regulan el proceso de conjugación bacteriana (Sørensen, S., et al., 2005).

Los plásmidos R confieren, a las células que lo poseen, resistencia a los antibióticos. Un plásmido R puede llegar a tener hasta 10 genes que confieren resistencia y pueden transferirse a otra bacteria de la misma especie, a virus e inclusive, a bacterias de diferentes especies. Actúan proporcionando la información necesaria para destruir el antibiótico o para circunvalar el bloqueo que produce el antibiótico en la vía metabólica bacteriana (Orman, B., 2006).

Las características de independencia de replicación y potencial inserción en el genoma celular convierte a los plásmidos en herramientas de ingeniería genética muy versátiles para producir ADN recombinante (Thomas, C., 2000).

#### ✓ Transposones

Son segmentos de ADN con la capacidad de moverse a lo largo del genoma. Son únicos en cuanto a que tienen la capacidad de escindir por si mismos desde un locus genético a otro, ya sea en la misma bacteria, o incluso entre bacterias de diferente género.

Cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio, se produce una delección o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen. De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen se produce una adición de una gran cantidad de nucleótidos que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen. Por consiguiente, los transposones producen mutaciones (Bryan, L.E., 1982).

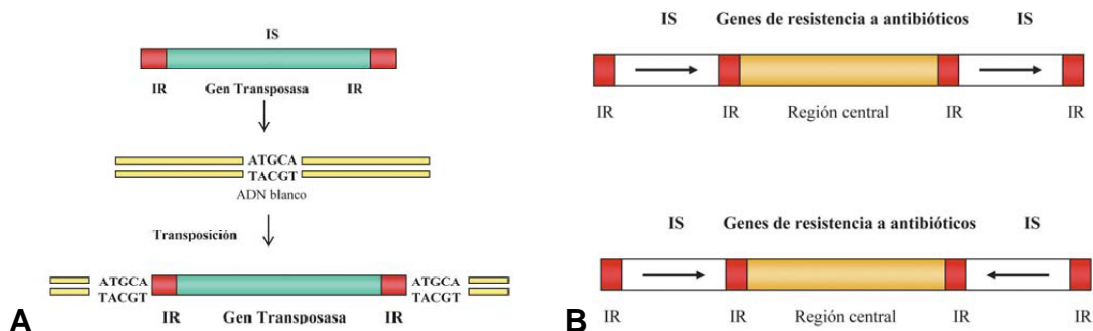
En el fenómeno de la transposición no se ha encontrado una relación clara entre la secuencia de la sede donadora (lugar en el que está el transposón) y la sede aceptora (lugar al que se incorpora el transposón). Algunos transposones

muestran preferencia por una determinada región (zona de 2000 a 3000 pares de bases), pero dentro de ella parecen insertarse al azar (Galun, E., 2003).

### Tipos de transposones

*Transposón Simple, Secuencia de Inserción o Elemento de Inserción (IS):* los transposones simples contienen una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos una secuencia repetida en orden inverso. Esta secuencia repetida en orden inverso no es necesariamente idéntica, aunque muy parecida. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de la secuencia diana (5-12 pb) (Galun, E., 2003).

*Transposón Compuesto (Tn):* contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los Factores de transferencia de resistencia (RTF), poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos (Galun, E., 2003).



**Figura 11.** Tipos de transposones. **A)** Transposón simple, **B)** Transposón compuesto.

(Orman, B., 2006)

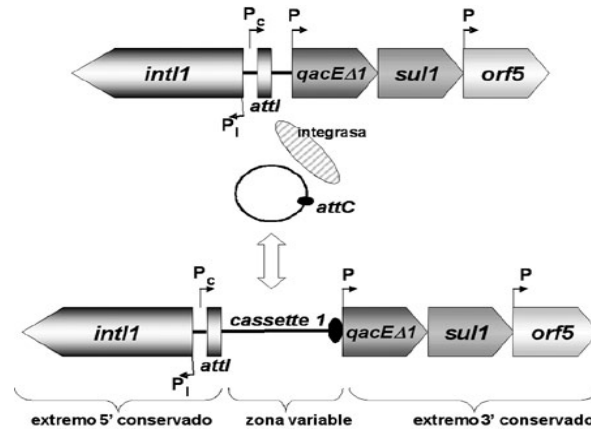
Los transposones desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos porque a menudo contienen secuencias de genes llamadas *integrones* que median la resistencia a los antibióticos (Pinilla, G., et al., 2006).

✓ Integrones.

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en el integrón para escindirse en forma de círculos de ADN autónomos (llamados *cassettes de genes*) y a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente (García, J.M, 1999).

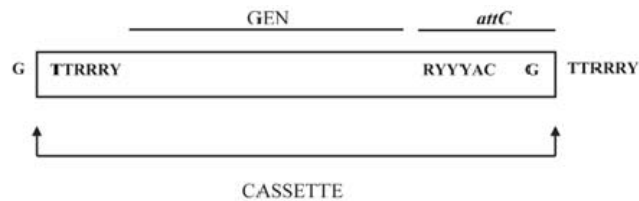
Todos los integrones conocidos están compuestos por tres elementos clave, necesarios para la obtención de genes exógenos: primero, un gen que codifica para una *integrasa (intl)*, segundo, un *sitio primario de recombinación (attI)*, y tercero, un *fuerte promotor (P)* (Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D., 1999).

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 nos encontramos una región central variable en la que se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos) en número variable. Las regiones constante 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la *integrasa*. A continuación de la región central encontramos otra región constante 3' en la que encuentra un gen de resistencia a sulfamidas y otros dos marcos abiertos de lectura (García, J.M, 1999).



**Figura 12.** Estructura y diferenciación de las regiones del integrón de clase 1.

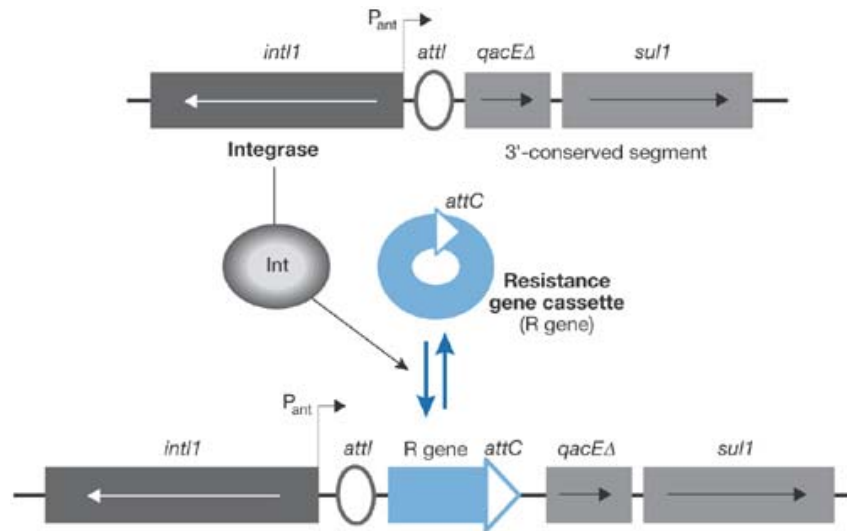
La *integrasa* es una recombinasa sitio-específica cuya función es recombinar unidades discretas de ADN conocidas como *cassettes de genes* río abajo del promotor, en el sitio primario de recombinación (*attI*), permitiendo la expresión de las proteínas codificadas en el *cassette*. Los *cassettes de genes* normalmente contienen un solo gen asociado con una secuencia de recombinación específica conocida como elemento de 59 pares de bases (59-bp) ó *attC* (Partridge, S.R., 2000).



**Figura 13.** Estructura de un gen en forma de cassette. El cassette está formado por el gen y el sitio de recombinación *attC*. Las flechas señalan el inicio y el final del cassette, denotando los sitios por donde se realiza la recombinación sitio-específico para la movilización del mismo (Orman, B., 2006).

La integración de un *cassette* en un integrón involucra una recombinación sitio-específica mediada por la *integrasa* entre el sitio *attI* ubicado en el integrón y el sitio *attC* en un *cassette* circular libre en el citoplasma. La escisión de los *cassettes* es la inversa de la integración (Hall, R.M., Collis, C.M., 1995).

*Cassettes* circulares simples o compuestos se regeneran por medio de la escisión, siendo importantes intermediarios en el proceso de movilización de genes. La recombinación entre un sitio *attI* y el sitio *attC*, y entre dos sitios *attC* es la reacción biológica más importante para la integración y escisión de *cassettes*. En experimentos de integración in vivo, la recombinación *attI* x *attC* ocurre a una frecuencia más alta que la recombinación *attC* x *attC*. Así, un *cassette* se integraría, en un integrón que posee *cassettes* inmediatamente adyacente al sitio *attI*, asegurando una máxima expresión a partir del promotor (*Orman, B., 2006*).



**Figura 14.** Integración de un *cassette* de genes en el integrón de clase 1.

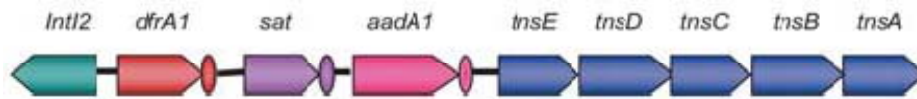
La estructura básica del integrón no es capaz de auto-transposición, pero este defecto se complementa mediante su asociación con secuencias de inserción (IS), transposones y/o plásmidos que sirven como vehículos para la transmisión de este material genético intra e inter-especies (*Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D., 1999*).

Hasta la fecha han sido descritos 4 clases de integrones que difieren primordialmente en la secuencia del gen de la *integrasa*.

El integrón de clase 1 es comúnmente asociado al transposón *Tn21* y contiene una secuencia 3'conservada que se compone de los genes de resistencia *qacEΔ1*, y *sul1*, con un marco abierto de lectura desconocido denominado *orf5*

que se encuentra localizado en una zona lejana río abajo del gen de la *integrasa* (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003). **Figuras 12 y 14.**

Los integrones de clase 2 son comúnmente asociados con el transposón *Tn7* y sus derivados, todos ellos tienen un segmento 3' conservado compuesto por el módulo de genes *tns*, el cual contiene 5 genes que codifican productos involucrados en el movimiento del transposón (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003).



**Figura 15.** Esquema de un integrón de clase 2. Este integrón está compuesto por la integrasa de tipo 2 y los genes *dfrA1*, *sat* y *aadA1* que codifican para la resistencia, a trimetoprima, estreptotricina y estreptomycin-espectinomicina. En el extremo 3' conservado se encuentran los genes *tns E, D, C, B* y *A*, necesarios para la transposición (Orman, B., 2006).

El integrón de clase 3 solamente se ha identificado en *Serratia marcescens* y no se asocia comúnmente con transposones (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003).

La secuencia de genes del integrón de clase 4 ha sido clasificada únicamente en el genoma de *Vibrio cholerae* y es asociado con lo que se conoce como secuencias repetidas de *Vibrio cholerae* (VCRs) y no con alguna secuencia relacionada con transposones (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003).

Los integrones, y de manera más frecuente el integrón de clase 1, han sido asociados a cepas aisladas de alimento para animales que presentan multiresistencia a antimicrobianos. En un estudio realizado (Bass et al., 1999) también se asoció a los integrones con la multiresistencia encontrada en cepas aisladas en granjas de aves de corral.

### Origen de los integrones

Estudios de la relación entre los integrones de resistencia a antibióticos y las secuencias repetidas de *Vibrio cholerae* (VCRs) han demostrado estrechas similitudes estructurales.

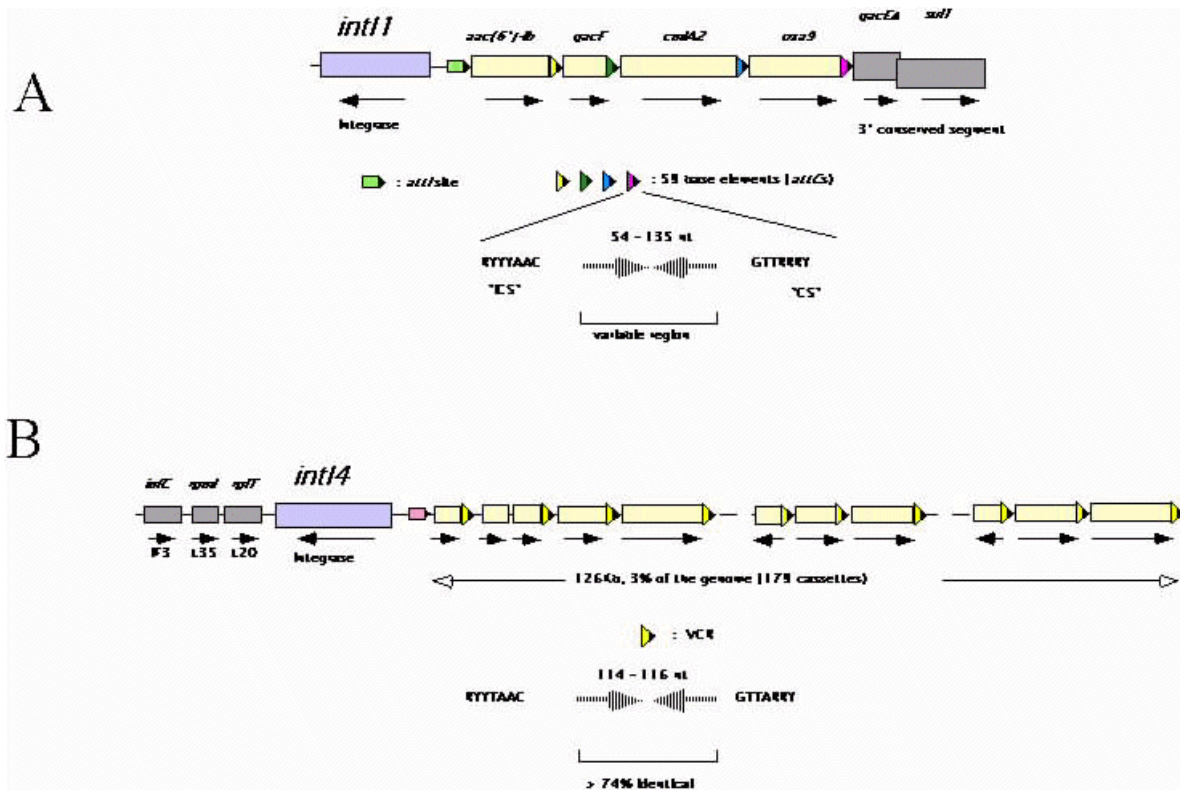
Ambos poseen *integrinas* específicas y relacionadas que son responsables de la inserción de secuencias codificantes (ORFs o *cassettes de genes*) en un único sitio de fijación, conduciendo a la formación de arreglos en tándem de los genes. En el caso de *Vibrio cholerae*, en el grupo de genes asociado a las VCRs, los ORFs representan entre 60-100 genes no identificados que ocupan alrededor del 4% de su genoma. Estos últimos, también llamados *super-integrones*, se han encontrado en varias especies de *Vibrio*; comparten las mismas características generales y claramente preceden a la era de los antibióticos, ya que se encuentran presentes en aislamientos realizados en los años 1800s (Mazel, D., Davies, J., 1999).

Los ORFs identificados hasta la fecha en los *super-integrones* parecen estar más estrechamente relacionados con funciones de virulencia, sin embargo, también se encuentran genes de resistencia a antibióticos aunque no han sido bien identificados en su totalidad. Cabe destacar el hallazgo de que los elementos de 59 pares de bases (*attC*) de los cassettes de genes *blaP4* y *dfrVI* de los integrones de multiresistencia (que codifican para  $\beta$ -*lactamasa*, confiriendo resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y *dihidrofolato reductasa*, confiriendo resistencia a trimetoprim, respectivamente) son prácticamente idénticos a los que se encuentran en los VCRs.

Esto sugiere que los integrones de multiresistencia pudieran haber evolucionado de los *super-integrones*, a través del atrapamiento de los genes *intl* y su sitio afín *attI* dentro de estructuras de alta movilidad como son los transposones (Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D., 1999).

La combinación de la movilidad y la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos habrían llevado a la captura específica de *cassettes de resistencia* por

diversas maneras, tomando como fuente los *cassettes* presentes en los *super-integrones*.



**Figura 16.** Comparación de un integrón de resistencia con un "super-integrón" ó VCR de *Vibrio* (Mazel, D., Davies, J., 1999).



#### **1.3.4. Alternativas para el desarrollo de resistencia.**

Como se mencionó anteriormente, las bacterias utilizan distintos mecanismos ingeniosos para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos (inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula). Estos mecanismos son bastante específicos para un antibiótico o alguna familia de antibióticos, sin embargo, hay otros mecanismos más generales de resistencia, en donde el acceso del antimicrobiano inalterado hasta su sitio de acción es prevenido por barreras de baja permeabilidad a fin de disminuir la entrada del antimicrobiano a la célula, o también mediante el bombeo del antimicrobiano fuera de la célula en un proceso dependiente de energía (Nikaido, 1994).

La industria farmacéutica ha tenido éxito en la producción de muchos agentes sintéticos y semisintéticos que son capaces de resistir la acción de la mayoría de las enzimas que degradan o modifican los antibióticos naturales. Debido a este éxito, los mecanismos menos específicos antes descritos pueden adquirir mayor importancia en el contexto clínico (Nikaido, 1994).

La primera bomba de expulsión descrita fue la glicoproteína P de origen mamífero, una bomba acoplada a la hidrólisis de ATP que confiere resistencia a un amplio espectro de compuestos, incluyendo agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (Paulsen, I., 2003).

Las bombas de expulsión de multiresistencia a fármacos (bombas de expulsión-MRF) son muy abundantes y ubicuas en la naturaleza, constituyen en promedio más del 10% de los transportadores en un organismo. La mayoría de los sistemas de expulsión descritos se encuentran generalmente en organismos asociados al suelo o plantas (Paulsen, I., 2003).

Es bien sabido que las bombas de expulsión-MRF codificadas por las bacterias pueden conferir resistencia clínicamente relevante a los antibióticos. Ahora se

entiende que estas bombas de expulsión también tienen un papel fisiológico. Estas pueden conferir resistencia a las sustancias naturales producidas por el hospedero, incluyendo hormonas, bilis y moléculas de autodefensa, lo que indica que estos sistemas podrían tener un papel importante al permitir a las bacterias sobrevivir en su nicho ecológico.

Es posible que la resistencia a los antibióticos que se utilizan en medicina humana y veterinaria sea un proceso mediado por bombas de expulsión, como subproducto de la función fisiológica de estas bombas que, dado el medio de estrés, resultan benéficas para la bacteria (Piddock, L., 2006).

Los genes y las proteínas de las bombas de expulsión se encuentran presentes en todos los organismos. En las bacterias, estos genes se encuentran en el cromosoma o en elementos genéticos transmisibles (Piddock, L., 2006).

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato, o pueden transportar una amplia gama de estructuras y compuestos diferentes (incluidos los antibióticos de diversas categorías químicas) (Piddock, L., 2006).

En los eucariotas, todas las bombas de expulsión-MRF bien caracterizadas se dividen en dos familias de proteínas de transporte: la familia ABC (*ATP binding cassette*) y la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Estas dos familias son amplias y muy antiguas.

En las células procariontes, las bombas de expulsión-MRF son miembros no sólo de estas dos familias de permeasas, sino también de otras familias descubiertas recientemente: la familia SMR (Small Multidrug Resistance), la familia RND (Resistance-Nodulation-Cell división), y la familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion) (Saier, M., 1998).

Cada familia de permeasas en donde se han encontrado miembros que confieren resistencia a antibióticos, posee, por lo menos, una subfamilia con miembros reconocidos que catalizan la expulsión de estos fármacos. Otras subfamilias

tienen otras funciones de transporte, generalmente llevando nutrientes al interior de la célula ó exportando macromoléculas que han sido sintetizadas (Saier, M., 1998).

Estudios recientes han demostrado que las bombas de expulsión-MRF desempeñan un papel importante en la resistencia “intrínseca” de bacterias Gram-negativas. (Nikaido, H., 1996)

### Resistencia intrínseca a los antibióticos.

Históricamente, se pensó que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas afectaba a la susceptibilidad antibiótica, en gran medida, restringiendo la penetración del antibiótico. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la mayoría de los agentes antibacterianos efectivamente penetran a los organismos Gram-negativos, pero fallan en alcanzar sus blancos intracelulares debido a que son expulsados de la célula. En bacterias Gram-negativas, incluyendo *Escherichia coli* y otros microorganismo no fermentadores la “resistencia intrínseca” es atribuida a la expresión de la bomba de expulsión RND. Este mecanismo, es una manera muy eficiente para tratar con diferentes clases de antibióticos utilizando un determinante de resistencia muy simple. Se piensa que la función natural del sistema de expulsión AcrAB (de la familia RND) en *Escherichia coli* está relacionado con la protección de la célula de la actividad inhibitoria de algunas sustancias como las sales biliares (Alekhshun, M., 2007).

En 1994, se reportó que la resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* a varios antibióticos era debida a la expulsión del antibiótico. Un año anterior, se había descrito un operón que codifica un sistema de expulsión, *MexAB-OprM*, de tipo silvestre.

Se demostró que la supresión de los genes que codifican los componentes de este sistema en *Pseudomonas aeruginosa* provocaba hiper-susceptibilidad a una gran variedad de agentes antimicrobianos. Posteriormente, se demostró que muchas

clases de agentes antimicrobianos tienen actividad pobre contra bacterias Gram-negativas en general, como consecuencia de su expulsión (Pidcock, L., 2006).

La barrera de la membrana externa en las bacterias Gram-negativas contribuye a la resistencia, así como lo hacen los estrechos canales de porinas al frenar la penetración de, incluso, pequeños solutos hidrofílicos, además, la baja fluidez de la capa de lipopolisacárido disminuye la velocidad de difusión transmembranal de solutos lipofílicos. Sin embargo, la barrera de la membrana externa no puede ser la única explicación, incluso en especies tales como *Pseudomonas aeruginosa*, que produce una membrana externa con permeabilidad excepcionalmente baja.

Lo descrito anteriormente sugiere que la barrera de la membrana externa y los múltiples componentes de los sistemas de expulsión deben actuar sinérgicamente para disminuir las concentraciones de agentes nocivos en el citoplasma e incluso en el espacio periplásmico. (Nikaido, H., 1996)

### Origen.

La gran diversidad de permeasas de resistencia que ha evolucionado de cada uno de los sistemas de expulsión primordiales ha sido resultado 1) de los extensos eventos de duplicación de genes dentro de un único organismo, 2) como consecuencia de la transferencia horizontal de material genético entre organismos y, 3) durante la especiación. (Saier, M., 1998)

### Tipos de bombas de expulsión.

La mayoría de las bombas de expulsión que confieren resistencia a antibióticos pertenecen a 5 distintas familias de proteínas: la familia RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Staphylococcal/small multidrug resistance), ABC (ATP-Binding Cassette) y MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion). La expulsión por las proteínas de las familias RND, SMR y MF es impulsada por una fuerza protón motriz; la expulsión por las proteínas de la familia MATE es impulsada por un sistema *antiport* de sodio. Al transporte por medio de las proteínas de las familias mencionadas, se le

conoce como transporte secundario. La hidrólisis acoplada de ATP provoca la expulsión en los transportadores primarios de la familia ABC. (Alekhun, M., 2007)

**Tabla 3.** Familias de bombas de expulsión y ejemplos.

	Familias de bombas de expulsión	Ejemplos de transportadores
Sistemas antiport impulsados por protones.	MF	TetA(B), TetA(K), QacA
	RND	Acr AB, Mex AB
	SMR	EmrE
Sistema antiport impulsado por sodio.	MATE	NorM, YdhE
Sistemas acoplados a hidrólisis de ATP	ABC	LmrA, Mac AB

- Familia MFS

Los transportadores MFS forman una superfamilia que comprende un gran número de subfamilias; de estas subfamilias, los transportadores de azúcares y de fármacos son, por mucho, los más numerosos. Los transportadores MFS están compuestos típicamente por aproximadamente 400 residuos de aminoácidos que se suponen arreglados en 12 hélices alfa intermembranales con un largo bucle citoplasmático entre las hélices 6 y 7. Lo más probable es que esta estructura haya surgido por duplicación genética, ya que las dos mitades del transportador, en general, poseen secuencias afines. Un pequeño número de estos transportadores tiene una supuesta topología de 14 hélices alfa; no obstante, los transportadores MFS de este tipo tienden a formar un bucle citoplasmático de menor tamaño (Borges-Walmsley, M.I., 2003).

- Familia RND

Los transportadores RND son mucho más grandes que los transportadores MFS, están compuestos típicamente por aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos.

Incluso con esta diferencia de tamaño, estos adoptan una estructura similar de 12 hélices alfa intermembranales. Sin embargo, a diferencia de los transportadores MFS estos poseen dos largos dominios extracitoplásmicos entre las hélices 1 y 2 y entre las hélices 7 y 8. Se ha demostrado que estos dominios tienen un papel importante en el reconocimiento de fármacos. De forma similar a los transportadores MFS, la primera mitad de los transportadores RND generalmente asemeja a la segunda mitad, nuevamente sugiriendo que estos transportadores fueron originados por duplicación genética (Borges-Walmsley, M.I., 2003).

- Familia SMR

Los transportadores SMR son mucho más pequeños que aquellos pertenecientes a las familias MFS y RND. Las bombas SMR normalmente están compuestas por 100 residuos de aminoácidos que supuestamente se encuentran ordenados en 4 hélices alfa transmembranales. La bomba SMR mejor caracterizada es la EmrE de *Escherichia coli*, un transportador multifármacos que confiere resistencia al bromuro de etidio y al metil viologen (una sustancia herbicida). Otra bomba SMR multifármacos de *Pseudomonas aeruginosa* muy cercana a la bomba EmrE ha sido recientemente caracterizada y se comprobó que tiene un papel importante en la resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* al bromuro de etidio, acriflavina y a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (Borges-Walmsley, M.I., 2003).

- Familia MATE

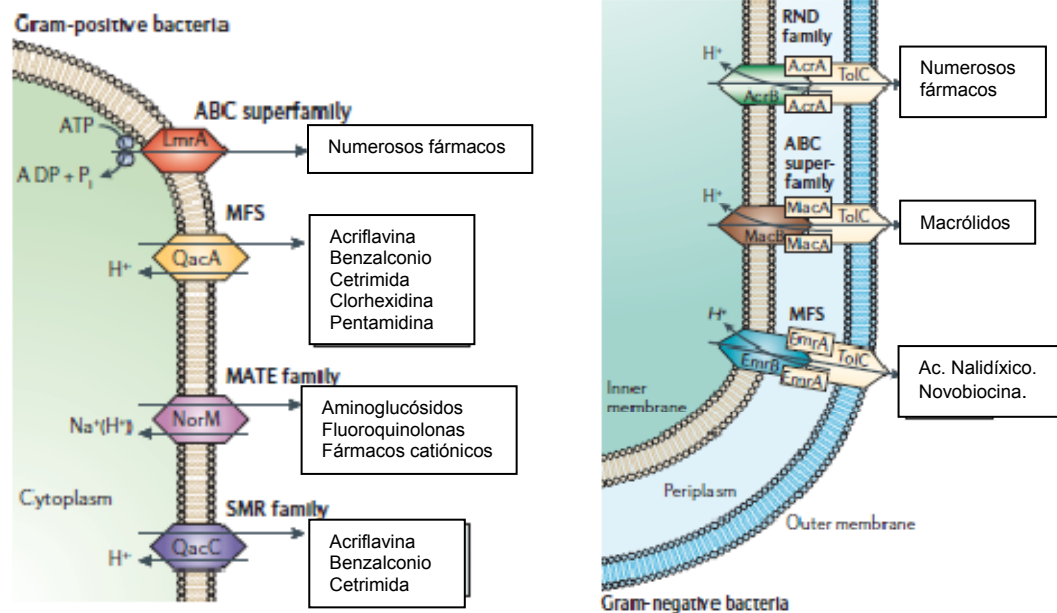
Los transportadores MATE son similares en tamaño a los transportadores MFS, están compuestos típicamente por 450 residuos de aminoácidos, los cuales se encuentran arreglados en 12 hélices alfa transmembranales; sin embargo, ellos no tienen secuencias similares a las de los miembros de la familia MFS. Esta nueva familia ha sido identificada recientemente, con la caracterización de NorM, un sistema antiport multifármacos impulsado por iones sodio de *Vibrio parahaemolyticus*, que confiere resistencia a colorantes, fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Otro transportador de la familia MATE, YdhE, ha sido caracterizado en *Escherichia coli*, y se demostró que confiere resistencia a antimicrobianos catiónicos.

Los transportadores MATE son una familia relativamente nueva de los transportadores de fármacos bacterianos y por tanto, de todas las familias de bombas de expulsión actualmente conocidas, estos transportadores son los menos caracterizados. Se sabe poco sobre su estructura, regulación o mecanismo de acción (Borges-Walmsley, M.I., 2003).

- Familia ABC

En contraste con los organismos procariotes, el principal mecanismo de expulsión en eucariotes es dependiente de proteínas que consiguen la energía para el transporte por medio de hidrólisis de ATP. Los miembros de esta familia incluyen a la bomba de resistencia multifármacos, P-gp (glicoproteína P) y MRP (proteína de resistencia multifármacos), ambas confieren resistencia a fármacos anticancerígenos. Dichos transportadores también se encuentran en numerosos hongos patogénicos y protozoarios, en donde confieren resistencia a antimicrobianos; por ejemplo, P-gpA, un homólogo de MRP, es una bomba de arsénico/antimonio que es responsable de la resistencia del fármaco Pentosam en *Leishmania*. Adicionalmente, se han encontrado homólogos bacterianos; estos incluyen al transportador multifármacos de *Lactococcus lactis*, LmrA, y más recientemente, el transportador Mac AB de *Escherichia coli* que está relacionado con la expulsión de antibióticos de la familia de los macrólidos (Borges-Walmsley, M.I., 2003).



**Figura 17.** Representación esquemática de la estructura y localización en la membrana de las diferentes familias de bombas de expulsión. Se indican los ejemplos más comunes de las proteínas individuales de cada familia. Se muestran algunos ejemplos de antibióticos que son sustrato para cada bomba en particular (Pidcock, L., 2006).

Las proteínas de expulsión también se presentan en dos tipos generales. Algunas, como los transportadores de tetraciclina y macrólidos (Tet y Mef, respectivamente) son sistemas de expulsión de un componente sencillo que tienen un perfil de sustratos restringido, actuando en muy pocos agentes, o en múltiples agentes pertenecientes a una misma clase de fármacos. Otros, como las proteínas miembros de la familia RND, requieren dos proteínas adicionales para desarrollar resistencia a fármacos, pero son capaces de unir múltiples compuestos con estructuras químicas no relacionadas, por lo tanto confieren extensos fenotipos de resistencia (Alekhun, M., 2007).

Para las bacterias Gram-negativas, las bombas de expulsión que están asociadas con resistencia clínicamente significativa a los antibióticos son de la familia RND, mientras que para las bacterias Gram-positivas, las bombas de expulsión clínicamente importantes son miembros de la familia MFS (Pidcock, L., 2006).



El perfil de sustratos de la bomba de *Escherichia coli* AcrAB-TolC (que es de la familia RND) incluye el antibiótico cloranfenicol, las fluoroquinolonas, ácido fusídico,  $\beta$ -lactámicos, el ácido nalidíxico, novobiocina, rifampicina y tetraciclina, así como acriflavina, el bromuro de etidio, las sales biliares, ácidos grasos de cadena corta, SDS, Triton X-100 y triclosan.

Se ha sugerido que algunas bombas de expulsión son pobremente expresadas *in vitro* y que un inductor de expresión está presente cuando la bacteria está creciendo en su entorno natural o en un hospedero. Sin embargo, sólo unos pocos de estos inductores naturales han sido identificados: las sales biliares y los ácidos grasos de bacterias entéricas (como se comentó anteriormente) y Triton X-100 (Piddock, L., 2006).

Un dato relevante es que las familias SMR y RND en la actualidad, sólo incluyen bombas de expulsión del tipo multifármacos. Las permeasas que son específicas a algún determinado fármaco aparentemente están ausentes en estas dos familias. Tal vez la naturaleza de la construcción de sus canales difiere de la naturaleza de los canales de las permeasas de las familias MFS o ABC, y se impide el reconocimiento intramembranal estereoespecífico de fármacos (Saier, M., 1998).

### Regulación.

La carente especificidad de los componentes de las bombas de expulsión multifármacos, sugiere que su expresión debe ser controlada cuidadosamente, ya que su sobreexpresión descontrolada podría dar como resultado la salida de metabolitos esenciales. En términos de regulación fisiológica, el sistema de AcrAB ha sido el más estudiado. En primer lugar, los sistemas globales de regulación, tales como *marAB* y *soxRS* influyen en la resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli*. Los reguladores positivos *Mar a* y *Sox S* se producen en niveles más altos, en respuesta a la presencia de antibióticos y de radicales superóxido, respectivamente, y estos reguladores son conocidos por aumentar la expulsión de varios fármacos, mediada por la bomba AcrAB. Además del aumento de la transcripción del operón *acrAB*, *Mar a* y *Sox S* regulan negativamente la síntesis

de la porina *OmpF* principalmente, a través del aumento de la producción de un ARN antisentido, *micF*. Como consecuencia, la disminución en la permeabilidad de la membrana externa, tiene un efecto sinérgico que intensifica el efecto de la maquinaria de expulsión que ha sido incrementada. En segundo lugar, otras condiciones de estrés global, tales como la adición de NaCl 0,5 M, de etanol al 4%, o la entrada a la fase estacionaria también aumenta la transcripción del operón *acrAB*. Este efecto no está mediado por *marAB* o *soxRS*. Bajo estas condiciones, la transcripción del gen represor también es mayor, un mecanismo que puede impedir la sobreexpresión de la bomba AcrAB sin control (Nikaido, H., 1996).

Curiosamente, se sabe que la tensión de oxígeno a la que las bacterias patógenas son expuestas en los tejidos del hospedero, produce represión de la síntesis de la porina *OmpF* aumentando la resistencia a varios agentes, posiblemente como resultado del aumento en la expulsión. Del mismo modo, se sabe que el salicilato que se produce en los tejidos vegetales en respuesta a la invasión de microorganismos, reprime la síntesis de la porina *OmpF* y hace a *Escherichia coli* transitoriamente más resistente a cloranfenicol, tetraciclina, quinolonas, y ampicilina. Esta gama de agentes nuevamente sugiere la participación de un sistema o sistemas de expulsión (Nikaido, H., 1994).

Poco se sabe acerca de la regulación fisiológica de la expresión de las bombas de expulsión multifármacos en otras especies.

Los transportadores “multifármacos” al parecer se encuentran abundantemente en la naturaleza, y en muchos casos se encuentran bajo una regulación global compleja, en algunos otros casos responden a diferentes tipos de estrés, y en otros casos son co-regulados por genes que no están relacionados con la resistencia a antibióticos (Paulsen, I., 2003).

Con excepción de las bombas de expulsión-MRF, un mecanismo de resistencia común, sólo permite protección contra un antibiótico, o, a lo sumo, antibióticos de

la misma clase. Por ejemplo, los factores determinantes de la resistencia que especifican la eritromicina-metil-transferasa (Erm) en una variedad de patógenos, son proteínas individuales que dan lugar a resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B: agentes estructuralmente únicos que comparten un blanco y mecanismo de acción común (Aleksun, M., 2007).

Debido a que se pensaba que los mecanismos específicos de resistencia a los antibióticos eran los más importantes, los esfuerzos para producir antibióticos más eficaces por lo general han implicado la modificación de grupos específicos de moléculas de antibióticos con el fin de hacerlos inertes como sustrato potencial de las enzimas inactivadoras de antibióticos comunes. La presencia de los mecanismos más generales de resistencia descritos nos obliga a reevaluar estas estrategias, ya que dichos mecanismos producen resistencia clínicamente significativa (Nikaido, H., 1994).

#### **1.4. Propiedades y uso de *Allium sativum*.**

*Allium sativum*, llamado tradicionalmente ajo, es una hortaliza cuyo bulbo se emplea comúnmente en la cocina mediterránea. Es de sabor fuerte, especialmente en crudo y ligeramente picante. Tradicionalmente se agrupaba dentro de la familia de las *liliáceas* pero actualmente se le ubica dentro de la subfamilia de las *alióideas* de las *amarilidáceas* (García, C., 1998).

Las hojas son planas y delgadas, de hasta 30 cm de longitud. Las raíces alcanzan fácilmente profundidades de 50 cm o más. El bulbo, de piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos comúnmente llamados *dientes*. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 *dientes*, cada uno de los cuales se encuentra envuelto en una delgada película de color blanco o rojizo. Cada uno de los *dientes* puede dar origen a una nueva planta de ajo, ya que poseen en su base una yema terminal que es capaz de germinar incluso sin necesidad de plantarse previamente. Este

brote comienza a aparecer luego de los tres meses de cosechado, dependiendo de la variedad y condiciones de conservación. Las flores son blancas, y en algunas especies el tallo también produce pequeños bulbos o hijuelos (García, C., 1998).



**Figura 18.** *Allium sativum*.

#### **1.4.1. Historia**

A lo largo de la historia se encuentran referencias al uso del ajo. El escrito más antiguo encontrado en donde se menciona su uso data entre 2600-2100 A.C. En este escrito de los sumerios se menciona que el ajo era ampliamente cultivado, por lo tanto, su uso debió de preceder esa época.

El ajo fue parte de la dieta de los constructores de las pirámides egipcias; varios dientes de ajo fueron encontrados en la tumba de Tutankamon; también ha sido asociado a los israelitas, ya que su uso es mencionado en la biblia, en el Éxodo. El *Codex Ebers*, un papiro medico egipcio traducido en 1937, contenía alrededor de 800 formulaciones medicas, 22 de las cuales se realizaban con ajo. Los romanos también explotaron las virtudes del ajo, en el escrito *Historia Naturalis* de un naturalista romano de nombre Plinio, se describe como el ajo podría ser usado para el tratamiento de desordenes gastrointestinales, mordeduras de serpientes, picaduras de escorpión, asma, convulsiones, demencia, tuberculosis, entre otras (Rivlin, R., 2001).

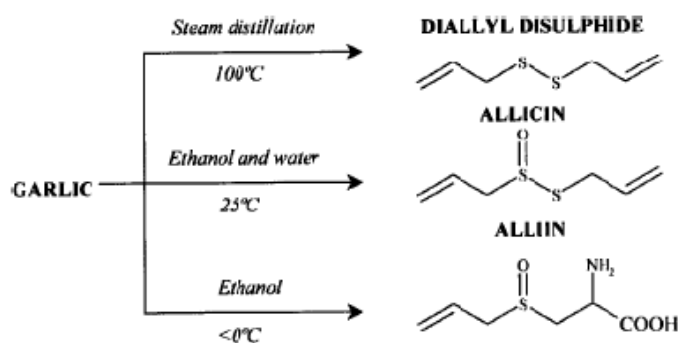
También las civilizaciones babilónica y griega utilizaban el ajo. Su uso como laxante, diurético, y para el tratamiento de tumores uterinos fue documentado por Hipócrates, Aristófanes y Galeno.

Los primeros indicios de la actividad antimicrobiana del ajo se establecieron en Francia, durante una plaga en Marsella en 1721. Cuatro hombres que se dedicaban a levantar los cuerpos de los muertos por la plaga sorprendentemente nunca cayeron enfermos, el secreto fue que tomaban un macerado de ajo con vino tinto llamado “*viniagre des quatre voleurs*”. Esta preparación sigue vigente hasta la fecha (Rivlin, R., 2001).

Los primeros estudios químicos sobre el ajo fueron realizados en 1884 por el químico alemán Wertheim. Mediante un proceso de destilación de vapor obtuvo un aceite de olor picante de los dientes de ajo. El propuso el nombre de “alilo” para el compuesto hidrocarbonado presente en el aceite, y este término es usado hasta la fecha para describir al grupo  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$  (Harris, J.C., et al., 2001).

Un destilado similar con propiedades antimicrobianas fue obtenido por Semmler en 1892.

En 1944 Cavallito y Bailey realizaron el primer estudio definitivo sobre la química del ajo (Ankri, S., Mirelman, D., 1999). Empleando diferentes métodos de extracción, aislaron 3 componentes del aceite de ajo: un dialil-disulfuro obtenido por destilación de vapor a  $100^\circ\text{C}$ ; *alicina*, el componente aislado anteriormente por Semmler, obtenido por extracción con etanol a  $25^\circ\text{C}$ ; y un precursor sin olor obtenido por extracción con etanol a  $0^\circ\text{C}$  al que posteriormente se le dio el nombre de *aliina*.



**Figura 19.** Compuestos del ajo extraídos bajo diferentes condiciones (Harris, J.C., et al., 2001).

Después de algunos estudios, establecieron que el componente identificado en el extracto etanólico obtenido a 25°C (*alicina*) era el que presentaba las principales propiedades antimicrobianas.

#### **1.4.2. Propiedades antimicrobianas**

Varios estudios han mostrado que el extracto de ajo es efectivo contra parásitos como: *Opalina ranarum*, *O. dimidicita*, *Balantidium entozoon*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosomas*, *Leishmania*, *Leptomonas* y *Crithidia*. La *alicina* y otros compuestos órgano-azufrados del ajo también son efectivos contra protozoarios (Reuter, H.D., Koch, H.P., Lawson, L.D., 1996). Se ha sugerido que las células microbianas son más afectadas que las células humanas debido a que no tienen un contenido intracelular de grupos tiol adecuado para contra-balancear la oxidación de tioles provocada por la *alicina* y sus productos derivados.

Por otra parte, se ha probado que el extracto de ajo es efectivo contra una amplia gama de bacterias gram-positivas, gram-negativas y ácido-resistentes. Algunos ejemplos de estas son: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Mycobacterium* y *Helicobacter*. Cabe mencionar que se tiene documentado el hecho de que el extracto de ajo ejerce una inhibición diferencial entre la microflora benéfica intestinal y las enterobacterias potencialmente nocivas; no se sabe exactamente a qué se debe esta inhibición diferencial, pero se piensa que algunas diferencias en la composición de las membranas celulares y la permeabilidad de estas a la *alicina* podrían ser un factor clave (Harris, J.C., et al., 2001).

El extracto de ajo ha demostrado tener propiedades antifúngicas. El primer reporte al respecto lo realizaron Schmidt y Marquardt en 1936 mientras trabajaban con cultivos de *Epidermophyton*. Posteriormente se reportó la susceptibilidad de diversos hongos ante el extracto de ajo, incluyendo: *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporum* y *Rhodotorula*. El extracto de ajo demostró disminuir la captación de oxígeno en estos microorganismos,

inhibiendo la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Harris, J.C., et al., 2001).

Se tienen muy pocos reportes de la actividad antiviral del extracto de ajo en comparación con los que se tienen sobre sus actividades antiparasitarias, antibacterianas y antifúngicas, sin embargo, en los pocos estudios realizados, se ha reportado que el extracto de ajo ejerce actividad in vitro en contra de virus como: influenza A y B (Fenwick, G.R., Hanley, A.B., 1985), citomegalovirus (Nai-Lan, G., et al., 1993), rinovirus, VIH, herpes simple 1 y 2 (Tsai, Y., et al., 1985), rotavirus y neumonía viral.

### 1.4.3. Química y mecanismo de acción

El debate entre la presencia de *alicina* en los dientes de ajo triturados, y su ausencia en los dientes de ajo intactos y carentes de olor fue resuelta después de que Stoll y Seebeck aislaron, identificaron y sintetizaron un aminoácido azufrado oxigenado que está presente en grandes cantidades en los dientes de ajo, al cual dieron el nombre de *alliina*. Se encontró que la *alliina* era el precursor estable que se convertía en *alicina* por la acción de la enzima *alliinasa* que también se encuentra presente en los dientes de ajo (Ankri, S., Mirelman, D., 1999).

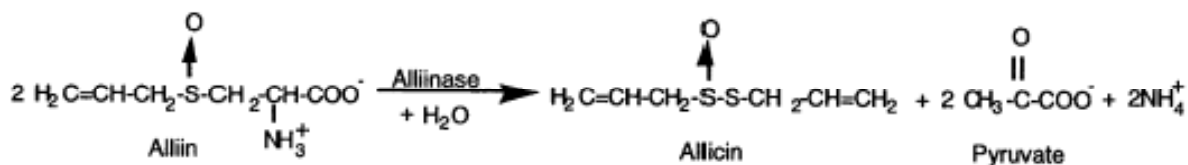


Figura 20. Formación de alicina por acción de la enzima aliinasa (Miron, T., et al., 2002).

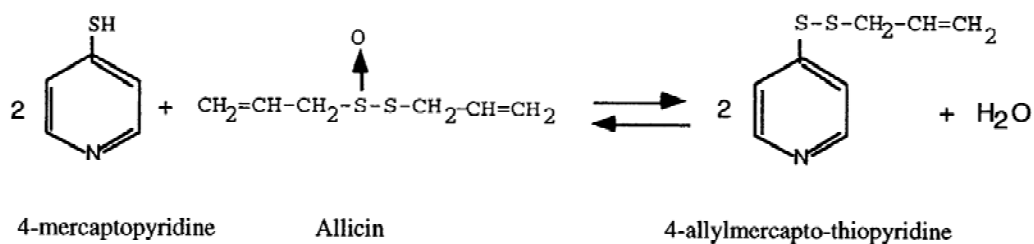
Los dientes de ajo no tienen olor hasta que estos son triturados. Estudios de corte transversal han indicado que el sustrato *alliina* y la enzima *alliinasa* están localizados en diferentes compartimentos. Esta organización única sugiere que se tiene un diseño de mecanismo de defensa contra posibles microorganismos patógenos del suelo. La invasión a los dientes de ajo por los hongos y otros microorganismos comienza por la destrucción de la membrana que envuelve los compartimentos que contienen la enzima y el sustrato. Esto provoca la interacción

entre la *aliina* y la *aliinasa* que rápidamente producen *alicina*, que a su vez, inactiva al posible invasor.

Las moléculas reactivas de *alicina* producidas tienen una vida media muy corta porque habrán de reaccionar con muchas de las proteínas aledañas, incluyendo la enzima *aliinasa*. Esta eficiente organización asegura que el mecanismo de defensa del diente de ajo solamente se active en una localización reducida y por un corto periodo de tiempo, mientras que el resto de la *aliina* y *aliinasa* se preservan en sus respectivos compartimentos y se encuentran disponibles en caso de ataques microbianos subsecuentes (Ankri, S., Mirelman, D., 1999).

La *alicina* es el compuesto activo más conocido del ajo, representa alrededor del 70% de la concentración total de tiosulfatos presentes o formados después de triturar los dientes de ajo.

Se piensa que el principal mecanismo por el que la *alicina* ejerce su efecto antimicrobiano es la inhibición de ciertas enzimas microbianas que contienen el grupo tiol, dada la reacción inmediata que se da entre dicho grupo y los tiosulfatos. La *alicina* reacciona rápidamente con los grupos tiol libres mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro (Miron, T., et al., 2002).



**Figura 21.** Ejemplo de reacción de la *alicina* por intercambio tiol-disulfuro (Miron, T., et al., 2002).

Por citar algunos ejemplos, en las amibas se ha encontrado que la *alicina* inhibe fuertemente las cistein-proteasas, alcohol deshidrogenasas y tioredoxin reductasas, que son enzimas fundamentales para mantener el equilibrio redox en el parásito (Ankri, S., Mirelman, D., 1999).



También se ha encontrado que inhibe la enzima papaína y la alcohol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  de *Thermoanaerobium brockii*; la alcohol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  del hígado equino también es inhibida por la *alicina*. De manera interesante, se ha observado que estas enzimas pueden ser reactivadas con compuestos que contienen grupos tiol, como DTT, mercaptoetanol y glutatión (Rabinkov, A., et al., 1998).

La *alicina* además, inhibe específicamente otras enzimas bacterianas como las que se encuentran en el sistema de formación de la acetil-CoA: acetato cinasa y fosfoacetil-CoA (Focke, M., Feld, A., Lichtenthaler, H., 1991). Se ha encontrado que en *Salmonella typhimurium* inhibe parcialmente la síntesis proteica y de ADN, sin embargo, se observan efectos inmediatos en la síntesis de ARN, sugiriendo que este podría ser uno de sus principales sitios de acción (Feldberg, R.S., et al., 1988).

La *alicina* exhibe una interesante selectividad y sensibilidad diferencial entre células animales y células microbianas, dañando en mucho mayor medida a estas últimas. Por lo que se ha mencionado anteriormente, se cree que dichas diferencias podrían ser explicadas por la gran cantidad de glutatión que contienen las células animales, lo cual les permite revertir la mayoría de los daños provocados en enzimas que presentan grupos tiol (Ankri, S., Mirelman, D., 1999).

Todas las descripciones anteriores sobre la amplia gama de actividades biológicas que se han encontrado en la *alicina* deberían impulsar a esta molécula a convertirse en un buen candidato para uso terapéutico.

## **CAPÍTULO 2.**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Aislar, purificar y tipificar cepas de microorganismos multiresistentes a antibióticos a partir de alimentos de origen animal para consumo humano, evaluando su comportamiento frente a extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*).

### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar la situación que guarda la aparición de cepas multiresistentes a antibióticos aisladas de alimentos de origen animal en México.
- Examinar los perfiles de resistencia de las cepas aisladas.
- Identificar la presencia de plásmido como posible elemento genético responsable de la multiresistencia a antibióticos.
- Identificar la presencia del integrón 1 como posible elemento genético responsable de la multiresistencia a antibióticos.
- Evaluar el comportamiento de las cepas multiresistentes frente a diferentes concentraciones (%P/V) de extracto acuoso de ajo.
- Estimar la CMI del extracto acuoso de ajo frente a cada cepa en estudio.
- Estimar la CMB del extracto acuoso de ajo frente a cada cepa en estudio.

### **2.3. HIPÓTESIS**

Algunos alimentos de origen animal como son: productos cárnicos, embutidos y lácteos suelen estar contaminados por microorganismos multiresistentes a antibióticos, y éstos pueden ser sensibles al efecto biocida demostrado en el ajo (*Allium sativum*).

### **2.4. JUSTIFICACIÓN**

En la literatura científica se encuentran muchos estudios en donde se documenta la aparición de cepas de bacterias multiresistentes aisladas de productos cárnicos. La multiresistencia se ha asociado tanto a factores ambientales como al uso de antibióticos como promotores de crecimiento dentro de las industrias ganadera y avícola.

Actualmente, esto se considera un problema a nivel mundial que exige tomar medidas preventivas y correctivas.

En años recientes, la Unión Europea ha dado los primeros pasos en el combate de esta problemática, implementando la vigilancia y seguimiento del uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano.

La existencia de cepas multiresistentes en la carne para consumo humano de esta región se ha considerado un riesgo potencial para la salud pública, ya que dichos microorganismos podrían actuar como reservorio de genes de resistencia y favorecer su diseminación en el medio ambiente.

En México, se cuenta con algunos estudios que documentan la presencia de cepas de bacterias multiresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano, sin embargo, son escasos los estudios del comportamiento de este tipo de cepas frente a agentes naturales con actividad biocida como el ajo, los cuales podrían representar una alternativa favorable para el tratamiento o

prevención de enfermedades causadas por microorganismos multiresistentes en donde la variedad en la elección del antibiótico se encuentra reducida.

Por las razones antes expuestas, se justifica la elaboración de trabajos como el presente y de otros que busquen explorar nuevas alternativas terapéuticas.

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Aislamiento

El aislamiento se realizó a partir de muestras de carne de pollo y carne de res de venta al menudeo en supermercados al sur de la Ciudad: Superama (sucursal Copilco) y Wal-Mart (sucursal Copilco). Se siguió el método descrito en la NOM-110-SSA1-1994 referente a la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Las muestras se trasladaron en refrigeración en una hielera hasta el laboratorio. La carne se utilizó el mismo día que fue comprada y se mantuvo en refrigeración hasta antes de su uso. Las muestras (muslo de pollo y falda de res) se tomaron con pinzas estériles y se cortaron con ayuda de un bisturí, tomando 10g de cada muestra cortada en trozos pequeños y se colocaron en un matraz con 90mL de agua peptonada estéril. Las muestras se dejaron en agitación durante 3 horas. Posteriormente, se homogeneizaron durante 2 minutos a velocidad media en un homogeneizador peristáltico (*stomacher*).

Del homogeneizado se hicieron diluciones seriadas de la siguiente manera: Se tomó 1mL del homogeneizado y se agregaron 9mL de medio de cultivo (Infusión cerebro-corazón, BHI), considerando a ésta como la dilución  $10^{-2}$  ya que el homogeneizado de la muestra representaba la dilución  $10^{-1}$ . De esta manera se prepararon las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Las diluciones fueron incubadas durante 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

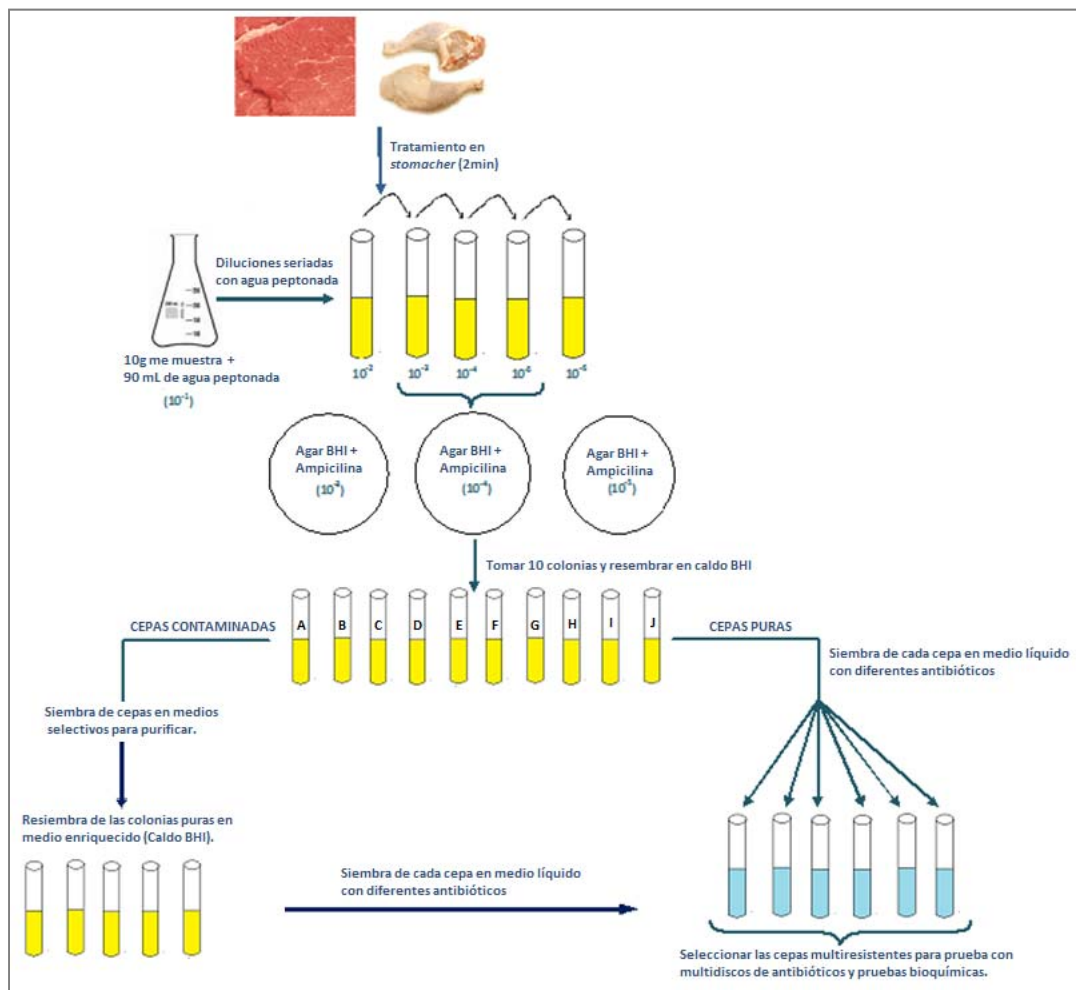
Los cultivos de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  que fueron los que presentaron mejor crecimiento, fueron sembrados en Agar BHI adicionado con un antibiótico para descartar de manera inicial a los microorganismos sensibles, limitando el crecimiento bacteriano y quedándonos con los posibles resistentes a otros antibióticos. En este caso se eligió ampicilina como antibiótico a adicionar en el medio tomando en cuenta que es uno de los antimicrobianos más ampliamente

utilizados y de fácil acceso para la población. Las cajas de Agar BHI fueron incubadas durante 24h a 37°C.

### 3.2. Purificación

Se observó la morfología macroscópica y se tomaron 10 colonias aisladas de la caja con la dilución en la que se presentó el mejor crecimiento, en cada caso. Cada colonia se resembró en caldo BHI y se le realizó tinción de Gram para observar su morfología microscópica.

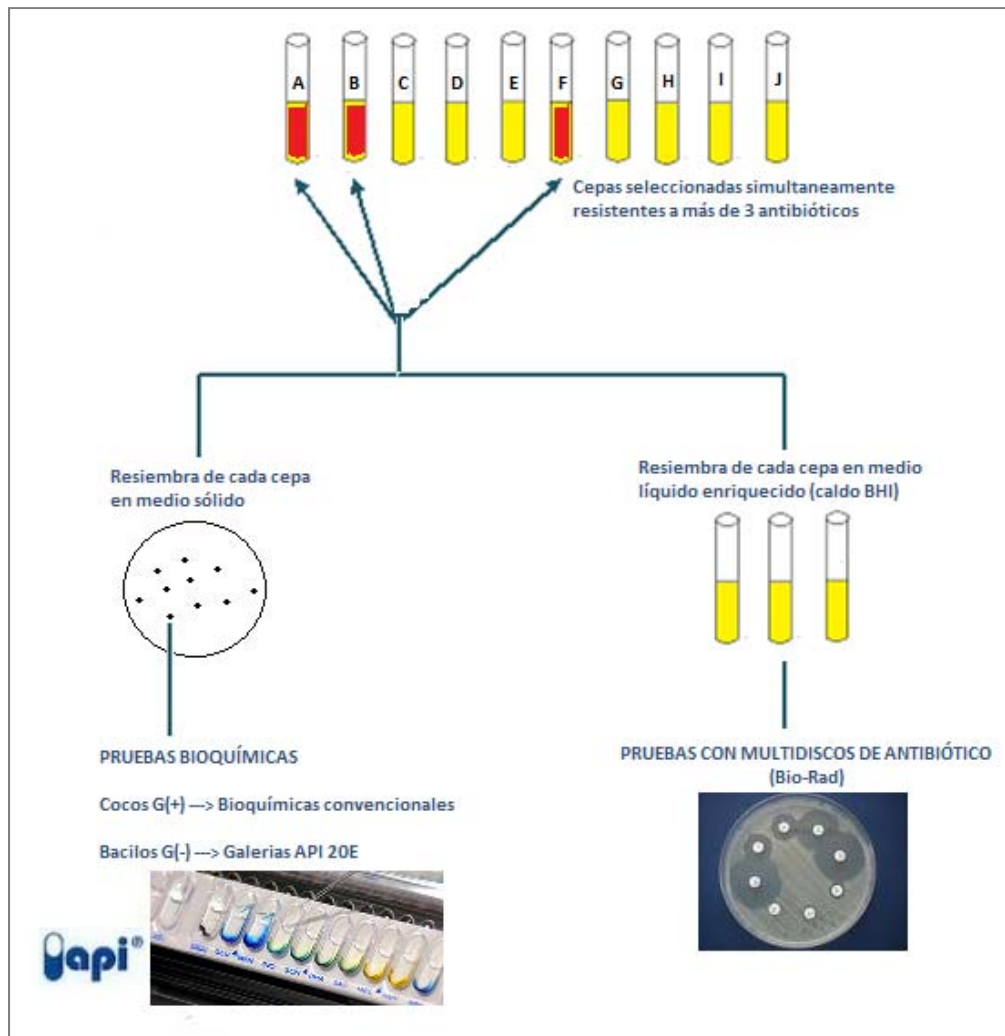
Se utilizaron medios selectivos para la purificación de algunas cepas contaminadas, como: Agar Mac Conkey, Agar ENDO, Agar EMB, Agar RVBA y Caldo BRILA.



**Figura 22.** Esquema del aislamiento, purificación y selección de las cepas de trabajo.

### 3.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Las cepas obtenidas fueron sembradas en diferentes tubos de caldo BHI adicionado con antibióticos: Ampicilina (32µg/mL), Ceftriaxona (64µg/mL), Gentamicina (8µg/mL), Trimetoprim (16µg/mL) y Vancomicina (32µg/mL). Se seleccionaron las cepas resistentes simultáneamente a más de 3 antibióticos. Se inocularon 100µL de cada cepa en cajas de Agar Mueller-Hinton y se sembró por extensión, posteriormente se colocaron multidiscos de antibiótico (Bio-Rad) para probar la sensibilidad de cada cepa de acuerdo al método de Bauer-Kirby. Las cajas de Agar Mueller-Hinton fueron incubadas durante 24h a 37°C.



**Figura 23.** Esquema de las pruebas de sensibilidad a antibióticos y pruebas bioquímicas.

### 3.4. Identificación bioquímica

Las cepas multiresistentes fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas. En el caso de los bacilos Gram-negativos se utilizaron galerías API 20E bioMérieux® S.A. por contar con este material en el laboratorio. En el caso de los cocos Gram-positivos se realizaron pruebas bioquímicas convencionales: Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Acido sulfhídrico, Indol, Movilidad, Fermentación de carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Sorbitol, Arabinosa, Manitol, Maltosa, Sacarosa), Ureasa, Nitrato, Catalasa, Ornitina, Coagulasa, Hemólisis de sangre, Bilis y esculina.

Las pruebas bioquímicas utilizadas en los bacilos Gram-negativos se llevaron a cabo de acuerdo a los procedimientos descritos en el manual de instrucciones para tiras api 20E bioMérieux® S.A.

Las pruebas bioquímicas utilizadas en los cocos Gram-positivos se realizaron de la siguiente manera:

#### *Prueba de rojo de metilo (MacFaddin, 2004)*

Se inoculó el medio RM/VP con las cepas de trabajo y fueron incubadas a 37°C durante 48h. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 2.5mL del medio y se agregaron 5 gotas del indicador de rojo de metilo. Se consideró como resultado positivo el desarrollo de un color distintivo rojo brillante en la superficie del medio, indicando la producción de grandes cantidades de ácidos durante el periodo de incubación.

#### *Voges-Proskauer (MacFaddin, 2004)*

Se inoculó el medio RM/VP con las cepas de trabajo y fueron incubadas a 37°C durante 24h. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó a cada tubo 3 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5% y 1 gota de hidróxido de potasio al 40%, se agitaron los tubos suavemente durante 30 segundos para exponer el medio al oxígeno, y se dejaron reposar durante 10 minutos. Se consideró como resultado positivo el desarrollo de



un color rosado-rojo en la superficie del medio, indicando la presencia de acetoina producida por los microorganismos a partir de la fermentación de la glucosa.

*Prueba de oxidasa (MacFaddin, 2004)*

Se colocaron discos comerciales de oxidasa sobre algunas colonias de los microorganismos de prueba incubados previamente en cajas de agar chocolate a 37°C, durante 24h. Se dejó incubar el disco durante 20 min a temperatura ambiente. Un cambio en la coloración de la colonia y/o del disco de oxidasa en una gama de púrpura a negro indican la presencia de enzimas oxidasas, tomándose este resultado como prueba positiva.

*Prueba de catalasa (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de trabajo en cajas de agar BHI por cuadrante radial para obtener colonias aisladas. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24h. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre una colonia aislada. Un resultado positivo se observó como un burbujeo inmediato sobre la colonia indicando la formación de oxígeno por acción de la enzima catalasa.

*Prueba de Acido sulfhídrico, indol y movilidad (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de trabajo en el medio de cultivo comercial SIM. El medio se sembró por picadura y se incubó a 37°C durante 24h.

La prueba de ácido sulfhídrico se consideró positiva al presentarse cualquier ennegrecimiento en el medio, a lo largo de la línea de siembra o en el fondo.

La prueba de movilidad se consideró positiva al observarse turbidez desde la línea de siembra y difundida hacia el medio, indicando que el microorganismo posee algún tipo de flagelos.

La prueba del indol se consideró positiva al observarse un anillo rojo en la interfase del medio inmediatamente después de agregar 5 gotas de reactivo de Ehrlich, indicando la capacidad del microorganismo de separar el indol a partir del triptófano.

#### *Prueba de fermentación de carbohidratos (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en caldo rojo de fenol adicionado con cada uno de los carbohidratos a evaluar (Glucosa, Lactosa, Sorbitol, Arabinosa, Manitol, Maltosa, Sacarosa), así como de tubos Durham en su interior. Los medios fueron incubados a 37°C durante 24h. La prueba se consideró positiva al observarse un vire del indicador a color amarillo indicando la utilización del carbohidrato. La presencia de una burbuja de gas dentro del tubo Durham indicó la producción de gas a partir del carbohidrato utilizado.

#### *Prueba de ureasa (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en caldo urea y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideraron resultados positivos al observarse un cambio en la coloración del medio a rosa-rojo intenso debido al aumento en la alcalinidad, indicando que el microorganismo en ese caso tiene la capacidad de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

#### *Prueba de nitrato (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en caldo nitrato, y se incubaron a 37°C durante 24h. Las pruebas fueron reveladas de la siguiente manera: Se registró la producción de burbujas de gas dentro del tubo Durham, se agregaron 5 gotas de reactivo A ( $\alpha$ -Naftilamina) y 5 gotas de reactivo B (ácido sulfanílico) para prueba de nitratos, se agitó el tubo con suavidad y se dejó reposar durante 2 minutos. Se consideró como resultado positivo para la producción de nitrito, el desarrollo de una coloración rosa a rojo en el medio de cultivo. En caso de haber obtenido un resultado negativo, se continuó con la prueba para comprobar la producción de gas  $N_2$  agregando una pequeña cantidad de zinc al medio, el desarrolló de color en este caso fue considerado como resultado positivo.

#### *Prueba de descarboxilasa: ornitina (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en medio base para descarboxilasa de MØller adicionado de ornitina. Se incubaron a 37°C durante 24h. Se consideró como

resultado positivo para ambos casos la turbidez y cambio de coloración en el medio a púrpura, indicando la producción de cadaverina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa.

*Prueba de bilis y esculina (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en medio comercial de bilis y esculina, sembrando por estría en el pico de flauta del medio. Se incubaron los tubos a 37°C durante 48h. El ennegrecimiento en la zona del pico de flauta y/o de más de la mitad del medio indicaron que la esculina fue hidrolizada por el microorganismo, tomándose este resultado como prueba positiva.

*Prueba de coagulasa (MacFaddin, 2004)*

Se inocularon las cepas de prueba en un tubo de ensaye estéril que contenía plasma humano, se rotó suavemente el tubo para favorecer la suspensión bacteriana. Se incubaron los tubos a 37°C durante 2 horas, revisando cada 30min si se presentaba coagulación.

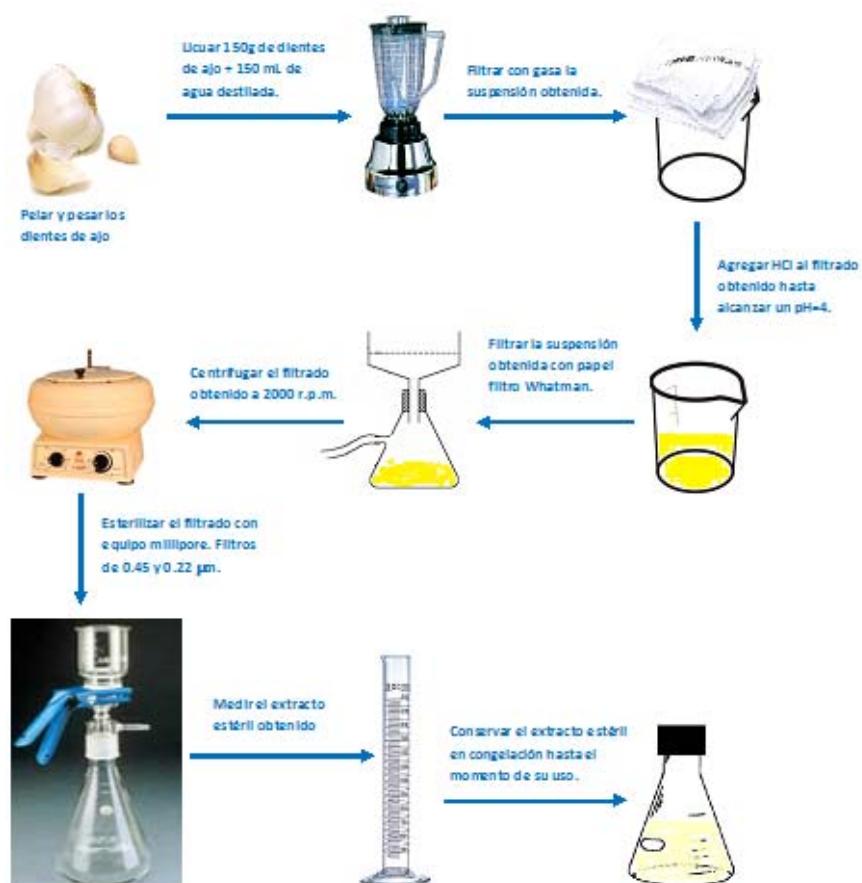
*Prueba de hemólisis (Facklam, 1991)*

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

### 3.5 Preparación del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*).

Se tomaron varias cabezas de ajo, se separaron y pelaron los dientes. Se pesaron 150g de dientes de ajo y se homogeneizaron en una licuadora con 150mL de agua destilada estéril. El homogenizado fue pasado por un filtro de gasa para retirar los restos celulares más gruesos; al filtrado obtenido se le agregó ácido clorhídrico para disminuir el pH del extracto a un valor de 4. Dicho filtrado fue pasado por filtros Whatman No. 1, No.2 y No.5 respectivamente. El nuevo filtrado obtenido fue centrifugado a 2000 r.p.m. , se recuperó el sobrenadante y finalmente éste fue pasado a través de filtros millipore de 0.45 $\mu$ m y 0.22 $\mu$ m. (Fani, M. et al., 2007; Iwalokun, B.A., 2004).

Los residuos fueron contabilizados en cada paso y el volumen final del extracto fue medido para poder calcular el %P/V del extracto estéril obtenido.

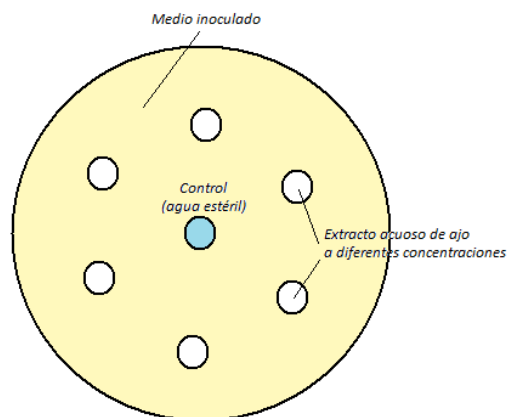


**Figura 24.** Esquema de preparación del extracto acuoso de ajo.

### 3.6. Pruebas de sensibilidad a extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*).

- ✓ Prueba de difusión en Agar.

Esta prueba fue realizada para observar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de ajo. Se crecieron las cepas de prueba durante 24h en infusión cerebro-corazón, las cepas fueron ajustadas a  $10^5$  células/mL y se inocularon 100 $\mu$ L de esta suspensión bacteriana en cajas de petri con 20mL de agar Mueller-Hinton. Posteriormente se realizaron pocillos de aproximadamente 5mm en las cajas de agar y fueron colocados 50 $\mu$ L de extracto de ajo a diferentes concentraciones en cada uno de ellos. En cada caja se colocó un pocillo con 50 $\mu$ L de agua destilada estéril como control negativo. Las cajas de agar fueron incubadas durante 24h a 37°C y finalmente se midieron los halos de inhibición observados.



**Figura 25.** Esquema de prueba de difusión en agar.

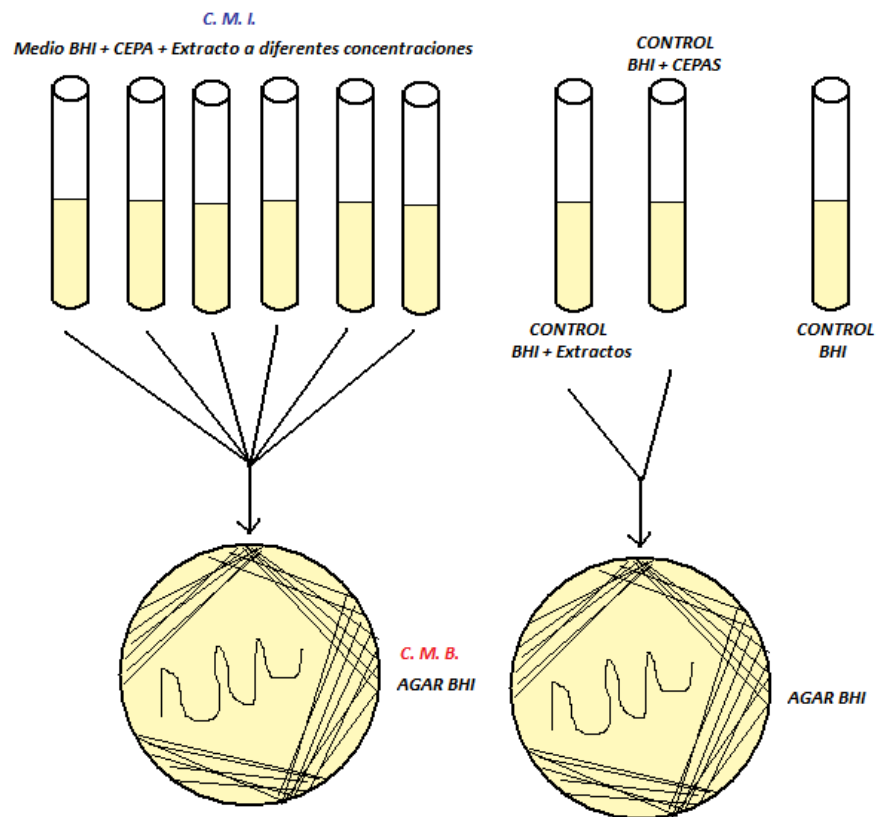
- ✓ Prueba de diluciones en caldo

Esta prueba fue realizada para calcular la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) del extracto acuoso de ajo. Se realizaron diluciones del extracto crudo obtenido de 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1% respectivamente, con infusión cerebro-corazón. Los tubos fueron inoculados con 25 $\mu$ L de cepas a 24h de crecimiento ajustados a  $10^4$  células/mL. Se colocaron tubos no inoculados conteniendo únicamente el medio de cultivo adicionado del extracto acuoso de ajo

como controles negativos, también se inocularon tubos con medio de cultivo puro como controles positivos. Todos los tubos fueron incubados a 37°C y se revisó el crecimiento a las 24 y 48h. La C.M.I. fue definida como la menor concentración de extracto de ajo en la que se observó completamente inhibido el crecimiento microbiano.

✓ Prueba de crecimiento en Agar

Esta prueba fue realizada para determinar si el extracto acuoso de ajo producía un efecto bacteriostático o bactericida, y, en este último caso, calcular la concentración mínima bactericida (C.M.B.). Se inocularon cajas de agar BHI a partir de los tubos utilizados en la prueba de diluciones en caldo. Las cajas de agar fueron incubadas durante 24h a 37°C. La C.M.B. fue definida como la menor concentración de extracto de ajo en la que no hubo crecimiento bacteriano en un medio de cultivo sólido.



**Figura 26.** Esquema de pruebas de crecimiento en caldo (C.M.I.) y crecimiento en agar (C.M.B.).

### 3.7. Extracción de ADN total y ADN plasmídico.

- ✓ Extracción de ADN total (Palumbi et al., 1991)

Se cultivaron cada una de las cepas durante 24h a 37°C en medio BHI, se tomaron 1.5mL del cultivo, se pasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron durante 1min a 10 000 r.p.m. El procedimiento se realizó por duplicado para lograr concentrar el pellet bacteriano.

Al término de la segunda centrifugación el sobrenadante se decantó y el pellet obtenido fue resuspendido en 400µL de buffer de lisis. La suspensión se agitó vigorosamente durante 1 minuto.

#### ***Buffer de lisis:***

EDTA..... 100 mM                      Tris pH 7.5..... 10 mM

SDS..... 1.0%

Posteriormente, la suspensión se centrifugó (10 000 r.p.m./4°C) durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y este se resuspendió con un volumen igual de solución de fenol:cloroformo (1:1), mezclando vigorosamente hasta obtener una suspensión de aspecto lechoso.

Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos para separar las fases orgánica y acuosa. Se recuperó la fase acuosa y nuevamente se resuspendió en un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores.

Se recuperó la fase acuosa. A esta se le agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 0.5 volúmenes de isopropanol, mezclando suavemente. La suspensión fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente.

Terminada la incubación, se centrifugó durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet obtenido se enjuagó con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante.

Finalmente se dejó secar el pellet por evaporación del disolvente y fue resuspendido en 20µL de agua desionizada estéril.

- ✓ Extracción de ADN plasmídico (Birnboim y Doly, 1979)

Se cultivaron 5mL de cada una de las cepas durante 24h en medio BHI, se tomaron 1.5mL del cultivo, se pasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron durante 1min. El procedimiento se realizó por duplicado para lograr concentrar el pellet bacteriano.

Se decantó y el pellet obtenido fue resuspendido en 100µL de solución1 (fría).

#### **Solución 1:**

Sacarosa..... 15%                      EDTA..... 10 mM  
Tris.HCl pH 8.0..... 25 mM

La suspensión se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación se agregaron 200µL de solución 2, se mezcló por inversión del tubo Eppendorf y se incubó durante 10 minutos en hielo.

#### **Solución 2:**

NaOH..... 0.2 N                      SDS..... 1%

Transcurrida la segunda incubación se agregaron 150µL de solución 3 (fría), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente durante 15 min en hielo.

#### **Solución 3:**

Acetato de potasio 5 M..... 60 mL                      H<sub>2</sub>O..... 28.5 mL  
Ácido acético..... 11.5 mL



Finalizado el tiempo de incubación se centrifugó la suspensión durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y éste fue centrifugado nuevamente durante 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1), agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión de aspecto lechoso. Dicha suspensión se centrifugó durante 30 seg (10 000 r.p.m./4°C).

Se recuperó la fase acuosa y a ésta se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La solución fue incubada durante 5 min a -70°C.

Terminada la incubación, se centrifugó durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet obtenido se enjuagó con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante.

Finalmente se dejó secar el pellet por evaporación del disolvente y fue resuspendido en 20µL de agua desionizada estéril.

El ADN extraído, tanto el total como el plasmídico, se corrió en un gel de agarosa al 1%, se tomaron 5µL de cada muestra, posteriormente se mezclaron con 4µL de agua desionizada estéril y 1µL de buffer de carga. Esta mezcla se colocó en cada uno de los pocillos. El gel se corrió en una cámara de electroforesis a 90 volts durante aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, se tiñó sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL), durante 2 a 3 minutos y se destiñó sumergiéndolo en agua destilada durante aproximadamente 5 minutos. Finalmente, se visualizó el gel bajo luz ultravioleta.

### 3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La metodología para realizar PCR fue la siguiente:

1. Se agregaron los siguientes componentes en el orden descrito.

a) 35µL de agua desionizada estéril para obtener un volumen final de reacción de 50µL.

b) 10 µL de GoTaq® Reaction buffer PROMEGA.

c) 1µL de ADN bacteriano (A una concentración de 1ng/□L)

d) 1µL de cada una de las soluciones de los primers: SUL 1B e INT F (la concentración final de cada primer fue de 200 nM).

**SUL 1B      5´- GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC - 3´**

**INT F        5´- GGC ATC CAA GCA GCA AGC - 3´**

e) 1µL de GoTaq® DNA Polymerase PROMEGA.

2. Se tapó y mezcló perfectamente el contenido de los tubos.

3. Se colocaron los tubos en el termociclador, con el siguiente programa:

I. Arranque 3 minutos a 94°C

II. Desnaturalización 30 segundos a 94°C

III. Hibridación 2 minutos a 59°C

IV. Amplificación 2 minutos a 72°C (35 ciclos)

V. Etapa final 6 minutos a 72°C

VI. Enfriamiento hasta alcanzar 4°C

Una vez concluido el programa de PCR las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta la realización del gel de agarosa al 1%. Se corrieron las muestras junto con un marcador de pesos moleculares (ADN del fago  $\lambda$ , cortado con la enzima de restricción HIND III) para poder visualizar los productos del PCR. Dicho gel se corrió y tiñó de la misma manera que el de ADN total y plasmídico.

Los geles ya corridos con los productos del PCR fueron fotografiados para su posterior análisis, utilizando regresión lineal.

Para el análisis se midió la distancia recorrida por los fragmentos a partir del pozo de cada carril en donde fue colocada la muestra, y se graficó contra el peso de los fragmentos del marcador de peso molecular, que en este caso fue ADN del fago  $\lambda$  cortado con la enzima de restricción Hind III; los fragmentos de ADN de este marcador presentan pesos de 23.1, 9.4, 6.7, 4.4, 2.3, 2.0 y 0.56 Kpb.

Una vez que se obtuvo la gráfica con regresión lineal (distancia recorrida contra peso molecular), se mide la distancia recorrida por los fragmentos que se observen en las muestras obtenidas por PCR, y se sustituye dicha distancia en la ecuación de regresión lineal, para obtener una estimación del peso molecular de cada fragmento.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento y purificación

La morfología macroscópica de las colonias observadas en las cajas de agar adicionado con ampicilina sugería colonias muy parecidas y, solamente se diferenciaban de manera evidente dos tipos de colonias: las primeras eran colonias blanquecinas grandes, circulares, de bordes enteros, con elevación convexa y textura butirosa; el otro tipo de colonias observadas eran puntiformes, de bordes enteros, de elevación convexa y de textura seca, ambos tipos de colonias presentaron crecimiento abundante.

Se seleccionaron 10 colonias procedentes de carne de pollo y 10 colonias procedentes de carne de res. Dado que en la morfología macroscópica solo se diferenciaron dos tipos de colonias, dentro de las colonias seleccionadas podrían existir más de 2 o 3 similares.

Las colonias seleccionadas se sembraron en medio líquido BHI para favorecer su crecimiento, ya que provenían de un medio en el que se encontraban bajo condiciones de estrés. Posteriormente se determinó la morfología microscópica de cada una de ellas.

En la **Tabla 4** se muestran las características microscópicas observadas de manera inicial de las 20 cepas seleccionadas en el aislamiento con el nombre que se le dio a cada una de ellas. En general, para ambos aislamientos (de carne de pollo y de carne de res) se observaron dos tipos de morfología: **Cocos Gram-positivos** y **Bacilos Gram-negativos**.

**Tabla 4.** Cepas obtenidas de los aislamientos y morfología microscópica observada.

Procedencia	Cepa denominada	Morfología microscópica
Carne de pollo	A	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	B	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	C	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	D	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	E	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	F	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	G	Bacilos cortos, anchos y delgados, Gram-negativos
	H	Cocos en racimos, Gram-positivos
	I	Cocos en racimos, Gram-positivos
	J	Cocos dispersos, Gram-positivos
Carne de res	A	Bacilos cortos, Gram-negativos
	B	Bacilos cortos, Gram-negativos
	C	Cocos en racimos, Gram-positivos
	D	Cocos en racimos, Gram-positivos
	E	Cocos en racimos, Gram-positivos
	F	Cocos en racimos, Gram-positivos
	G	Cocos dispersos, Gram-positivos
	H	Cocos dispersos, Gram-positivos
	I	Cocos dispersos, Gram-positivos
	J	Cocos dispersos, Gram-positivos

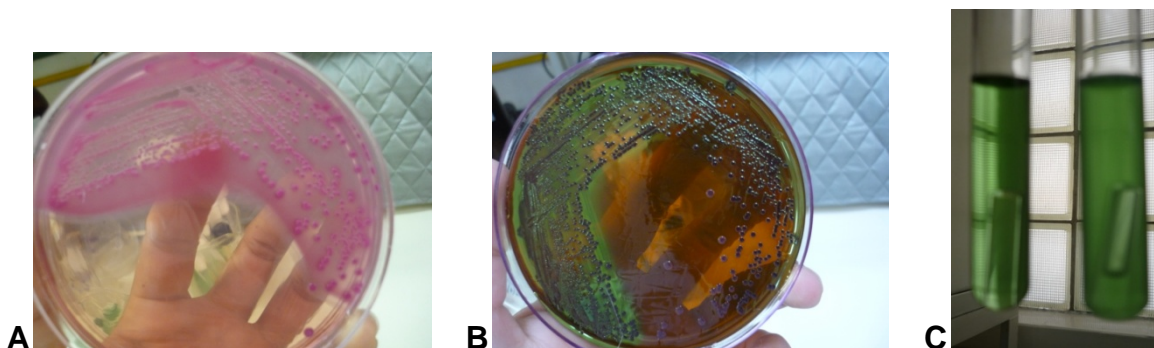
Para lograr un mejor aislamiento y purificación, las cepas procedentes de carne de pollo: A, B, C, D, E, F y G fueron sembradas en los medios selectivos que se muestran en la **Tabla 5** para bacilos entéricos Gram-negativos, ya que la morfología microscópica sugirió una posible contaminación por dos diferentes tipos de bacilos.

En la **Tabla 5** se muestra la morfología microscópica y macroscópica del crecimiento de las cepas con sospecha de contaminación en diferentes medios de cultivo selectivos. En todas las cepas, las descripciones macroscópicas y microscópicas fueron similares.

**Tabla 5.** Resultados del crecimiento de las cepas de bacilos Gram-negativos con sospecha de contaminación en diferentes medios selectivos.

Medio de cultivo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<b>Agar Mac Conkey</b>	Colonias grandes, rosadas, rodeadas de un halo de precipitación blanquecino.	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>Agar ENDO</b>	Colonias grandes, rojizas con brillo verde metálico.	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>Agar EMB</b>	Colonias grandes, moradas con brillo verde metálico.	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>Agar RVBA</b>	Colonias grandes de coloración rojizas-púrpura.	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>Caldo BRILA</b>	Turbidez en el medio y presencia de burbujas dentro de la campana de Durham.	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)

En la **Figura 27** se muestra la morfología macroscópica observada en todas las cepas, en algunos de los medios selectivos utilizados.



**Figura 27.** Crecimiento de las cepas de bacilos Gram-negativos con sospecha de contaminación en algunos medios selectivos. **A)** Agar Mac Conkey, **B)** Agar EMB, **C)** Caldo BRILA (A la izquierda se muestra el control con el medio translúcido y sin gas en el tubo Durham; a la derecha se muestra el medio inoculado).

Después de observar el crecimiento de los microorganismos y analizar la morfología macroscópica y microscópica en cada uno de los medios anteriores, se determinó que las cepas aisladas no estaban contaminadas y se consideraron como cepas con *pleomorfismo*.

Una vez obtenidas cepas puras, estas fueron sembradas en medio selectivo (caldo BHI adicionado de diferentes antibióticos) para seleccionar aquellas cepas resistentes a 3 o más antibióticos simultáneamente. Se prepararon 5 diferentes medios selectivos adicionados de un antibiótico [Ampicilina (32µg/mL), Ceftriaxona (64µg/mL), Gentamicina (8µg/mL), Trimetoprim (16µg/mL) y Vancomicina (32µg/mL)], como se mencionó en el capítulo referente a materiales y métodos. Las cepas fueron consideradas resistentes si se presentaba crecimiento en el medio de cultivo, es decir, turbidez en el medio.

En la **Tabla 6** se presentan los resultados, en donde se encontró que el 35% (7 cepas) del total de las cepas aisladas (20 cepas) resultaron ser simultáneamente resistentes a más de 3 antibióticos. El 86% de dichas cepas multiresistentes correspondieron a bacilos Gram-negativos. Considerando que las características macroscópicas y microscópicas de estos últimos fueron similares en todos los casos, se seleccionaron 2 cepas de bacilos Gram-negativos que, a nuestro criterio, presentaban mejores características de crecimiento para continuar con las pruebas de sensibilidad a antibióticos y evitar gasto innecesario de reactivos.

**Tabla 6.** Resultados del número de antibióticos a los que resistió cada cepa.

Procedencia	Cepa	No. de antibióticos resistente
Carne de pollo	<b>A</b>	<b>4</b>
	<b>B</b>	<b>4</b>
	<b>C</b>	<b>4</b>
	D	3
	<b>E</b>	<b>4</b>
	F	3
	<b>G</b>	<b>4</b>
	H	2
	I	1
	J	1
Carne de res	A	3
	<b>B</b>	<b>4</b>
	C	2
	D	2
	E	1
	<b>F</b>	<b>5</b>
	G	2
	H	2
	I	1
	J	2

En la **Tabla 7** se presentan las cepas que finalmente fueron seleccionadas para continuar con las pruebas, tanto de sensibilidad a antibióticos, como de caracterización bioquímica. En esta tabla también se presenta el origen de su aislamiento y la morfología microscópica en cada caso.

**Tabla 7.** Cepas seleccionadas para el análisis y estudio de resistencia e identificación bioquímica.

Cepa	Origen	Morfología
<b>A</b>	Carne de pollo	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>B</b>	Carne de pollo	Bacilos cortos, delgados y anchos. Gram (-)
<b>F</b>	Carne de res	Cocos en racimos, Gram (+)



## 4.2. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Las cepas resistentes a más de 3 antibióticos que fueron seleccionadas se sembraron en agar Mueller-Hinton, colocando multidiscos de antibiótico (Bio-Rad) para determinar su posible resistencia a otros antibióticos de acuerdo con el método de Bauer-Kirby.

Los resultados obtenidos (**Tablas 8 y 9**) muestran que la cepa A proveniente de carne de pollo fue resistente a 11 antibióticos; la cepa B también proveniente de carne de pollo fue resistente a 12 antibióticos y la cepa F proveniente de carne de res fue resistente a 10 antibióticos (incluyendo las resistencias intermedias).

**Tabla 8.** Resultados del antibiograma de las cepas A y B.

CEPA	Discos de antibiótico											
	NF	CL	CPF	CFX	CF	CB	AM	STX	NOF	NET	GE	AK
<b>A</b>	S	R	R	R	MR	MR	MR	MR	MR	I	R	R
<b>B</b>	I	R	R	R	MR	MR	MR	MR	MR	R	R	R

**NF:** Nitrofurantoína, **CL:** Cloranfenicol, **CPF:** Ciprofloxacina, **CFX:** Cefotaxima, **CF:** Cefalotina, **CB:** Carbenicilina, **AM:** Ampicilina, **STX:** Sulfametoxazol/Trimetoprim, **NOF:** Norfloxacina, **NET:** Netilmicina, **GE:** Gentamicina, **AK:** Amikacina.

**Tabla 9.** Resultados del antibiograma de la cepa F.

CEPA	Discos de antibiótico											
	AM	CF	CFX	CPF	CLM	PE	TE	SXT	DC	E	GE	VA
<b>F</b>	R	MR	S	MR	MR	MR	S	MR	MR	R	MR	R

**AM:** Ampicilina, **CF:** Cefalotina, **CFX:** Cefotaxima, **CPF:** Ciprofloxacina, **CLM:** Clindamicina, **PE:** Penicilina, **TE:** Tetraciclina, **STX:** Sulfametoxazol/Trimetoprim, **DC:** Dicloxacilina, **E:** Eritromicina, **GE:** Gentamicina, **VA:** Vancomicina.

### Referencias:

**MR: Muy resistente.** Sin halo de inhibición.

**R: Resistente.** Se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano (C.M.I.).

**S: Sensible.** Indica que la posible infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la C.M.I. o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano.

**I: Intermedia.** Indica que el halo traducido en valores de C.M.I. se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en la sangre y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual.

### 4.3. Caracterización e identificación bioquímica

A continuación se muestran los resultados de la caracterización bioquímica de las cepas multiresistentes. En la **Tabla 10** se presentan los resultados de las galerías API 20E bioMérieux® S.A. con lo cual se determinó que las cepas A y B provenientes de carne de pollo corresponden a *Escherichia coli*. En la **Tabla 11** se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de la cepa F proveniente de carne de res, con las cuales se determinó que esta corresponde a *Enterococcus raffinosus*.

**Tabla 10.** Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas A y B.

Prueba	Resultado
ONPG	+
ADH	-
LDC	+
ODC	+
CIT	-
H <sub>2</sub> S	-
URE	-
TDA	-
IND	+
VP	-
GEL	-
GLU	+
MAN	+
INO	-
SOR	+
RHA	+
SAC	-
MEL	+
AMY	-
ARA	+
OX	-
NO <sub>2</sub>	+
N <sub>2</sub>	-
MOB	+
McC	+
OF-O	-
OF-F	-

**Tabla 11.** Resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa F.

Prueba	Resultado
HEM	-
OXI	-
CAT	-
URE	-
RM	-
VP	-
N <sub>2</sub>	+
MOV	-
IND	-
ORN	-
SH <sub>2</sub>	-
OF(Ox)	+
OF(Fer)	+
LAC	+
GLU	+
SOR	+
ARA	+
MAN	+
MAL	+
SAC	+
BIL	+
ESC	+
COG	-

*Referencias de las pruebas bioquímicas para la cepa F :*

**HEM:** Hemólisis, **OXI:** Citocromo oxidasa, **CAT:** Catalasa, **URE:** Ureasa, **RM:** Producción de ácidos, **VP:** Producción de acetoina, **N<sub>2</sub>:** Reducción al estado N<sub>2</sub>, **MOV:** Movilidad, **IND:** Producción de indol, **ORN:** Ornitina descarboxilasa, **SH<sub>2</sub>:** Producción de ác. Sulfhídrico, **OF(Ox):** Oxidación de glucosa, **OF(Fer):** Fermentación de glucosa, **LAC:** Fermentación/oxidación de lactosa, **GLU:** Fermentación/oxidación de glucosa, **SOR:** Fermentación/oxidación de sorbitol, **ARA:** Fermentación/oxidación de arabinosa, **MAN:** Fermentación/oxidación de manitol, **MAL:** Fermentación/oxidación de maltosa, **SAC:** Fermentación/oxidación de sacarosa, **BIL:** Crecimiento en sales biliares, **ESC:** Hidrólisis de esculina, **COG:** Coagulasa.

En la **Figura 28** se muestran los resultados de las galerías API inoculadas con las cepas A y B, en varios casos es posible observar el vire de los indicadores.



**Figura 28.** Fotografía de los resultados obtenidos con galerías API 20E bioMérieux® S.A.

*Referencias de las pruebas en galerías API 20E bioMérieux® S.A.:*

**ONPG:** β-galactosidasa, **ADH:** Arginina-dihidrolasa, **LDC:** Lisina decarboxilasa, **ODC:** Ornitina decarboxilasa, **CIT:** Utilización de citrato, **H<sub>2</sub>S:** Producción de H<sub>2</sub>S, **URE:** Ureasa, **TDA:** Triptófano desamilasa, **IND:** Producción de indol, **VP:** Producción de acetoina, **GEL:** Gelatinasa, **GLU:** Fermentación/oxidación de glucosa, **MAN:** Fermentación/oxidación de manitol, **INO:** Fermentación/oxidación de inositol, **SOR:** Fermentación/oxidación de sorbitol, **RHA:** Fermentación/oxidación de ramnosa, **SAC:** Fermentación/oxidación de sacarosa, **MEL:** Fermentación/oxidación de melibiosa, **AMY:** Fermentación/oxidación de amígdalina, **ARA:** Fermentación/oxidación de arabinosa, **OX:** Citocromo oxidasa, **NO<sub>2</sub>:** Producción de NO<sub>2</sub>, **N<sub>2</sub>:** Reducción al estado N<sub>2</sub>, **MOB:** Movilidad, **McC:** Crecimiento en agar Mac Conkey, **OF-O:** Oxidación de glucosa, **OF-F:** Fermentación de glucosa.

#### 4.4. Pruebas para determinar la sensibilidad al extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*).

Para las pruebas de sensibilidad frente al extracto acuoso de ajo, se utilizaron las cepas que fueron aisladas y caracterizadas bioquímicamente. Además se emplearon 3 cepas más que previamente se habían aislado de carne de res y que se conservaban en congelación en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular, y a las cuales ya se les había determinado su multiresistencia.

De esta manera, las cepas de trabajo para pruebas con el extracto acuoso de ajo fueron las siguientes:

**Tabla 12.** Cepas de trabajo con extracto acuoso de ajo.

Cepa	Procedencia	Morfología	No. de antibióticos a los que es resistente
A	Carne de pollo	Bacilos Gram (-)	11
B	Carne de pollo	Bacilos Gram (-)	12
C	Cepario (carne de res)	Cocos Gram (+)	12
D	Cepario (carne de res)	Cocos Gram (+)	12
E	Cepario (carne de res)	Cocos Gram (+)	12
F	Carne de res	Cocos Gram (+)	10

A continuación se presentan los resultados de las pruebas realizadas con extracto acuoso de ajo:

#### **Prueba de difusión en Agar.**

En la **Tabla 13** se muestran los resultados de esta prueba. Los números expresan el diámetro del halo de inhibición medido en milímetros, mientras que la letra N representa un resultado negativo indicando que no se observó halo de inhibición alrededor del pocillo con extracto acuoso de ajo.

En general, el crecimiento de las cepas de bacilos (A y B) se inhibió a concentraciones más bajas de extracto comparadas con las concentraciones

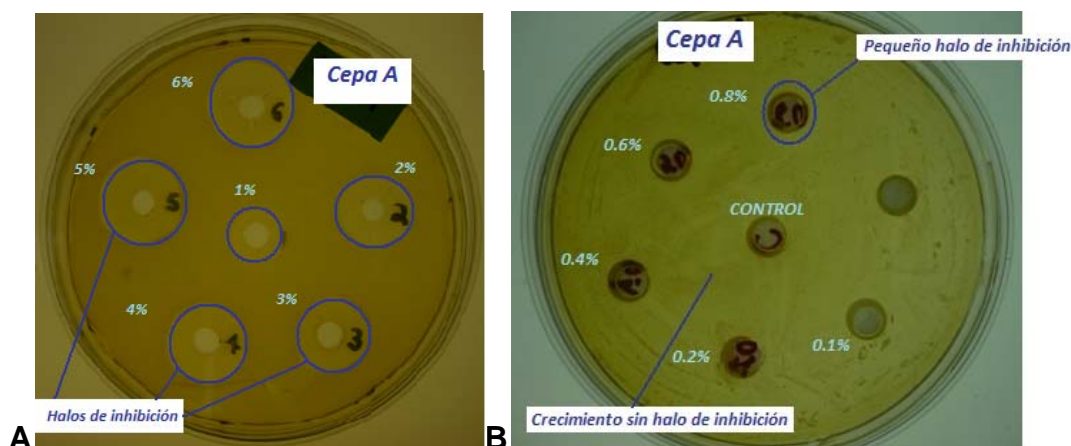
necesarias para inhibir el crecimiento de las cepas correspondientes a cocos (cepas C, D, E y F).

**Tabla 13.** Resultados del halo de inhibición medido para cada cepa a diferentes concentraciones de extracto acuoso de ajo.

PRUEBAS EN AGAR MUELLER-HINTON (Halo de inhibición mm)																
Concentración del extracto de ajo (%P/V)																
CEPA	40%	30%	20%	10%	6%	5%	4%	3%	2%	1%	0.80%	0.60%	0.40%	0.20%	0.10%	
A	21	21	21	21	21	20	19	18	17	12	10	N	N	N	N	
B	20	20	20	20	20	20	19	17	16	12	10	N	N	N	N	
C	24	20	18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
D	20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
E	16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
F	17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

N=Resultado negativo, sin halo de inhibición.

En la **Figura 29** se muestran encerrados con un círculo azul los halos de inhibición que fueron observados durante las pruebas de difusión en agar, en este caso se muestran como ejemplo los resultados para la cepa A. En los pocillos en donde no hay círculos se observa crecimiento microbiano alrededor de ellos, indicando que el microorganismo tiene la capacidad de crecer bajo esas condiciones de porcentaje de extracto acuoso de ajo.

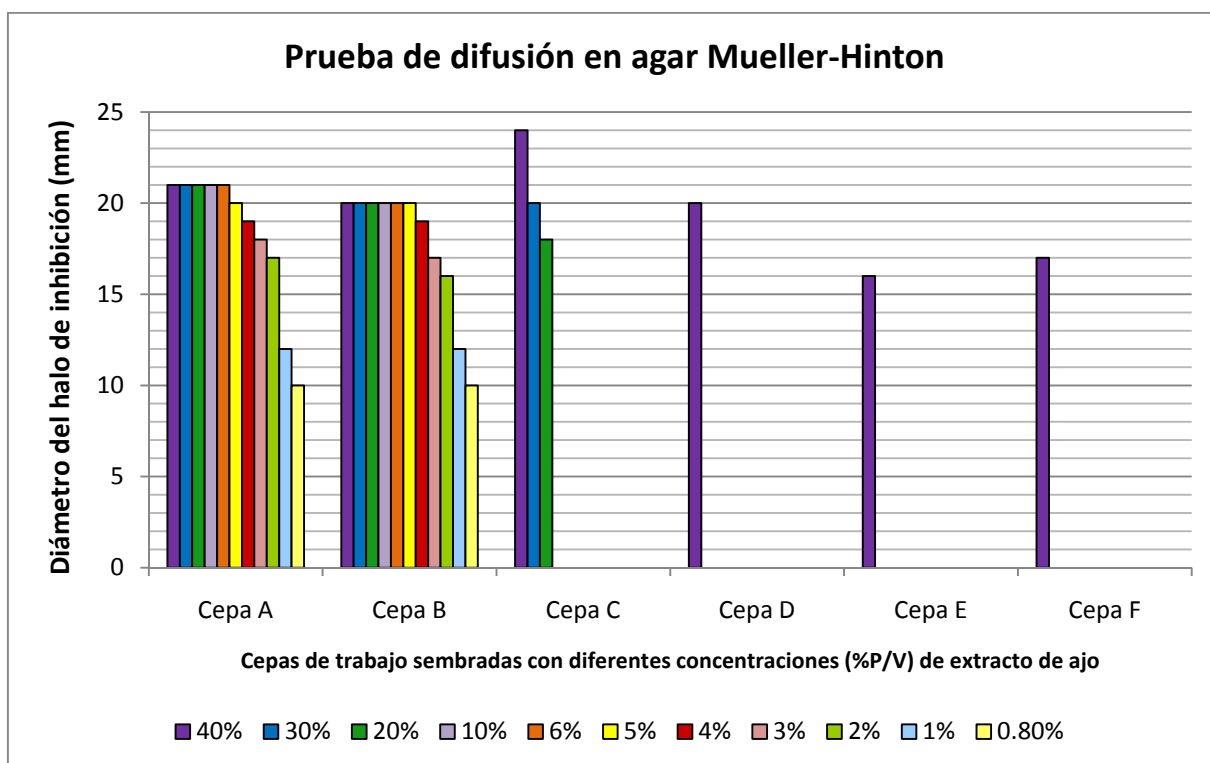


**Figura 29.** Halos de inhibición observados en la prueba de difusión en agar Mueller-Hinton. Ejemplo de algunos de los resultados de la Cepa A. **A)** Pocillos con extracto acuoso de ajo a concentraciones de 6% a 1%. **B)** Pocillos con extracto acuoso de ajo a concentraciones de 0,8% a 0.1%, incluyendo un control con agua destilada estéril.

En la **Gráfica 1** se presentan de manera resumida los resultados de la prueba de difusión en agar para cada una de las cepas. Cada barra representa un porcentaje de extracto acuoso de ajo y el diámetro del halo de inhibición medido para dicho porcentaje en cada una de las cepas. En el caso de la cepa C, solo se observan 3 barras ya que en porcentajes de extracto acuoso de ajo menores de 20% todos los resultados fueron negativos, es decir, no se observó halo de inhibición. Lo mismo sucedió con las cepas D, E y F, aunque en este caso los resultados negativos se presentaron a partir de porcentajes de extracto acuoso de ajo menores al 40%.

Como se puede observar, el crecimiento de las cepas A y B (correspondientes a bacilos) se ve inhibido en diferente medida desde la concentración más alta de extracto (40%) hasta una concentración de extracto de 0.8%. Por otra parte, el crecimiento de las cepas C, D, E y F (correspondientes a cocos) solo resultó inhibido a las concentraciones más altas de extracto utilizadas.

**Gráfica 1.** Resultados del halo de inhibición medido para cada cepa a diferentes concentraciones de extracto acuoso de ajo. No se presentan en este gráfico los extractos de 0.6% y menores, ya que no se observó halo en ninguno de los casos.



## Prueba de diluciones en caldo

En la **Tabla 14** se muestran los resultados de esta prueba. En este caso, las letras N representan un resultado negativo, es decir, que no se observó turbidez en el medio de cultivo. Las letras P representan un resultado positivo, es decir, turbidez en el medio de cultivo después de 24 o 48 horas de incubación. El crecimiento de todas las cepas, con excepción de la cepa F, se inhibió a concentración de 1% de extracto acuoso de ajo.

**Tabla 14.** Resultados del crecimiento observado en cada cepa sembrada en medio líquido adicionado de extracto acuoso de ajo a diferentes concentraciones.

PRUEBAS EN INFUSION CEREBRO-CORAZÓN (C.M.I.)															
Concentración del extracto de ajo (%P/V)															
CEPA	20%	15%	10%	8%	6%	5%	4%	3%	2%	1%	0.80%	0.60%	0.40%	0.20%	0.10%
A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P
B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	<u>P</u>	P	P	P	P
C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P
D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	<u>P</u>	P	P	P	P
E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P
F	N	N	N	N	N	N	N	N	<u>P</u>	P	P	P	P	P	P

N=Resultado negativo, sin turbidez en el medio.

P=Resultado positivo en 24h, turbidez en el medio.

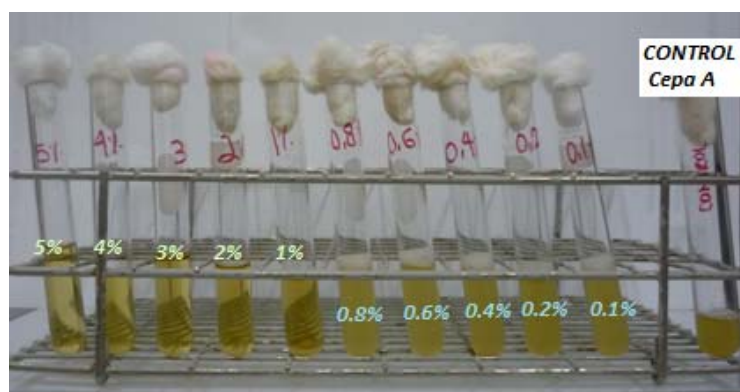
P=Resultado positivo en 48h, turbidez en el medio.

En la **Figura 30** se muestra la serie de controles que fueron utilizados para esta prueba. Se observan los controles de medio de cultivo adicionado solamente con extracto acuoso de ajo, además de un control de medio de cultivo sin inocular. En todos los casos el medio en los tubos se observa translúcido después del tiempo de incubación.



**Figura 30.** Pruebas de diluciones en caldo. Se presenta la serie de los controles del extracto de ajo a diferentes concentraciones, así como del control del medio BHI después de haber sido incubados.

En las **Figuras 31 y 32** se muestran los resultados de esta prueba para la cepa A y cepa F, respectivamente, como ejemplo del procedimiento realizado en cada una de las cepas. La cepa A presentó crecimiento (turbidez) en el medio de cultivo adicionado de extracto desde una concentración de 0.1% hasta una concentración de 0.8%, a concentraciones mayores de extracto el crecimiento fue inhibido. Por otra parte, la cepa F presentó crecimiento en el medio de cultivo adicionado de extracto desde una concentración de 0.1% hasta una concentración de 2% ya que a mayores concentraciones de extracto el crecimiento fue inhibido.



**Figura 31.** Pruebas de diluciones en caldo. Se presentan los resultados de la Cepa A sembrada en concentraciones de extracto de 0.1% a 5%, incluyendo un control positivo de crecimiento de la cepa.





**Figura 32.** Pruebas de diluciones en caldo. Se presentan los resultados de la Cepa F sembrada en concentraciones de extracto de 0.1% a 5%, incluyendo un control positivo de crecimiento de la cepa.

### **Prueba de crecimiento en Agar**

En la **Tabla 15** se muestran los resultados de esta prueba. Los números expresan el número de unidades formadoras de colonias (UFC) contadas en cada caso, la letra P se refiere a un resultado positivo, es decir crecimiento microbiano con UFC incontables, mientras que la letra N se refiere a un resultado negativo indicando que no se observó crecimiento en el medio.

Los resultados de la concentración mínima bactericida (C.M.B.) fueron similares en el caso de las cepas A y B, correspondientes a bacilos. Por otra parte, hay grandes variaciones en la C.M.B. encontrada en las cepas correspondientes a cocos, observándose C.M.B. que abarcan un rango desde 2% de extracto acuoso de ajo, hasta 15% de extracto.

**Tabla 15.** Resultados del número de colonias observado en cada cepa sembrada en medio sólido, provenientes de un cultivo en medio líquido adicionado de extracto acuoso de ajo a diferentes concentraciones.

PRUEBAS EN AGAR BHI (C.M.B.)															
Concentración del extracto de ajo (%P/V)															
CEPA	20%	15%	10%	8%	6%	5%	4%	3%	2%	1%	0.80%	0.60%	0.40%	0.20%	0.10%
A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P
B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	50	P	P	P	P
C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	16	P	P	P	P	P
D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	63	P	P	P	P	P
E	N	N	5	5	10	16	13	10	16	50	57	P	P	P	P
F	N	N	N	3	20	7	8	16	P	75	82	P	P	P	P

**N**=Resultado negativo, sin crecimiento en el medio.

**P**=Resultado positivo, UFC incontables.

**Numero**=Resultado positivo, numero de UFC contabilizadas.

En la **Tabla 16** se resumen los resultados de la prueba de crecimiento en agar, en donde se encontró la concentración mínima bactericida (C.M.B.) y los resultados de la prueba de diluciones en caldo, en donde se encontró la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.).

**Tabla 16.** Resultados de la C.M.I. y C.M.B. encontradas para cada cepa en estudio.

Cepa	C.M.I.	C.M.B.
A	1%	1%
B	1%	1%
C	1%	2%
D	1%	2%
E	1%	15%
F	3%	10%

#### 4.5. Extracción de ADN total y ADN plasmídico.

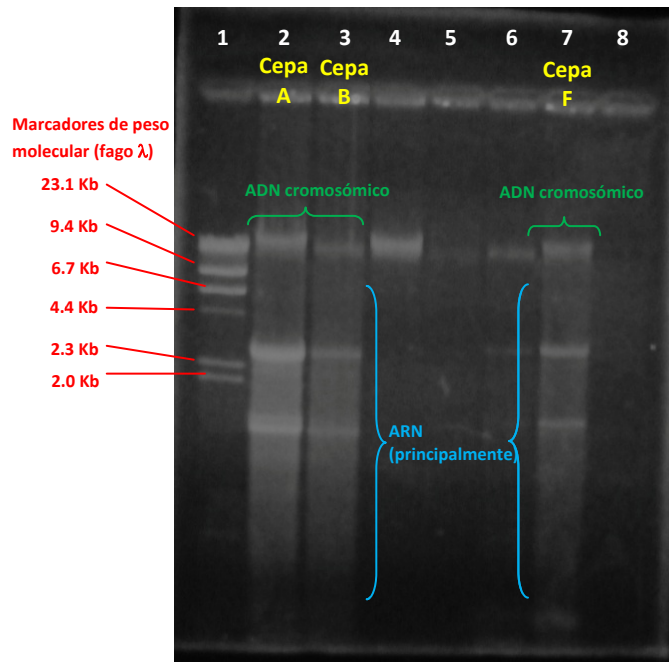
A las cepas multiresistentes seleccionadas en el aislamiento (cepas A, B y F) se les extrajo el ADN total para calcular la concentración de dicho material genético y poder preparar las muestras para realizar el procedimiento de PCR. A estas mismas cepas se les realizó extracción de ADN plasmídico para comprobar si estas eran portadoras de este material genético.

En la **Figura 33** se muestran los resultados de la extracción de ADN total de dichas cepas. En el carril numero 1 se observa el marcador de peso molecular y en los carriles 2, 3 y 7 es posible observar las bandas correspondientes al ADN cromosómico en buen estado de cada una de las cepas, a la altura de la banda de 23.1 Kb del marcador de peso molecular. Los carriles restantes contienen muestras que no corresponden a este estudio.

En la **Figura 34** se muestran los resultados de la extracción de ADN plasmídico. En el carril numero 1 se observa el marcador de peso molecular y en los carriles 3, 4 y 5 se encuentran las muestras de las cepas multiresistentes aisladas. La región en donde se esperaba encontrar el ADN plasmídico corresponde a aquella por encima de la banda de 23.1 Kb del marcador de peso molecular, sin embargo, en el gel no se observa ninguna banda en esta zona, por lo que no hay evidencia de ADN plasmídico en estas cepas. Los carriles restantes contienen muestras que no corresponden a este estudio.

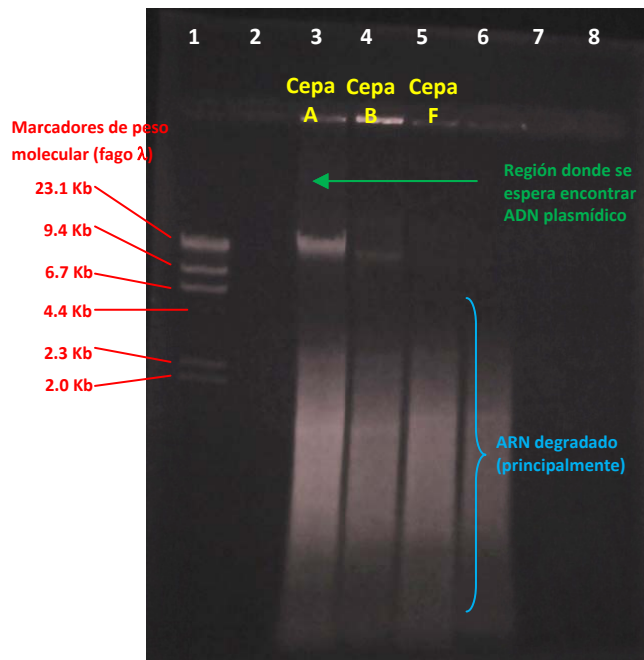
Como se mencionó en el capítulo de introducción, los integrones que confieren multiresistencia a antibióticos se encuentran frecuentemente (aunque no exclusivamente) en plásmidos. Estos resultados sugieren que, sí las cepas son portadoras de algún integrón, este posiblemente se encuentre integrado en el genoma bacteriano o en algún otro elemento genético móvil.

✓ Extracción de ADN total.



**Figura 33.** Gel de agarosa de la extracción de ADN total.

✓ Extracción de ADN plasmídico.

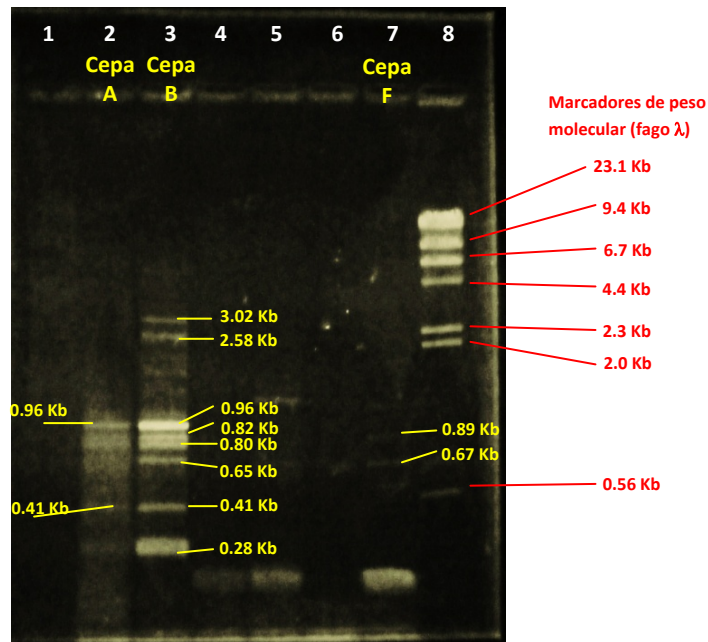


**Figura 34.** Gel de agarosa de la extracción de plásmido.

#### 4.6. Observación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la **Figura 35** se presentan los productos de la reacción de PCR que fueron observados. En el carril numero 8 se observa el marcador de peso molecular y en los carriles 2, 3 y 7 se encuentran las muestras de las cepas multiresistentes aisladas.

De los fragmentos obtenidos en esta reacción, solamente dos fragmentos observados en el carril número 3, correspondiente a la cepa B (2.58 Kb y 3.02 Kb) podrían corresponder a dos integrones de tipo I cargados con diferente número de cassettes de genes. Las bandas restantes no coinciden por sus pesos con estructuras de integrón, por lo que pudieran corresponder a fragmentos amplificados de manera inespecífica.



**Figura 35.** Gel de agarosa con los fragmentos amplificados en la reacción de PCR.

## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Como se puede observar en la **Tabla 4**, se aislaron un total de 20 cepas a partir de dos tipos de carne para consumo humano. En ambos casos solo se observaron bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos, lo cual resulta consistente con lo esperado, tomando en cuenta la facilidad con la que la contaminación proveniente del tracto gastro-intestinal (ya sea humano, o animal) puede ser diseminada en este tipo de alimentos. Por lo tanto, es posible encontrar microorganismos que sean bacilos entéricos y/o enterococos.

Desde el sacrificio del animal y durante todo el trayecto necesario para que la carne llegue hasta el supermercado, esta se encuentra expuesta a varios factores que contribuyen a su contaminación. La primera contaminación con la que la carne tiene contacto proviene del tracto gastro-intestinal del animal durante la evisceración. Por otro lado, su manipulación por las personas en rastros o en el mismo supermercado, así como las maquinas utilizadas para su procesamiento contribuyen como fuentes adicionales de contaminación. De esta manera, muchos de los microorganismos aislados en este tipo de alimentos pueden provenir de la contaminación cruzada durante el procesamiento del alimento.

Para obtener una buena purificación de algunas cepas (bacilos Gram negativos) fue necesario sembrarlas en medios selectivos para microorganismos Gram negativos, como se muestra en la **Tabla 5**. Inicialmente, se consideró la posibilidad de contaminación al observar morfologías variables en las tinciones de Gram, sin embargo, después de realizar resiembras en dichos medios, y observar el mismo crecimiento y morfología inicial, se descartó la posibilidad de contaminación y se consideró que las cepas en cuestión presentaban pleomorfismo (Wainwright, M., 1997). Debe tenerse en cuenta que, dado el origen de los aislamientos, las cepas aisladas, aun cuando sean de microorganismos conocidos y bien caracterizados, son cepas silvestres, y debido a ello es muy probable que presenten algunas características que difieran de las cepas conocidas y manejadas comúnmente en los ceparios.

Una vez asegurada la pureza de la totalidad de las cepas aisladas, se sembraron en medio líquido adicionado (por separado) de diferentes antibióticos y únicamente se seleccionaron las cepas simultáneamente resistentes a más de 3 antibióticos, con la finalidad de obtener solamente cepas multiresistentes, lo cual permitiría cumplir otra parte de los objetivos de este trabajo. (**Tabla 7**)

Finalmente, las cepas seleccionadas A, B y F (**Tabla 7**) fueron sometidas a la prueba de sensibilidad antibiótica utilizando multidiscos de antibiótico (Bio-Rad) para determinar su resistencia. Como se observa en la **Tabla 8**, las cepas de bacilos (A y B) presentan patrones de resistencia similares, aunque no iguales, siendo resistentes a más de 10 antibióticos pertenecientes a diferentes familias, incluyendo: penicilinas, cefalosporinas, anfenicoles, sulfonamidas, quinolonas y aminoglucósidos.

En la **Tabla 9** se observan los resultados del antibiograma de la cepa de cocos Gram positivos (cepa F) en donde se muestra que es resistente a un total de 10 antibióticos, abarcando diferentes familias, como son: penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, lincosaminas, macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas y glucopéptidos.

Como se puede notar, las cepas aisladas presentaron patrones de resistencia amplios, que incluyen diferentes familias de antibióticos. Debe hacerse notar la relevancia del hallazgo de este tipo de cepas en productos destinados al consumo humano, ya que el consumo de estos alimentos conlleva la ingesta de una diversidad de microorganismos que, aun cuando no sean patógenos, podrían funcionar como reservorio de genes de resistencia en el tracto gastro-intestinal del ser humano, contribuyendo además a su diseminación en el medio ambiente.

El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos. La gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y

de la selección de las mismas, así como de su habilidad para intercambiar material genético horizontalmente (Beaber, J.W., Waldor, B., 2004).

En un estudio realizado dentro del programa SIREVA II de la Organización Panamericana de la Salud (Agudelo, 2009), se encontró que México es uno de los países de Latinoamérica que presenta los mayores porcentajes de aislamientos de bacterias resistentes a antibióticos. Desde el año 1999 Chile implementó un programa nacional de control del uso de antibióticos, y en este estudio, es posible destacar el bajo porcentaje de aislamientos de cepas multiresistentes como resultado de la aplicación de este programa, comparado con otros países latinoamericanos, incluyendo México.

Respecto a la utilización de antibióticos en animales destinados al consumo humano, la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó un reporte en 2002 donde se recomendaba no utilizar como promotores del crecimiento agentes antimicrobianos utilizados para fines terapéuticos en humanos. En el caso de Dinamarca, la avoparcina fue prohibida para este fin en 1995, y se observó una reducción del 60% a menos del 5% del número de cepas resistentes a este antibiótico en solo 5 años de que se comenzó a aplicar la prohibición, mientras que la resistencia a virginamicina disminuyó de 65% al 30% (Aarestrup, et al., 2001).

Salyers y colaboradores, en 1997 reportaron que en un estudio realizado, analizando los patrones de resistencia a antibióticos en heces fecales de niños mexicanos de ambientes rurales y urbanos se observaba que aquellas cepas aisladas de ambientes urbanos presentaban mayor resistencia a antibióticos, y en el caso de las cepas aisladas de ambientes rurales también se presentaba resistencia, pero sólo a aquellos medicamentos que también se utilizaban para fines agrícolas (Salyers, et al., 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó, en septiembre de 2001, su WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, como resolución de la Asamblea Mundial de la Salud en 1998, e invitó a los países



miembros a la adopción de medidas para limitar la diseminación de la resistencia a los antibióticos. Se propuso entonces la inclusión de la vigilancia de la resistencia a los antibióticos, y la obligatoriedad del reporte sobre resistencia a estos fármacos en las revisiones de las regulaciones internacionales de salud (Benavides-Plascencia, L., Aldama-Ojeda, A., 2005).

A pesar de que el uso de antibióticos ha sido foco de variada investigación en México, es poca la información publicada que resuma la situación actual en el país, o bien que describa la respuesta que, desde los sistemas y políticas de salud, se ha dado a esta situación (Dresler, A., et al. 2008).

Es escasa la información que permita analizar el impacto en el país del uso inapropiado de antibióticos en términos de gasto de salud, resistencia bacteriana y daños a la salud (reacciones adversas y falla terapéutica). La creciente resistencia bacteriana en patógenos causantes de infecciones comunitarias e intrahospitalarias es quizás el problema relacionado con el uso inapropiado de antibióticos más reportado en la literatura científica en México (Dresler, A., et al. 2008).

La mayor parte de las intervenciones documentadas en nuestro país para mejorar el uso de antibióticos se han centrado en intervenciones educativas y gerenciales para médicos en el sector público, así como en estrategias para vigilar y contener la resistencia bacteriana, generalmente circunscritas al control de las infecciones nosocomiales.

El actual marco normativo y las políticas farmacéuticas y de salud en México no incorporan estrategias sobre el uso apropiado de antibióticos ni la contención de la resistencia bacteriana, como se recomienda internacionalmente (Dresler, A., et al. 2008). La normatividad respecto al uso de antibióticos en animales de consumo es aún más restringida. No hay reportes o estudios (por lo menos no disponibles para consulta) en donde se describa la cantidad o el tipo de antibióticos que las industrias ganadera y avícola emplean como promotores de crecimiento en el alimento de los animales destinados al consumo humano en nuestro país.

En México, la NOM-004-ZOO-1994 referente al Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos establece que: “La aplicación de antibióticos en concentraciones subterapéuticas para mejorar la conversión alimenticia o como promotores de crecimiento en los animales, conlleva el riesgo de poner en peligro la vida del consumidor de los productos de origen animal o la salud de éste, ya sea por una reacción de hipersensibilidad, un efecto específico o por el desarrollo y transmisión de organismos patógenos resistentes a la terapia con antibióticos”.

Esta norma tiene la finalidad de asegurar el suministro de alimentos sanos e inocuos a los ciudadanos, teniendo en cuenta que el consumo de alimentos de origen animal contaminados implica diversos riesgos para la salud. En apoyo a esta norma se tiene la NOM-032-ZOO-1996 referente a la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo.

La vigilancia de estas Normas corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y a los gobiernos de los estados, sin embargo, es evidente que el uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano requiere de un control más eficiente, ya que continúan apareciendo cepas multiresistentes a antibióticos en alimentos de este tipo.

Existen recomendaciones claras en el plano internacional para lograr un mejor uso de los antibióticos. En México, es prioritario que las políticas farmacéuticas y de salud aborden el problema, es necesario consolidar una estrategia nacional sobre antibióticos, con el fin de mejorar la calidad de atención de la salud y contener la resistencia bacteriana.

Por otra parte, un objetivo de este trabajo era conocer el/los posibles mecanismos genéticos involucrados con la multiresistencia de las cepas aisladas. Para ello se realizó extracción de ADN plasmídico en búsqueda de algún plásmido R. El gel de agarosa en donde se colocó el material genético extraído se presenta en la **Figura**

**34.** En este gel se observan unas pequeñas bandas en los carriles de las cepas A y B de aproximadamente 23 Kb, las cuales corresponden a fragmentos de ADN cromosómico, sin embargo, no se encontró evidencia de ADN plasmídico en ningún caso.

Los plásmidos R son comúnmente relacionados con la multiresistencia a antibióticos de muchas cepas. Por otra parte, otro elemento genético relacionado con la multiresistencia a antibióticos es el integrón de tipo I, el cual, frecuentemente (pero no exclusivamente) se encuentra dentro de plásmidos.

Al no encontrar ADN plasmídico, se realizó extracción de ADN total (**Figura 33**) para buscar al integrón de tipo I en el cromosoma bacteriano mediante la técnica de PCR. En la **Figura 35** se pueden observar los fragmentos amplificados obtenidos por PCR.

La estructura básica del integrón de tipo I (sin cassettes de genes en su zona central variable) tiene una longitud aproximada de entre 1.6 y 1.8 Kb (Hall, R.M., et al., 1994; Partridge, S.R., et al., 2001) por lo tanto, un integrón de tipo I portador de cassettes de genes deberá tener una longitud superior a esta.

Analizando los fragmentos obtenidos en la reacción de PCR, solamente dos fragmentos (2.58 Kb y 3.02 Kb) observados en el carril 3, correspondiente a la cepa B podrían corresponder a dos integrones de tipo I cargados con diferente número de cassettes de genes. Esto quiere decir que la cepa B posiblemente porta en su cromosoma dos integrones de tipo I y este podría ser un factor clave en el fenotipo de multiresistencia desarrollado por esta cepa.

En lo que respecta a las cepas restantes A y F, probablemente la multiresistencia desarrollada se deba a la sobre-expresión de bombas de expulsión como consecuencia de la presión selectiva a la que han sido sometidas. Se debe tomar en cuenta que posiblemente la carne de donde fueron aisladas tuvo, de alguna manera, contacto con antimicrobianos, esto aunado a las condiciones de estrés en el laboratorio durante su aislamiento, las pruebas con diferentes antibióticos, las resiembras de mantenimiento adicionadas de antibiótico y las pruebas con

extracto de ajo suponen un ambiente de tensión al que el microorganismo debe adecuarse de alguna manera para lograr sobrevivir.

Es bien sabido que las bombas de expulsión se encuentran en todos los organismos y estas pueden sobre-expresarse en respuesta a factores de estrés en el medio como mecanismo de defensa. Incluso, se ha sugerido que la resistencia a antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria frecuentemente es un proceso mediado por bombas de expulsión, nuevamente en respuesta a las condiciones de estrés.

Los elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones) presentes en alguna cepa bacteriana pueden actuar de manera sinérgica con los mecanismos propios de defensa de la célula (p. ej. bombas de expulsión) dando como resultado cepas con armas muy potentes para resistir la acción de una amplia gama de agentes antimicrobianos.

La gran diseminación de cepas multiresistentes a antibióticos ha sido consecuencia, en parte, al aumento en las alternativas de reservorios de genes de resistencia (incluyendo los animales destinados al consumo humano). La diseminación de estos genes en el medio ambiente representa un peligro latente, ya que su adquisición por microorganismos patógenos puede desencadenar infecciones en donde las opciones disponibles para el tratamiento antimicrobiano se encontrarán limitadas. En respuesta a ello, surge la necesidad de explorar otros campos terapéuticos y por esto se han realizado estudios (como el presente) con agentes naturales, evaluando su potencial bactericida frente a este tipo de microorganismos con la finalidad de ser utilizados como una alternativa plausible en el tratamiento de posibles infecciones por patógenos multiresistentes.

Alternativas para el tratamiento de este tipo de cepas podrían desarrollarse explorando la capacidad antimicrobiana de diferentes compuestos naturales, por ejemplo, las especias y condimentos (p. ej. ajo, cebolla, comino, clavo, jengibre, pimienta, etc.).

Existen varios trabajos en donde se ha probado la eficacia del extracto de ajo frente a diversas cepas de microorganismos, sin embargo, pocos son los que relacionan la efectividad de este extracto contra microorganismos que tienen la característica de ser multiresistentes a antibióticos. Por ello, del aislamiento se seleccionaron y caracterizaron únicamente cepas de este tipo.

La **Tabla 12** muestra las cepas que se utilizaron para las pruebas con extracto acuoso de ajo, en donde se incluyen 3 de las cepas aisladas durante el desarrollo de este trabajo, además de 3 cepas tomadas del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular. Estas últimas cepas fueron aisladas previamente en este mismo laboratorio, procedentes también de carne de res destinada al consumo humano y con patrones de resistencia amplios.

Los resultados de las pruebas preliminares con extracto acuoso de ajo se muestran en la **Tabla 13**. Con esta prueba se pretendía evaluar la capacidad del extracto de ajo a diferentes concentraciones para inhibir el crecimiento de las cepas multiresistentes a antibióticos en un medio sólido. Se puede observar que, en el caso de las cepas de bacilos (A y B) el extracto de ajo tiene efecto de inhibición desde concentraciones bajas (0.8%) y se sigue una tendencia creciente de inhibición directamente proporcional al aumento en la concentración del extracto de ajo, hasta llegar a valores continuos en la mayor concentración probada de extracto (40%) (**Gráfica 1**).

Para las cepas de cocos (C, D, E y F) se tiene una tendencia diferente. En estos casos las cepas mostraron inhibición del crecimiento frente a mayores concentraciones de extracto de ajo, en comparación con las cepas A y B. El extracto comenzó a tener efecto de inhibición a concentraciones entre 20 y 40%.

Las diferencias en la sensibilidad al extracto acuoso de ajo observadas entre bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos, podrían estar relacionadas al factor limitante de la velocidad de crecimiento, que es diferente en cada caso. Los bacilos Gram negativos mostraron ser más rápidos en cuanto a su crecimiento comparados con los cocos Gram positivos. Dado lo anterior y tomando en cuenta

que los principales compuestos del ajo a los que se les atribuye sus propiedades antimicrobianas son compuestos volátiles, es probable que varios de estos compuestos se volatilizaran durante el tiempo de incubación, necesitándose concentraciones más altas de extracto para poder ejercer un efecto antimicrobiano frente a estas cepas de crecimiento lento.

Una vez comprobado que el extracto de ajo tiene efecto inhibitorio sobre bacterias multiresistentes, se siguió a la determinación de su concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) y de su concentración mínima bactericida (C.M.B.).

Los resultados de la prueba realizada para obtener el valor de la C.M.I. se muestran en la **Tabla 14**. De manera interesante y, sólo con excepción de la cepa F, todas las cepas se comportaron del mismo modo, inhibiéndose su crecimiento en medio líquido a partir de bajas concentraciones de extracto de ajo (0.8%). Por lo tanto, las concentraciones mínimas inhibitorias encontradas fueron bajas y relativamente similares en todas las cepas (**Tabla 16**).

El caso particular de la cepa F, que presentó inhibición a una concentración más alta de extracto, pudiera deberse a que comienzan a ser sobre-expresados algunos mecanismos de defensa de la célula en respuesta al estrés o a agentes nocivos (en este caso, los compuestos azufrados del extracto de ajo).

La cepa F fue la que presentó resistencia al menor número de antibióticos, comparada con las otras cinco cepas de trabajo, sin embargo, es una de las que presentó resistencia a un mayor número de familias diferentes de antibióticos. Tomando en cuenta lo anterior, y las condiciones de estrés a las que fue sometida durante las pruebas con ajo, podría pensarse que la sobreexpresión de alguno de los mecanismos de expulsión de agentes nocivos esté jugando un papel importante de defensa en esta cepa en particular.

En la **Tabla 15** se muestran los resultados de la prueba realizada para obtener el valor de la C.M.B. En este caso se observaron diferencias entre las cepas. El extracto de ajo tuvo efecto bactericida a bajas concentraciones sobre las cepas de bacilos A y B, así como en las cepas de cocos C y D (1% y 2%, respectivamente)

resultando consistente con los resultados obtenidos anteriormente en las pruebas de C.M.I.

Por otra parte, el extracto de ajo tuvo efecto bactericida a concentraciones notablemente mayores en las cepas E y F (15% y 10%, respectivamente). Este efecto podría estar relacionado a la activación de mecanismos de expulsión de los agentes nocivos de la célula, como se mencionó anteriormente, así como al factor limitante de la velocidad de crecimiento de estas cepas de cocos Gram-positivos en particular.

Relacionando los resultados obtenidos en estas pruebas con los resultados de la búsqueda de elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia y, no encontrar evidencia en ningún caso de ADN plasmídico, se puede pensar que existe una alta posibilidad de que el principal mecanismo de resistencia en las cepas en estudio, tanto a diferentes antibióticos, como al extracto acuoso de ajo, esté relacionado con bombas de expulsión. Tomando en cuenta que este tipo de mecanismo de defensa se encuentra en todas las células y su sobreexpresión es estimulada en muchos casos bajo condiciones de estrés, resulta una alternativa viable para explicar el comportamiento de las cepas multiresistentes aisladas.

Sólo en un caso se encontró evidencia de integrones, sin embargo, esta cepa en particular (cepa B) no presentó patrones de resistencia diferentes a las cepas restantes, por lo que la presencia de este elemento genético, al parecer, no le confiere una ventaja significativa sobre otras cepas, por lo menos frente a las distintas familias de antibióticos con las que fueron probadas en este estudio, así como frente a extracto acuoso de ajo.

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.

Más de medio siglo ha pasado desde que los primeros antibióticos se introdujeron comercialmente. No pasó mucho tiempo para que los microorganismos desarrollaran "fortaleza antibiótica" frente a las originales "balas mágicas". El uso generalizado de muchos fármacos antibacterianos ofreció condiciones ideales para la propagación de los microorganismos multiresistentes.

Muchos de los primeros investigadores fueron expertos muy habilidosos en la identificación de los mecanismos utilizados para evadir los efectos inhibitorios de estos fármacos. Desde los investigadores como Esther y Joshua Lederberg, que caracterizaron la naturaleza aleatoria de los eventos de mutación que confiere resistencia a la estreptomycin; hasta otros como Tsutomu Watanabe, que supuso que la mutación por sí sola no podría ser suficiente para explicar el fenotipo de multiresistencia. Los factores de transferencia de la resistencia, más tarde llamados factores de resistencia y plásmidos, proporcionaron las bases para la resistencia a múltiples fármacos causada por la "herencia infecciosa" de los microorganismos.

Actualmente, se sabe que hay muchas más alternativas para el desarrollo de la resistencia a antibióticos. Otros elementos genéticos móviles como los transposones y los integrones han sido frecuentemente relacionados con la resistencia antibiótica, así como mecanismos menos específicos propios de las células como las bombas de expulsión, que son armas muy utilizadas para defenderse de agentes nocivos y sobrevivir en condiciones de estrés.

Durante este estudio se aislaron cepas simultáneamente resistentes a más de 10 antibióticos a partir de carne para consumo humano, las cuales no fueron portadoras de plásmidos R o de integrón del tipo I (a excepción de un caso). Estos resultados sugieren que la adquisición de genes de resistencia específicos y las mutaciones son procesos que se han hecho menos importantes en la célula bacteriana y que la flexibilidad de sistemas menos específicos de expulsión, propios de la célula, como mecanismos



aparentemente más sencillos para el desarrollo de resistencia ha adquirido una relevancia notable.

Se ha demostrado que el uso de antibióticos en la cría de animales fomenta la colonización en humanos por cepas resistentes (Levy, S.B., et al., 1976). Esto podría ser consecuencia directa o indirecta del uso de antibióticos como promotores de crecimiento, y de la falta de regulación en este ámbito.

Es importante crear conciencia de la magnitud del problema para evitar que se sigan ampliando los sitios reservorio de genes de resistencia, y no sólo de dichos genes, puesto que, como lo muestran los resultados, la presión selectiva y las condiciones de estrés también favorecen el desarrollo de resistencia por medio de otros mecanismos.

La multiresistencia es un problema mundial que no reconoce límites territoriales y puede afectar indiscriminadamente a los miembros de todas las clases socioeconómicas.

El problema de la escasa regulación sobre el uso de antibióticos en México también tiene implicaciones para las naciones vecinas. La frontera de México con los Estados Unidos de América (E.U.A.) es particularmente importante, dada su flexibilidad para el movimiento de personas y medicamentos. Ambos países podrían beneficiarse con el trabajo conjunto sobre estrategias para mejorar el uso de antibióticos.

Las bacterias adoptan estrategias complejas para evitar los efectos letales de los antibióticos. Al enfrentar este problema crítico, debemos de ser conscientes de la fluidez del genoma microbiano y la relativa facilidad con la que la resistencia puede surgir por diversos mecanismos. El conocimiento de estos mecanismos de resistencia puede ayudar al diseño de nuevos fármacos.

En este estudio se demostró que agentes naturales como el extracto acuoso de ajo tienen efecto inhibitorio sobre microorganismos multiresistentes a antibióticos. Esto podría resultar una alternativa importante para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos que poseen un arsenal genético importante contra diversos antimicrobianos, ya que, al parecer, la presencia de elementos genéticos de multiresistencia no representa

una ventaja importante frente a los compuestos bactericidas que se encuentran en estos agentes naturales.

Es necesario impulsar la realización de estudios sobre el potencial bactericida de diversos agentes naturales, así como desarrollar las mejores opciones viables en cuanto a su posible uso terapéutico.

## Referencias

1. Aarestrup, F., et al. ***Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **45(7)**: 2054-2059, 2001.
2. Agudelo, C., et al. ***Resistencia a antibióticos no betalactámicos de aislamientos invasores de Streptococcus pneumoniae en niños latinoamericanos.*** Revista panamericana de salud pública. **25(4)**: 305-312, 2009.
3. Alekshun, M., Levy, S. ***Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance.*** Cell. **128**: 1037-1050, 2007.
4. Allen, N.E., Nicas. T.I. ***Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics.*** FEMS Microbiology Review. **26**: 511-532, 2003.
5. Ankri, S., Mirelman, D. ***Antimicrobial properties of allicin from garlic.*** Microbes and Infection. **2**: 125-129, 1999.
6. Appleton, A. ***Bacterial resistance. A worldwide problem.*** Clinical Laboratory International. **25**:22-23, 2001.
7. Bakri, I.M., Douglas, C.W.I. ***Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria.*** Archives of Oral Biology. **50**: 645-651, 2005.
8. Bass, L., et al. ***Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **43**: 2925-2929, 2000.

9. Beaber, J.W., et al. ***SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes.*** Nature. **427**: 72-74, 2004.
10. Benavides-Plascencia, L., Aldama-Ojeda, A.L., Vázquez, H.J. ***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**(3): 219-225, 2005.
11. Betoni, J.E., et al. ***Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureus diseases.*** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **101**(4): 387-390, 2006.
12. Borges-Walmsley, M., et al. ***Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.*** Biochemical Journal. **376**: 313-338, 2003.
13. Bryan, L.E. ***Genetics of resistance to antimicrobial agents.*** In: Bacterial resistance and susceptibility to chemotherapeutic agents (1982). 1<sup>o</sup>ed. Cambridge University. Pp. 104-133.
14. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. ***Mecanismos de acción de los antimicrobianos.*** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **27**:44-52, 2009.
15. Cavallieri, S., et al. ***Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.*** University of Washington. Seattle, Whashington, 2005.
16. Cervantes, H. ***Why responsible antibiotic use enhances animal and human health.*** Proceedings of the 2004 Midwest Poultry Federation Convention, St. Paul, MN. Pp. 201-210.

17. Coates, M.E., et al. ***A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germfree apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin.*** British Journal of Nutrition. **17**(1): 141-150, 1963.
18. Cordiés, L., et al. ***Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.*** Acta Médica. **8**(1): 13-27, 1998.
19. Cutler, R.R., Wilson, P. ***Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant Saphylococcus aureus.*** British Journal of Biomedical Science. **61**(2): 1-4, 2004.
20. Dámaso, D. ***Historia de los antibióticos y Quimioterápicos.***(1991) Ed. Marketing Pharma S.A., Madrid. Pp. 1-23.
21. Delaha, E., Garagusi, V. ***Inhibition of Mycobacteria by Garlic Extract (Allium Sativum).*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **27**(4): 485-486, 1985.
22. Dibner, J.J., Richards, J.D. ***Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action.*** Journal of Poultry Science. **84**: 634-643, 2005.
23. Dreser, A., et al. ***Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas.*** Salud pública de México. **50**(4): S480-S487, 2008.
24. Elkins, C., C. E. Thomas, H. S. Seifert, and P. F. Sparling. ***Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence.*** Journal of Bacteriology. **173**: 3911–3913, 1991.

25. Errecalde, J. **Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública.** FAO Producción y sanidad animal, 2004.
26. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2001.
27. Eyssen, H. **Role of gut microflora in metabolism of lipids and sterols.** Proceedings of the Nutrition Society. **32**:59-63, 1973.
28. Fani, M.M., Kohanteb, J., Dayaghi, M. **Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*.** Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry. **25**: 164-168, 2007.
29. Feldberg, R.S., et al. **In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **32**: 1763-1768, 1988.
30. Fenwick, G.R., Hanley, A.B. **The genus *Allium*.** Food Science and Nutrition. **22**: 199-377, 1985.
31. Focke, M., Feld, A., Lichtenthaler, H. **Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase.** FEBS Letters. **261**(1): 106-108, 1991.
32. Fuchs, L.Y., et al. **Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana.** Salud Pública de México. **36**: 428-438, 1994.

33. Fujisawa, H., et al. ***Thermostability of Allicin Determined by chemical and Biological Assays***. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. **72**(11): 2877-2883, 2008.
34. Galun, E. ***Bacterial insertion sequences***. In: Transposable elements (2003). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
35. García, C. ***El ajo***. (1998) 2<sup>o</sup>ed. Mundi-Prensa México. Pp. 35-40.
36. García, J.M. ***Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos***. Actualidad, Sociedad Española de Microbiología. **28**:18-22, 1999.
37. Gaskins, H.R. Swine Nutrition (2001). ***Intestinal bacteria and their influence on swine growth***. Pp. 585-608, 2a edición, Ed. CRC Press LLC. Florida, United States of America.
38. Georgopapadakou, N.H. ***Beta-lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets***. Expert Opinion on Investigational Drugs. **13**: 1307-1318, 2004.
39. Hall, R.M., Collis, C.M. ***Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination***. Molecular Microbiology. **15**: 593-600, 1995.
40. Hall, R.M., et al. ***Integrons Found in Different Locations Have Identical 5´ Ends but Variable 3´ Ends***. Journal of Bacteriology. **176**(20): 6286-6294, 1994.
41. Harris, J.C., et al. ***Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic)***. Applied Microbiology and Biotechnology. **57**: 282-286, 2001.

42. Iwalokun, B.A., et al. ***In vitro Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug-Resistant Bacteria and Candida Species from Nigeria.*** Journal of Medicinal Food. **7**(3): 327-333, 2004.
43. Jawetz, E. ***Quimioterapia antimicrobiana.*** En: Manual de microbiología médica (1989). 9ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno. Pp. 110-153.
44. Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. ***Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli.*** Microbiology and Molecular Biology Reviews. **71**: 477-494, 2007.
45. Kanafani, Z.A., Corey, G.R. ***Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections.*** Expert Review of Anti Infective Therapy. **5**: 177-184, 2007.
46. Lanosa, R. ***Enfoque diagnóstico del paciente séptico.*** Archivos de Medicina Interna. **19**: 27-34, 1997.
47. Lee, C. ***Pathogenicity islands and the evolution of bactericidal pathogens.*** Infectious Agents and Disease. **5**: 1-7, 1996.
48. Levy, S.B., et al. ***Spread of antibiotic-resistance plasmids from chicken and from chicken to man.*** Nature. **260**: 40-42, 1976.
49. Macan, H., et al. ***Significance of Garlic and its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease.*** Journal of Nutrition. **136**: 793S-795S, 2006.
50. Madigan, M., et al. ***Biología de los microorganismos.*** (1999) 8ª edición. Prentice Hall, España.



51. Martínez, J.L. ***Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments***. Science. **321**: 365-367, 2008.
52. Masters, P.A., et al. ***Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited***. Archives of Internal Medicine. **163**: 402-410, 2003.
53. Mazel, D., Davies, J. ***Antibiotic resistance in microbes***. Cellular and Molecular Life Sciences. **56**: 742-754, 1999.
54. Miron, T., et al. ***A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates***. Analytical Biochemistry. **307**: 76-83, 2002.
55. Montiel F. ***Introducción a la Metodología del ADN Recombinante e Ingeniería Genética*** (1994). Tercera Edición. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.
56. Naganawa, R., et al. ***Inhibition of Microbial Growth by Ajoene, a Sulfur-Containing Compound Derived from Garlic***. Applied and Environmental Microbiology. **62**(11): 4238-4242, 1996.
57. Nai-Lan, G., et al. ***Demonstration of antiviral activity of garlic extract against human cytomegalovirus in vitro***. Chinese Medical Journal. **106**: 93-96, 1993.
58. Nikaido, H. ***Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria***. Journal of Bacteriology. **178**(20): 5853-5859, 1996.
59. Nikaido, H. ***Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux***. Science. **264**: 382-388, 1994.

60. Norby, S. ***Treatment failures with broad-spectrum antibiotics.*** Scandinavian Journal of Infectious Diseases. **78**: 64-70, 1991.
61. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. ***Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.***
62. Núñez, B., et al. ***Programa: Uso racional de antibióticos,*** Bristol-Myers Squibb.
63. Orman, B. ***La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión.*** Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. **21**(50/51): 13-19, 2006.
64. Partridge, S.R., et al. ***Definition of the attI1 site of class 1 integrons.*** Microbiology. **146**: 2855-2864, 2000.
65. Partridge, S.R., et al. ***Transposons Tn1696 and Tn21 and Their Integrons In4 and In2 Have Independent Origins.*** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **45**(4): 1263-1270, 2001.
66. Patiño, D. ***¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?.*** Umbral científico. **3**: 48-56, 2003.
67. Paulsen, I. ***Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution.*** Current Opinion in Microbiology. **6**: 446-451, 2003.
68. Phillips, I., et al. ***Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data.*** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **53**: 28-52, 2004.

69. Piddock, L. ***Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance.*** Nature. **4**: 629-636, 2006.
70. Pinilla, G., et al. ***Presencia de Integrones Clase 1 en Aislamientos de Staphylococcus epidermidis de las unidades de neonatología del Instituto Materno Infantil de Bogotá.*** Nova-Publicación científica. **4**(6): 55-59.
71. Poole, K. ***Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa and Related Organisms.*** Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. **3**(2): 255-264, 2001.
72. Porcelli, S. ***Shrewd survival strategy.*** Nature. **454**: 702-703, 2008.
73. Rabinkov, A., et al. ***The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins.*** Biochimica et Biophysica Acta. **1379** (2): 233-244, 1998.
74. Retsema, J., Fu, W. ***Macrolides: structures and microbial targets.*** International Journal of Antimicrobial Agents. **18**: S3-S10, 2001.
75. Reuter, H.D., Koch, H.P., Lawson, L.D. (1996). ***Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations.*** In: Garlic: The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 135-213.
76. Roe, M.T., Pillai, S.D. ***Monitoring and Identifying Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria.*** Journal of Poultry Science. **82**: 622-626, 2003.

77. Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. **Resistance gene capture**. Current Opinion in Microbiology. **2**: 483-488, 1999.
78. Saier, M., et al. **Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria**. The FASEB Journal. **12**: 265-274, 1998.
79. Saleha, A.A., et al. **Possible Effect of Antibiotic-Supplemented Feed and Environment on the Occurrence of Multiple Antibiotic Resistant Escherichia coli in Chickens**. International Journal of Poultry Science. **8**(1): 28-31, 2009.
80. Salyers, A., et al. **Why Are Antibiotic Resistance Genes So Resistant to Elimination?** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **41**(11): 2321-2325, 1997.
81. Shlaes, D.M. **An update on tetracyclines**. Current Opinion in Investigational Drugs. **7**:167-171, 2006.
82. Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M. **Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos**. Salud pública de México. **40**(6): 510-515, 1998.
83. Sørensen, S., et al. **Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review**. Nature. **3**: 700-710, 2005.
84. Sørum, H., L'Abée-Lund, T.M. **Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics**. International Journal of Food Microbiology. **78**: 43-56, 2001.
85. Taubs, G. **The bacteria fight back**. Science. **321**: 356-361, 2008.

86. Thomas, C. ***Paradigms of plasmid organization***. Molecular Microbiology. **37**(3): 485-491, 2000.
87. Tsai, Y., et al. ***Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex virus, and coxsackie viruses***. Planta Medica. **51**: 460-461, 1985.
88. Tung-His, Y., Chung-May, W., Yoh-Cherng, L. ***Volatile Compounds from Garlic***. Journal of Agriculture and Food Chemistry. **37**(3): 725-730, 1989.
89. Vaidya, V., Ingold, K., Pratt, D. ***Garlic: Source of the Ultimate Antioxidants—Sulfenic Acids***. Angewandte Chemie. **121**: 163-166, 2009.
90. Villain-Guillot, P., et al. ***Progress in targeting bacterial transcription***. Drug Discovery Today. **12**: 200-208, 2007.
91. Visek, W.J. ***The mode of Growth Promotion by Antibiotics***. Journal of Animal Science. **46**: 1447-1469, 1978.
92. Wainwright, M., ***Extreme pleomorphism and the bacterial life cycle: a forgotten controversy***. Perspectives in Biology and Medicine. **40**: 407-414, 1997.
93. Watson, D.H., Food Chemical Safety (2001). ***Chapter 6. "Veterinary drug residues"*** pp. 109-120. Cambridge, England. ISBN: 1-85573-563-6.
94. White, D., et al. ***The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats***. The New England Journal of Medicine. **345**(16): 1147-1154, 2001.

95. WHO ***Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food.*** World Health Organization. Geneva, Switzerland, 2000.
96. WHO ***Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health.*** World Health Organization. Oslo, Norway, 2001.
97. Yin, M., Chang, H., Tsao, S. ***Inhibitory Effects of Aqueous Garlic Extract, Garlic Oil and Four Diallyl Sulphides against Four Enteric Pathogens.*** Journal of Food and Drug Analysis. **10**(2): 120-126, 2002.
98. Young, L. ***Tratamiento antimicrobiano.*** En: Wyngaarden J, Lloyd HS, Bennett J, eds. Cecil: Tratado de medicina interna (1994). 19 ed. México DF: Nueva editorial interamericana. Pp. 1859-1872.