



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRESENCIA DE BACTERIAS MULTIRESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS EN PIEL SANA DE INDIVIDUOS JÓVENES
ASINTOMÁTICOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JUAN CARLOS JIMÉNEZ CASTELLANOS



MÉXICO, D.F.

2012



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: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

VOCAL: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SECRETARIO: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

1er. SUPLENTE: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

2do SUPLENTE: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Biología. Laboratorio de Microbiología Molecular. Anexo 1-A.
Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M en C Raquel Ortega Muñoz _____

SUSTENTANTE: Juan Carlos Jiménez Castellanos _____

Índice.

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antibióticos.....	5
Mecanismos de acción de los antibióticos	6
1) <i>Inhibición en la síntesis de pared celular bacteriana.</i>	7
2) <i>Inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos.</i>	8
3) <i>Inhibición en la síntesis de proteínas.</i>	9
4) <i>Alteración de la membrana citoplasmática.</i>	9
5) <i>Inhibición de las enzimas inactivadoras de antimicrobianos.</i>	10
Resistencia a los antibióticos.	11
<input type="checkbox"/> <i>Transformación.</i>	11
<input type="checkbox"/> <i>Transducción.</i>	12
<input type="checkbox"/> <i>Conjugación.</i>	12
<input type="checkbox"/> <i>Plásmidos.</i>	13
<input type="checkbox"/> <i>Transposones.</i>	14
<input type="checkbox"/> <i>Integrones.</i>	15

Bombas de expulsión como mecanismo de resistencia.	17
<input type="checkbox"/> Bomba de expulsión MFS.....	18
<input type="checkbox"/> Bombas de expulsión RND	18
El microbioma humano y la resistencia a antibióticos	19
Objetivo General.....	23
Objetivos particulares.....	23
Hipótesis.	24
Metodología	25
Resultados y discusión.	28
<input type="checkbox"/> Estudios moleculares	38
<input type="checkbox"/> Bombas de Expulsión	40
Conclusiones.....	42
Perspectivas	43
Anexo 1. Pruebas bioquímicas.	44
Anexo 2. Secuencia del integrón IN4.....	46
Anexo 3. Estructura química de los antibióticos.....	50
Referencias.....	52

Abreviaturas.

Zona A	Pliegue alar
Zona B	Cicatriz umbilical
Zona C	Espacio interdigital de manos
Zona D	Pliegue poplíteo
Zona E	Canal auditivo externo
AM	Ampicilina
CF	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
CFP	Ciprofloxacino
CLM	Clindamicina
DC	Dicloxacilina
E	Eritromicina
GE	Gentamicina
PE	Penicilina
TE	Tetraciclina
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
VA	Vancomicina
AK	Amikacina
CB	Carbenicilina
CL	Cloranfenicol
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
NOF	Norfloxacina
McC	MacConkey

Resumen.

La piel humana representa una barrera biológica importante para la prevención de infecciones aún cuando sobre de ella existe una enorme diversidad de bacterias. Constituye un ecosistema extraordinariamente complejo con zonas secas, húmedas y grasosas. En el presente estudio se estudiará la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos aisladas de diferentes regiones de la piel de 24 voluntarios asintomáticos. El descubrimiento de este tipo de bacterias en la piel de individuos asintomáticos obliga a reconsiderar la forma de como ciertos factores de resistencia podrían transmitirse entre los diferentes microorganismos y el papel que juegan estas bacterias en diversas enfermedades infecciosas, en particular las relacionadas con la piel humana. Se realizó la toma de muestra de 24 voluntarios jóvenes asintomáticos en cinco zonas diferentes de la piel, las cuales fueron: (1) Pliegue alar, (2) Cicatriz umbilical, (3) Espacio interdigital de mano, (4) Pliegue poplíteo y (5) Canal auditivo externo. Las muestras obtenidas se crecieron en caldo BHI más antibióticos para determinar cuáles cepas mostraban resistencia. Las muestras que presentaron resistencia en esta primera etapa se purificaron en medios diferenciales agar sal manitol y agar Mac Conkey. En la purificación se obtuvieron bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Al conjunto de cepas puras se les realizó antibiograma por el método de Bauer-Kirby para poder determinar multiresistencia a antibióticos. El resultado obtenido de esta prueba fue que el 100% de las bacterias Gram positivas fueron multiresistentes (resistencia a 5 o más antibióticos) y que el 75% de las bacterias Gram negativas también lo son. En la siguiente etapa del proyecto, se realizó un estudio relativo de las cepas multiresistentes que habitan nuestra piel en las distintas zonas de muestreo. Estas pruebas se realizaron mediante la técnica de *replica plating*. Los resultados obtenidos de esta prueba indicaron que el 80% de las bacterias presentes sobre la piel humana en las distintas zonas de muestreo son multiresistentes a antibióticos. Por último, se realizaron estudios moleculares en los que se encontró que más del 80% de la población de bacterias resistentes en la piel es portadora de posibles factores de resistencia tales como plásmidos, integrones y bombas de expulsión.

Introducción.

La piel humana, el órgano más grande del ser humano, es la primera barrera física y biológica contra las infecciones. El estudio de la biogeografía de las comunidades bacterianas sobre la piel es crítico para establecer parámetros de salud asociados a diferentes enfermedades (Costello. K.C. *et.al.*, 2009). Se ha reportado que la piel constituye un ecosistema extraordinariamente complejo con zonas grasosas, húmedas o secas (Costello. K.C. *et.al.*, 2009). Sin embargo, también se ha observado que las diferentes comunidades bacterianas tienen un patrón predecible biogeográfico.

El microambiente grasoso de la piel incluye zonas como el canal auditivo externo, pliegue alar y el occipucio. Dentro del microambiente húmedo se encuentran el ombligo, espacio interdigital de manos y pies, la ingle y el pliegue poplíteo. Por último, el microambiente seco está compuesto por zonas como las palmas de las manos y los antebrazos. En todos los microambientes antes mencionados, los filos predominantes son *Firmicutes*, que puede incluir bacterias Gram positivas como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, y *Proteobacteria* que puede incluir bacterias Gram negativas como *Klebsiella sp.*, y *Eikenella sp.*, géneros de clara importancia en salud pública. Otra característica importante acerca de los microambientes sobre la piel es que su crecimiento puede estar influenciado con respecto al género del individuo y también a si son diestros ó no. (Fierer, N. *et.al.*, 2008). El estudio del microbioma de la piel en los últimos años ha dejado clara la existencia de un proceso simbiótico entre las bacterias y la piel humana.

El descubrimiento de bacterias multiresistentes a antibióticos en la piel de individuos jóvenes asintomáticos reportado en este trabajo obliga a reconsiderar la forma de cómo ciertos factores de resistencia tales como plásmidos, transposones e integrones podrían transmitirse entre los diferentes microorganismos. La multiresistencia a antibióticos durante mucho tiempo ha sido asociada a los diversos elementos genéticos antes mencionados, pero la observación de que las bacterias son capaces de tolerar un número muy elevado de antibióticos cuestiona si estos elementos presentes en las bacterias multiresistentes son los únicos mecanismos para la generación de multiresistencia a antibióticos.

Los plásmidos son elementos genéticos que se replican independientemente del cromosoma bacteriano; están constituidos de ADN, son circulares y su tamaño puede variar entre 1 a 250 kb. (Ruth, M. *et.al.*, 2006). Estos elementos se pueden encontrar tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas.

Los elementos transponibles se caracterizaron por vez primera como inserciones espontáneas en los operones bacterianos ya que anulaban la transcripción o la traducción de los genes en los cuales se insertaban (Ruth, M. *et.al.*, 2006). De manera general, se pueden dividir a los elementos transponibles en cuatro grupos: (i) Secuencias de inserción, (ii) transposones compuestos, (iii) transposones replicativos y (iv) transposones no replicativos (Galun, E. *et.al.*; 2003).

Los integrones son un sistema de recombinación sitio-específica independiente de RecA, que les permiten insertar y expresar elementos genéticos. El integrón consiste de un gen, *intl*, que codifica para una recombinasa sitio- específica denominada integrasa y un sitio adyacente de recombinación *attI*. Los integrones pueden contener cassettes, los cuales consisten en un gen y un sitio de recombinación y que pueden ensamblarse en un arreglo tándem y diseminarse a través de la población bacteriana por mecanismo de transferencia horizontal de genes.

Muy recientemente, se ha observado que las bombas de expulsión juegan un papel importante en la multiresistencia a antibióticos (Nikaido, H. 2009). Las bombas de expulsión son proteínas transmembranales capaces de transportar varios tipos de compuestos con diversas estructuras al exterior de la célula, utilizando ya sea un gradiente de concentración o ATP (Diixa, P. *et.al.*, 2010). Hasta hace aproximadamente 5 años, se había pensado que las bombas de expulsión carecían de especificidad. Sin embargo, estudios recientes muestran todo lo contrario (Nikaido, H. 2009). Estos transportadores celulares tienen una alta especificidad a diferentes sustratos incluyendo a los antibióticos (Nikaido, H. 2009).

La sobre expresión de las bombas disminuye la concentración intracelular de los compuestos haciendo que estos no alcancen dosis tóxicas coadyuvando a que la célula se adapte al compuesto y que tras varias generaciones se vuelva tolerante o resistente al mismo (Borges-Walmsley. *et.al.*; 2003).

Las bombas de expulsión se pueden dividir en diversas familias; entre las más importantes dado el número de grupos de antibióticos que puede expulsar se encuentran las familias MFS y RND (por sus siglas en inglés Major Facilitator Superfamily y Resistance-Nodulation-Division Family, respectivamente). Existen otras bombas más que están también involucradas aunque su participación en la multiresistencia parecería ser menor. Al conjunto de familias de bombas de expulsión capaces de transportar diferentes tipos de moléculas se les ha denominado MDR (Multi Drug Resistant efflux pumps) (Diixa P. *et.al.*, 2010).

Las bacterias multiresistentes a antibióticos representan un serio problema para la salud pública por lo difícil de su tratamiento y por poner frecuentemente en riesgo la vida de los pacientes infectados. En este estudio se pretende poner en evidencia la alta incidencia de este tipo de microorganismos en microambientes considerados inocuos *a priori*. Asimismo, poner en evidencia uno o más mecanismos involucrados en el fenotipo de multiresistencia tales como: plásmidos, integrones y bombas de expulsión.

Antibióticos.

Generalidades

El término antibiótico proviene de la voz griega *anti* (contra) y *bios* (vida) y fue propuesto para definir sustancias con efecto antimicrobiano. Son sustancias químicas producidas por diversos microorganismos como bacterias y hongos. Además, pueden también ser de origen sintético.

Su función es la de inhibir y/o eliminar el crecimiento de otros microorganismos. Sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano, pueden ser muy distintos entre los diversos grupos existentes actualmente (Patiño, D. *et.al*; 2003).

Generalmente, su acción se mide en términos de espectro bacteriano, es decir, si un antibiótico actúa en un sector restringido es denominado “de espectro limitado”. Por otra parte, si lleva a cabo su acción en diferentes grupos de microorganismos es llamado “de amplio espectro”. Existe un grupo llamado “de espectro selectivo” y estos solo actúan frente a un grupo particular de microorganismos (Norby, S. *et.al*; 1991).

Además, pueden tener efecto bacteriostático y/o bactericida. El primero, inhibe la proliferación bacteriana y una vez suspendido el tratamiento las bacterias pueden reanudar su crecimiento. El segundo, tiene la propiedad de destruir a las bacterias y su efecto es irreversible (Madigan, M. *et.al*; 2000).

El comienzo clínico de los antibióticos es muy incierto. Sin embargo, la literatura muestra que en los primeros años del siglo XX Paul Ehrlich anuncia la eficacia del *Salvarsán* contra el agente causal de la sífilis. A raíz de este descubrimiento, se pensó que la lucha contra las infecciones estaba totalmente controlada. Al comenzar la primera guerra mundial, este descubrimiento queda estático y los estudios en relación a la generación de nuevos antibacterianos se vuelven poco atractivos dentro de la comunidad científica.

Sin embargo, en la misma época, Alexander Fleming culminó con la determinación del efecto antimicrobiano de la penicilina (Young, L. *et.al*; 1994). Posteriormente, en el año de 1936 Franklin Delano Roosevelt Jr, se recupera de un proceso infeccioso gracias a la primera sulfonamida conocida como *Prontosyl* y descrita en 1935 por Domagk (Errecalde, J. *et.al*; 2004). Debido a este hallazgo, el siglo XX se dio a conocer como el siglo de las sulfonamidas. Retomando toda su fuerza y vigor la investigación en el campo de los antibacterianos, Woods en 1940 descubre el mecanismo de acción de las sulfonamidas. En 1944 Waksman estudia microorganismos provenientes del suelo y descubre a la estreptomicina. De esta manera, en las siguientes décadas comenzaron a descubrirse nuevos antimicrobianos, algunos muy importantes como la eritromicina y la vancomicina (1950), gentamicina y ampicilina (1960), cefalexina y cefaclor (1970), entre otros. (Errecalde, J. *et.al*; 2004).

Mecanismos de acción de los antibióticos

Para ejecutar su acción frente a diversos microorganismos, los antibióticos deben de penetrar la barrera superficial de las bacterias. Una vez que cruzan esta barrera, deben interaccionar con su sitio específico de acción conocido como “sitio diana”. Actualmente, no se ha logrado elucidar los mecanismos exactos a través de los cuales muchos de los antibióticos ejercen su efecto. Sin embargo, se infiere que estos mecanismos son muy complejos y en las diversas fuentes de literatura se mencionan cinco grupos fundamentales de mecanismos de acción.

1. Inhibición en la síntesis de pared celular.
2. Inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos.
3. Inhibición en la síntesis de proteínas.
4. Alteración de la membrana citoplasmática.
5. Inhibición de las enzimas inactivadoras de antimicrobianos.

1) *Inhibición en la síntesis de pared celular bacteriana.*

Este grupo de agentes antimicrobianos bloquea la síntesis del peptidoglicano y, por lo tanto, es activo contra bacterias en crecimiento. Son considerados bactericidas. Además, pueden llevar a cabo la inhibición de la pared celular mediante tres vías diferentes. a) Inhibición de la fase citoplasmática, b) Inhibición de la fase de precursores y c) Inhibición de la organización estructural del peptidoglicano (Carvallieri, S. 2005). Ejemplos de este primer grupo son penicilina y ampicilina.

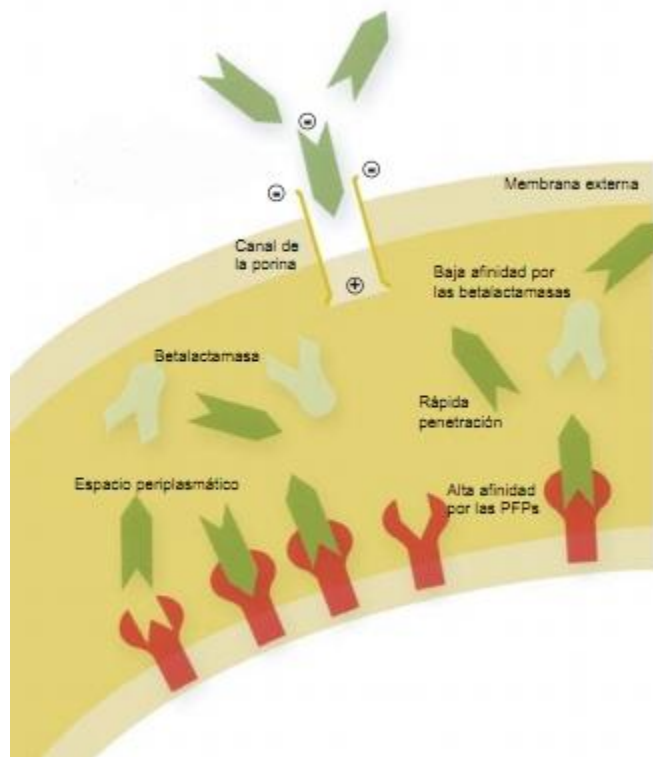


Figura1. Mecanismo de acción de antibióticos que inhiben a la pared celular bacteriana.

2) Inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos.

Este grupo actúa en la transcripción y replicación del ADN. Su acción se lleva a cabo en varias fases en las cuales la participación de enzimas y de sustratos activados pueden interferir en la síntesis de precursores. (Calvo, J. *et.al.* 2009). Al igual que el primer grupo, existen diversas vías para llevar a cabo su efecto. Entre las más importantes se encuentra la inhibición de la síntesis de ácido fólico sin el cual la biosíntesis de bases púricas y pirimídicas no se puede llevar a cabo. Ejemplos de este grupo son las sulfonamidas y el trimetoprim.

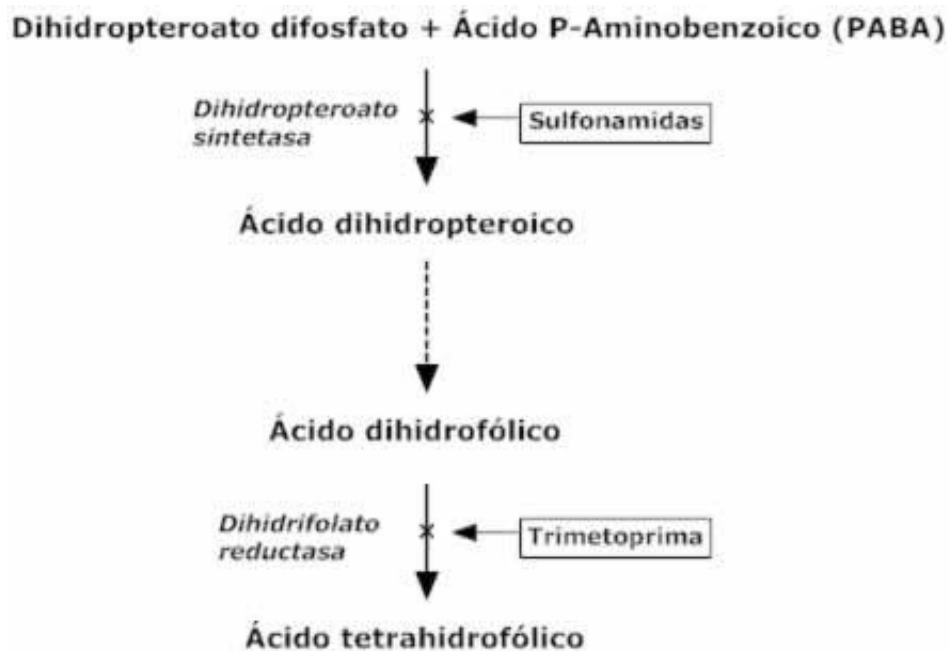


Figura 2. Mecanismo de acción de antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.

3) Inhibición en la síntesis de proteínas.

Este grupo actúa en cualquiera de las cuatro fases en la síntesis de proteínas bacteriana. a) Inhibición de la activación, b) Inhibición de la activación y formación del complejo inicial, c) Inhibición de la fijación del complejo aminoacil-ARNt, d) inhibición de la transpeptidación. Ejemplos de este grupo son kanamicina y gentamicina.

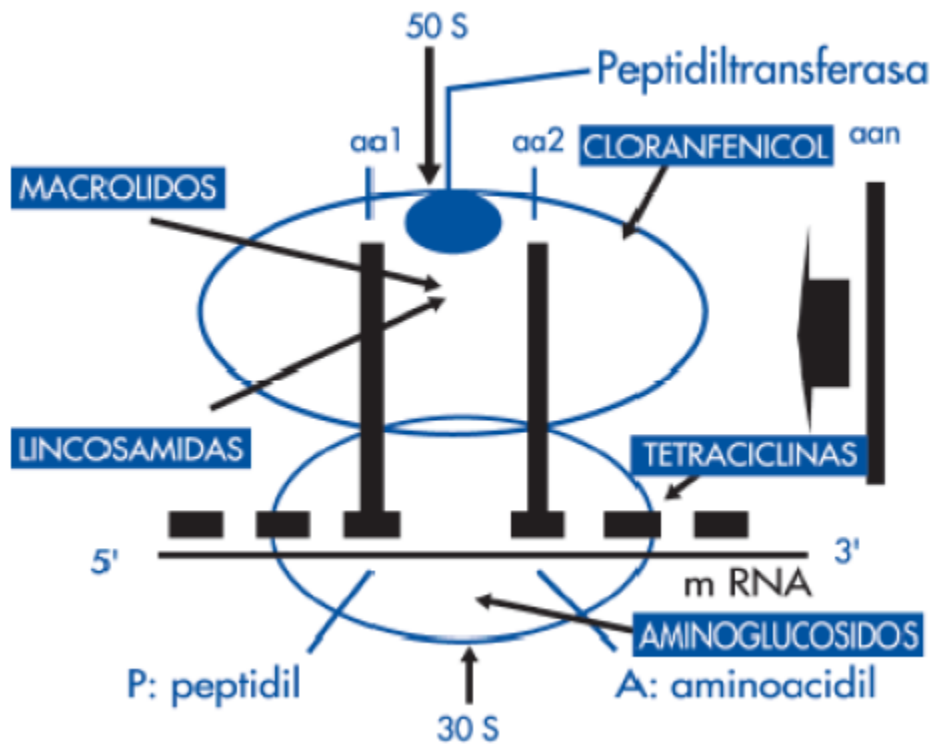


Figura 3. Mecanismo de acción de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

4) Alteración de la membrana citoplasmática.

Este grupo de antibióticos actúa a través de diversos mecanismos sobre la membrana citoplasmática bacteriana tales como a) Ionóforos, b) Formadores de poros, c) Reordenamiento de la membrana citoplasmática. Ejemplos de este grupo son gramicidina y polimixina.



Figura 4. Mecanismo de acción de antibióticos que alteran la membrana citoplasmática

5) Inhibición de las enzimas inactivadoras de antimicrobianos.

Estos antimicrobianos se fijan, por ejemplo, a las beta-lactamasas formadas por las bacterias. Actúan 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 y de esta manera inhiben la formación de pared celular. Ejemplos de este primer grupo son sulbactam y ácido clavulónico.

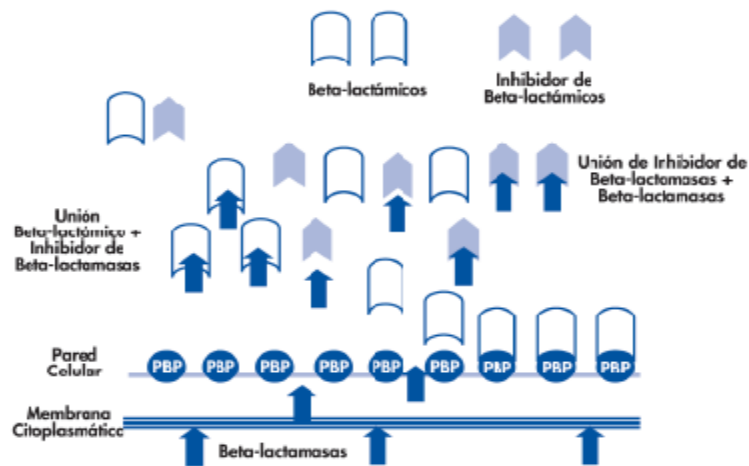


Figura 5. Mecanismo de inhibición de enzimas inactivadoras de antimicrobianos.

Resistencia a los antibióticos.

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad de un microorganismo para resistir, inhibir o revertir los efectos de un antibiótico. Esta resistencia, puede ser producida de manera natural mediante mutaciones inducidas por la aplicación de una presión selectiva a una determinada población microbiana. La información generada puede ser transmitida entre las bacterias por medio de transferencia horizontal de genes (Cordiés, L. *et al*; 1998).

El principal mecanismo por el cual una bacteria adquiere resistencia a un antibiótico es por la adquisición de genes (Mazel, D. *et al*; 1999). Esta adquisición genética puede desarrollarse mediante diversos procesos. Por ejemplo:

- **Transformación.**

Se produce al incorporar ADN desnudo directamente del entorno. Para poder llevar a cabo este tipo de proceso, las bacterias deben tener algunas características tales como: ser “competentes” es decir, que sean capaces de tomar ADN ajeno y lograr incorporarlo funcionalmente a su genoma para transformarse genéticamente. El fenómeno de cepas transformables ocurre de manera natural en diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Elkins, C. *et al*; 1991).

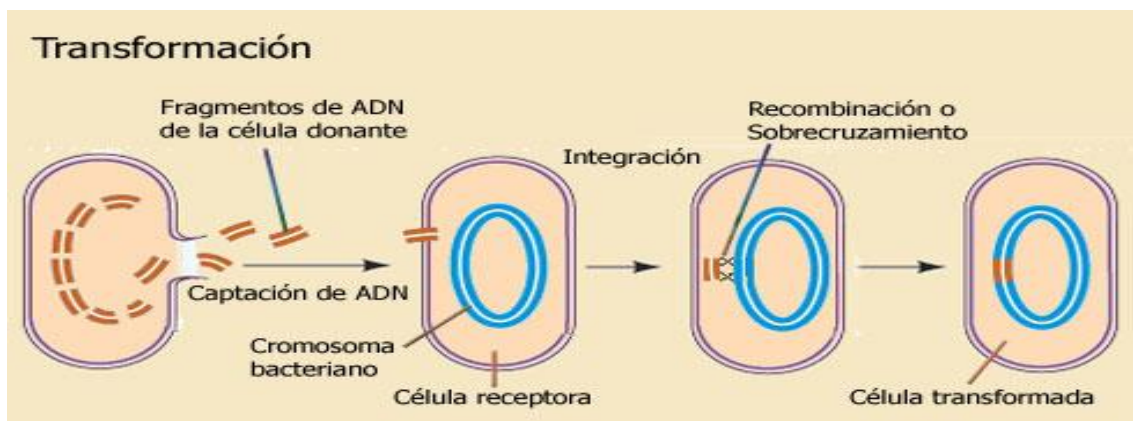


Figura 6. *Mecanismo de transformación bacteriano.*

- **Transducción.**

Se denomina transducción a la introducción de material genético a una bacteria a través de un bacteriófago. Durante este proceso, el virus se adsorbe e inyecta su ácido nucleico a la bacteria y en algunos casos, se facilita la introducción de nuevos genes al genoma bacteriano. Además, este proceso puede ser generalizado o especializado. En el primero, un ADN bacteriano ya sea cromosómico o plasmídico puede formar parte del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma del virus. En el segundo, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente al genoma del virus.

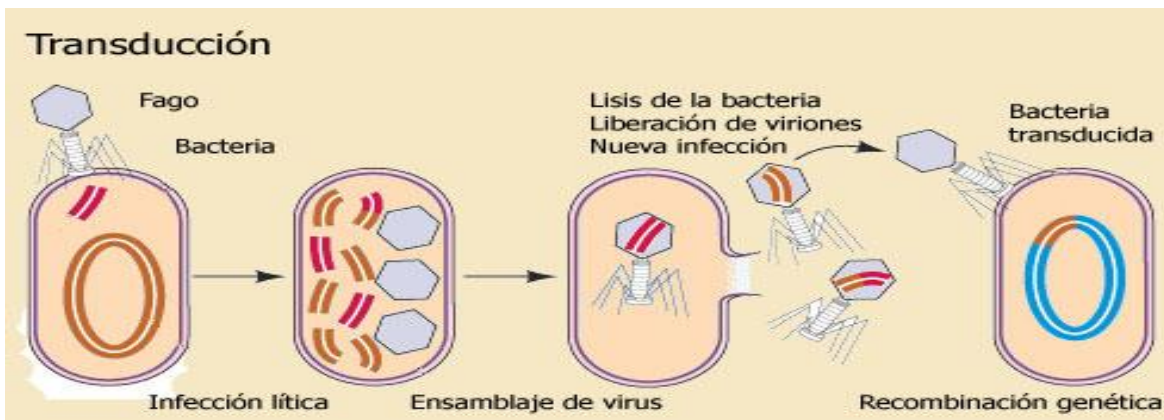


Figura 7. Mecanismo de transducción bacteriana.

- **Conjugación.**

Es una transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos que portan genes de resistencia. Se requiere un contacto directo entre las células así como también, estructuras superficiales especializadas. (Roe, M.T. *et.al*; 2003).

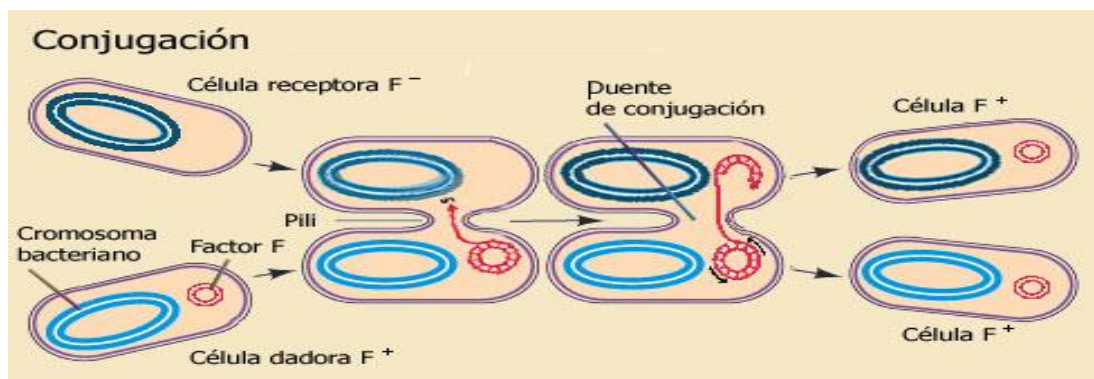


Figura 8. Mecanismo de conjugación bacteriano.

En general, la mayoría de los genes que codifican para el fenotipo de resistencia se encuentran dentro de elementos genéticos tales como: 1) Plásmidos 2) Transposones y 3) Integrones.

- **Plásmidos.**

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular que pueden replicarse y transcribirse de manera independiente al ADN cromosómico. Usualmente están presentes en bacterias y en menor medida pueden encontrarse en organismos eucariontes. El número de plásmidos puede variar dependiendo de su tipo desde una sola copia hasta varios cientos por célula (Thomas, C. *et.al*; 2000) y su tamaño puede oscilar entre 1 a 250 kb (Thomas, C. *et.al*; 2000).

Estos elementos adoptan una conformación tipo doble hélice al igual que el ADN de los cromosomas. Se han encontrado plásmidos en casi todas las bacterias. Tienen la característica de poseer información genética potencialmente útil para las bacterias. Por ejemplo, los genes que codifican para las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos frecuentemente están en plásmidos (Orman, B. 2006).

Existen algunos plásmidos llamados integrativos y tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano. Generalmente, rompen de manera momentánea el cromosoma para poder insertarse (Sorensen, S. *et.al*; 2005). A consecuencia de esta inserción, la maquinaria celular comienza a reproducir la información codificada en el plásmido (Sorensen, S. *et.al*; 2005). Una vez insertado el plásmido en el cromosoma se le denomina *episoma* (Sorensen, S. *et.al*; 2005)

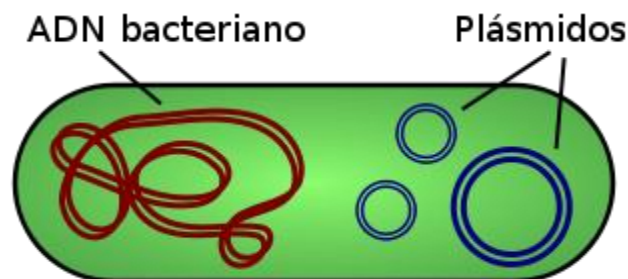


Figura 9. Esquema de ADN plasmídico bacteriano

- **Transposones.**

Los transposones son segmentos de ADN capaces de moverse a lo largo del genoma. Son únicos debido a que tienen la capacidad de trasladarse por sí mismos desde un locus genético a otro. Pueden realizarlo en la misma bacteria o incluso entre bacterias de diferente género (Bryan, L.E. 1982). Cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, se produce una deleción o pérdida de bases. Si el transposón estaba insertado en un gen, puede que éste recupere su función. Por el contrario, si el transposón al cambiar de posición se inserta en un gen se producirá una gran adición de ácidos nucleicos y en consecuencia el gen perderá su función (Bryan, L.E. 1982). Es importante mencionar que no se ha encontrado una relación clara entre la secuencia del donador (lugar en el que está el transposón) y la secuencia del aceptor (lugar al que se incorpora el transposón) (Galun, E. 2003). Los transposones, pueden llegar a ser simples o compuestos. Los transposones, juegan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a antibióticos debido a que regularmente contienen secuencias de genes llamadas integrones que pueden mediar la resistencia a antibióticos (Pinilla, G. *et.al*; 2006).

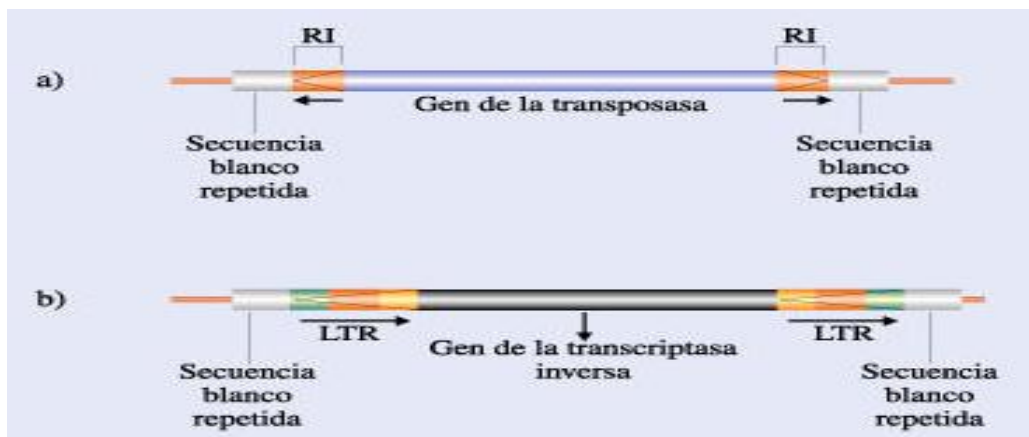


Figura 10. Esquema de transposones. a) Transposón simple
b) Transposón compuesto

- **Integrones.**

Se puede definir a un integrón como un elemento genético dinámico. Al hablar de dinamismo, nos referimos a la capacidad de los genes estructurales para escindirse en forma de círculos de ADN autónomo también conocidos como *cassettes de genes*. Además, nos referimos a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en diferentes integrones a través de un mecanismo de recombinación sitio-específica. Los genes estructurales presentes en los integrones son en su mayoría genes de resistencia a antibióticos.

Los integrones están compuestos de tres elementos clave para lograr la obtención de genes exógenos. El primero, un gen que codifica para una integrasa (*intI*). El segundo, un sitio primario de recombinación (*attI*). El tercero, un promotor (P) (Rowe-Magnus. *et.al*; 1999).

Estructuralmente, existen tres regiones importantes. Una región constante 5' la cual contiene el gen de la integrasa y dos marcos de lectura abierta; una región central variable la cual contiene los genes estructurales del integrón y, por último, una región constante 3' en la que se encuentran los genes de resistencia y dos marcos de lectura abierta.

La integrasa es una recombinasa sitio-específica que permite recombinar unidades discretas de ADN (*cassettes de genes*), permitiendo la expresión de las proteínas codificadas en el *cassette*. Usualmente, los *cassettes* solo contienen un gen asociado a una secuencia de recombinación sitio-específica conocido como elemento de 59 pb o *attC*. La integración de un *cassette*, involucra una recombinación sitio- específica mediada por la integrasa entre el sitio *attI* del integrón y el sitio *attC* (Hall, R. *et.al*; 1995).

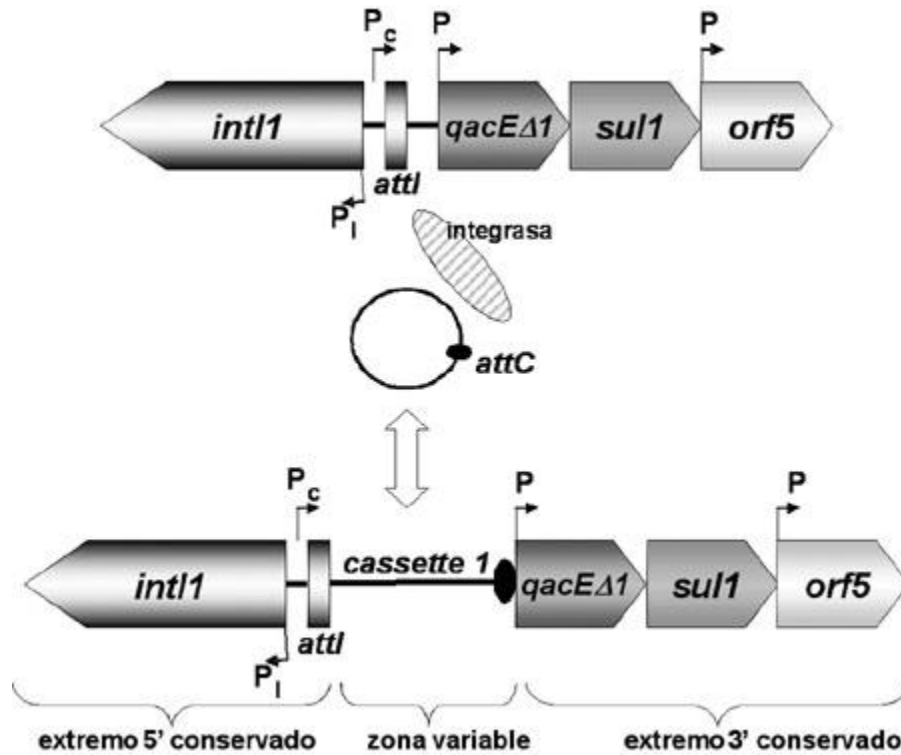


Figura 11. Esquema de integrones

Actualmente, se conocen cuatro clases de integrones que difieren primordialmente en la secuencia del gen de la integrasa. El integrón de clase 1, ha sido el más estudiado debido a su alto índice de presencia en bacterias multiresistentes a antibióticos. Generalmente, está asociado al transposón *Tn21*. Contiene una secuencia 3' conservada en la cual se encuentran los genes de resistencia *qacEΔ1* y *sul1* (Roe, M.T. *et.al*; 2003).

Bombas de expulsión como mecanismo de resistencia.

Durante mucho tiempo, la multiresistencia a antibióticos ha sido asociada a los diversos elementos genéticos antes mencionados, pero la observación de que las bacterias son capaces de tolerar un número muy elevado de antibióticos cuestiona si estos elementos presentes en las bacterias multiresistentes son los únicos mecanismos para la generación de multiresistencia a antibióticos.

Actualmente se ha observado que las bombas de expulsión juegan un papel importante en la multiresistencia a antibióticos de manera intrínseca (Nikaido, H. 2009). Hasta hace algunos años se pensaba que la resistencia a antibióticos estaba solamente asociada a la ineficacia de los mismos al tratar de penetrar la pared celular y realizar su acción.

Sin embargo, existen estudios que demuestran la efectividad de los antibióticos para penetrar a los microorganismos. Se observó que el problema es causado debido a que el fármaco es expulsado fuera del espacio intracelular impidiendo su unión al sitio diana por acción de las bombas de expulsión (Nikaido, H. 2009). Las bombas de expulsión que se han estudiado relacionadas con la generación del fenotipo de resistencia son cinco.

1. RND (Resistance-Nodulation Cell Division)
2. MFS (Major Facilitator Superfamily)
3. SMR (Staphylococcal/small Multidrug Resistance)
4. ABC (ATP-Binding Cassette)
5. MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion).

Las familias RND, SMR y MFS, utilizan fuerza protón motriz para realizar su acción. Mientras que MATE es impulsada por un sistema antiporte. Las bombas de expulsión más importantes debido al número de grupos de antibióticos que pueden expulsar son las familias MFS y RND (Nikaido, H. 2009)

- **Bomba de expulsión MFS**

Esta superfamilia comprende un gran número de subfamilias. Los transportadores de azúcares y fármacos son los más numerosos. Los transportadores MFS están compuestos típicamente de 400 residuos de aminoácidos, aproximadamente. Están arreglados en 12 hélices alfa intermembranales con un largo bucle citoplasmático entre las hélices 6 y 7 (Nikaido, H. 2009). El origen más probable de esta familia es por duplicación genética. Existe un pequeño número de transportadores que pudieran contener 14 hélices en vez de 12. Sin embargo, tienden a formar un bucle citoplasmático de menor medida (Borges-Walmsley. *et.al*; 2003).

- **Bombas de expulsión RND**

Estos transportadores se caracterizan por tener un mayor tamaño que los transportadores MFS. Se componen de 1000 residuos de aminoácidos, aproximadamente. De manera similar a los transportadores MFS, adoptan estructuras de 12 hélices alfa intermembranales. A diferencia de los MFS, estos poseen dos largos dominios extracitoplasmáticos entre las hélices 1 y 2, y 7 y 8, respectivamente. Estos dominios juegan un papel importante en el reconocimiento de fármacos (Borges-Walmsley. *et.al*; 2003).

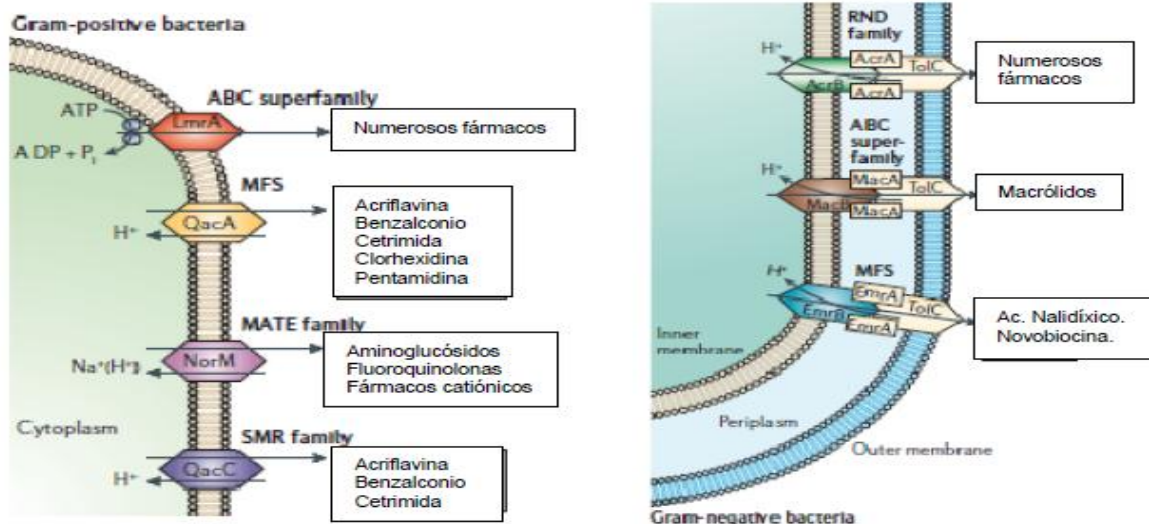


Figura 12. Esquemas de bombas de expulsión.

El microbioma humano y la resistencia a antibióticos

En la actualidad, la presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos ha sido asociada con ambientes intrahospitalarios en donde el uso intensivo de antibióticos puede generar resistencia a los mismos mediante los mecanismos ya mencionados. Además, también se han hallado en alimentos para consumo humano como carne de pollo, carne de res, productos lácteos, etc (Watson, D.H. *et.al*; 2001). Esto último, ha sido asociado al uso indiscriminado de antibióticos como factores de crecimiento en la industria agropecuaria (Watson, D.H. *et.al*; 2001).

Por estas razones, se ha vuelto de suma importancia a nivel mundial estudiar no solo los mecanismos de resistencia sino los nichos en donde podrían encontrarse este tipo de microorganismos. Para empezar a entender el ambiente o ambientes mediante los cuales las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos, se han caracterizado genes de resistencia de células estomacales provenientes de personas sanas (Morten, O. *et.al*; 2009).

Al realizar este estudio en un nicho como el estomago considerado inocuo, se han encontrado miles de bacterias portadoras de genes de resistencia (Morten, O. *et.al*; 2009). Estos microorganismos pueden ser reservorios genéticos y mediante la transferencia horizontal de genes, representan un serio problema de salud pública a nivel nacional y mundial. Por consiguiente, ha nacido un gran interés en estudiar diferentes nichos que puedan albergar bacterias clínicamente importantes que sean portadoras de genes de resistencia (Morten, O. *et.al*; 2009).

Con la finalidad de comenzar a elucidar este tema, se ha aislado y caracterizado DNA de las bacterias que viven sobre la piel humana con el objetivo de secuenciar el genoma de cada uno de los filos presentes en la piel humana. Al conjunto de genomas de los microorganismos se le conoce como “microbioma humano” (Turnbaugh, P.J. *et.al*; 2007).

Uno de los laboratorios con mayor presencia en este proyecto global es el National Institute of Health Roadmap for Medical Research en Estados Unidos. También, se está trabajando de manera conjunta con diversos laboratorios en Europa y Asia (Turnbaugh, P.J. *et.al*; 2007).

Hasta ahora, se han logrado identificar 13 filos de bacterias asociadas a la piel humana las cuales son: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-termus*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* y *Candidate* TM7 y SR1. De este grupo, el de mayor interés son los primeros cuatro debido a su alto porcentaje de presencia en la piel (Dethlefsen, L. *et.al*; 2007). El estudio del microbioma sobre la piel en los últimos años ha dejado clara la existencia de un proceso simbiótico entre las bacterias y la piel humana (Dethlefsen, L. *et.al*; 2007).

Las bacterias multiresistentes a antibióticos representan un serio problema para la salud pública por lo difícil de su tratamiento y por poner frecuentemente en riesgo la vida de los pacientes infectados. El estudio de la biogeografía de las comunidades bacterianas sobre la piel es crítico para establecer parámetros de salud en diferentes enfermedades (Costello. K.C. *et.al.*, 2009). La piel constituye un ecosistema extraordinariamente complejo el cual se ha dividido en tres zonas: 1) Grasosa, 2) Húmeda, 3) Seca (Costello. K.C. *et.al.*, 2009). Se ha observado que las diferentes comunidades bacterianas caracterizadas hasta el momento tienden a tener un patrón biogeográfico predecible (Costello. K.C. *et.al.*, 2009).

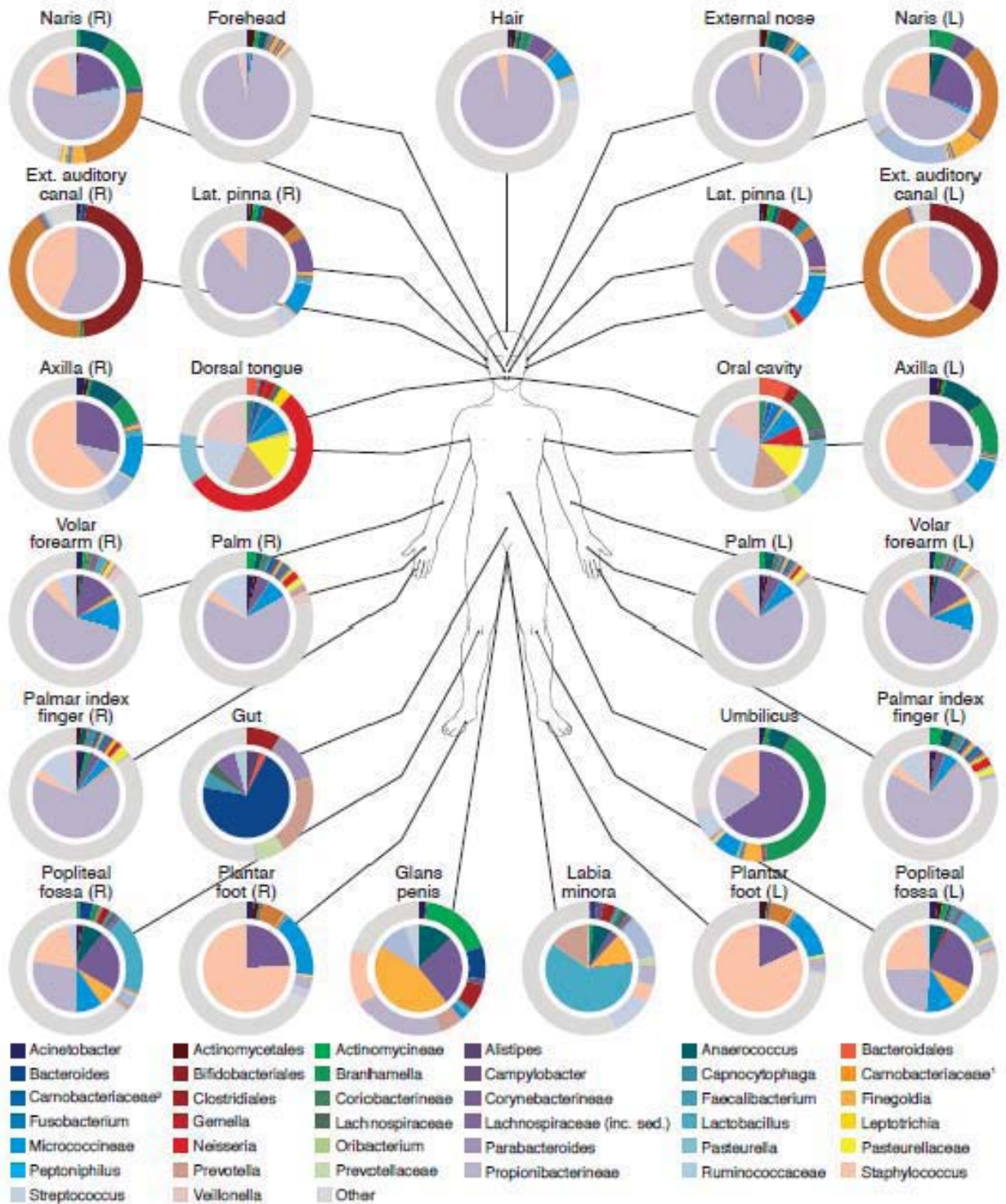


Figura 13. Distribución de las distintas filogenias bacterianas en las diferentes zonas (húmeda, grasosa y seca) (Dethlefsen, L. et al; 2007).

Dentro del microambiente grasoso se incluyen zonas de la piel como el canal auditivo externo, pliegue alar y el occipucio, etc. Dentro del microambiente húmedo se encuentran el ombligo, espacio interdigital de manos y pies, la ingle y el pliegue poplíteo, etc. Por último, el microambiente seco está compuesto por zonas como las palmas de las manos y los antebrazos, etc.

Como ya se ha mencionado, los filos predominantes sobre la piel son *Firmicutes* y *Proteobacteria*. El primero, puede incluir bacterias Gram positivas como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*; y el segundo, bacterias Gram negativas como *Klebsiella sp.*, y *Eikenella sp.* La presencia de estas bacterias es de clara importancia en salud pública. Una característica peculiar acerca de los microambientes sobre la piel es que las poblaciones de microorganismos pueden estar en mayor o menor presencia con respecto al género del individuo y también a si es diestro ó no. (Fierer, N. *et.al.*, 2008). El actual crecimiento en número de bacterias multiresistentes a antibióticos obliga, por lo tanto, a considerar estudiar otros nichos como la piel, órgano considerado inocuo *a priori*, como posible reservorio de genes de resistencia.

Objetivo General

- Buscar bacterias multiresistentes a antibióticos en piel sana de individuos jóvenes asintomáticos.

Objetivos particulares

- Determinar la multiresistencia a antibióticos mediante el método de Bauer-Kirby (antibiograma).
- A través de la técnica de *replica plating* de Lederberg, reportar el número relativo de cepas resistentes a antibióticos en diferentes zonas de la piel humana.
- Determinar la presencia de plásmidos e integrones como posibles mecanismos de resistencia.
- Evaluar la sobre-expresión de bombas de expulsión como posible mecanismo de multiresistencia.

Hipótesis.

Dada la amplia distribución de bacterias resistentes y multiresistentes a antibióticos, es posible que una fracción de las bacterias normalmente presentes en la piel sana de individuos jóvenes que no han recibido recientemente tratamiento con antibióticos presente resistencia a este tipo de fármacos.

Metodología

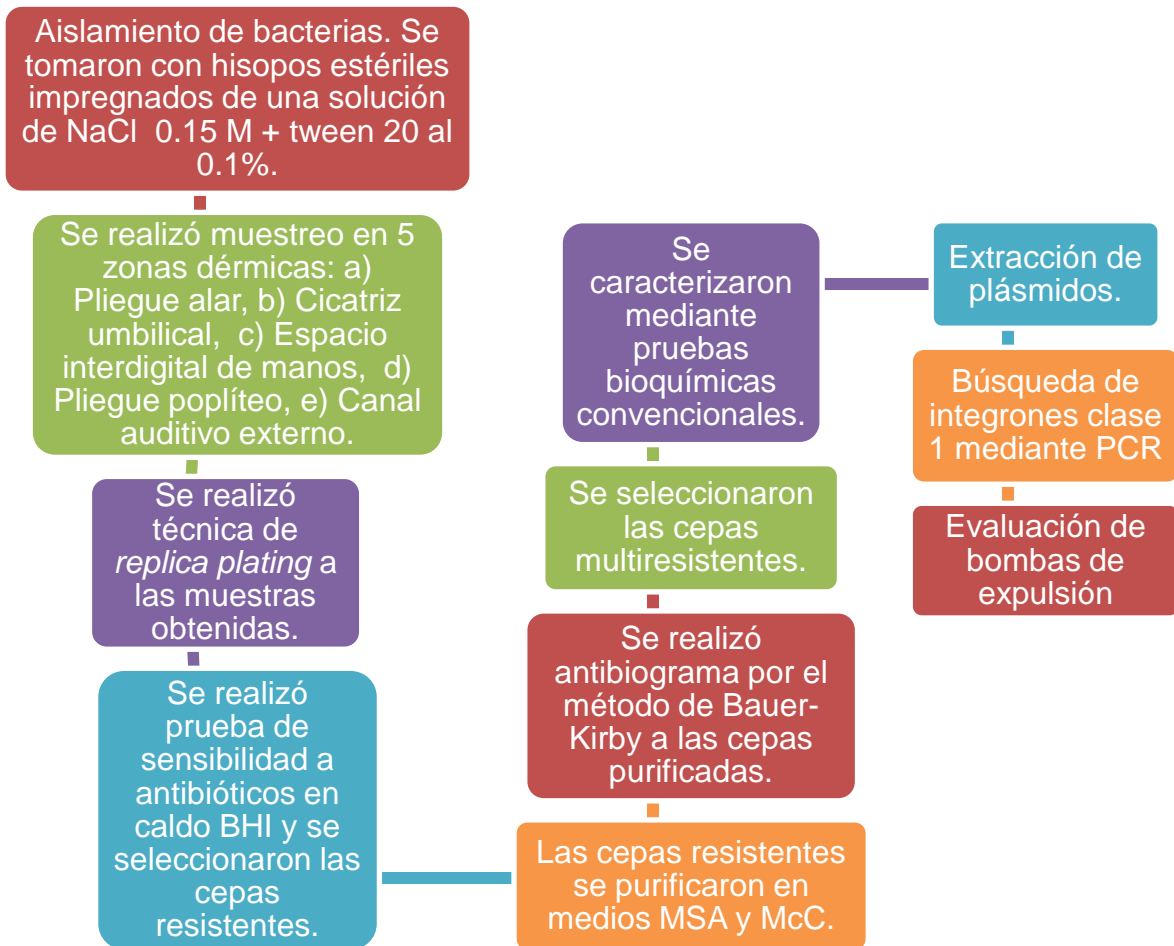


Diagrama 1. Diseño experimental.

a) Toma de muestra

Las muestras se tomaron con hisopos estériles impregnados con una solución de NaCl 0.15M y Tween 20 al 0.1%. Se realizó la toma de muestra de 24 voluntarios jóvenes asintomáticos en cinco zonas microecológicas diferentes de la piel, las cuales fueron: (1) Pliegue alar (zona grasosa), (2) Cicatriz umbilical (zona húmeda), (3) Espacio interdigital de mano (zona húmeda), (4) Pliegue poplíteo (zona húmeda) y (5) Canal auditivo (zona grasosa).

b) Selección preliminar de cepas resistentes

Las muestras obtenidas se crecieron en caldo BHI más antibióticos con la concentración mínima inhibitoria (ampicilina, gentamicina y ceftriaxona) para determinar cuáles cepas mostraban resistencia.

c) Purificación y caracterización de cepas

Las muestras que presentaron resistencia en esta primera etapa se purificaron en medios diferenciales agar sal manitol (MSA) y agar Mc Conkey (McC). En la purificación se obtuvieron bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para la determinación de género (Ver Anexo 1)

d) Determinación de cepas multiresistentes

Al conjunto de cepas puras se les realizó antibiograma por el método estandarizado de Bauer-Kirby (Liberman, D. 1975) para determinar la resistencia a antibióticos.

e) Estudio de la población relativa de cepas multiresistentes que habitan la piel en las distintas zonas de muestreo.

Se realizó un estudio porcentual de las cepas multiresistentes que habitan la piel en las distintas zonas de muestreo. Estas pruebas se realizaron mediante la técnica de *replica plating* de Lederberg (Lederberg, J. 1952).

f) Aislamiento de DNA plasmídico.

Se realizó aislamiento de plásmido mediante lisis por detergente y se corrió el gel de electroforesis para observar la presencia o ausencia de plásmidos (Palumbi. *et.al*; 1991).

g) Amplificación del integrón clase 1

Se realizó PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para observar la presencia o ausencia del integrón clase 1 (Hall, R. *et.al*; 1995). Las secuencias de primers utilizados fueron: **INT-F** 5' GGCATCCAAGCAGCAAGC 3' y **sul1-B** 5' GCAAGGCGGAAACCCGCGCC 3' (Ver anexo 2)

h) Evaluación de sobre expresión de bombas de expulsión por métodos espectrofluorométricos.

Se tomaron las cepas multiresistentes de 24 horas y se ajustaron a 0.7 de densidad óptica a 660 nm. Se les adicionó bromuro de etidio y se incubaron por 20 minutos. Se realizó una segunda dilución para ajustar las cepas a una densidad óptica de 0.4. Se centrifugó y decantó el sobrenadante y, posteriormente se resuspendió el pellet en medio fresco. Se tomaron las lecturas utilizando un espectrofluorómetro (Hitachi) el cual se ajustó a una onda de excitación de 540nm y una onda de emisión de 545nm. La evaluación de las muestras se realizó por duplicado. Se utilizó como control negativo para bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y para Gram negativas *Escherichia coli* DH5 α ATCC 53868; ambas cepas son totalmente sensibles a todos los antibióticos (Kaatz, G.W. *et.al*; 2000).

Resultados y discusión.

Se tomaron 24 muestras de voluntarios asintomáticos considerando diferentes criterios de inclusión como: edad, género, ocupación, etc. (Cuadro 1).

	Número de voluntarios	%	Promedio de edad	% Estudiantes	% Otro	% Afines al área de salud	% No afines al área de salud
Mujeres	16	67	24±3	87.5	12.5	25	75
Hombres	8	33	20±2	100	---	37.5	62.5

Cuadro 1. Características de los voluntarios.

Las muestras obtenidas se sembraron en caldo BHI mas antibióticos (ampicilina, gentamicina y ceftriaxona), a fin de determinar aquellos microorganismos resistentes a al menos un antibiótico. Posteriormente, se purificaron y caracterizaron mediante métodos bioquímicos. El resultado indicó que el 87.4% de la población son bacterias Gram positivas que pertenecen al filo Firmicutes, en la cual se encuentran géneros como *Staphylococcus sp.*, y *Streptococcus sp.* El 12.60% son bacterias Gram negativas del filo Proteobacteria en la que destacaron los géneros *Klebsiella sp.*, y *Eikenella sp.*, (Cuadros 2 y 3). Se realizaron antibiogramas por el método de Bauer-Kirby a un total de 127 cepas purificadas. Los resultados mostraron que el 34.23% de las bacterias Gram positivas y el 12.5% de las bacterias Gram negativas son resistentes a 12 antibióticos de manera simultánea. El 80% de la población bacteriana mostró resistencia a no menos de 5 antibióticos, lo cual nos indica una alta incidencia de bacterias multiresistentes a antibióticos presentes en un ambiente considerado inocuo, extremadamente ubicuo y de acceso inmediato (Figura 14).

Es importante aclarar que la mayor parte de la población de bacterias aisladas de piel humana son Gram positivas mientras que el número de bacterias Gram negativas es aparentemente menor (Figura 15).

<i>Grupo</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Bacterias Gram positivas	87.40
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.55
<i>Staphylococcus sp</i>	34.64
<i>Streptococcus</i>	25.20
Bacterias Gram negativas	12.60
<i>Klebsiella sp</i>	8.66
<i>Eikenella sp</i>	3.93

Cuadro 2. Géneros de bacterias multiresistentes a antibióticos en piel humana

Clasificación	<i>Eikenella sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
Filo	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Firmicutes
Clase	β -proteobacteria	γ -proteobacteria	Bacilli	Bacilli
Orden	Neisseriales	Enterobacteriales	Bacillales	Lactobacillales
Familia	Neisseriaceae	Enterobacteriaceae	Staphylococcaceae	Streptococcaceae
Género	<i>Eikenella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>

Cuadro 3. Clasificación filogenética de bacterias de piel humana multiresistentes a antibióticos.

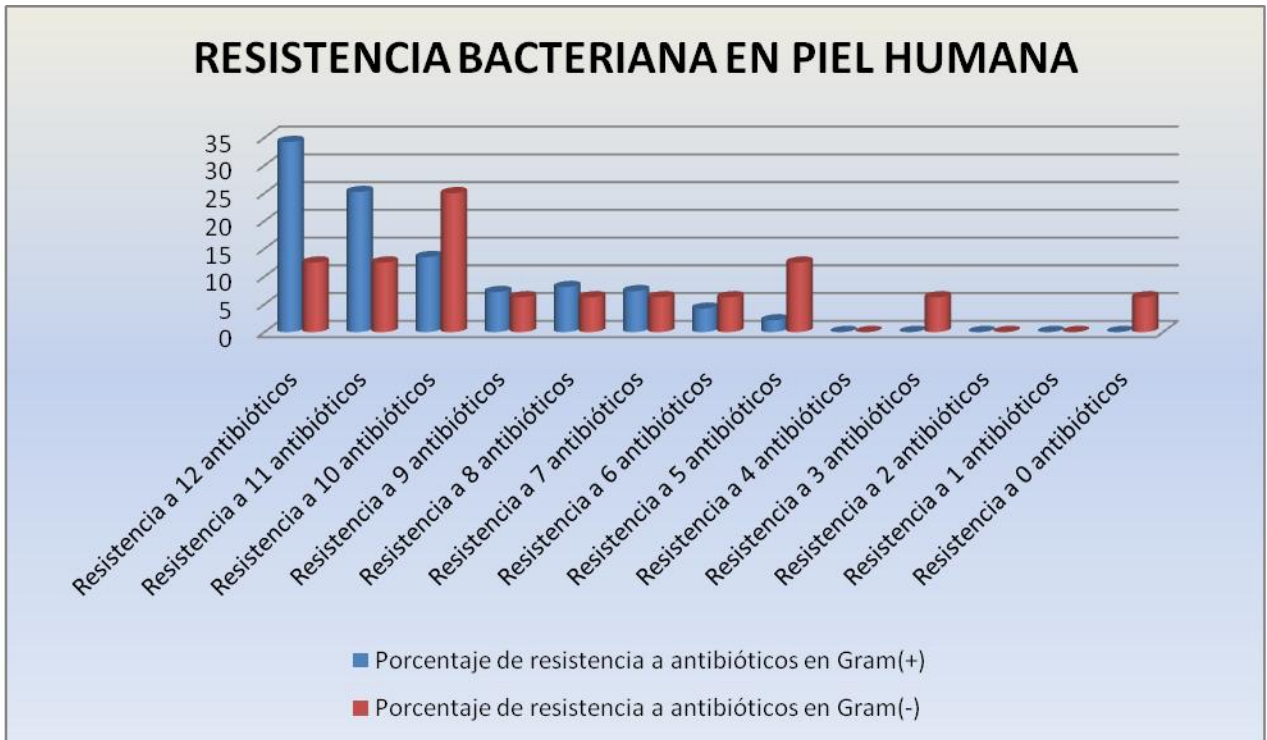


Figura 14. Porcentaje de resistencia de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Los antibióticos utilizados fueron: AM, CF, CFX, CFP, CLM, DC, E, GE, PE, TE, SXT, VA, AK, CB, CL, NET, NF y NOF. (Ver Abreviaturas, p. iv).

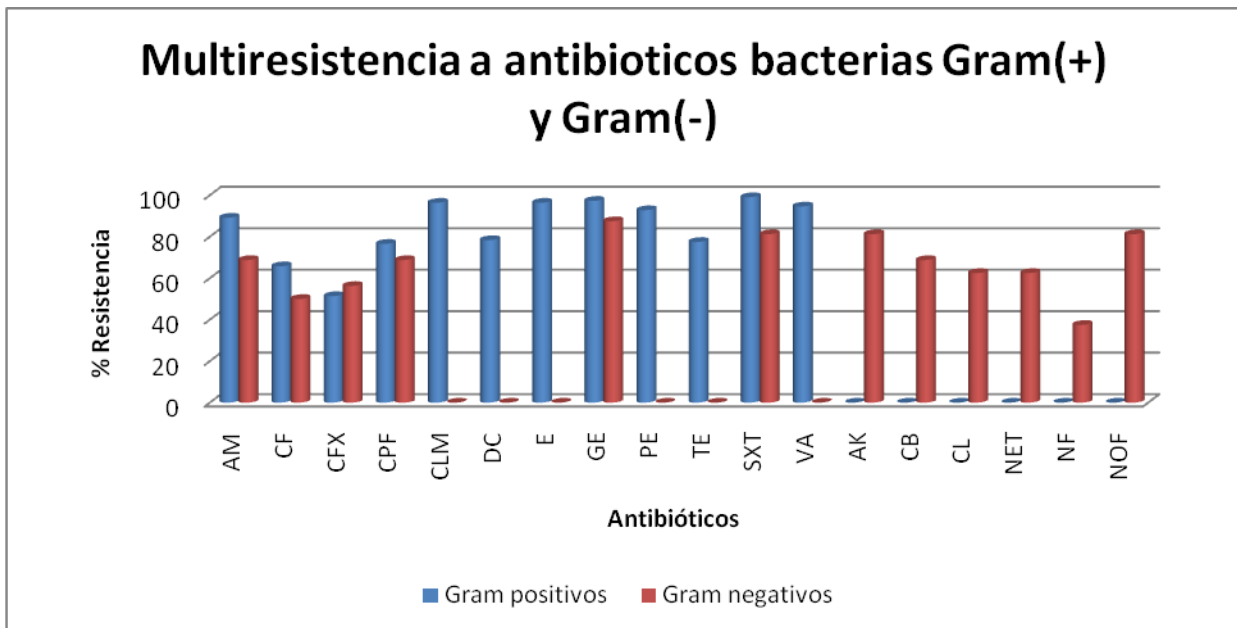


Figura 15. Porcentaje de resistencia en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. (Ver Abreviaturas, p. iv).

Además, al realizar el estudio comparativo de los antibióticos se puede observar que tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas más del 50% de la población tiene una frecuencia muy alta de tolerancia a cada uno de los diferentes antibióticos (Figuras 16 y 17)

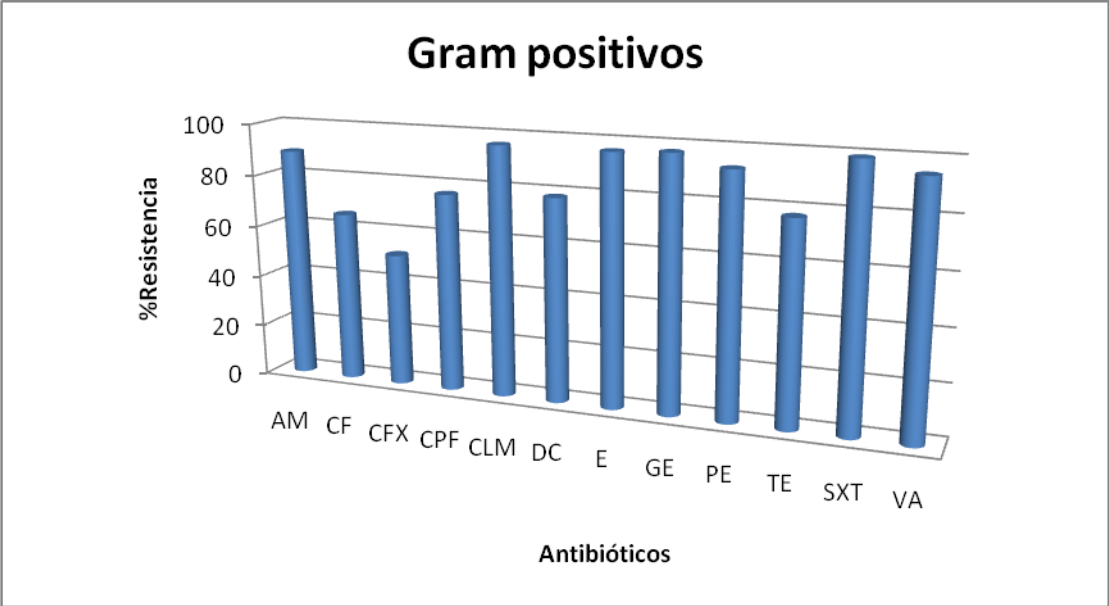


Figura 16. Porcentaje de resistencia a cada uno de los antibióticos en bacterias Gram positivas. (Ver Abreviaturas, p. iv).

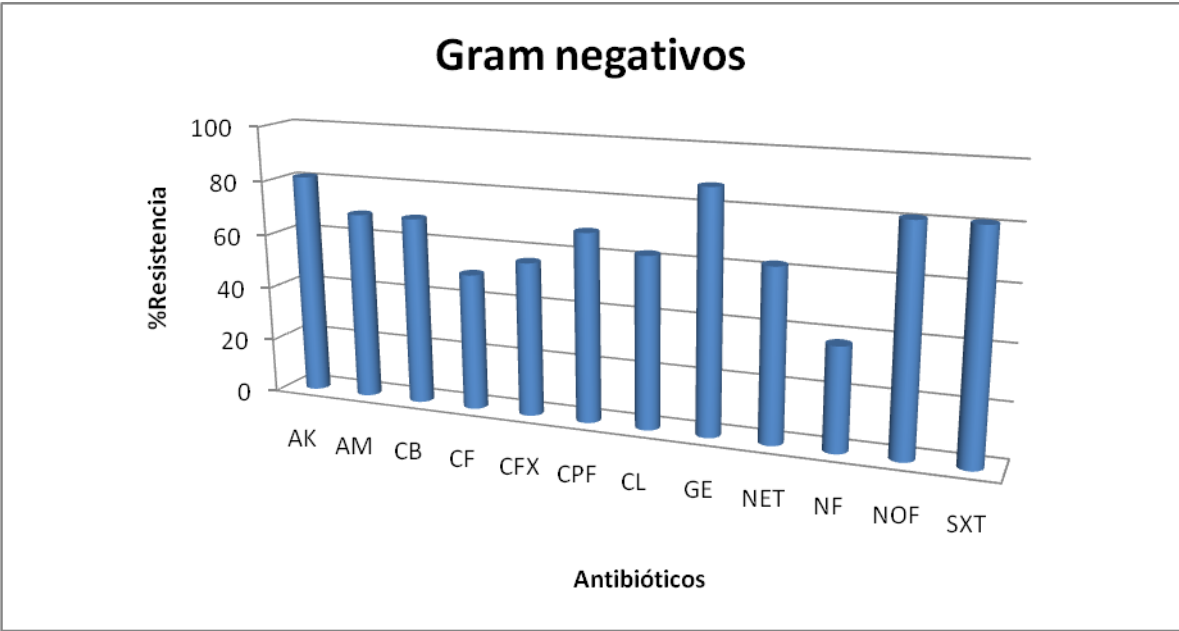


Figura 17. Porcentaje de resistencia a cada uno de los antibióticos en bacterias Gram negativas. (Ver Abreviaturas, p. iv).

Es importante resaltar que el estudio de multiresistencia se realizó utilizando diversos grupos de antibióticos (Cuadro 4), lo cual sugiere la extremadamente variada capacidad de adaptación de los microorganismos frente a diversas sustancias. Además, es importante resaltar que los fármacos disponibles para los tratamientos de infecciones son relativamente pocos.

Antibióticos	Grupo
Ampicilina	Beta- lactámicos
Cefalotina	Cefalosporina de primera generación
Cefotaxima	Cefalosporina de tercera generación
Carbenicilina	Carboxipenicilinas
Ciprofloxacino	Fluoroquinolonas
Cloranfenicol	Anfenicoles
Gentamicina	Aminoglucósidos
Tetraciclina	Tetraciclinas
Trimetropim/sulfametoxazol	Combinación de sulfonamidas y diamino - pirimidinas
Vancomicina	Glucopéptidos
Netilmicina	Aminoglucósidos
Nitrofurantoína	Nitrofuranos
Clindamicina	Lincosaminas
Eritromicina	Macrólidos

Cuadro 4. Clasificación farmacológica de los antibióticos utilizados en los antibiogramas. (Ver anexo 3 para fórmulas)

Al analizar las tablas anteriores, es claro que los mecanismos de resistencia presentes en estas bacterias son muy complejos, y que probablemente involucran diversos mecanismos como plásmidos e integrones y que mecanismos como las bombas de expulsión también podrían estar presentes.

Otra parte importante de esta investigación fue estudiar la distribución de las cepas multiresistentes a antibióticos en las distintas zonas microecológicas de la piel. Los datos mostraron que sin importar la edad, género, ocupación o zona de la piel, más del 50% de la población bacteriana es resistente a al menos tres antibióticos de manera simultánea (Figura 18).

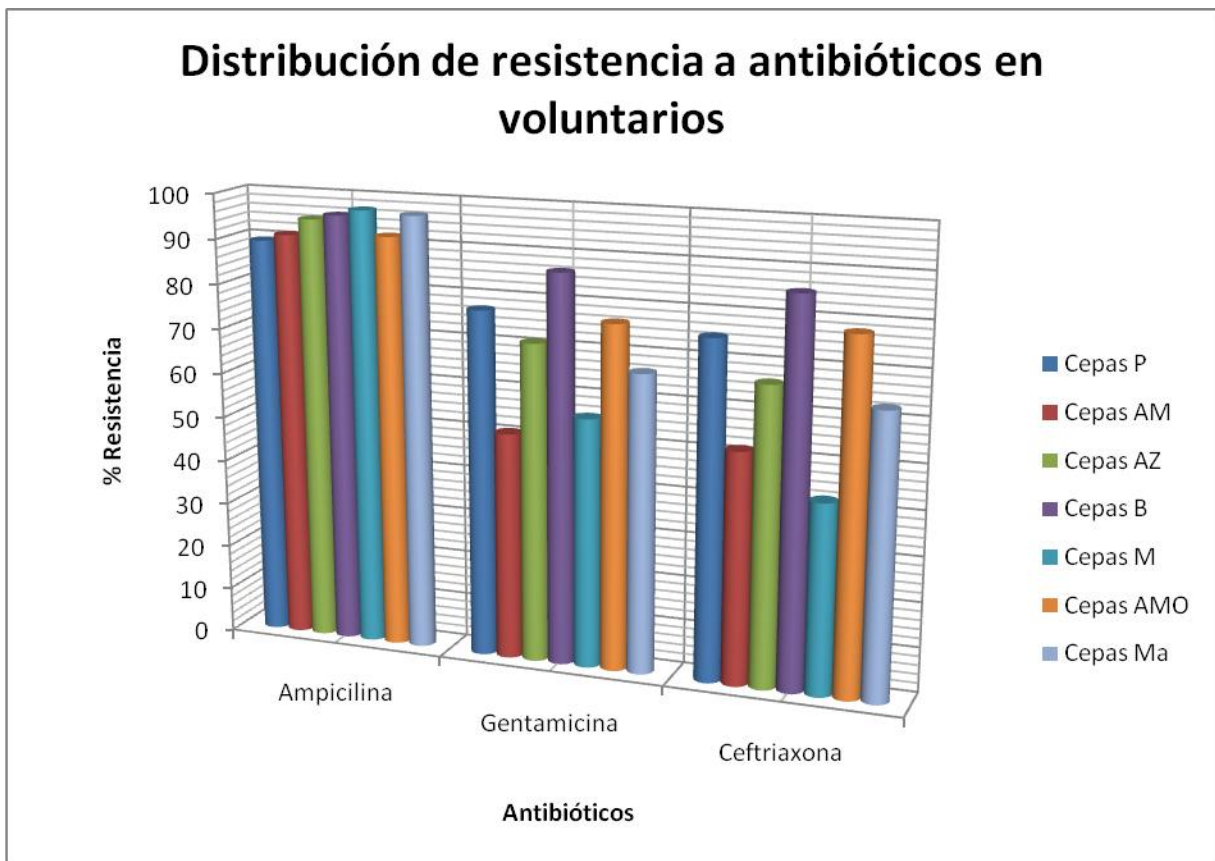


Figura 18. Porcentaje de distribución de multiresistencia a antibióticos en voluntarios.

La figura 19 muestra que más del 30% de la población bacteriana sin importar las características de la toma de muestra son multiresistentes.

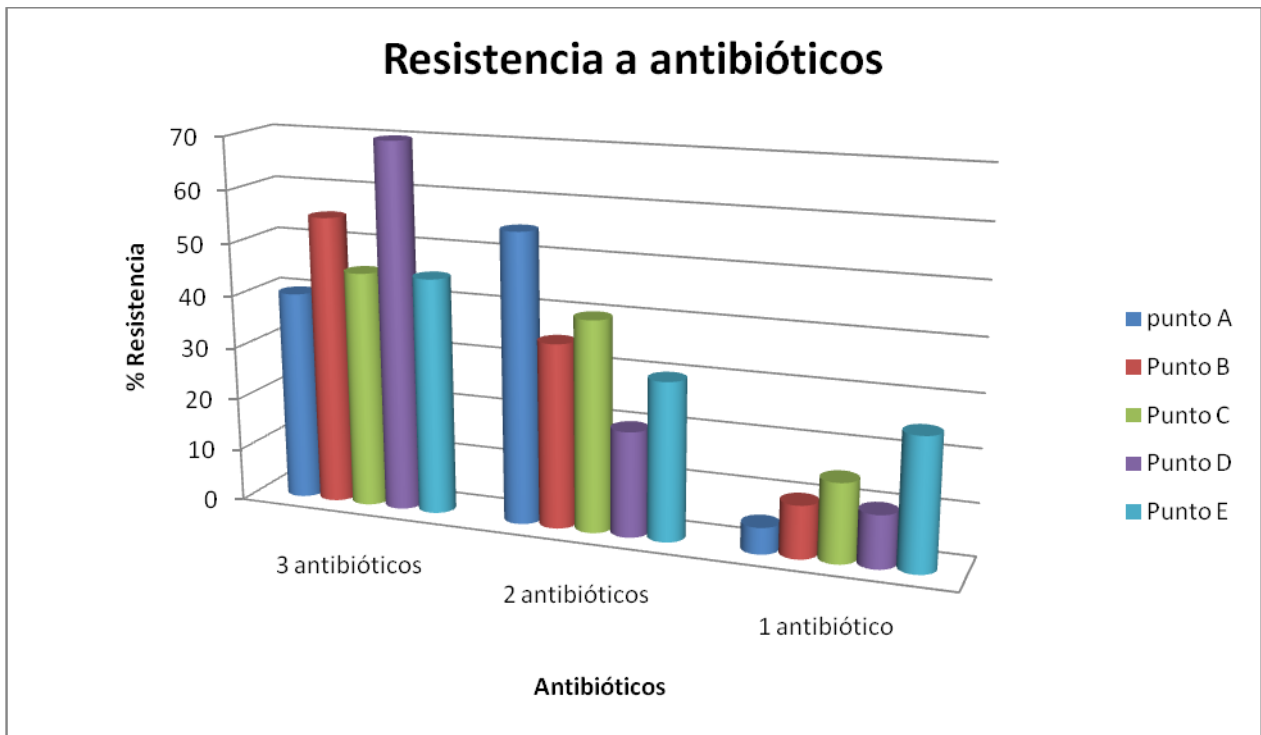


Figura 19. Multiresistencia en los puntos de muestreo en los voluntarios. (Ver Abreviaturas, p. iv).

En las diferentes zonas de muestreo tanto en hombres como en mujeres se reflejó un elevado porcentaje de bacterias multiresistentes; en su mayoría presentaron más del 30% de multiresistencia. Sin embargo, se puede observar que en los puntos B y D (cicatriz umbilical y pliegue poplíteo, respectivamente) existió un mayor porcentaje de resistencia con un valor de 57.14% aproximadamente (figura 20).

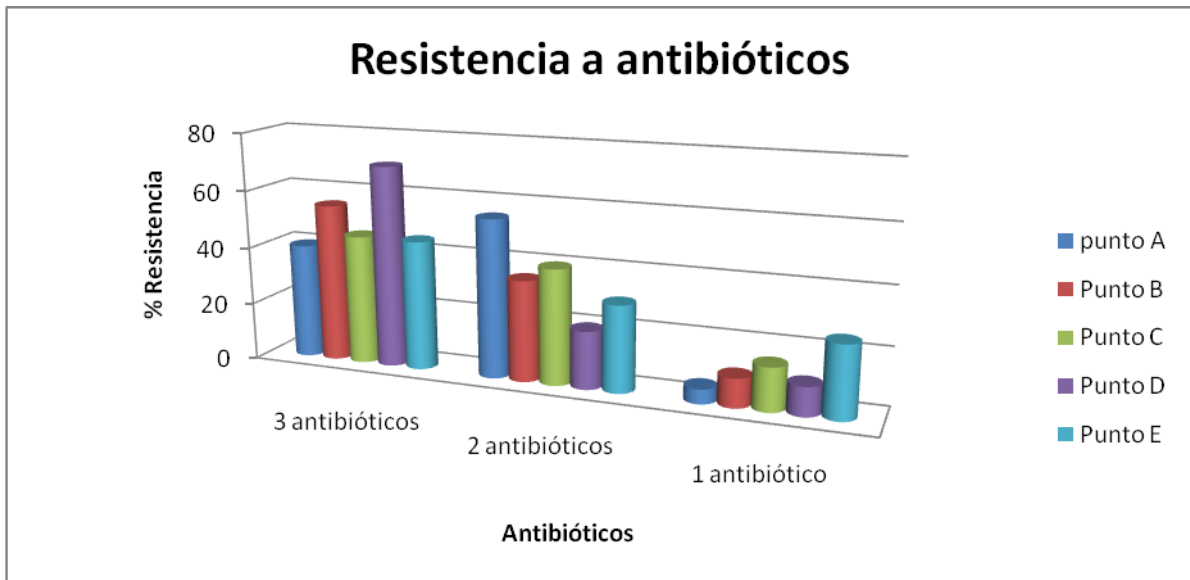


Figura 20. Multiresistencia a antibióticos de la población. (Ver Abreviaturas, p. iv).

La resistencia a antibióticos entre mujeres y hombres en los distintos puntos de muestreo nos indica que son similares y se puede ver que en ambos casos el punto D (pliegue poplíteo) son las que mayor porcentaje de resistencia presentaron (figura 21 y 22).

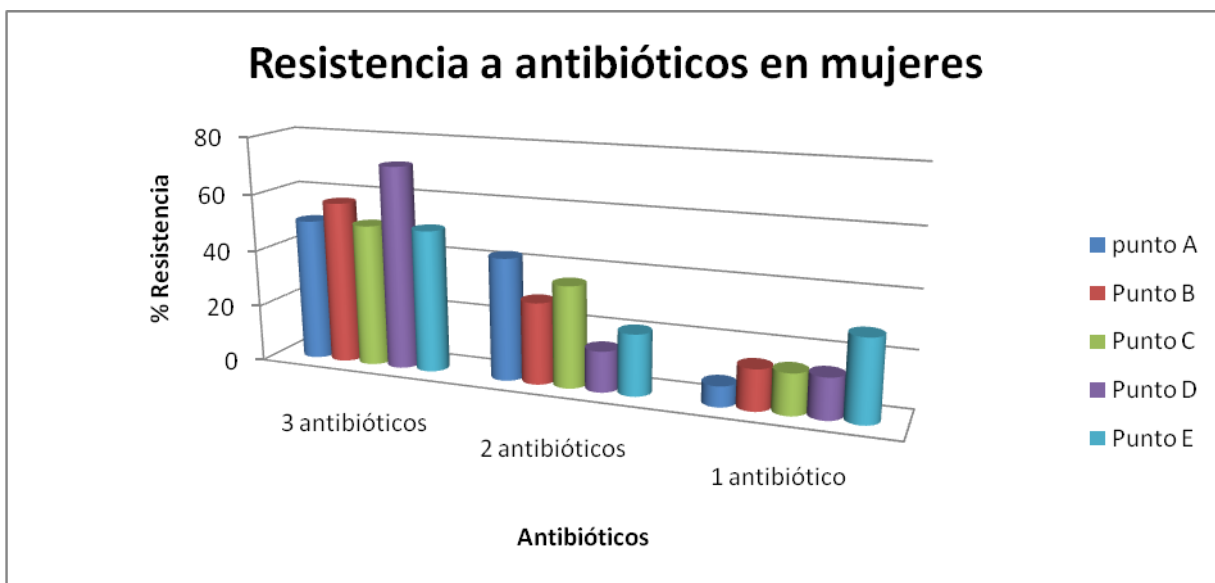


Figura 21. Multiresistencia a antibióticos en mujeres. (Ver Abreviaturas, p. iv).

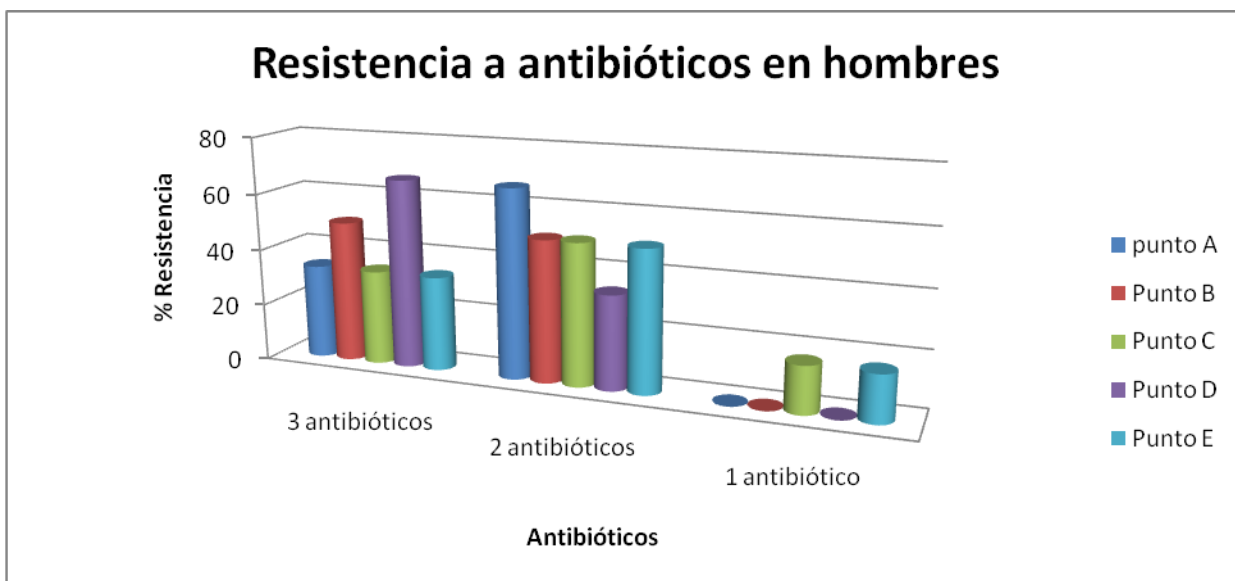


Figura 22. Multiresistencia a antibióticos en hombres. (Ver Abreviaturas, p. iv).

Al observar en qué lado del cuerpo predominan bacterias multiresistentes a antibióticos en hombres y mujeres se observa que en el caso de los hombres la mayor parte de la multiresistencia parece localizarse del lado derecho (Figura 23) mientras que en el caso de las mujeres no existe alguna diferencia aparente, excepto por el punto A (pliegue alar) que fue el de menor porcentaje de resistencia (Figura 24).

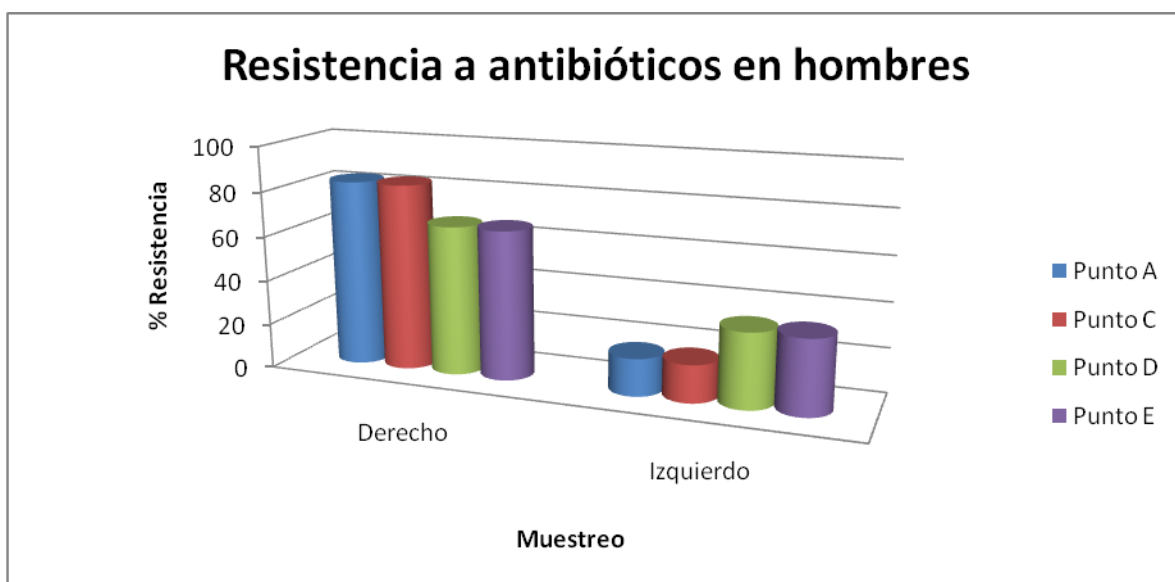


Figura 23. Porcentaje de multiresistencia en ambos lados de muestreo en hombres. (Ver Abreviaturas, p. iv).

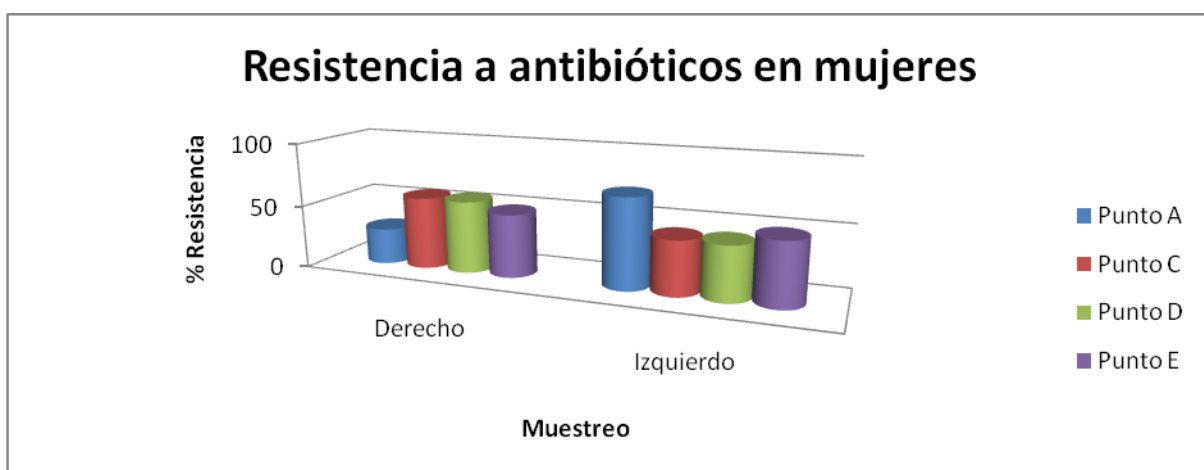


Figura 24. Porcentaje de multiresistencia en ambos lados de muestreo en mujeres. (Ver Abreviaturas, p. iv).

- **Estudios moleculares**

A continuación se realizaron extracciones de ADN plasmídico para determinar la presencia o ausencia de dicho elemento genético en las diferentes cepas multiresistentes a antibióticos de la piel humana. Los resultados obtenidos tras haber realizado el corrimiento electroforético fue que el 100% de las bacterias Gram positivas que se estudiaron portan plásmido mientras que el 75% de las bacterias Gram negativas estudiadas también lo tienen. (Figura 25).

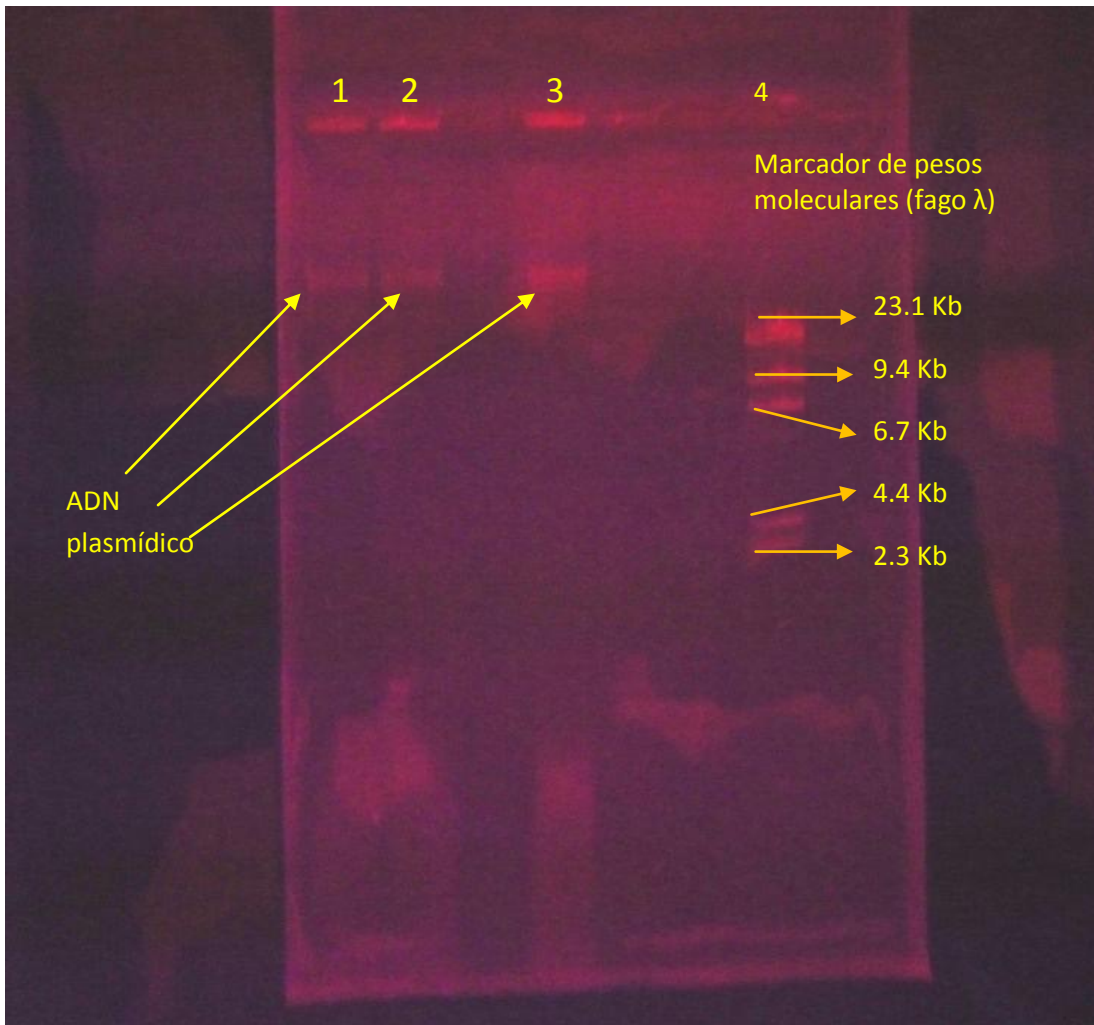


Figura 25. Electroforesis en geles de agarosa. Carril 1,2 y 3 ADN plasmídico de cepas multiresistentes a antibióticos provenientes de piel sana humana. Carril 4, marcador de pesos moleculares fago λ/HIND III.

Posteriormente, se realizó PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para observar la presencia o ausencia del integrón clase 1 en las diferentes cepas multiresistentes a antibióticos de la piel humana. Los resultados obtenidos tras haber realizado el corrimiento electroforético fue que el 80% de las bacterias Gram positivas que se estudiaron portan plásmido mientras que el 65% de las bacterias Gram negativas estudiadas también lo tienen. (Figura 26).

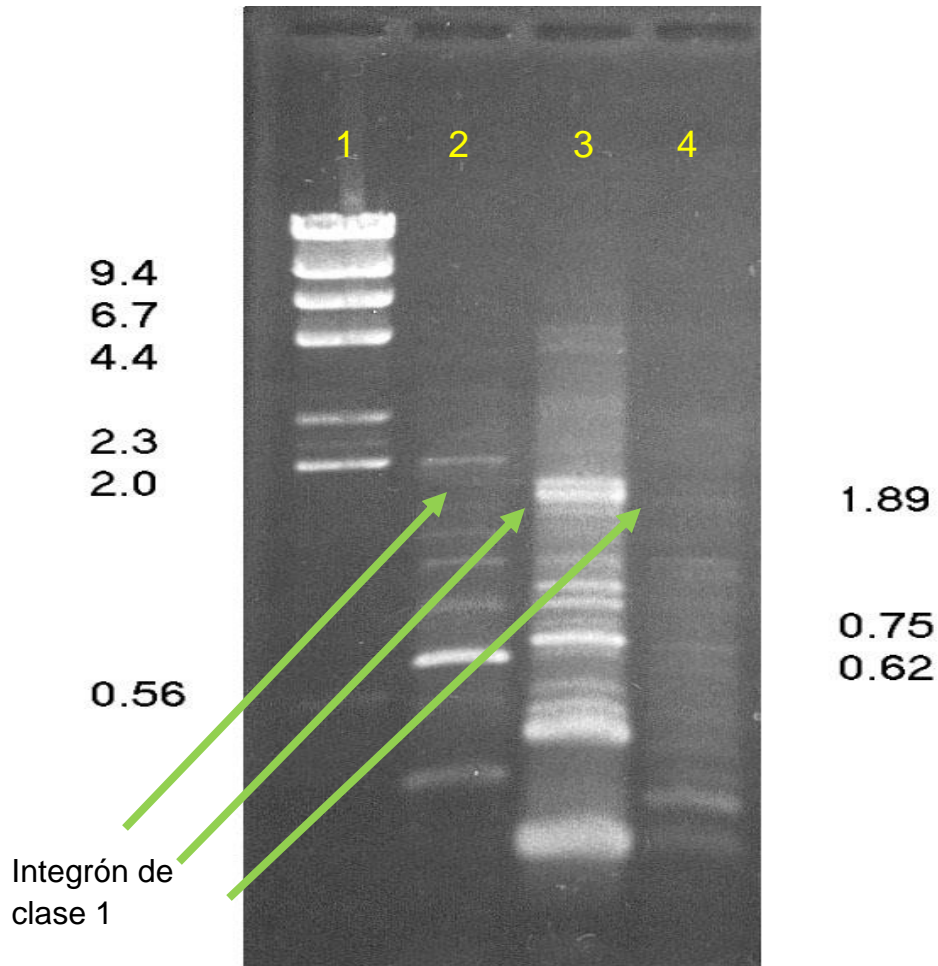


Figura 26. Electroforesis en geles de agarosa. Carril 1, marcador de pesos moleculares fago λ /HIND III. Carril 2, 3, y 4 integrón de clase 1 de cepas multiresistentes a antibióticos provenientes de piel sana humana.

- **Bombas de Expulsión**

Tras haber determinado la presencia de plásmidos e integrones como posibles orígenes de multiresistencia, mediante métodos espectrofluométricos evaluamos la sobre expresión de bombas de expulsión. Se utilizó bromuro de etidio para la evaluación. El bromuro de etidio es un agente intercalante que al estar unido a los ácidos nucleicos presenta una fluorescencia intensa debido a la unión con los ácidos nucleicos presentes en el DNA de las bacterias mientras que al estar en forma libre la fluorescencia es menor (Kaatz, G.W. *et.al*; 2000). Se colocó primero el control negativo (en el caso de las bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) observándose que en el 85.71% de las muestras se están sobre expresando las bombas de expulsión (Figura 27) en comparación con el control negativo (al cual se le realizó previamente pruebas de sensibilidad a antibióticos para corroborar su susceptibilidad a los mismos).

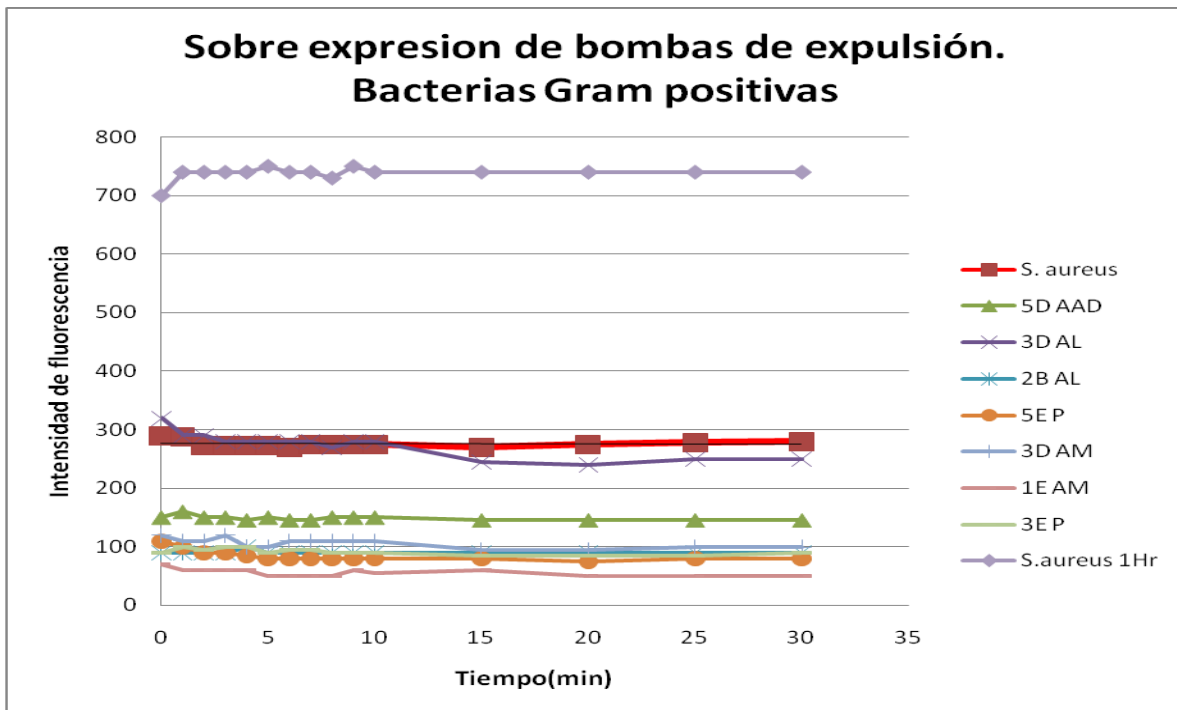


Figura 27. Expulsión de bromuro de etidio. Cepas de estudio: 5D AAD, 3D AL, 2B AL, 5E P, 3D AM, 1E AM, 3E P. Control negativo: *S.aureus*. A este último se le evaluó una hora después. Los resultados están por duplicado.

Para el caso de las bacterias Gram negativas se utilizó como control negativo *Escherichia coli* DH5 α ATCC 53868 sensible a todos los antibióticos. Los resultados mostraron que el 100% de las bacterias están sobre expresando las bombas de expulsión (Figura 28) en comparación con el control negativo.

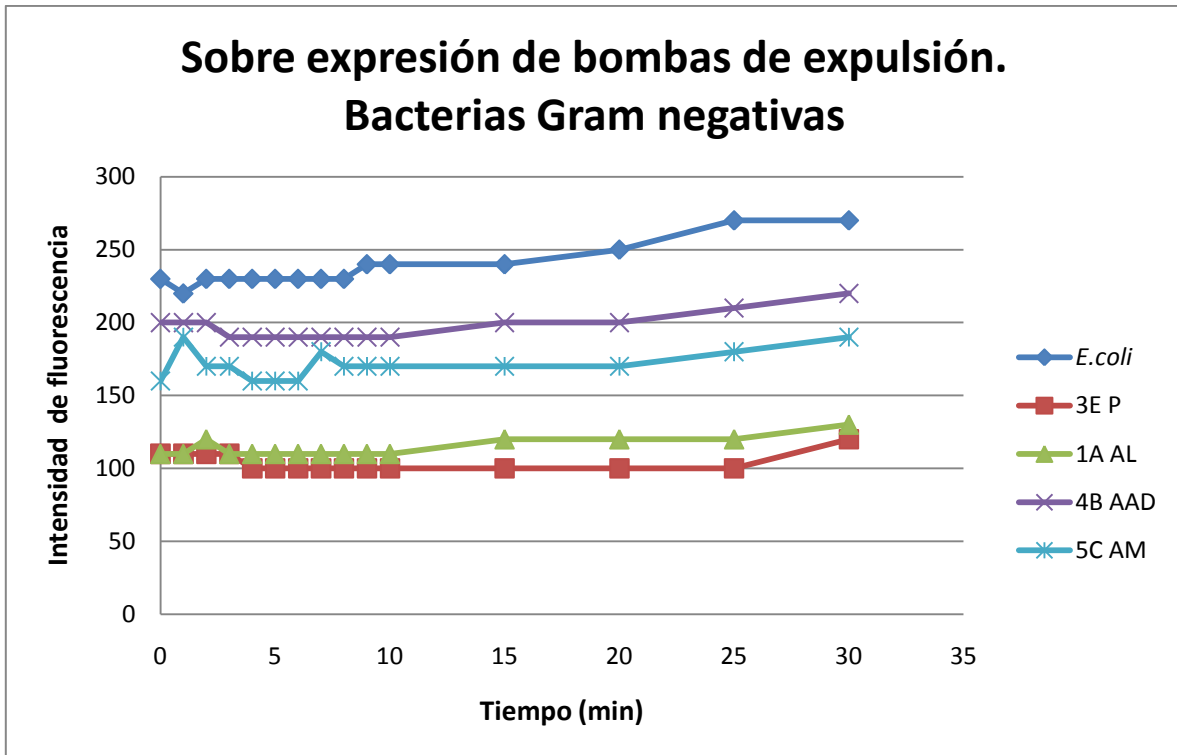


Figura 28. Expulsión de bromuro de etidio. Control negativo: *E. coli*. Los resultados están por duplicado.

Los resultados indican claramente que tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas están sobre expresando bombas de expulsión. Es importante recalcar que el tiempo de exposición al bromuro de etidio durante el experimento es importante para determinar de manera precisa la sobre expresión. Como se observa en la gráfica 1, tras haber pasado una hora aparentemente la bomba deja poco a poco de funcionar y la intensidad de la fluorescencia es mayor. Esto se debe tomar en cuenta ya que podría dar falsos negativos.

Conclusiones.

Se logró aislar y caracterizar bacterias multiresistentes a antibióticos de piel sana en individuos jóvenes asintomáticos. Asimismo, se encontró que las bacterias aisladas de piel pertenecen a los géneros *Staphylococcus sp*; *Streptococcus sp*; *Eikenella sp.* y *Klebsiella sp.* Por último, se encontró que en su mayoría, las bacterias son portadoras de plásmidos e integrones y sobre expresan bombas de expulsión; todos mecanismos íntimamente ligados en el fenotipo de multiresistencia.

Perspectivas

- Evaluar si la sobre expresión de bombas de expulsión presentes en bacterias multiresistentes a antibióticos se debe a la sobre expresión de sus genes o bien a una amplificación de los mismos.
- Explorar el potencial de diferentes inhibidores de las bombas de expulsión en el posible manejo de las bacterias multiresistentes a antibióticos.
- Explorar algunos de los posibles mecanismos de especificidad a diferentes sustratos, particularmente los antibióticos, que posean las bombas de expulsión.

Anexo 1. Pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas bacterias Gram negativas										
CEPA	SIM	CIT.SIM	KLIGLER	SACAROSA	VP	LIA	UREA	CMRF	OF	BACTERIA
1	H2S=- Mov=+ Ind=-	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	-	-	F	<i>Klebsiella sp</i>
2	H2S=- Mov=+ Ind=-	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	-	AM=+ AC=-	M	+	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
3	H2S=- Mov=+ Ind=+	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	-	AM=+ AC=-	A	-	-	NOF	<i>Eikenella sp</i>
4	H2S=- Mov=+ Ind=+	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	-	AM=+ AC=-	A	-	-	NOF	<i>Eikenella sp</i>
5	H2S=- Mov=+ Ind=-	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
6	H2S=- Mov=- Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	A/M	-	-	F	<i>Klebsiella sp</i>
7	H2S=- Mov=- Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	A	-	+	NOF	<i>Eikenella sp</i>
8	H2S=- Mov=+ Ind=+	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
9	H2S=- Mov=+ Ind=+	-	Glu=+ Lac=- H2S=-	-	AM=+ AC=-	A/M	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>

10	H2S=- Mov=+ Ind=-	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	A	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
11	H2S=- Mov=+ Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	A	-	+	NOF	<i>Eikenella sp</i>
12	H2S=- Mov=- Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
13	H2S=- Mov=+ Ind=+	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	-	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
14	H2S=- Mov=- Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	-	-	-	F	<i>Klebsiella sp</i>
15	H2S=- Mov=- Ind=-	+	Glu=+ Lac=+ H2S=-	+	AM=+ AC=-	M	+	+	F	<i>Klebsiella sp</i>
16	H2S=- Mov=- Ind=-	-	Glu=+ Lac=+ H2S=-	-	AM=+ AC=-	M	+	+	NOF	<i>Eikenella sp</i>

Anexo 2. Secuencia del integrón IN4.

Integrón Clase 1

Integrón IN4 (8.33 kb) en transposón Tn 1696 (13.6 kb) del plásmido R1033 de *Pseudomonas aeruginosa* (U12338)

3721 agcagcggag gggttggatc catcaggcaa cgacgggctg ctgcccggca tcagcgggacg
3781 cagggaggac tttccgcaac cggccgttcg atgcggcacc gatggccttc ggcagggggt
3841 agtgaatccg ccaggattga cttgcgctgc cCTACCTCTC ACTAGTGAGG GCGGCAGCG
3901 CATCAAGCGG TGAGCGCACT CCGGCACCGC CAACTTTCAG CACATGCGTG TAAATCATCG
3961 TCGTAGAGAC GTCGGAATGG CCGAGCAGAT CCTGCACGGT TCGAATGTCTG TAACCGCTGC
4021 GGAGCAAGGC CGTCGCGAAC GAGTGCCGGA GGGTGTGCGG TGTGGCGGGC TTCGTGATGC
4081 CTGCTTGTTT TACGGCACGT TTGAAGGCGC CTGAAAGGT CTGGTCATAC ATGTGATGGC
4141 GACGCACGAC ACCGCTCCGT GGATCGGTCG AATGCGTGTG CTGCGCAAAA ACCCAGAACC
4201 ACGGCCAGGA ATGCCCGGCG CGCGGATACT TCCGCTCAAG GGCCTCGGGA AGCGCAACGC
4261 CGCTGCGGCC CTCGGCCTGG TCCTTCAGCC ACCATGCCCG TGCACGCGAC AGCTGCTCGC
4321 GCAGCGTGGG TGCCAAGCTC TCGGGTAAACA TCAAGGCCCG ATCCTTGGAG CCCTTGCCCT
4381 CCCGCACGAT GATCGTGCCG TGATCGAAAT CCAGATCCTT GACCCGAGT TGCAAACCCT
4441 CACTGATCCG CATGCCCGTT CCATACAGAA GCTGGGCGAA CAAACGATGC TCGCCTTCCA
4501 GAAAACCGAG GATGCGAACC ACTTCATCCG GGGTCAGCAC CACCGCAAG CGCCGCGACG
4561 GCCGAGGTCT TCCGATCTCC TGAAGCCAGG GCAGATCCGT GCACAGCACC TTGCCGTAGA
4621 AGAACAGCAA GGCCGCAAT GCCTGACGAT GCGTGGAGAC CGAAACCTTG CGCTCGTTTCG
4681 CCAGCCAGGA CAGAAATGCC TCGACTTCGC TGCTGCCCAA GGTTGCCGGG TGACGCACAC
4741 CGTGGAAACG GATGAAGGCA CGAACCAGT **TGACATAAGC CTGTTCCGGTT CGTAAACTGT**
4801 AATGCAAGTA GCGTATGCGC TCACGCAACT GGTCCAGAAC CTTGACCGAA CGCAGCGGTG
4861 GTAACGGCGC AGTGGCGGTT TTCATggctt gttatgactg tttttttgta **cagtctatgc**
4921 ctcgggcatc caagcagcaa ggcggttacg ccgtgggtcg atgtttgatg ttatggagca
4981 gcaacg**ATGT TACGCAGCAG CAACGATGTT ACGCAGCAGG GCAGTCGCCC TAAAACAAAG**
5041 **TTAGGTGGCT CAAGTATGGG CATCATTCGC ACATGTAGGC TCGGCCCTGA CCAAGTCAAA**
5101 TCCATGCGGG CTGCTCTTGA TCTTTTCGGT CGTGAGTTCG GAGACGTAGC CACCTACTCC
5161 CAACATCAGC CGGACTCCGA TTACCTCGGG AACTTGCTCC GTAGTAAGAC ATTCATCGCG
5221 CTTGCTGCCT TCGACCAAGA AGCGGTTGTT AGCGCTCTCG CGGCTTACGT TCTGCCAGG
5281 TTTGAGCAGC CGCGTAGTGA GATCTATATC TATGATCTCG CAGTCTCCGG CGAGCACCGG
5341 AGGCAGGGCA TTGCCACCGC GCTCATCAAT CTCCTCAAGC ATGAGGCCAA CGCGCTTGGT
5401 GCTTATGTGA TCTACGTGCA AGCAGATTAC GGTGACGATC CCGCAGTGGC TCTCTATAACA
5461 AAGTTGGGCA TACGGGAAGA AGTGATGCAC TTTGATATCG ACCCAAGTAC CGCCACCTAA
5521 caattcgttc aagccgagat cggcttcccg gccgcgagat tgttcggtaa attgtcacia
5581 cgccgcggcc gcaaagcgct ccggcttaac tcaggcggtta gtcccatcac ccgctttatg
5641 cgcgcagcca cttatttcag cgctccgccc tgttccaaag gctttctagc cttttgggcc
5701 tccagcgctt gtgcagcaag cgccaccagc tatecttctt gcagcgtgc gccgctttcg
5761 tgggtccagcg gtttttcttg ggctgcgccc ttcttcaagg ccgggcgctc cttttgggcc
5821 ttgggttcta actctgcggt caagcggacc cgcattctgc gggccgctta ccttggcctg
5881 tagacatcat gagggtagcg gtgaccatcg aaatttcgaa ccaactatca gaggtgctaa
5941 gcgtcattga gcgccatctg gaatcaacgt tgcgtggcctg gcatttgtac ggctccgcag
6001 tggatggcgg cctgaagcca tacagcgata ttgatttgtt ggttactgtg gccgtaaagc
6061 ttgatgaaac gacgcggcga gcattgctca atgaccttat ggaggcttcg gctttccctg
6121 gcgagagcga gacgctccgc gctatagaag tcacccttgt cgtgcatgac gacatcatcc
6181 cgtggcggtta tccggctaag cgcgagctgc aatttggaga atggcagcgc aatgacattc
6241 ttgcgggtat cttcagacca gccatgatcg acattgatct agctatcctg cttacaaaag

6301 caagagaaca tagcgttgcc ttggttaggtc cggcagcggga ggaattcttt gaccocggttc
6361 ctgaacagga tctatctcgag gcgctgaggg aaaccttgaa gctatggaac tgcagccccg
6421 actgggcccgg cgatgagcga aatgtagtgc ttacgttgtc ccgcatttgg tacagcgcga
6481 taaccggcaa aatcgcgccc aaggatgtcg ctgcccactg ggcaataaaa cgcctacctg
6541 cccagtatca gcccgctctta cttgaagcta agcaagctta tctggggacaa aaagaagatc
6601 acttggcctc acgcgcagat cacttgggaag aatttattcg ctttgtgaaa ggcgagatca
6661 tcaagtcagt tggtaaatga tgtctaacaa ttcgttcaag ccgaccgcgc tacgcgcggc
6721 ggcttaactc cggcgttggg cgcacaataa ggctccttgc agagttgctt gaaagttggt
6781 acgattcaaa ttcaatcatg agatagtcag cagatgagca cttccaagaa cgcagacaag
6841 taagccgcag caaccttcat ttttcggttg ttgcccggtt ctcatgaatc cttttgctct
6901 acgggagcgc cgcctaatcc tttgttcaag gagatggttt cgtgagctca aaaaacttta
6961 gttggcggtg ctcocctgcc gccacgggtg tgttgttacc accgttcgat ttattggcat
7021 cactcggcat ggacatgtac ttgcccagcag tgcocgtttat gccaaacgcg cttggtaocg
7081 cagcagcagc aattcagctt acgctgacaa cgtacttggg catgattggg gccggtcagc
7141 tcttgtttgg accgctatcg gaccgactgg ggcgcgcgcc cgttctactg ggaggtggcc
7201 tgcctacgt tgtggcgtca atgggcctcg ctcttacgtc atcggctgaa gtctttctgg
7261 ggcttcggat tcttcaggct tgtggtgcct cggcgtgcct tgtttccaca tttgcaacag
7321 tacgtgacat ttacgcaggt cgcgaggaaa gtaatgtcat ttacggcata ctcgatcca
7381 tgctggccat ggtcccggcg gtagggccat tgctcggagc gctcgtcgac atgtggcttg
7441 ggtggcgggc tatctttgcy tttctaggtt tgggcatgat cgtcgcactc gcagcagcgt
7501 ggcgattctg gctgaaacc cgggtgcaac gagttgcggg cttgcaatgg tgcagctgc
7561 tactccccgt taagtgcctg aacttctggt tgtacacggt gtgttacgcc gctggaatgg
7621 gtagcttctt cgtctttttc tccattgcgc cgggactaat gatgggcagg caaggtgtgt
7681 ctcagcttgg cttcagcctg ctgttcgcc cagtggcaat tgccatgggt tttacggctc
7741 gttttatggg gcgctgtgata cccaagtggg gcagcccaag tgtcttgca atgggaatgg
7801 gatgcctgat agctggagca gtattgcttg ccatcaccga aatatgggct ttgcagtcg
7861 tgtttaggctt tattgctcca atgtggctag tgggtattgg tgcgccaca gcggtatctg
7921 tggcccccga tggcgcctt cgaggattcg accatggtgc tggaacggtc acggcagctc
7981 actctgctt gggcgggtgta ctgctaggaa gcatcggaac gttgatcatt tgcgtgttc
8041 cgcgcaaac gccttggccg gttgctggt actgttgac ccttgaaca cctgctcgc
8101 gtctgtcttg tgtttccgga gtgaagggct ctgcggcca gggggagcat gatgtggtc
8161 cgctacaaag tgcgggaagt acatcaaat ccaatcgttg agagaatgtg gcaagctatc
8221 gcccaacaaa tgcgtgcagc cgacccaaaa ccgctacgcg gtttcggctc gctgagctca
8281 ggcgttagat gcaactaagca cataattgct cacagccaaa ctatcaggtc aagtctgctt
8341 ttattatctt taagcgtgca taataagccc tacacaaatt gggagatata tcATGAAAGG
8401 CTGGCTTTTT CTTGTTATCG CAATAGTTGG CGAAGTAATC GCAACATCCG CATTAAATC
8461 TAGCGAGGGC TTTACTAAGC TTGCCCTTC CGCCGTTGTC ATAATCGGTT ATGGCATCGC
8521 ATTTTATTTT CTTTCTCTGG TTCTGAAATC CATCCCTGTC GGTGTTGCTT ATGCAGTCTG
8581 GTCGGGACTC GCGTTCGTCA TAATTACAGC CATTGCCTGG TTGCTTCATG GGCAAAAGCT
8641 TGATGCGTGG GGCTTTGTAG GTATGGGGCT CATAATTGCT GCCTTTTTGC TCGCCCATC
8701 CCCATCGTGG AAGTCGCTGC GGAGGCCGAC GCCATGGTGA CGGTGTTCCG CATTCTGAAT
8761 CTCACCGAGG ACTCCTTCTT CGATGAGAGC CGGCGGCTAG ACCCCGCCGG CGCTGTCACC
8821 GCGGCATCG AAATGCTGCG AGTCGGATCA GACGTCGTGG ATGTCGGACC GGCCGCCAGC
8881 CATCCGACG CGAGGCCTGT ATCGCCGCC GATGAGATCA GACGTATTGC GCCGCTCTTA
8941 GACGCCCTGT CCGATCAGAT GCACCGTGT TCAATCGACA GCTTCCAACC GGAAACCCAG
9001 CGTATGCGC TCAAGCGCG CGTGGGCTAC CTGAACGATA TCCAAGGATT TCCTGACCCT
9061 GCGCTCTATC CCGATATTGC TGAGGCCGAC TGCAGGCTGG TGGTTATGCA CTCAGCGCAG
9121 CGGGATGGCA TCGCCACCCG CACCGGTCAC CTTGACCCG AAGACGCGCT CGACGAGATT
9181 GTGCGGTTCT TCGAGGCGCG GGTTCGCC CTTGCGACGGA GCGGGGTCGC TGCCGACCGG
9241 CTCATCTCG ATCCGGGGAT GGGATTTTTT TTAGCCCCG CACCGGAAAC ATCGCTGCAC
9301 GTGCTGTCGA ACCTTCAAAA GCTGAAGTCG GCGTTGGGGC TTCCGCTATT GGTCTCGGTG
9361 TCGCGAAAT CCTTCTTGGG CGCCACCGTT GGCCTTCTG TAAAGGATCT GGGTCCAGCG
9421 AGCCTTGGCG CGGAACCTCA CGCGATCGGC AATGGCGCTG ACTACGTCG CACCCACGCG
9481 CCTGGAGATC TGCGAAGCGC AATCACCTTC TCGGAAACCC TCGCGAAATT TCGCAGTCGC
9541 GACGCCAGAG ACCGAGGGTT AGATCATGCC TAGcattcac cttccggccg cccgctagcg
9601 gaccctggtc aggttccgcy aaggtgggcy cagacatgct gggctcgtca ggatcaact
9661 gcaactatgag gcggcggttc ataccgcgc aggggagcga atggacagcg aggagcctcc
9721 gaacgttcgg gtcgcctgct cgggtgatat cgaocaggtt gtgcggctga tgcacagcgc

9781 tgcggcgtgg atgtccgcca agggaacgcc cgctgggac gtcgcgcgga tcgaccggac
 9841 attcgcggag accttcgtcc tgagatccga gtcctagtc gcgagttgca gcgacggcat
 9901 cgtcggctgt tgcaccttgt cggcgcgagga tcccgagttc tggcccgacg cctcaaggg
 9961 ggaggccgca tatctgcaca agctcgcggt gcgacggaca catgcggggc ggggtgtcag
 10021 ctccgcgctg atcgaggctt gccgccatgc cgcgcgaacg caggggtgcg ccaagctgcg
 10081 gctcgactgc caccggaacc tgcgtggcct atacgagcgg ctccgattca cccacgtcga
 10141 cactttcaat cccggctggg atccaacctt catcgcagaa cgcctagaac tcgaaatcta
 10201 acgtccgttc gggcatcgag gtccatgtcg ggggtgggacg ggcccgtggc ttcaagatca

Coordenadas:

- 1) 3872 ←----- 4885, gen int1 (integrasa) (rojo, mayúsculas).
- 2) 4770 -----→ 4798, promotor Pc para genes del cassette (azul).
- 3) 4912 ←----- 4940, promotor para int1 (integrasa) (azul)
- 4) 4925 -----→ 4942, primer int-F (subrayado, azul).
- 5) 4966 -----→ 5049, sitio de recombinación att1 (cursivas).
- 6) 4987 -----→ 5520, gen aacC1 (aminoglicósido acetil transferasa) que confiere resistencia a gentamicina (rojo, mayúsculas).
- 7) 8323 ←----- 8340, primer int-B (subrayado, negro).
- 8) 8417 ←----- 8436, primer qace□1F (subrayado, rojo).
9214
- 9) 9195 ←----- 9214, primer sul1-B (subrayado, rojo).
4289

Genes (4 cassettes integrados):

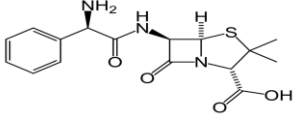
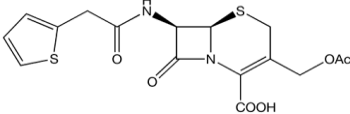
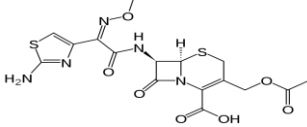
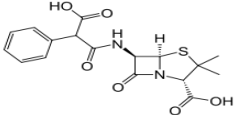
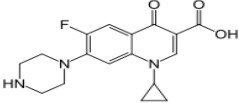
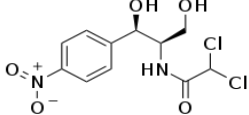
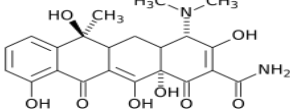
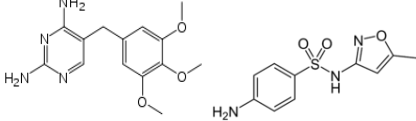
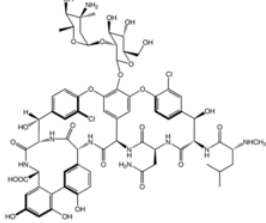
aacC1.- Confiere resistencia a gentamicina

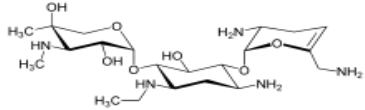
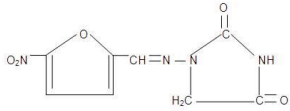
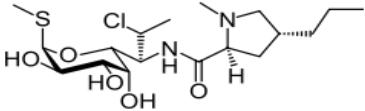
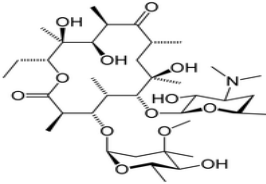
aadA2- Confiere resistencia a estreptomicina

cm1A1- Transportador de cloranfenicol

sulI- Dihidropteroato sintetasa 8734-9573

Anexo 3. Estructura química de los antibióticos

Antibióticos	Estructura química
Ampicilina	 <p>The structure shows a penicillin nucleus (a fused beta-lactam and thiazolidine ring system) with a phenylglycine side chain and a carboxylic acid group.</p>
Cefalotina	 <p>The structure features a cephem nucleus (a fused beta-lactam and dihydrothiazine ring system) with a thienylmethyl side chain, an acetoxy group, and a carboxylic acid group.</p>
Cefotaxima	 <p>The structure shows a cephem nucleus with a 2-aminothiazolidine-4-ylmethyl side chain, a methoxy group, and a carboxylic acid group.</p>
Carbenicilina	 <p>The structure is a penicillin nucleus with a phenylglycine side chain and a carboxylic acid group.</p>
Ciprofloxacino	 <p>The structure is a fluoroquinolone with a piperazine ring, a cyclopropyl group, a fluorine atom, and a carboxylic acid group.</p>
Cloranfenicol	 <p>The structure is a chloramphenicol with a p-nitrophenyl group and a dichloroethyl side chain.</p>
Tetraciclina	 <p>The structure is a tetracycline with a dimethylamino group, a methyl group, and a primary amide group.</p>
Trimetoprim/Sulfametoxazol	 <p>Two structures are shown: Trimetoprim (a pyrimidine derivative) and Sulfametoxazol (a sulfonamide derivative).</p>
Vancomicina	 <p>The structure is a large glycopeptide antibiotic with multiple sugar rings and various functional groups.</p>

<p>Netilmicina</p>	 <p>The structure shows a complex molecule consisting of two aminoglycoside rings (2-deoxystreptamine and 2-streptamine) linked together. The 2-deoxystreptamine ring has two methyl groups on the C2 nitrogen and a methylamino group on the C4 nitrogen. The 2-streptamine ring has an amino group on the C2 nitrogen and a methylamino group on the C4 nitrogen.</p>
<p>Nitrofurantoína</p>	 <p>The structure shows a furan ring with a nitro group (O₂N) at the 5-position and a methylene group at the 2-position. This methylene group is connected to a nitrogen atom, which is part of a five-membered imidazole ring. The imidazole ring has a carbonyl group (C=O) at the 4-position and a methyl group (H₂C) at the 5-position.</p> <p>NITROFURANTOÍNA</p>
<p>Clindamicina</p>	 <p>The structure shows a complex molecule consisting of a thiazolidine ring and a pyridine ring. The thiazolidine ring has a sulfur atom at the 4-position and a chlorine atom at the 2-position. The pyridine ring has a methyl group at the 2-position and a propyl group at the 4-position. The two rings are connected via a methylene group at the 5-position of the thiazolidine ring and the 3-position of the pyridine ring.</p>
<p>Eritromicina</p>	 <p>The structure shows a complex molecule consisting of a 14-membered macrolide ring and a 14-membered tetracycline ring. The macrolide ring has a methyl group at the 14-position and a methylamino group at the 13-position. The tetracycline ring has a methyl group at the 12-position and a methylamino group at the 11-position. The two rings are connected via a methylene group at the 11-position of the macrolide ring and the 12-position of the tetracycline ring.</p>

Referencias.

1. Borges-Walmsley. M, "Structure and Function of Efflux Pumps that Confers Resistance to Drugs", *Biochemical Journal*, **376**, 2003, pp. 313-338.
2. Bryan, L.E, "Genetics of resistance to Antimicrobial Agents", Cambridge University Press, 1982, pp. 104-133.
3. Calvo, J, "Mecanismo de Acción de los Antimicrobianos", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **27**, 2009, pp. 44-52.
4. Cavallieri, S, " Why Responsible Antibiotic Use Enhances Animal and Human Health, Proceedings of the 2004 Midwest Poultry Federation Convention, St Paul, pp. 201-210.
5. Cordiés, L, "Principios Generales de la Terapéutica Antimicrobiana", *Acta médica*, **8**, 1998, pp. 13-27.
6. Costello. K.C, "Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time", *Science*, **326**, 2009, pp. 1694-1697.
7. Dethlefsen, L, "An Ecological and Evolutionary Perspective on Human-Microbiome Mutualism and Disease", *Nature*, **449**, 2007, pp. 811-818.
8. Diixa, P, "Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 2010, pp. 5070-5073.
9. Elizabeth, P, "Bacteria Are Picky About Their Homes on Human Skin", *Science*, **320**, 2008, pp. 1001.
10. Elkins, C, "Species- specific uptake of DNA by gonococci is Mediated by a 10-base-pair Sequence", *Journal of Bacteriology*, **173**, 1991, pp. 3911-3913.
11. Errecalde, J, "Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo. Incidencia del desarrollo de Resistencias en la Salud Pública, FAO, 2004

12. Fierer, N, "The Influence of Sex, Handedness, and Washing on the Diversity of Hand Surface Bacteria", PNAS, **105**, 2008, pp. 17994-17999.
13. Galun, E, "Bacterial Insertion Sequences", Kluwer Academics Publishers, 2003.
14. Grace. E.A., "Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome", Science, **324**, 2009, pp. 1190, 1191.
15. Hall, R.M, "Integrans Found In Different Locations Have identical 5'Ends but Variable 3'Ends", Journal of Bacteriology, **176**, 1994, pp. 6286-6294.
16. Kaatz, G.W, "Evidence for The Existence of Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **19**, 2000, pp. 1404-1406.
17. Lederberg, J, "Replica plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants", Journal of Bacteriology, **63**, 1952, pp. 398-406.
18. Liberman, D, "Evaluation of a Rapid Bauer-Kirby Antibiotic Susceptibility Determination", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **7**, 1975, pp.250-255.
19. Madigan, S, "Biología de los Microorganismos", Prentice Hall, 8a edición, 2000.
20. Mazel, D, "Antibiotic Resistance in Microbes", Cellular and Molecular Sciences, **56**, 1999, pp. 742-754.
21. Morten, O, "Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora", Science, **325**, 2009, pp. 1128-1131.
22. Nikaido, H, "Resistance Caused by Gram- Negative Multidrug Efflux Pumps", Clinical Infectious diseases, **27**, 2011, pp. S32-S41.
23. Norby, S, "Treatment Failures with Broad-spectrum Antibiotics", Scandinavian Journal of Infectious Diseases, **78**, 1991, pp. 64-70.

24. Orman, B, "La Resistencia Bacteriana y sus Mecanismos de Dispersión", Revista de la Facultad de Odontología, Buenos Aires, **21**, 2006, pp. 13-19.
25. Palumbi, S.R, "Strong Reproductive Isolation between Closely Related Tropical Sea Urchins (genus *Echinometra*)", Molecular Biology and Evolution, **8**, 1991, pp. 227-239.
26. Patiño, D, "¿Porqué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?", Umbral científico, **3**, 2003, pp. 48-56.
27. Roe, M.T, "Monitoring and Identifying Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria", Journal of Poultry Science, **82**, 2003, pp. 622-626.
28. Rowe-Magnus, "Resistance Gene Capture", Current opinion in Microbiology, **2**, 1999, pp. 483-488.
29. Ruth, M. Hall, "Mobile Gene Cassettes and Integrons: Captures and Spread of Genes by Site-specific Recombination", Molecular Microbiology, **15**, 1995, pp. 593-600.
30. Sorensen, H, "Antibiotic resistance in food-related bacteria- a Result of Interfering with the global Web of Bacterial genetics", International Journal of Food Microbiology, **78**, 2001, pp. 43-56.
31. Thomas, C, "Paradigms of Plasmid Organization", Molecular Microbiology, **37**, 2000, pp. 485-491.
32. Turnbaugh, P.J, "The Human Microbiome Project", Nature, **449**, 2007, pp. 804-810.
33. Watson, D.H, "Chapter 6. Veterinary Drug Residues", ISBN: 1-85573-563-6, 2001, pp. 109-120.
34. Young, L, "Tratamiento Antimicrobiano", Tratado de Medicina Interna, **19**, 1994, pp. 1859-1872.