



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del extracto de manzana (*Malus domestica*) sobre dos especies de *Pasteurellas* aisladas de frutas para consumo humano y multirresistentes a antibióticos.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ACUARIO ITZEL ALVARADO CORONA

México, D.F.

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: María Del Carmen Wachter Rodarte

Vocal: Jesús Fernando Montiel Aguirre

Secretario: Eduardo Bonilla Espinoza

1er. Suplente: Aleida Mina Cetina

2do. Suplente: Raquel Ortega Muñoz

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio1-A de Microbiología y Biología Molecular.

Asesor del tema: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Supervisor Técnico: Raquel Ortega Muñoz

Sustentante: Acuario Itzel Alvarado Corona

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
I. Historia de los antibióticos	3
II. Principales familias de antibióticos	3
a) Betalactámicos.....	4
b) Betalactámicos asociados a inhibidores de las Betalactamasas.....	4
c) Glicopéptidos.....	4
d) Aminoglucósidos.....	5
e) Macrólidos	5
f) Quinolonas.....	5
III. Mecanismos de resistencia a antibióticos	6
a) Inactivación del antibiótico	7
b) Alteración del sitio blanco del antibiótico	7
c) Barreras de permeabilidad.....	7
d) Bombas de expulsión.....	7
IV. Definición de multirresistencia antibiótica	7
V. Antecedentes bibliográficos	8
VI. Importancia del consumo de frutas y el impacto que conlleva la posible presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos.	11
4. Hipótesis	13
5. Objetivo general.....	13
6. Objetivos particulares.....	13
7. Metodología	14
I. Diseño Experimental	15
8. Resultados y Discusión.....	21
9. Conclusiones	33
Anexo A.....	35
Glosario.....	35

Anexo B	36
Medios de cultivo y soluciones	36
Anexo C.....	41
Principales antibióticos utilizados	41
Referencias	42

Índice de abreviaturas para antibióticos

AK..... amikacina

Am.....ampicilina

CB.....carbenicilina

CF.....cefalotina

CFX.....cefotaxima

CTX.....ceftriaxona

CL.....cloranfenicol

GE.....gentamicina

NET.....netilmicina

NF.....nitrofurantoina

PEF.....pefloxacina

SXT.....trimetopim-sulfametoxazol

1. Resumen

En la actualidad, el rápido incremento del número de alimentos que presentan microorganismos con resistencia y multiresistencia a antibióticos acarrea problemas en el área de salud pública ya que estos microorganismos podrían causar enfermedades o actuar como reservorios de genes de resistencia, razón por la cual podría estarse generando un problema que atañe tanto a las autoridades del sector salud como a los que trabajan con alimentos. En virtud de este problema potencial es que se decidió estudiar dos frutos de amplio consumo en México: manzana (*Malus domestica*) y mango (*Manguifera indica*). En la primera parte se realizó un muestreo de la zona epicuticular de las frutas, lavadas y sin lavar. Se encontraron bacilos y cocos como parte de la microbiota de ambas frutas. Curiosamente, se observó que el porcentaje de bacterias aisladas de manzana fue cinco veces mayor que las encontradas en mango. Como segunda parte del trabajo, se realizó un perfil de resistencia a antibióticos por medio del método microbiológico Bauer-Kirby, determinando también así a cuales antibióticos lo son. A las cepas a las que se les comprobó su multiresistencia se les identificaron por género y especie. Cabe resaltar que las bacterias aisladas de manzana no fueron resistentes, mientras que el 66.67% de las aisladas del mango sí, presentando una resistencia simultánea a 12 antibióticos. Dichas cepas fueron identificadas como *Pasteurella testudinis* y *Pasteurella bettyae*.

En función de estos hallazgos, se decidió, como última parte, estudiar si la manzana presentaba alguna actividad antimicrobiana sobre las bacterias multiresistentes, realizando extractos acuosos y etanólicos de este fruto y probándolos con las cepas multiresistentes aisladas a partir del mango.

2. Introducción

Desde hace tiempo las enfermedades causadas por los alimentos han sido un tema central de investigación en el ámbito de la salud, ya que al verse relacionadas con la carencia de higiene llevaron a plantear sistemas y modelos para el aseguramiento y mejora de la calidad de los mismos. Pero el día de hoy surge una nueva problemática, la de que los alimentos que consumimos en la actualidad también son el posible origen de la presencia de microorganismos multirresistentes a antibióticos, lo cual es un tema que ha causado interés ya que implica hablar de si estos microorganismos tiene la capacidad de causar enfermedades en los consumidores o de actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos.

Pero es muy interesante preguntarse qué es lo que está sucediendo con los alimentos, en qué alimentos sí encontramos microorganismos multirresistentes y cuáles están exentos, ya que al estar destinados para su consumo principalmente en fresco, nosotros pensaríamos que todos son inocuos y aptos para dicho fin.

Por ello se decidió realizar el presente trabajo enfocándose en frutas, específicamente dos, tanto manzana (*M. domestica*) como mango (*M. indica*) e intentar aislar bacterias multirresistentes a antibióticos de dichas frutas.

3. Marco teórico

I. Historia de los antibióticos

La era de los antibióticos comienza con dos eventos importantes. El primero fue en 1935 con el descubrimiento de los efectos curativos del colorante rojo de Prontosil frente a las infecciones por *Streptococcus*, siendo este colorante el precursor de las sulfonamidas.

El segundo evento ocurrió unos años antes, en 1929, cuando Fleming descubre la penicilina dando lugar a un cambio de paradigma en la medicina y una nueva forma de combatir las enfermedades por medio de los antibióticos.

Los antibióticos se definen como compuestos naturales o sintéticos que sirven para combatir las infecciones producidas por bacterias.

II. Principales familias de antibióticos

Los antibióticos intervienen en las moléculas de los procesos biológicos esenciales en las bacterias. Dichas moléculas pueden ser la ADN girasa en la replicación del ADN, la ARN polimerasa en la síntesis del ARN, los ribosomas en la síntesis de proteínas y las transpeptidasas en la síntesis del peptidoglucano que conforma la pared celular (Garza R., U., 2009).

Los antibióticos actúan en diferentes niveles, las quinolonas inhiben la replicación del ADN, la rifampicina suprime la síntesis de ARN y los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol anulan la síntesis de las proteínas. El grupo de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas,

cefalosporinas, monobactam y carbapenémicos) inhibe la síntesis de la pared celular.

a) Betalactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia de antibióticos más numerosa y la más utilizada. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes.

b) Betalactámicos asociados a inhibidores de las Betalactamasas

Son moléculas que contienen en su estructura un anillo betalactámico. No tienen casi ninguna acción antibiótica, con la excepción de sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii*, pero presentan una gran afinidad por las betalactamasas, estas son enzimas producidas por las bacterias que destruyen la actividad de determinados betalactámicos. Los inhibidores son conocidos como inhibidores suicidas, debido a que una vez que se unen a la enzima la destruyen pero también son destruidos por ésta. Hay tres en uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Estos inhibidores unidos a penicilinas o cefalosporinas recuperan la actividad perdida por estas como consecuencia de la producción de betalactamasas. Estas betalactamasas deben ser susceptibles al inhibidor para que la combinación sea efectiva.

c) Glicopéptidos

Se trata de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana. Actualmente hay dos drogas en uso clínico: vancomicina y teicoplanina. La vancomicina es un antibiótico bactericida de espectro reducido (solo actúa sobre bacterias Gram positivas); la teicoplanina tiene una estructura similar a la vancomicina y un perfil de actividad también similar. Los glicopéptidos inhiben la síntesis y el

ensamblado de la segunda etapa del peptidoglicano de la pared celular mediante la formación de un complejo con la porción D-alanina-D-alanina del pentapéptido precursor. Además, daña los protoplastos alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y altera la síntesis de ARN.

d) Aminoglucósidos

Están definidos por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Según los aminoazúcares se clasifican en familias. Los aminoglucósidos más usados son: gentamicina, amikacina y estreptomina. Los aminoglucósidos se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria.

e) Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos semisintéticos derivados de la eritromicina producida por *Streptomyces erythreus*. Se clasifican de acuerdo al número de carbonos: 14 carbonos (eritromicina y claritromicina), 15 carbonos (azitromicina) y 16 carbonos (espiramicina). Su mecanismo de acción consiste en que se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación.

f) Quinolonas

Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el super enrollamiento del

ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Se clasifican en generaciones que van de la primera a la cuarta generación.

III. Mecanismos de resistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación, ya sea en nosocomios o el ambiente. El uso excesivo de los antibióticos favorece la selección de bacterias que poseen dicha capacidad (Vignoli R, 2008).

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación), o por adquisición mediante plásmidos, transposones, e integrones (Sussmann P.O., 2001).

Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia gracias a un sistema de recombinación propio. Esto, sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia.

Algunos plásmidos y transposones poseen elementos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos dando lugar a la aparición de la resistencia a múltiples antibióticos (Sussmann P.O., 2001).

Desde una perspectiva molecular y bioquímica existen cuatro mecanismos a través de los cuales las bacterias pueden hacerse resistentes a los antibióticos (Sussmann P.O., 2001), dichos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente:

a) Inactivación del antibiótico.

Causado por la producción de enzimas que ocasionan cambios en la estructura del antibiótico provocando que pierda su funcionalidad. Por ejemplo, la enzima β -lactamasa, es una proteína capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia.

b) Alteración del sitio blanco del antibiótico.

La propia bacteria puede alterar el sitio de unión específico para el antibiótico, para evitar que interrumpa una función vital de dicha bacteria (mecanismo más común en bacterias Gram positivas).

c) Barreras de permeabilidad.

Las bacterias generan cambios en la bicapa lipídica, afectando la permeabilidad por cambios en las porinas, de modo que se evita la entrada de los antibióticos al espacio periplásmico.

d) Bombas de expulsión.

El mecanismo opera tomando al antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual se evita que llegue a su sitio de acción, mecanismo utilizado más frecuentemente por bacterias Gram negativas.

IV. Definición de multirresistencia antibiótica

Se definen como la capacidad de aquellos microorganismos que son resistentes a una o más familias de antibióticos simultáneamente. No existe una definición universal aceptada de bacteria multirresistente que sea aplicable a todos estos microorganismos; el concepto puede ser diferente en función de el enfoque que se de, ya sea clínico, microbiológico o

epidemiológico. Pero de manera general, se deben incluir al menos dos condiciones: que exista resistencia a más de una familia o grupo de antimicrobianos, y que esa resistencia pueda suponer una dificultad para el tratamiento y la posibilidad de transmisión del mecanismo de resistencia (López Pueyo, M.J., 2011).

El término “microorganismo multirresistente” se ha utilizado sobre todo para bacterias hospitalarias que han desarrollado resistencia a diferentes antibióticos, y que son capaces de ocasionar brotes, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus spp.*, resistente a vancomicina, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y bacilos gramnegativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a distintos grupos de antibióticos (López Pueyo, M.J., 2011).

De forma más específica, hablamos de bacterias multirresistentes cuando son resistentes a tres o más familias de antibióticos, a los que habitualmente son sensibles, incluyendo betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), aminoglucósidos y quinolonas (López Pueyo, M.J., 2011).

V. Antecedentes bibliográficos

El problema generado por los microorganismos multirresistentes a antibióticos es un tema de importancia en salud pública mundial, por lo que se han realizado y publicado diversos estudios y artículos acerca de éste suceso, a los cuales nos referiremos como antecedentes para este trabajo.

De los primeros artículos en los que se estudiaron muestras de origen alimenticio con microorganismos resistentes, está uno publicado en Estados Unidos que trata sobre *Salmonella* resistente a antibióticos aislada de carne molida, el cual muestra que bacterias transmitidas por los alimentos como *Salmonella* no tifoidea representan un importante problema de salud pública en todo el mundo considerando que la mayoría de las infecciones por esta bacteria se adquieren al comer alimentos contaminados y que cuando la infección se propaga más allá del tracto intestinal lo más recomendado es el tratamiento con antibióticos; sin embargo, el uso de los mismos en cualquier entorno crea presiones selectivas que favorecen la supervivencia de patógenos resistentes a dichos fármacos (White David G., 2001).

En cuanto a los resultados de este artículo, también se describe que las salmonellas aisladas presentaron integrones clase 1, característicos de la resistencia a sulfas como el sulfametoxazol; y la presencia genética de β -lactamasas de amplio espectro, como la cefalosporinasa plasmídica_{CMY-2}.

Las bacterias son campeonas de la evolución y relativamente unos pocos microbios se han adaptado a un punto en el que plantean graves problemas clínicos para los seres humanos (Arias y Murray, 2009). Otro artículo expone el caso de un hombre de 70 años de edad, residente en San Francisco, que padeció endocarditis por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina y que, a pesar de la administración por muchos días de los mejores antibióticos disponibles para combatir la infección, no fue posible salvar al paciente, quién murió de una bacteremia generalizada. El artículo hace mención de más bacterias y a que antibióticos se han vuelto resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina que se hizo rápidamente resistente tanto a glucopéptidos como a β -lactámicos de amplio espectro y ahora es a menudo resistente a múltiples medicamentos,

incluyendo clindamicina, aminoglucósidos, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas.

Se ha llegado a un punto tal que de seguir así para los pacientes infectados con bacterias multirresistentes no se encontrarán antibióticos que los puedan salvar.

Como ya se mencionó, la resistencia a los antibióticos puede ser natural o adquirida. La resistencia adquirida es a través de alteraciones genéticas, que ocurren en el genoma de los microorganismos o por la transferencia de genes de resistencia que se encuentran en varios tipos de elementos móviles del ADN. La resistencia por lo general tiene un costo biológico alto para los microorganismos, pero las mutaciones compensatorias se acumulan rápidamente para suprimir este gasto; esto explica por qué muchos tipos de resistencias no desaparecen en una población bacteriana (Herriques Normark, 2002).

Por otro lado, en España se realizó un trabajo sobre piensos para animales destinados al consumo humano. Describe que en la práctica de la crianza y engorda de estos animales, se acostumbra el uso de antibióticos en los piensos con dos propósitos, uno como promotores de crecimiento y el otro con fines terapéuticos. El artículo menciona que esta antigua práctica debería ser controlada por medio de límites máximos residuales, ya que muchos de los medicamentos utilizados se pueden presentar como formas activas del antibiótico en los tejidos de los animales destinados al consumo humano (Cancho Grande B., 2000). Esto podría ser otro mecanismo que explicara el origen de la aparición de bacterias resistentes en alimentos de origen animal.

Como se puede notar, esto es muy serio ya que no solo son los alimentos de origen animal en los que se han encontrado bacterias multirresistentes

(a cinco o más antibióticos); sino que también las encontramos presentes en otros grupos de alimentos y a esto no escapan los de origen vegetal. Por ello se hace particular énfasis en este trabajo al estudio de frutos como lo son el mango y la manzana.

VI. Importancia del consumo de frutas y el impacto que conlleva la posible presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos.

La manzana y el mango son de las frutas con mayor aceptación por la población mexicana y ambas frutas con una alta preferencia por consumirse en fresco (INIFAP, 2011).

Las variedades tanto de la manzana (*M. domestica*) (Royal gala, Golden delicious y Granny smith), como del mango (*M. indica*) (manila, que es una variedad del grupo mulgova), son de las frutas más comunes en nuestro país y a nivel mundial (SAGARPA, 2008). Además de tener más variedades, también poseen un valor nutritivo alto.

En México se estima que se producen 500 000 toneladas de manzana y se tiene una demanda del doble de esta cifra a nivel nacional. El consumo per cápita de manzana a nivel mundial es de 8.5 kg, y en México es de 5 kg, principalmente del fruto en fresco (INIFAP, 2011).

Las Normas sobre manzana incluyen entre sus criterios de especificaciones que las variedades de manzana roja tengan un valor de 11°Brix y las variedades amarilla y verde un valor de 12 °Brix (NMX-FF-061-SCFI-2003). Y como criterios de daño severo, defectos de cicatrización que cubran más del 2% del área total del fruto, quemaduras causadas por productos químicos, desprendimiento del pedúnculo que cause la exposición de la

pulpa y presencia de enfermedades (como la Sarna del manzano causada por el hongo *Venturiaina equalis*) y plagas de insectos. Pero los organismos reguladores de la ley no consideran límites permisibles de flora bacteriana propia de la manzana, ni que géneros y especies de microorganismos constituyan dicha flora, un requerimiento necesario, ya que el mayor consumo de esta fruta es en fresco.

Por otro parte, México también cuenta con 150,000 hectáreas de mango aproximadamente, y el consumo per cápita de mango a nivel nacional es de 14 Kg al año (SAGARPA, 2004). En esta fruto ocurre algo muy similar como lo ya descrito antes sobre la manzana, los organismo reguladores no consideran límites permisibles de flora bacteriana propia de la fruta, solo se toman en cuenta criterios como °Brix (6 °Brix para variedades de manila) y firmeza entre otros (NMX-FF-058-SCFI-2006). En cuanto a defectos críticos se mencionan daños físicos, no cumplir con las especificaciones fitosanitarias (NOM-075-FITO-2003) y presencia de síntomas por enfermedades (como la antracnosis provocada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*). Esto es de importancia mundial, ya que México abastece al mercado de Estados Unidos, quien es el primer importador de mango en el mundo.

4. Hipótesis

- Ya que se ha comprobado la presencia de bacterias multirresistentes en la mayoría de los alimentos, incluyendo diversas variedades de frutas; existen bacterias multirresistentes a antibióticos sobre las cáscaras de manzana (*Malus domestica*) y mango (*Manguifera indica*). De no ser así, existe algún compuesto con efecto antimicrobiano en las frutas.

5. Objetivo general

En alimentos considerados inocuos *a priori* poner en evidencia el alto número de microorganismos multirresistentes a antibióticos.

6. Objetivos particulares

1. Aislar y caracterizar bacterias multirresistentes (a cinco o más antibióticos), provenientes de mango (*M. indica*) y manzana (*M. domestica*).
2. Determinar si hay diferencias entre muestrear la fruta lavada y sin lavar para hallar la presencia de bacterias multirresistentes.
3. Realizar extractos acuosos y etanólicos de diferentes variedades de manzana, y determinar si los extractos presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias multirresistentes.
4. Determinar si hay diferencia de actividad antimicrobiana entre el tipo de extracto que se está probando.

7. Metodología

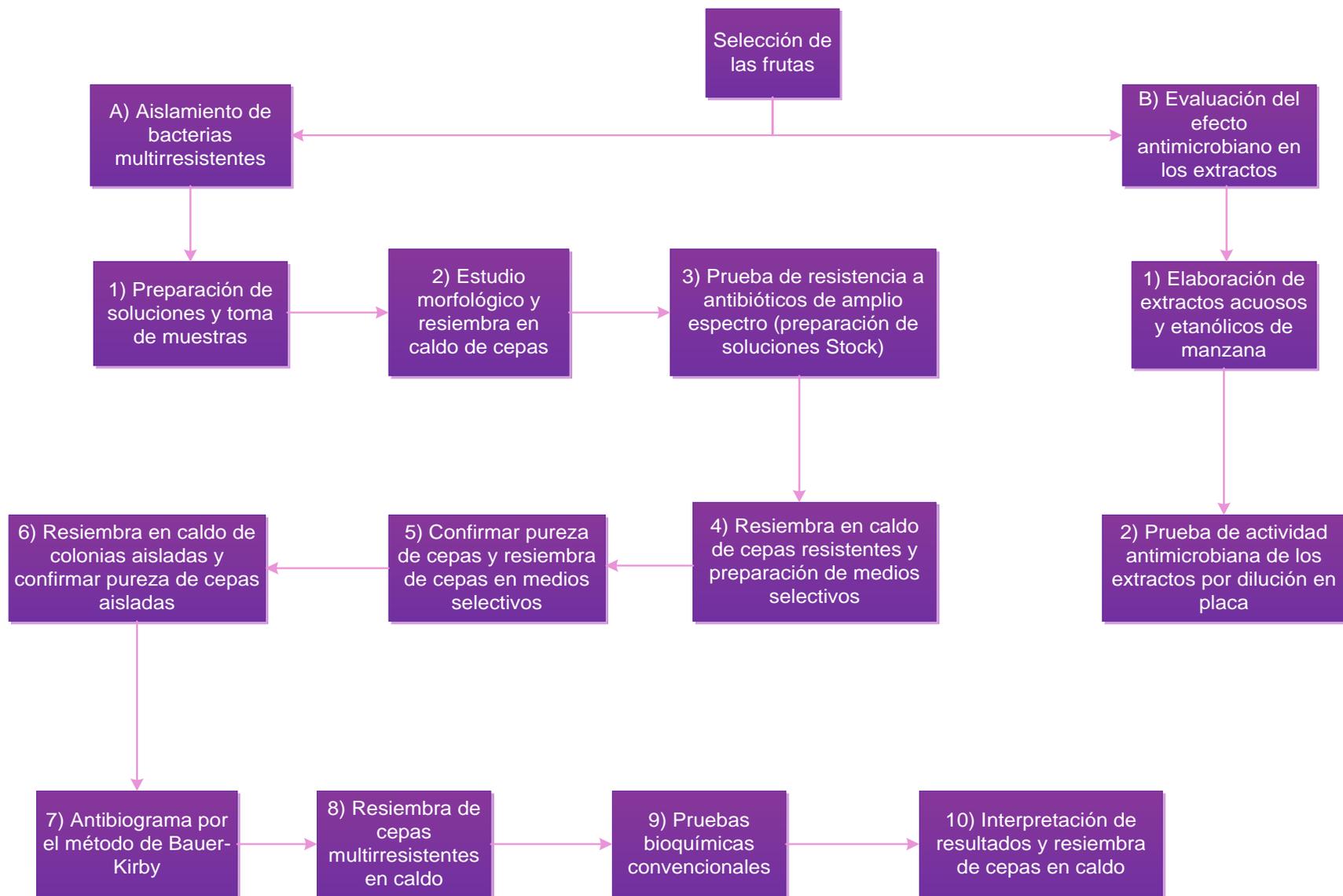


Figura 1. Diagrama de Flujo

I. Diseño Experimental

Selección de las frutas:

Se decidió trabajar con dos frutas de alto consumo en fresco por la población mundial, además que una se consumiera con exocarpo como la manzana y otra que se consumiera sin el exocarpo como el mango.

A) Aislamiento de bacterias multirresistentes

1. Preparación de soluciones y toma de muestras

Se prepararon las siguientes soluciones para el muestreo:

- a) Solución salina isotónica
- b) Caldo BHI
- c) Caldo Luria

Una vez seleccionadas las frutas con base a si eran frutas con un alto consumo en fresco, se procedió a la toma de muestras. Para fines prácticos nombraremos a las muestras de manzanas mediante su color (ver *Figura 2* como referencia), es decir, la Royal gala se nombró con la R de manzana roja, la Golden delicious con la A de manzana amarilla y la Granny smith con una V de manzana verde. Y a la muestra de mango manila con las letras Mg.

Las muestras se compraron en cadenas comerciales como tiendas de autoservicio, en mercados públicos y en tianguis (todos los puntos de compra dentro de la delegación Xochimilco); dichas frutas desde el momento de seleccionarse se colocaron en bolsas para que no hubiera contaminación cruzada proveniente del medio ambiente exterior. Se dividieron las frutas en lavadas (en el laboratorio) y no lavadas, se tomaron muestras de tres zonas diferentes (*Figura 3*) de cada fruta con un hisopo estéril impregnado con solución salina, e incubado en 3mL de caldo BHI a 37°C durante 24 horas.

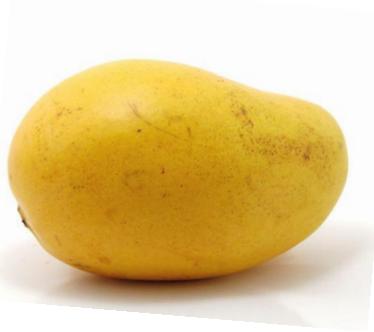
Frutas muestra	
<p>Manzana Royal gala: R (roja)</p> 	<p>Mango manila: Mg (mango)</p> 
<p>Manzana Golden delicious: A (amarilla)</p> 	<p>Manzana Granny smith: V (verde)</p> 

Figura 2. Se muestran las especies y las diferentes variedades de frutas utilizadas para el estudio.

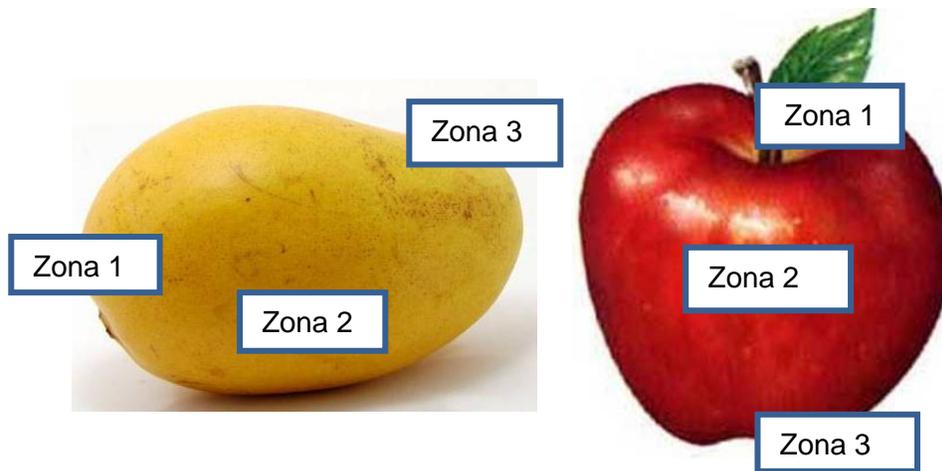


Figura 3. Ejemplos de las zonas de muestreo en la fruta. *Zona 1: la parte donde se une el pedúnculo con el fruto, Zona 2: en el exocarpo de una de las caras laterales de la fruta y Zona 3: la parte posterior del fruto (parte opuesta al pedúnculo).*

2. Estudio morfológico y resiembra de muestras

Se revisaron los tubos para observar el crecimiento bacteriano y se hizo tinción de Gram para tener una vista muy general de la microbiota presente, se resembró 100 μ L de inóculo en 3mL de caldo Luria, y se incubó a 37°C durante 24 horas.

3. Prueba de resistencia a antibióticos de amplio espectro (preparación de soluciones stock)

Posterior mente se prepararon dos soluciones, una con cefotaxima y otra con ceftriaxona en caldo Luria, con concentración para ambos antibióticos de 64 μ g/mL. Esta concentración se tomó de la CMI (concentración mínima inhibitoria). De cada una de las muestras se tomó un inóculo (de acuerdo al 0.5 de la escala de McFarland), se inocularon por duplicado y se incubaron.

4. Resiembra en caldo de cepas resistentes y preparación de medios selectivos

Las muestras que fueron resistentes a la cefotaxima y a la ceftriaxona se utilizaron como cepas con las que se continuó trabajando. Se resembraron en caldo Luria e incubaron. Para cada cepa se prepararon por duplicado medios selectivos de Agar Mc Conkey y Agar Sal Manitol (MSA).

5. Confirmar pureza de cepas y siembra en medios selectivos

Al realizar la correspondiente tinción de Gram, se procedió a sembrar por agotamiento en los medios ya mencionados.

6. Resiembra en caldo de colonias aisladas y confirmar pureza de las mismas.

Las colonias que se aislaron en los respectivos medios se resembraron en caldo Luria, se incubaron para aumentar la cantidad de bacterias del inóculo, y así poder tomar la suficiente muestra para la tinción de Gram, con lo que se confirmó la pureza de estas.

7. Antibiograma por el método de Bauer-Kirby. Prueba de resistencia con multidiscos

Una vez puras se sembraron por extensión en placa 100µL de inóculo en agar Luria, utilizando multidiscos BIO-RAD (Agente Diagnostico para el estudio *in vitro* de la sensibilidad bacteriana a 12 antimicrobianos) y se incubaron a las condiciones de trabajo ya mencionadas.

8. Se hizo la resiembra de las cepas multirresistentes del mismo modo que se vino realizando con anterioridad.

9. Para cada una de las cepas se realizaron pruebas bioquímicas convencionales (se incubó de acuerdo a cada prueba).

10. Lectura e interpretación de resultados y resiembra en caldo Luria de las cepas (37°C, por 24 horas).

B) Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos

1. Se elaboraron dos extractos acuosos y uno etanólico de cada una de las tres diferentes variedades de manzana (por triplicado) de la siguiente manera:
 - ❖ Acuoso 1. La fruta (en promedio 200g) se lavó, partió, se quitaron las semillas y se procesó para extraer el jugo con un extractor, este se filtró doble vez en papel filtro, luego en membrana Millipore de 0.22 μ m, y se almacenó a 5°C.
 - ❖ Acuoso 2. Se lavó, partió, se quitaron las semillas y peló la fruta (en promedio 200g). Posteriormente, fue procesada con un extractor para extraer el jugo, el cual se filtró doble vez en papel filtro, luego en membrana Millipore de 0.22 μ m, y se almacenó a 5°C.
 - ❖ Etanólico 1. La fruta (en promedio 200g) se lavó, se cortó en trozos pequeños, se añadieron 150 mL de etanol y se dejó reposar durante 24h, posteriormente se filtró en papel filtro y luego en membrana Millipore de 0.22 μ m y se almacenó a 5°C. Este extracto se probó utilizando un control de etanol preparado.

2. Hacer un antibiograma, probando los extractos por triplicado con dos cepas de bacterias multirresistentes para ver si alguno presenta actividad antimicrobiana y entonces concentrar el extracto ya sea con rotavapor si se trata del extracto etanólico o por medio de un liofilizador (*Figura 4*) para cualquiera de los extractos acuosos. Volver a probar el extracto una vez concentrado.

Nota: Si alguno de los extractos no presenta efecto significativo en las cepas no es necesario concentrarlo.

3. Después de liofilizar el extracto, se debe pesar y medir cantidades conocidas de extracto y agua, haciendo soluciones para una curva a diferentes concentraciones y así comparar con el extracto original.

En las pruebas de inhibición bacteriana se evaluaron 1, 2, 3, 8, 16 y 30 mg/mL de extracto por duplicado con cada cepa, de este modo se hablará de una concentración mínima inhibitoria de extracto.



Figura 4. Equipo Liofilizador LABCONCO de la Facultad de Química, anexo del Laboratorio 4-A.

8. Resultados y Discusión

Al realizar el muestreo se encontraron bacterias tanto en las frutas lavadas, como en las no lavadas (*Cuadro 1*), encontrándose en la observación al microscópico solo cocos en las manzanas y en el caso de los mangos cocos y bacilos. Al encontrarse aparentemente las mismas bacterias en las tres zonas de muestreo, podemos afirmar que no parece haber distinción entre lavar y no lavar la fruta en lo que a este aspecto se refiere (*ver Cuadro 2*).

Fruta	Zona de Muestreo		
	A	B	C
MR1	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
MR2	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
MA1	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
MA2	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
MV1	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
MV2	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos
Mg1	Gram + cocos y diplococos	Gram - bacilos cortos	Gram + cocos y diplococos
Mg2	Gram + cocos y diplococos	Gram + cocos y diplococos	Gram - bacilos cortos

Cuadro 1. Resultados de la observación microscópica del muestreo de la microbiota, 1 fruta sin lavar, 2 fruta lavada, MR manzana roja, MA manzana amarilla, MV manzana verde, Mg mango, A, B y C las diferentes zonas de muestreo de la fruta.

Muestra	Lavada	No Lavada
MR	4.8x10 ⁴	4.95x10 ⁴
MV	4.88x10 ⁴	4.93x10 ⁴
MA	4.75x10 ⁴	4.78x10 ⁴
Mg	5.50x10 ⁴	5.68x10 ⁴

Cuadro 2. Resultados de la cuenta en placa del muestreo de la microbiota expresados en UFC/cm² de exocarpo de fruta, MR manzana roja, MA manzana amarilla, MV manzana verde y Mg mango.

De las pruebas de resistencia con antibióticos de amplio espectro, se encontró que en ninguna de las manzanas (*Cuadro 3*) había bacterias resistentes a estos antibióticos. Esto se determinó en experimentos realizados en 3 ocasiones diferentes con manzanas diferentes, haciendo notar que todas las manzanas fueron compradas en lugares diferentes.

Esto podría explicarse a que posiblemente la manzana posea alguna sustancia o compuesto químico que le de ciertas características microbicidas. Esto es de relevante importancia ya que le permitiría, de algún modo que no conocemos, afectar a las bacterias multirresistentes ya que no se hallan presentes en las manzanas. Esto da la oportunidad de poder realizar en el futuro un estudio sobre el porqué en las manzanas no parece haber bacterias multirresistentes. Sin embargo, en el caso del mango sí se encontraron bacterias resistentes.

Cepas	CFX (64µg/mL)	CTX (64µg/mL)
MR1	-	-
MR2	-	-
MA2	-	-
MA2	-	-
MV1	-	-
MV2	-	-
Mg1	Resistente	Resistente
Mg2	Resistente	Resistente

Cuadro 3. Resultados de la prueba de resistencia, Cepas procedentes de Manzana Roja (MR), Manzana Amarilla (MA), Manzana Verde (MV), Mango (Mg), 1 fruta sin lavar, 2 fruta lavada.

Al sembrar las cepas de mango en medios selectivos (Cuadro 4), no se presentó crecimiento en ninguna caja de MSA, mientras que en Mc Conkey se consiguieron aislar colonias Gram negativas de todas las cajas, es decir tanto de las muestras de CFX como las de CTX. La tinción de Gram mostró que eran bacilos cortos Gram negativos de colonias ya puras.

Cepas	Agar Mc Conkey	Agar MSA
Mg1 α	Con crecimiento	Sin crecimiento
Mg1 β	Con crecimiento	Sin crecimiento
Mg2 α	Con crecimiento	Sin crecimiento
Mg2 β	Con crecimiento	Sin crecimiento

Cuadro 4. Resultados de siembra en medios selectivos.

Una vez realizado el antibiograma con sensidiscos, se encontró que *sí hay bacterias multirresistentes provenientes de las cepas de mango* como se muestra en el Cuadro 5, donde se puede apreciar que las cepas nombradas como Mg1 α , Mg1 β y Mg2 β fueron resistentes a todos los agentes antimicrobianos del multidisco. En tanto que la cepa Mg2 α aunque presentó halos de inhibición para AK, CI y PEF, aun así fue resistente a los otros nueve antibióticos por lo que sí se considera multirresistente (Figura 5), ya que el criterio es ≥ 5 antibióticos simultáneamente.

Agente Antimicrobiano	Cepa	Mg1 α	Mg1 β	Mg2 α	Mg2 β
Ak 30mcg		-	-	+	-
Am 10mcg		-	-	-	-
CB 100mcg		-	-	-	-
CF 30mcg		-	-	-	-
CFX 30mcg		-	-	-	-
CPF 30mcg		-	-	-	-
CL 30mcg		-	-	+	-
GE 10mcg		-	-	-	-
NET 30mcg		-	-	-	-
NF 300mcg		-	-	-	-
PEF 5mcg		-	-	+	-
SXT 25mcg		-	-	-	-

Cuadro 5. Resultados del antibiograma por Bauer-Kirby, se muestran los resultados los halos de inhibición. Cepa inoculada en solución de cefotaxima (α), inoculada en solución de ceftriaxona

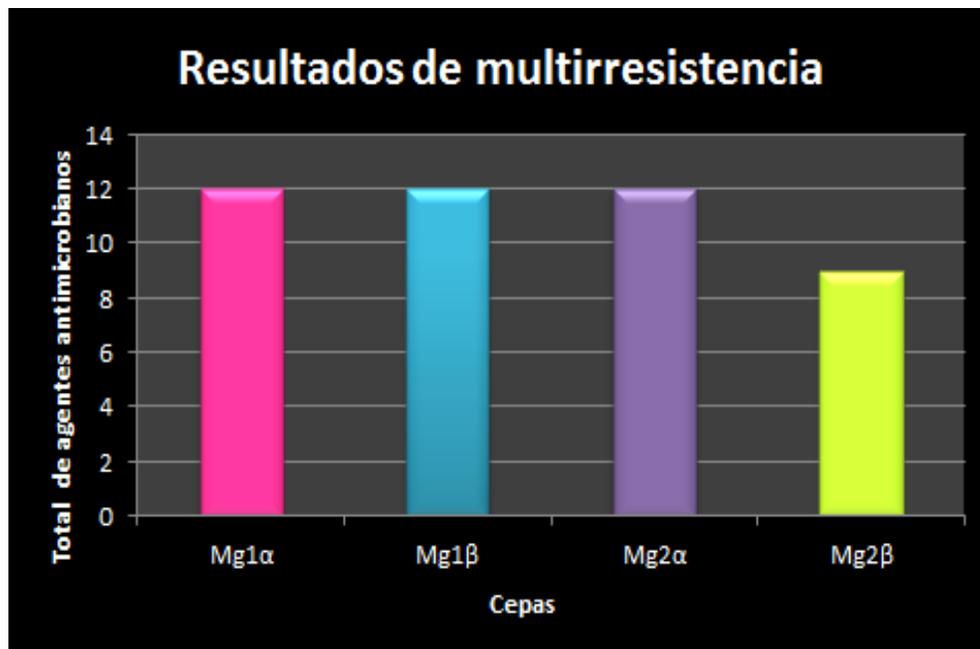


Figura 5. Se muestran los datos resumidos generados por la prueba de Bauer-Kirby.



Figura 6. Tubos de ensayo con la prueba de carbohidratos fermentables, para Galactosa de las cepas α , de izquierda a derecha se muestra tubo control, tubo con prueba positiva de Mg1 α y tubo con prueba negativa de Mg2 α .

Prueba Bioquímica	Cepas	Mg1α	Mg1β	Mg2α	Mg2β
H ₂ S ₂		-	-	-	-
Movilidad		-	-	-	-
Indol		+	+	-	-
Ornitina		+	+	+	+
Metabolismo		oxidativo	oxidativo	oxidativo	oxidativo
Manitol Rojo de Fenol		-	-	-	-
Ureasa		+	+	+	+
Rojo de Metilo		-	-	-	-
Acetoína		-	-	-	-
Catalasa		+	+	+	+
Oxidasa		+	+	-	-
Bilis Esculina		Resiste sales biliares, y si hidroliza esculina	Resiste sales biliares, y si hidroliza esculina	Resiste sales biliares, pero no hidroliza esculina	Resiste sales biliares, pero no hidroliza esculina
Citrato		+	+	-	-

Cuadro 6. Resultados de las pruebas bioquímicas.

Perfil de Carbohidratos				
	Mg1 α	Mg1 β	Mg2 α	Mg2 β
Glucosa	+	+	+	+
Fructosa	-	-	+	+
Galactosa	+	+	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-
Maltosa	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-
Xilosa	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Interpretación	<i>P. testudinis,</i>	<i>P. testudinis,</i>	<i>P. bettyae.</i>	<i>P. bettyae.</i>

Cuadro 7. Resultados del Perfil de Carbohidratos fermentables.

Al hacer pruebas bioquímicas convencionales se encontraron los resultados mostrados en los Cuadros 6 y 7, obteniendo finalmente que las cuatro cepas sometidas a las pruebas, eran cuatro bacterias del género *Pasteurella*.

Al observar sus perfiles de carbohidratos, encontramos que las dos cepas de Mg1 son iguales en sus perfiles, al igual que las dos Mg2 por lo que al interpretar y comparar, las características morfológicas observadas en la tinción de Gram, las pruebas bioquímicas y el perfil de carbohidratos, mediante las tablas de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana (MacFaddin, 2003, páginas 628 y 629), se determinó que las cepas multirresistentes Mg1 α y Mg1 β corresponden a la bacteria *Pasteurella testudinis*, y las cepas multirresistentes Mg2 α y Mg2 β corresponden a *Pasteurella bettyae*.

Para fines prácticos nos referiremos a las cepas solo como **Mg1** y **Mg2**. Una vez elaborados los extractos de manzana y probados en las cepas **Mg1** y **Mg2**, los resultados generados inicialmente se exponen en el *Cuadro 8*.

Variedad de Manzana		Cepa Mg1								
No. de repeticiones		Extracto Acuoso 1			Extracto Acuoso 2			Extracto Etanólico		
Roja	1	Si 13 mm	Si 13 mm	Si 13 mm	No	Si 13 mm	No	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	2	Si 13 mm	Si 13 mm	No	No	no	No	Si 16 mm	Si 15.9 mm	Si 16 mm
	3	Si 13 mm	Si 13 mm	Si 13 mm	No	no	Si 12 mm	Si 16 mm	Si 15.9 mm	Si 15.8 mm
Amarilla	1	No	No	No	No	no	No	Si 15.8 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	2	si 12 mm	No	No	No	Si 12 mm	No	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	3	No	si 12 mm	No	No	no	No	Si 16 mm	Si 15.9 mm	Si 16 mm
Verde	1	No	No	No	No	no	No	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	2	No	No	No	No	no	No	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	3	No	No	No	No	no	No	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm

Cuadro 8. Resultados de todos los extractos de las manzanas al probarlos para la cepa Mg1, donde se muestra la presencia de halos inhibitorios.

Variedad de Manzana		Cepa Mg2								
No. de repeticiones		Extracto Acuoso 1			Extracto Acuoso 2			Extracto Etanólico		
Roja	1	no	Si 13 mm	Si 13 mm	No	si 13 mm	no	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	2	Si 13 mm	Si 13 mm	No	No	No	no	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm
	3	Si 13 mm	Si 13 mm	Si 12 mm	No	No	Si 12 mm	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 17 mm
Amarilla	1	no	no	No	No	No	no	Si 15 mm	Si 15 mm	Si 15 mm
	2	no	Si 12 mm	No	No	Si 11 mm	no	Si 16 mm	Si 15 mm	Si 15 mm
	3	no	si 12 mm	No	No	No	no	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 15 mm
Verde	1	no	no	No	No	No	no	Si 15 mm	Si 15 mm	Si 16 mm
	2	no	no	No	No	No	no	Si 16 mm	Si 17 mm	Si 16 mm
	3	no	no	No	No	No	no	Si 16 mm	Si 16 mm	Si 16 mm

Cuadro 9. Resultados de los extractos de las manzanas donde se muestra la presencia de halos inhibitorios para la cepa Mg2.

Se observa (Cuadro 8 y 9) que para las cepas Mg1y Mg2 los resultados fueron similares:

- Hubo discrepancia entre utilizar un extracto de tipo acuoso y uno etanólico.
- Que hay también diferencia entre los extractos acuosos 1 y 2, por lo que la forma de preparar el extracto es un punto importante.

-Hay diferencia entre el tipo de variedad utilizada siendo la manzana roja (R), la que presentó mejores resultados para ambas cepas (*Figura 7*).

-Que el extracto etanólico presentó siempre la formación de halos, pero estos halos eran similares a los que presentó la referencia de etanol.

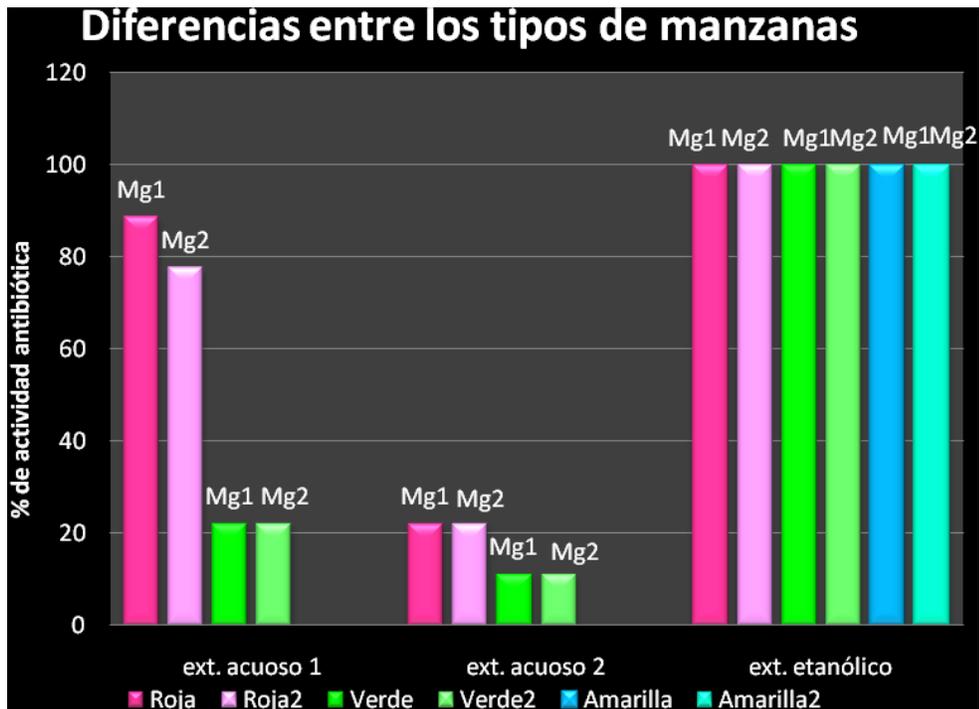


Figura 7. Se muestra en este gráfico la diferencia entre las variedades de manzanas utilizadas frente a cada uno de los extractos mostrando así una determinada actividad.

Como se aprecia en la grafica anterior, el extracto etanólico sí presentó halos de inhibición sin discrepancia entre las diferentes variedades de manzana, pero a pesar de esto no se considera que este extracto posea

actividad antimicrobiana debido a que el diámetro de dichos halos fueron similares a los obtenidos por el control de etanol.

Para el extracto acuoso 2 no se lograron obtener halos de inhibición para la variedad de manzana amarilla y tampoco de manera significativa para las otras variedades, por lo que se descarta también la posibilidad de exista dicha actividad.

Para el extracto acuoso 1 sí se ve una clara diferencia entre variedades, siendo así la manzana roja la única que podría presentar una actividad antimicrobiana, por lo que se continuó trabajando solo con este extracto.



Figura 8. Muestra el proceso de liofilización del extracto acuoso de manzana Royal gala, 1 muestra líquida, 2 muestra congelada, 3 muestra liofilizada.

Se hizo un concentrado del extracto acuoso 1 de manzana roja como se indicó en la metodología. Los resultados obtenidos se muestran en el *Cuadro 10*.

Concentración mg/mL	Cepa Mg1		Cepa Mg2	
	Si	Si	Si	Si
1	13 mm	13 mm	13 mm	13 mm
2	13 mm	13 mm	13 mm	13 mm
3	14 mm	14 mm	13 mm	13 mm
8	14 mm	13 mm	14 mm	13 mm
16	14 mm	14 mm	13 mm	14 mm
30	15 mm	14 mm	14 mm	14 mm

Cuadro 10. *Resultados del antibiograma con el extracto de manzana roja concentrado por duplicado.*

Como se observa en el cuadro anterior, sí hubo formación de halos de inhibición, con el concentrado de la manzana roja. Los halos de inhibición aumentaron su tamaño de diámetro comparados con el extracto original.

9. Conclusiones

Se demostró la presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos (a cinco o más antibióticos), aunque solo se lograron obtener del mango. Dichas bacterias son *Pasteurella testudinis*, y *Pasteurella bettyae*,

En este estudio se observó que no hay diferencia entre muestrear las frutas lavadas y sin lavar ya que se encontró la presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos en ambas muestras respectivamente.

Al evaluar la capacidad de agente antimicrobiano de los extractos de las diferentes variedades de manzana se encontró que el extracto que funcionó mejor para este experimento fue el de tipo acuoso (que incluía el exocarpo) ya que si formo halos de inhibición.

El extracto etanólico no es de interés para este estudio, ya que hay cierta interferencia por parte del etanol, y no se puede evaluar con claridad el efecto antibacteriano por lo que se tendría que preparar este extracto con otra metodología.

Por criterio de variedad de manzana, el extracto acuoso de la manzana roja Royal gala (que incluye el exocarpo) presentó mayor tamaño de halos de inhibición (en promedio 13 mm de diámetro), hay mayor efecto antimicrobiano sobre las bacterias multirresistentes (a cinco o más antibióticos) *Pasteurella testudinis* y *Pasteurella bettyae*.

Con respecto a la eficacia del extracto acuoso de la manzana Royal gala, dicha eficacia aumento al concentrarse el extracto, ya que los diámetros de los halos de inhibición aumentaron 1mm comparado con los valores de los halos sin concentrar el extracto.

Se puede concluir que se podrían tener resultados diferentes y más favorables si se hacen varias modificaciones en la metodología.

Recomendaciones para mejora de la metodología:

1. Hacer cambios en el modo de preparar los extractos ya que se podría también desengrasar la muestra.
2. Hacer un extracto metanólico, como se sugiere en otros estudios similares que se realizaron con extractos de frutas o plantas (Camacho Hernández, I.L.; 2011)
3. Hacer pruebas con otros géneros de bacterias multirresistentes a antibióticos para poder comparar si la actividad antimicrobiana es mayor o menor en dichas bacterias.
4. También se puede hacer un estudio de la composición química o estudio analítico como una cromatografía de componentes de la manzana enfocado a encontrar la causa o la sustancia que da origina dicha actividad antimicrobiana.

Anexo A

Glosario

Plásmidos. Algunas bacterias poseen elementos genéticos extracromosomales, llamados plásmidos. Son pequeños fragmentos circulares de doble cadena de DNA que se mantienen en un número estable y contienen los genes necesarios para replicarse y para su transferencia a otras células, así como para sintetizar toxinas, algunas estructuras de superficie (adhesinas) y para la resistencia a antibióticos (plásmidos R).

Transposones, Los transposones son segmentos de DNA de gran movilidad, simples o compuestos; dan lugar a mutaciones, ya sea por inserción o pérdida de genes o diseminación de los mismos entre células. Cabe señalar que en los transposones se encuentran habitualmente los genes que determinan la síntesis de toxinas, factores de adhesión, virulencia o resistencia a algunos antibióticos.

Integrones, Los integrones son elementos genéticos capaces de captar y expresar genes en casetes de resistencia a antibióticos. Tanto los transposones como los integrones pueden estar integrados en plásmidos y/o en el cromosoma bacteriano.

Porinas, proteínas que forman conductos llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunas sustancias entre ellos los antibióticos.

Anexo B

Medios de cultivo y soluciones

Solución isotónica

Solución a una concentración de 0.85%, sirve como vehículo para la adecuada recolección de microorganismos al muestrear.

Fórmula en gramos por litro	
Cloruro de sodio	8.5 g

Caldo BHI

El medio de Infusión Cerebro Corazón es utilizado para el cultivo de microorganismos con altos requerimientos nutricionales, como estreptococos, neumococos y meningococos. El medio de Infusión Cerebro Corazón está especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. También es recomendado para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Fundamento

En este medio la infusión de carne de corazón y de cerebro de ternera así como la peptona proveen la fuente de carbono, nitrógeno sulfuro y vitaminas. La dextrosa actúa como fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico del medio. El fosfato disódico actúa como buffer.

Componentes	
Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Peptona de gelatina	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2.5 g
Dextrosa	2 g
pH 7.4 ± 0.2	

Luria Bertani

Es un medio nutricionalmente rico, se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias. Se desarrolló en un principio para optimizar el crecimiento de *Shigella* y la formación de placas. Este medio se ha utilizado ampliamente en aplicaciones de la microbiología molecular para la preparación del plásmido de ADN y proteínas recombinantes. Sigue siendo uno de los medios más utilizados para el mantenimiento y cultivo de cepas de laboratorio recombinante de *Escherichia coli* para estudios fisiológicos.

Fundamento

Péptidos y peptonas son proporcionados por triptona. Vitaminas y determinados oligoelementos son proporcionados por el extracto de levadura. Los iones de sodio para el transporte y el equilibrio osmótico se proporcionan por el cloruro de sodio.

Fórmula en gramos por litro	Medio líquido	Medio sólido
Triptona de caseína	10 g	10 g
Extracto de Levadura	5 g	5 g
Cloruro de sodio	10 g	10 g
Agar bacteriológico	0 g	15 g
pH 7.0 ± 0.2		

Mueller Hinton

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fundamento

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que

se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

Componentes	
Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar bacteriológico	15 g
pH 7.3 ± 0.1	

Mac Conkey Agar.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* se desarrollan en el mismo.

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el

desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. La diferenciación de organismos entéricos se lleva a cabo por la fermentación de la lactosa, ya que se disminuye el pH alrededor de la colonia y hay un viraje del color del indicador que da como resultado colonias rosas o rojas.

Componentes	
Peptona	17 g
Pluripeptona	3 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Agar bacteriológico	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
pH 7.1 ± 0.2	

Agar Sal Manitol MSA (Chapman).

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas y de alimentos.

Fundamento

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positivos hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura.

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

Componentes	
Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne	1 g
D-Manitol	10 g
Cloruro de sodio	75 g
Agar bacteriológico	15 g
Rojo de fenol	0.025 g
pH 7.4 ± 0.2	

Anexo C

Principales antibióticos utilizados

CEFTRIAXONA

Es un antibiótico bactericida, de acción prolongada para uso parenteral, y que posee un amplio espectro de actividad contra organismos gram positivos y gram negativos como: *S. pneumoniae*, *S. beta haemolyticus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Borrelia burgdorferi*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*, *S. viridans*, *S. bovis*, *N. gonorrhoeae*, *B. fragilis*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* y *N. meningitidis*. Su CMI es de 64µg/mL.

CEFOTAXIMA

Es un antibiótico semisintético de amplio espectro, pertenece al grupo de las cefalosporinas de tercera generación. Es resistente a la mayoría de las betalactamasas, tanto penicilinasas como cefalosporinasas. Su CMI es de 64µg/mL. Es activa *in vitro*, así como en infecciones clínicas contra los siguientes microorganismos:

Aerobios gram positivos: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* productores y no productores de penicilinasas, *Streptococcus epidermidis* y *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus sp.*

Son susceptibles los aerobios gram negativos como: *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Morganella morganii*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Serratia sp.*, *Providencia rettgeri*. Algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* y a bacterias anaerobias: *Clostridium sp.*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*.

Referencias

1. Alekshun M. N.; Levy S. B., 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial multidrug Resistance. *Elsevier, Cell*, 128, pp. 1037-1047.
2. Arias, C. A., Murray, B.E., 2009. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st century, a clinical super-challenge. *The New England Journal of Medicine*, 360 (5), pp. 439-443.
3. Camacho Hernández, I.L.; Cisneros Rodríguez C.; Muñiz Noriega, L.M.; Chávez Velázquez J.A., 2011. Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de frutos silvestres del estado de Sinaloa. *Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos*, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.
4. Cancho Grande, B.; García Falcón, M. S., 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal; perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 3, pp. 39-47.
5. Espinosa de los Montes L. E. 2008. Outbreak of Infection by Extended-Spectrum β -Lactamase SHV-5 Producing *Serratia Marcescens* in a Mexican Hospital. 20, pp. 586-592.
6. Garza González E.; Mendoza Ibarra S.; Llaca Díaz J. M.; González G. M., 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *Journal of Medical Microbiology*. 60 (1), pp. 84-90.
7. Garza Ramos, U.; Silva Sánchez, J.; Martínez Romero, E., 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*. 51 (3), pp. 439-444.
8. Guzmán M., 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*; (Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias

mención Biología Celular. *Instituto de Biología Celular. Universidad Central de Venezuela.*

9. Hebert C.; Weber S. G., 2010. Common approaches to the control of multidrug-resistant organisms other than methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infect Diseases and Global Health*, 25(1), pp.181-200.
10. Henriques Normark, B.; Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252, pp. 91-106.
11. Hiroshi N. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. *NCBI National Center for Biotechnology Information*, 78, pp. 119-146.
12. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 2011.
13. Kumarasamy K.; Toleman M.; Walsh T.; Bagaria J., 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10, pp. 597-602.
14. Labrie S. J.; Samson J. E., Moineau S., 2010. Bacteriophage Resistance Mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 317-327.
15. López Pueyo, M.J.; Barcenilla-Gaite, F.; Amaya-Villar, R.; Garnacho-Montero, J., 2011. Antibiotic multiresistance in critical care units. *Med Intensiva; Elsevier*, 35 (1), pp. 1-50.
16. Mac Faddin, J. F., 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3era Edición, Buenos Aires: Médica Panamericana.
17. Mazel D.; Davies J., 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci*, 56, pp.742-754.
18. Mosqueda J. L.; Montano A.; Rolon A.L.; Cervantes C.; Bobadilla J, M.; Silvia Sanchez. 2008. Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* A case-control study. *Int J Infect Dis*, 12, pp. 653-659.

19. NORMA MEXICANA, NMX-BB-012-1974 MULTIDISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS – ESPECIFICACIONES.
20. NORMA MEXICANA, NMX-F-285-1977 MUESTREO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.
21. NORMA MEXICANA, NMX-FF-061-SCFI-2003 PRODUCTOS AGRÍCOLAS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - FRUTA FRESCA - MANZANA (*Malus pumila Mill*) - (*Malus domestica Borkh*) – ESPECIFICACIONES.
22. NORMA MEXICANA, NMX-FF-058-SCFI-2006 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO – FRUTA FRESCA – MANGO (*Mangifera indica L.*) – ESPECIFICACIONES.
23. NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-110-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.
24. Pedroza R.; Torres L.; Narváez P.; Alonso G.; Rodríguez V., 2001. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen hospitalario. *MIBE*, 3, pp. 97-100.
25. Palomo G., I.; Gutiérrez C., M.; Astudillo S., L.; Rivera S., C., 2009. Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (2), pp. 152-158.
26. Payne D. J., 2008. Desperately Seeking New Antibiotics. *Science, Microbiology*, 321, pp. 1644-1645.
27. Pitout J., 2010. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 10 (9), pp. 578-579.
28. Rodríguez Baño J.; Pascual A, 2004. Microorganismos multirresistentes, ¿Adquisición nosocomial o comunitaria? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22 (9), pp.505-506.
29. Taubes G., 2008. The Bacteria Fight Back, *Science, Special Section*, 321, pp. 356-361.

30. Sussmann, O.A.; Mattos, L.; Restrepo, A., 2002. Resistencia Bacteriana. *Revista Universitas Médica*, Univ. Méd. Bogotá Colombia 43 (1).
31. Tafur, J.D.; Torres, J.A.; Villegas, M.V., 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Colombian Association of infectious*. 12 (3), pp. 217-226.
32. The tip of the iceberg. 2010. Editorial, Biodiversity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 384.
33. Torres L.; Gagliotta V.; Torres O.; Benítez M.; Domínguez M.; Pedroza R., 2006. β -Lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Ven Micro.*, 26, pp.80-88.
34. Vignoli, R.; Bado, I.; Cordeiro, N.F.; García, V.; Robino, L.; Seija V., 2008. Temas de bacteriología y virología médica. *Montevideo, Oficina del libro FEFMUR*, pp. 727-752.
35. White, D. G.; Zhao, S.; Sudler, R.; Meng, J., 2001. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *The New England Journal of Medicine*, 345 (16), pp. 1147-1154.

Referencias electrónicas

1. Dr. Molina L.J.; Dra. Uribarren B. T., Generalidades de Bacterias, 2011. UNAM
<<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>>
2. Ficha Técnica Cefotaxima, 2007. UNAM
<http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Cefotaxima.htm>
3. Ficha Técnica Ceftriaxona, 2007. UNAM
<http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Ceftriaxona.htm>
4. La OMS insta a los países a que tomen medidas para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos, 2010. Página oficial de la Organización Mundial de la Salud
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/amr_20100820/es/index.html>
5. Página oficial de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>>
6. New superbug found in UK hospitals, 2010. *Health reporter, BBC News*
<<http://www.bbc.co.uk/news/health-10925411>>
7. Innovative mechanisms for tackling antibiotic resistance, *The Royal Society*.
<http://royalsociety.org/displaypagedoc.asp?id=30717>>