



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE *Streptococcus spp*  
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS AISLADOS DE  
CARNE DE POLLO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**DULCE MARÍA SALAZAR CONTRERAS**



**MÉXICO, D. F.**

**2006**



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.

## DEDICATORIA

*A Dios por todas las oportunidades y enseñanzas que me ha dado y por permitirme lograr uno de mis más grandes sueños.*

*A mi mamá porque compartirías mi felicidad y se que estarías orgullosa de mi.*

*A mi hermana por lo que eres y significas para mi.*

## *AGRADECIMIENTOS:*

*A mis abuelitos Amando y Yolanda, a mis tíos Lulú y Roberto y a mi niña Amanda por haberme hecho parte de su familia, por su apoyo, consejos y sobre todo por su amor.*

*A mi mamá y a mi papá por todo el esfuerzo que hicieron y el apoyo que me dieron para lograr que yo fuera una persona de bien.*

*A mi hermano por su estimo y cariño.*

*A Alicia, Sandra, Ivone y Martín por haber formado parte de este sueño, por arrancarme todos los días una sonrisa y sobre todo por su amistad.*

*A la Dra. Biserka por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto.*

*A todas las personas que me ayudaron en la elaboración de esta tesis, en especial a José Luis, Oswaldo, Javier, Raquel y Fernando.*

*A todas las personas que en su momento me han dado su apoyo y algún consejo para que yo sea una mejor persona.*

*A todos los profesores que contribuyeron en mi formación y en especial al maestro Francisco Hernández y Misael Ibarra porque en cada una de sus enseñanzas demostraron el amor que le tienen a su profesión y a la Universidad.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado como persona y profesionista.*

Jurado asignado:

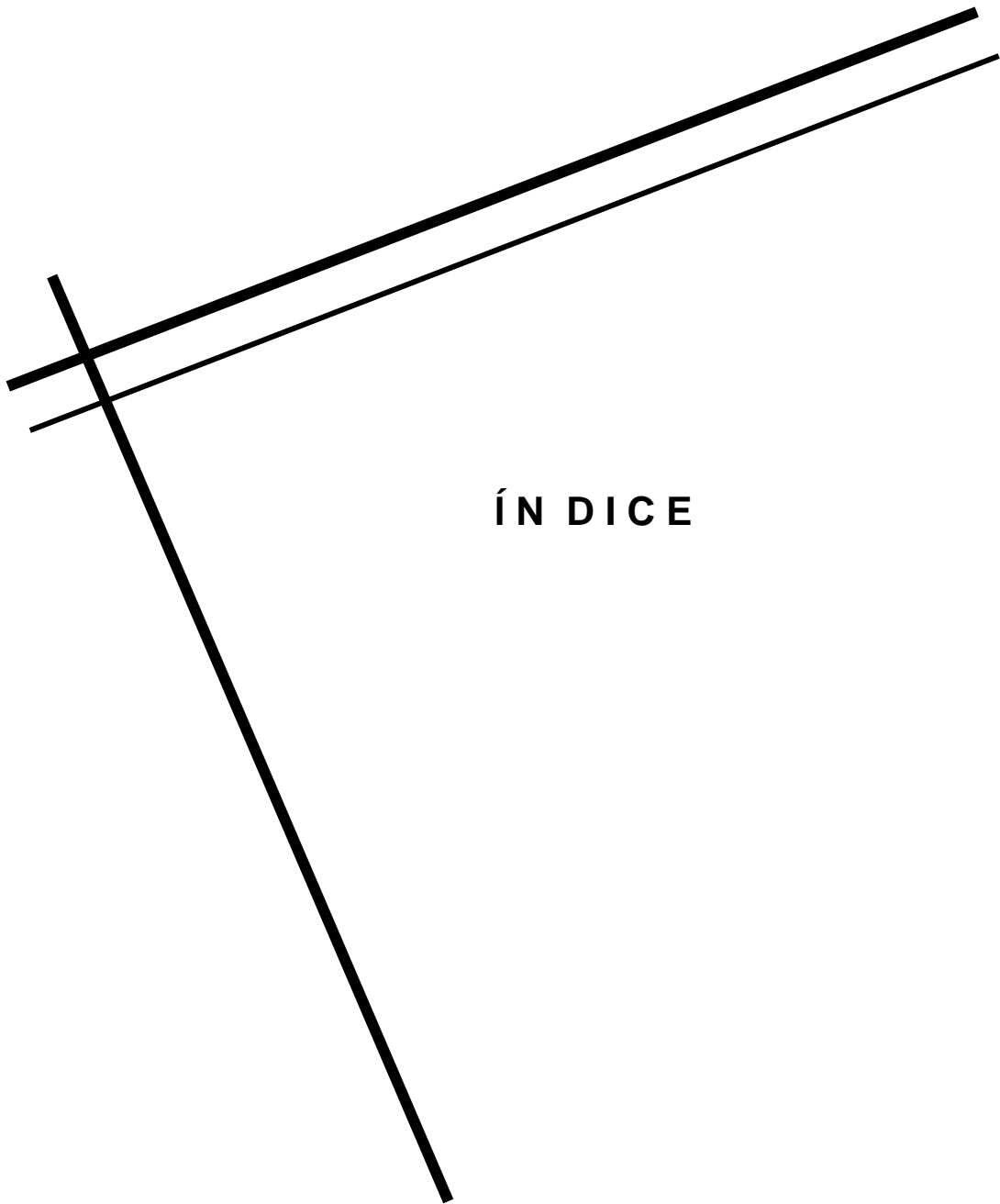
|               |  |
|---------------|--|
| Presidente    | Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova      |
| Vocal         | Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López |
| Secretario    | Prof. María del Pilar Granada Macias     |
| 1er. Suplente | Prof. Eduardo Bonilla Espinosa           |
| 2do. Suplente | Prof. Felipe Cruz García                 |

Sitio en donde se desarrolló el tema: Facultad de Química

Asesor del tema: Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova \_\_\_\_\_

Supervisor técnico: Q. F. B Guadalupe Velez Pratt \_\_\_\_\_

Sustentante: Dulce María Salazar Contreras \_\_\_\_\_



ÍNDICE

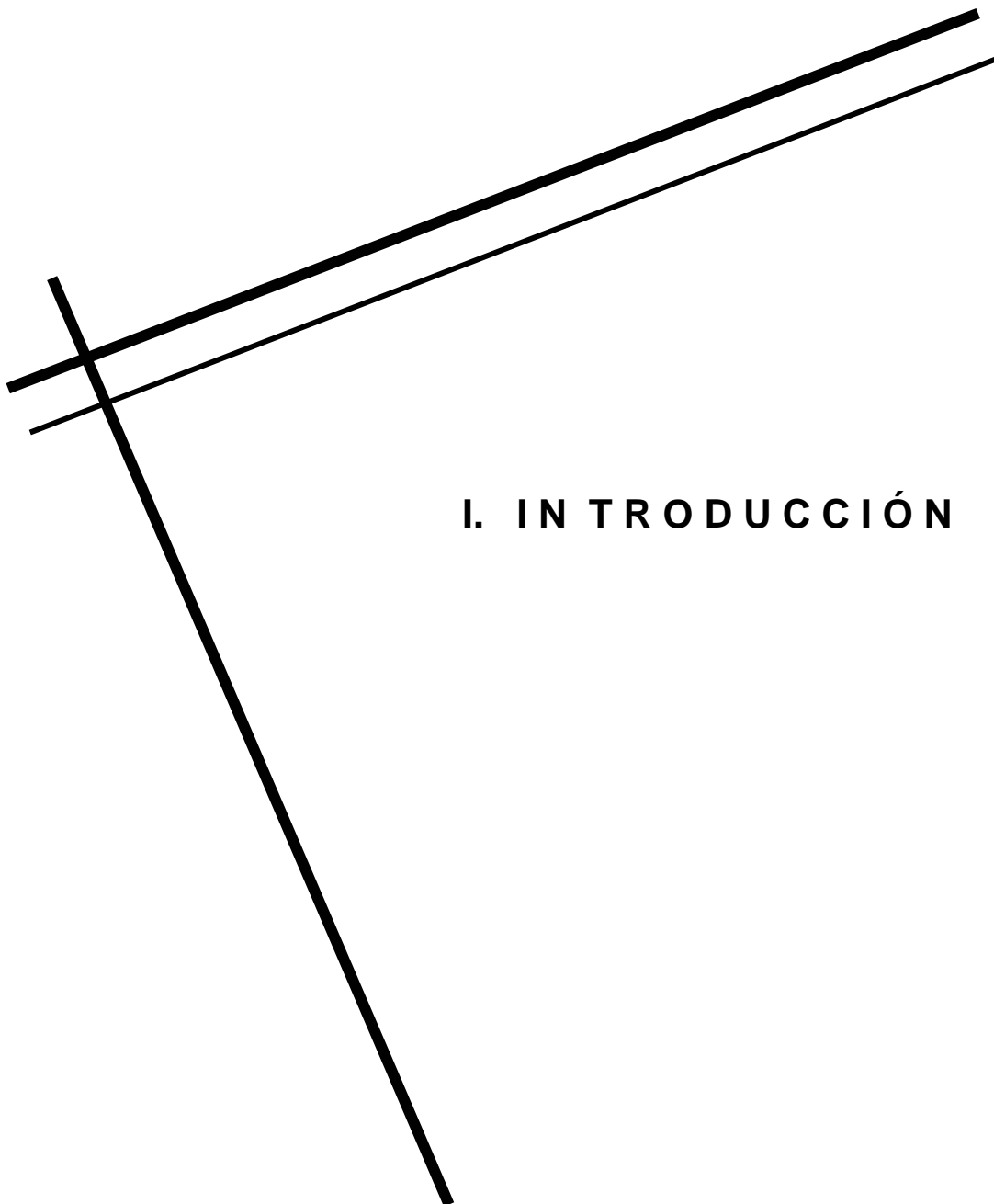
---

|  | Página |
|--|--------|
| I. Introducción .....  | 1      |
| II. Objetivos .....  | 4      |
| 1. Objetivo general .....  | 5      |
| 2. Objetivos particulares .....                                      | 5      |
| III. Generalidades .....   | 6      |
| 1. <i>Enterococcus</i> .....   | 7      |
| 1.1 Taxonomía .....  | 8      |
| 1.2 Patogenicidad .....  | 10     |
| 1.3 Tratamiento .....  | 11     |
| 2. Antibióticos .....  | 12     |
| 2.1 Clasificación y mecanismo de acción .....                        | 12     |
| 2.2 Uso de los antibióticos .....                                    | 15     |
| 2.3 Antimicrobianos promotores del crecimiento .....                 | 16     |
| 2.4 Proporción de antibióticos utilizados en humanos y animales .... | 17     |
| 3. Resistencia a los antibióticos .....                              | 19     |
| 3.1 Resistencia intrínseca .....                                     | 19     |
| 3.2 Resistencia adquirida .....                                      | 19     |
| 3.3 Resistencia cruzada .....  | 21     |
| 3.4 Mecanismos de resistencia .....                                  | 21     |
| 4. Intercambio genético y diversidad genética .....                  | 24     |
| 4.1 Mutación .....   | 24     |
| 4.2 Recombinación genética .....                                     | 25     |
| 4.3 Intercambio genético .....                                       | 26     |
| 4.3.1 Transformación .....   | 26     |
| 4.3.2 Transducción .....   | 28     |
| 4.3.3 Conjugación .....  | 29     |
| 5. Elementos genéticos móviles .....                                 | 32     |
| 5.1 Plásmidos .....  | 32     |

---

|  | Página |
|--|--------|
| 5.1.1 Plásmidos R .....  | 33     |
| 5.2 Transposones .....   | 34     |
| 5.3 Integrones .....   | 36     |
| 5.3.1 Cassettes genéticos .....  | 38     |
| IV. Metodología .....  | 40     |
| 1. Muestreo .....  | 41     |
| 2. Aislamiento de <i>Streptococcus spp</i> .....                       | 41     |
| 3. Identificación presuntiva de <i>Enterococcus spp</i> .....          | 42     |
| 3.1 Siembra en caldo BHI .....   | 42     |
| 3.2 Crecimiento en caldo BHI + 6.5% NaCl .....                         | 42     |
| 3.3 Tinción de Gram .....  | 43     |
| 3.4 Prueba de la catalasa .....  | 43     |
| 3.5 Siembra en gelosa sangre de carnero .....                          | 43     |
| 4. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos .....                  | 44     |
| 5. Extracción de DNA total .....                                       | 44     |
| 6. Identificación de integrones de clase 1 por la técnica de PCR ..... | 46     |
| 7. Identificación de especie .....                                     | 46     |
| V. Resultados .....  | 48     |
| 1. Aislamiento e identificación de <i>Enterococcus spp</i> .....       | 49     |
| 2. Susceptibilidad a los antibióticos .....                            | 49     |
| 3. Identificación de especie .....                                     | 64     |
| 4. Presencia de integrones de clase 1 .....                            | 64     |
| VI. Discusión .....  | 69     |
| VII. Conclusiones .....  | 95     |
| VIII. Bibliografía .....   | 98     |
| IX. Apéndice .....   | 109    |





# I. INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* es un grupo de bacterias consideradas de baja patogenicidad, que en años recientes ha creado relevancia médica por convertirse en uno de los principales agentes causales de infecciones nosocomiales [2, 13]

La importancia de este género radica en su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su gran capacidad de adquirir resistencia a otros [31]; lo que incrementa la prevalencia de cepas de enterococos multirresistentes a antimicrobianos, limitando las opciones terapéuticas [32].

La resistencia adquirida frente a antibióticos comúnmente utilizados se ha observado desde que estos agentes se introdujeron tanto en medicina humana como en medicina veterinaria [61].

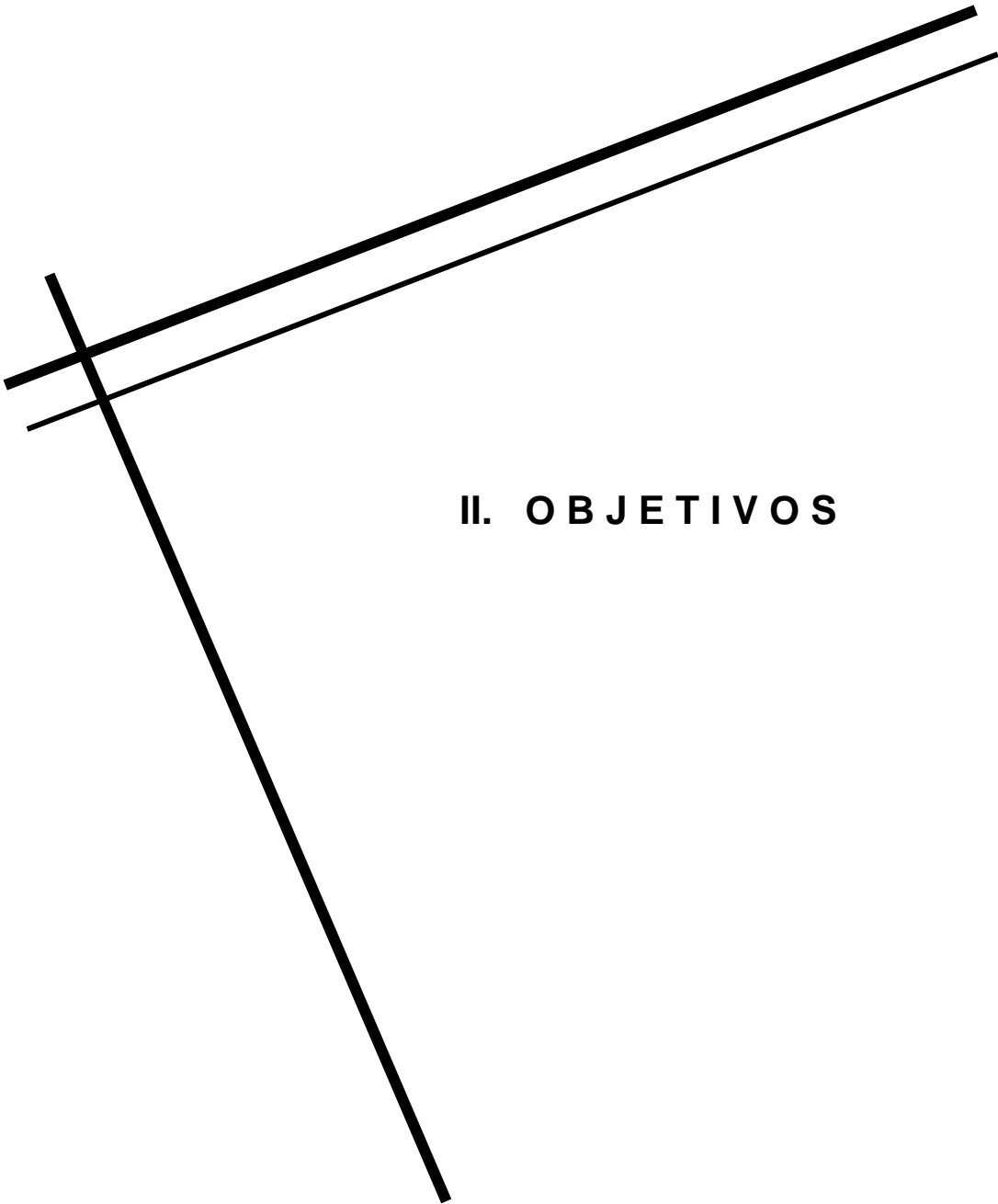
En la industria moderna de aves de corral los antibióticos son utilizados en grandes cantidades, no solo con fines terapéuticos y profilácticos, sino también como promotores del crecimiento en el alimento para animales [47, 61]. Esta práctica rutinaria es un factor importante en el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos que subsecuentemente pueden transferirse de los animales al humano a través de la cadena alimenticia [68].

Frecuentemente la ocurrencia de enterococos resistentes a agentes antimicrobianos se ha observado en alimentos de origen animal y esto ha sugerido que estos productos puedan ser reservorio de enterococos resistentes y de genes de resistencia [1, 2, 47].

Los enterococos pueden colonizar el organismo del ser humano a través de diversas vías como la cadena alimenticia, el ambiente y el contacto directo con los animales. Los enterococos resistentes al colonizar el organismo, transmiten su resistencia a bacterias comensales, las cuales juegan un papel importante en la reserva de la resistencia, que podrán transmitir a otras bacterias, incluyendo a aquellas bacterias patógenas [3, 23, 29].

La diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias es un problema creciente. Muchos de los genes de resistencia se encuentran localizados en transposones o plásmidos, lo que permite su diseminación entre una variedad de bacterias. En años recientes se ha descubierto otro mecanismo de diseminación de genes de resistencia. Este mecanismo involucra a un elemento de DNA que incorpora uno o un grupo de genes de resistencia a antibióticos por medio de una recombinación sitio-específica. Este nuevo elemento de DNA es denominado integrón, el cual ha adquirido importancia por su fácil diseminación y su gran capacidad de adquirir y transmitir genes de resistencia a antibióticos [40, 51, 49].

Por esta razón en el presente estudio se investigó la incidencia de enterococos multirresistentes a antibióticos en carne de pollo, por ser este uno de los productos cárnicos de mayor consumo en México, además se buscó la presencia de integrones en cepas multirresistentes de enterococos.



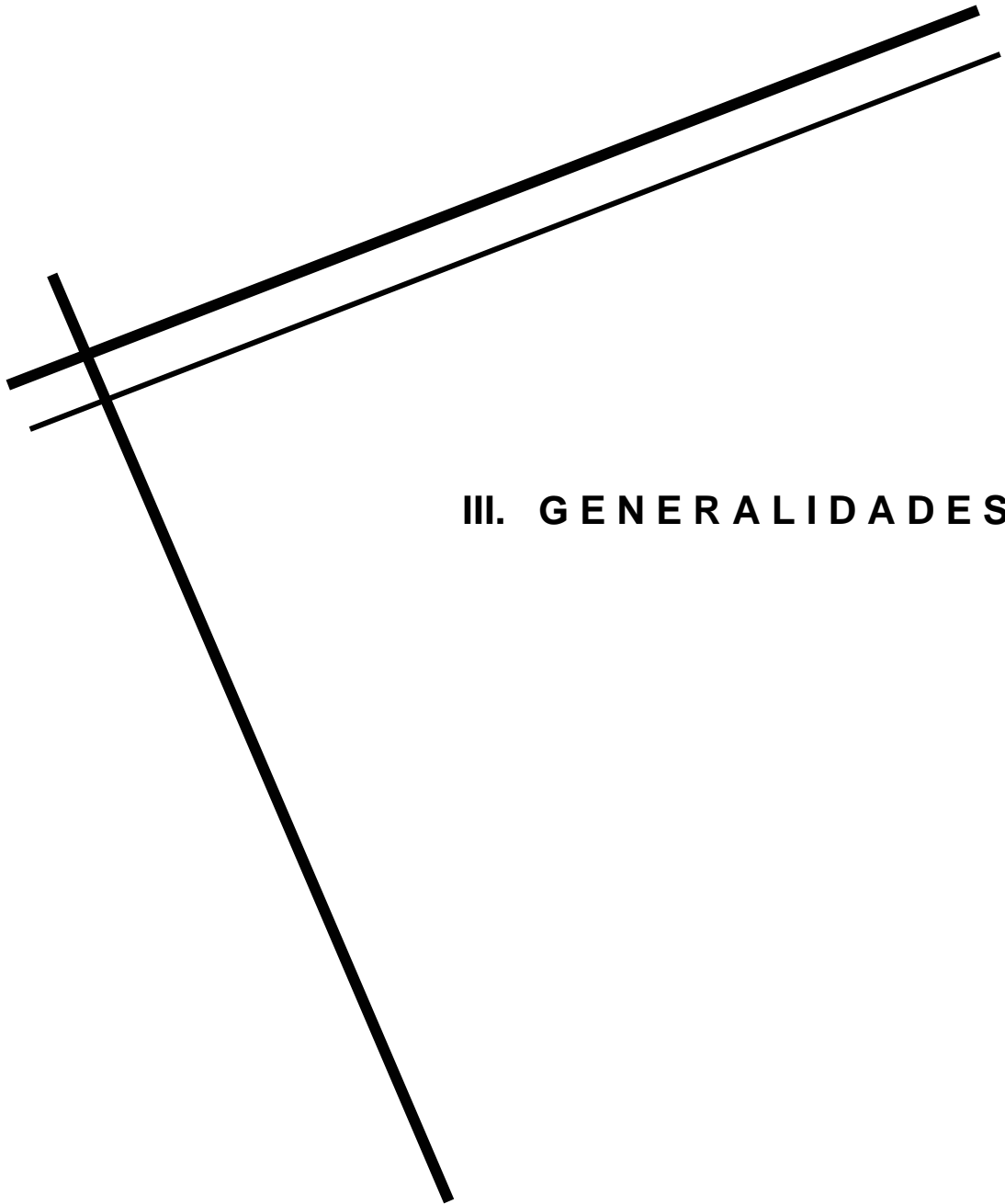
**II. OBJETIVOS**

**Objetivo general:**

Aislar e identificar cepas de enterococos multirresistentes a antibióticos a partir de muestras de carne molida de pollo e hígado de pollo

**Objetivos particulares:**

- Aislar cepas de enterococos a partir de muestras de carne molida de pollo e hígado de pollo.
- Identificar a los enterococos.
- Determinar la susceptibilidad de los enterococos a distintos antibióticos
- Determinar si la carne de pollo (carne molida e hígado) es reservorio de enterococos multirresistentes
- Determinar la presencia de integrones en cepas de enterococos multirresistentes.



### III. GENERALIDADES

## 1. *Enterococcus*

El género *Enterococcus* fue descrito por primera vez en 1984 por Schleifer y Kilpper-Bälz (Tabla 1). Ellos retomaron el nombre de *Enterococcus* cuando retiraron el género *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* del género *Streptococcus* al cual pertenecían como parte del grupo D de Lancefield transfiriéndolos al género *Enterococcus*.

**Tabla 1.** Subagrupaciones de los enterococos antes de 1984 [36]

| Año        | Autor                    | Descripción  |
|------------|--------------------------|--|
| 1899       | Thiercelin               | Grupo de <i>Streptococcus</i>  |
| 1903       | Thiercelin y Jouhaud     | Grupo de <i>Enterococcus</i>   |
| 1906       | Andrewes y Horder        | <i>Streptococcus faecalis</i> como bacteria potencialmente patógena                                      |
| 1933       | Lancefield               | Serogrupos de estreptococos  |
| 1937       | Sherman                  | Cuatro grupos de estreptococos: enterococos, láctico, viridans y pyogenes                                |
| 1984, 1987 | Schleifer y Kilpper-Bälz | Subdivisión del grupo D en tres géneros: <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Enterococcus</i> |

Después de la descripción de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, una gran variedad de especies han sido descritas en el género de *Enterococcus*. Actualmente han sido validadas 26 especies (Tabla 2) y 3 más están propuestas para su validación [36].

## 1.1 Taxonomía

Familia: Enterococcaceae

Géneros: *Enterococcus*

*Melissococcus*

*Tetragenococcus*

*Vagococcus*

Los miembros del género *Enterococcus* así como los del género *Streptococcus* y *Lactococcus* son cocos Gram positivos que se disponen en pares o cadenas cortas, son catalasa negativos, anaerobios facultativos. Son quimiorganotróficos y producen ácido láctico a partir de hexosas.

Los enterococos típicos (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. mundtii*) pueden distinguirse fácilmente de los lactococos y estreptococos por su habilidad para crecer a 10°C y 45°C, así como en presencia de NaCl 6.5%, en bilis 40% y a un pH 9.6 [16].

La identificación de especies de enterococos se lleva a cabo por medio de pruebas bioquímicas y fisiológicas (Fig. 1).



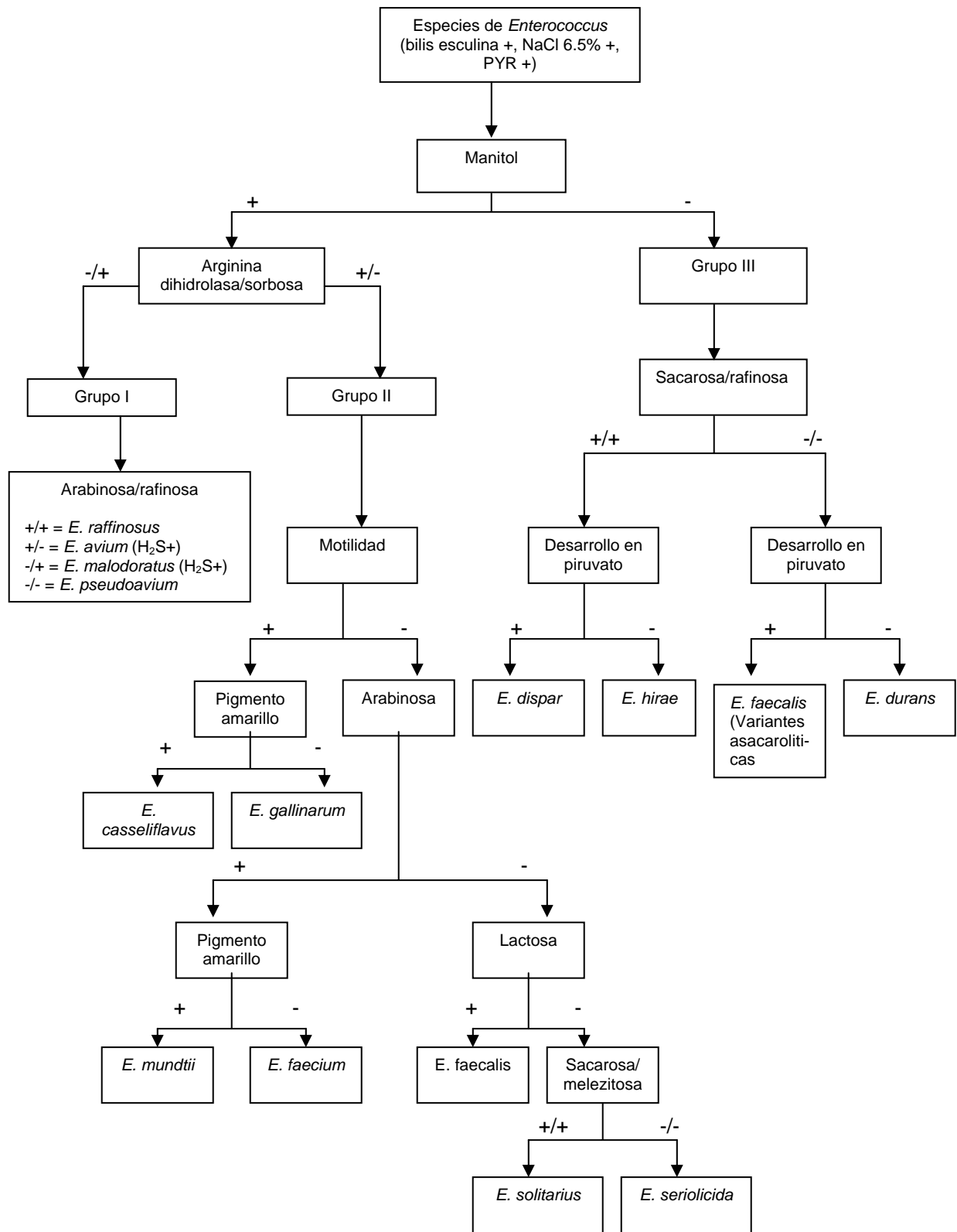


Fig. 1. Diagrama de flujo para la identificación bioquímica de especies de *Enterococcus* [39].

**Tabla 2.** Especies del género *Enterococcus* [16,36]

|                         |                          |                           |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>E. asini</i>         | <i>E. flavescens</i>     | <i>E. porcinus</i>        |
| <i>E. avium</i>         | <i>E. gallinarum</i>     | <i>E. pseudoavium</i>     |
| <i>E. casseliflavus</i> | <i>E. gilvus</i>         | <i>E. raffinosus</i>      |
| <i>E. cecorum</i>       | <i>E. haemoperoxidus</i> | <i>E. ratti</i>           |
| <i>E. columbae</i>      | <i>E. hirae</i>          | <i>E. saccharolyticus</i> |
| <i>E. dispar</i>        | <i>E. malodoratus</i>    | <i>E. solitarius</i>      |
| <i>E. durans</i>        | <i>E. moraviensis</i>    | <i>E. sulfureus</i>       |
| <i>E. faecalis</i>      | <i>E. mundtii</i>        | <i>E. villorum</i>        |
| <i>E. faecium</i>       | <i>E. pallens</i>        |                           |

## 1.2 Patogenicidad

Los enterococos se encuentran entre los patógenos nosocomiales más comunes; pueden estar implicados como causa importante de endocarditis, bacteremias, infecciones del tracto urinario, de heridas, del conducto biliar, del sistema nervioso, intraabdominales y pélvicas. Las infecciones intrahospitalarias están asociadas a procedimientos como instalación de catéteres vasculares, urinarios y neuroquirúrgicos entre otros [5, 16, 20, 31, 37, 47, 61].

La incidencia de infecciones causadas por enterococos ha incrementado en años recientes. En Estados Unidos aproximadamente el 12% de las infecciones nosocomiales son causadas por enterococos [16, 20, 61].

Los enterococos son patógenos oportunistas y usualmente causan infecciones en pacientes con enfermedades severas o que están inmunocomprometidos [16, 47].

Datos epidemiológicos indican que *E. faecalis* es la especie más común entre los enterococos aislados de infecciones humanas (más del 80%), mientras que *E. faecium* está asociado con la mayoría de las infecciones persistentes causadas por enterococos, posiblemente por poseer una amplia resistencia a los antibióticos [16, 20].

### 1. 3 Tratamiento

Tradicionalmente las infecciones causadas por enterococos en medicina humana son tratadas con penicilinas (ampicilina, amoxicilina) en combinación con aminoglucósidos (gentamicina), que son los medicamentos de elección en infecciones serias causadas por enterococos. Los antibióticos glicopéptidos, vancomicina y teicoplanina, son antibióticos importantes de reserva en caso de infecciones debidas a enterococos resistentes a las penicilinas, a los aminoglucósidos de alto nivel o en pacientes con hipersensibilidad a las penicilinas [32, 37, 47].

## **2. Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias producidas de forma natural por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos [7].

Otras sustancias son sintetizadas por medios químicos. En conjunto las sustancias naturales y sintéticas que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos se denominan agentes antimicrobianos; sin embargo el uso común a menudo ha ampliado el término antibiótico para denominar a ambas sustancias [7, 15].

### **2.1 Clasificación y mecanismo de acción**

Los diferentes agentes antibacterianos poseen una gran especificidad en lo que se refiere a sus blancos de acción en la célula bacteriana. Por esta razón se clasifican con frecuencia en función de su mecanismo de acción (Tabla 3).

Hay varios blancos posibles para la acción de los antimicrobianos dentro de la célula bacteriana, pero las vías o las estructuras atacadas con mayor frecuencia son la síntesis de la pared celular, la membrana celular, la síntesis de proteínas, y la síntesis de DNA y RNA [15].

**Tabla 3.** Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos [7, 15, 19].

| Clasificación                                     | Mecanismo de acción  | Grupo                 | Subgrupo                                  | Ejemplos   |
|---|--|-----------------------|---|--|
| A. Inhibidores de la síntesis de la pared celular | Bloquean los sitios de unión para las enzimas bacterianas participantes en la síntesis de la pared celular, inhibiendo directamente a éstas últimas, o bien, impidiendo el transporte y/o la reactividad de las moléculas precursoras. | β-lactámicos          | Penicilinas                               |  |
|   |  |                       | 1. Naturales                              | 1. Penicilina G y V<br>Benzatina                             |
|   |  |                       | 2. Resistentes a penicilinasas            | 2. Meticilina<br>Cloxacilina<br>Dicloxacilina<br>Oxacilina   |
|   |  |                       | 3. Aminopenicilinas                       | 3. Amoxicilina<br>Ampicilina                                 |
|   |  |                       | 4. De espectro extendido                  | 4. Azlocilina<br>Carbencilina<br>Mezlocilina<br>Piperacilina |
|   |  | Cefalosporinas        |   |  |
|   |  | a. Primera generación | a. Cefazolina<br>Cefalexina<br>Cefalotina |  |
| b. Segunda generación                             | b. Cefuroxima<br>Cefaclor<br>Cefamandol<br>Cefoxitina  |                       |   |  |
| c. Tercera generación                             | c. Cefotaxima<br>Ceftazidima<br>Ceftriaxona  |                       |   |  |
| d. Cuarta generación                              | d. Cefepima<br>Cefpiroma   |                       |   |  |
| Carbapenems                                       | Imipenem<br>Meropenem  |                       |   |  |
| Monobactamas                                      | Aztreonam  |                       |   |  |
|   |  | Glucopéptidos         |   | Vancomicina<br>Teicoplanina<br>Daptomicina<br>Ramoplanina    |

**Tabla 3.** Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos [7, 15, 19].

| Clasificación   | Mecanismo de acción  | Grupo  | Ejemplos  |
|---|--|--|---|
| B. Inhibidores de la síntesis de proteínas            | Afectan la función de la subunidad ribosómica 50S y causan inhibición reversible de la síntesis proteica   | Macrólidos   | Eritromicina<br>Azitromicina<br>Claritromicina                                    |
|   |  | Cloranfenicol  | Cloranfenicol   |
|   |  | Lincosamidas   | Clindamicina<br>Lincomicina   |
|   |  | Estreptograminas   | Quinupristina/dalfopristina   |
|   |  | Oxazolidinonas   | Linezolid   |
|   | Compuestos que se unen a la subunidad ribosómica 30S y alteran la síntesis de proteínas  | Tetraciclinas  | Tetraciclina<br>Clortetraciclina<br>Doxiciclina<br>Minociclina<br>Oxitetraciclina |
|   | Aminoglucósidos  | Gentamicina<br>Tobramicina<br>Amikacina<br>Kanamicina<br>Neomicina<br>Estreptomina |   |
| C. Inhibidores de la función de la membrana celular   | Agentes que alteran la membrana de la célula bacteriana, produciendo la pérdida de macromoléculas y de iones esenciales para la supervivencia de la célula | Polimixinas  | Polimixinas (A, B, C, D, E o colistina)   |
|   |  | Polienos   | Monensina   |
| D. Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos | Inhiben a la DNA girasa y de esta manera la síntesis de DNA  | Quinolonas   | Ciprofloxacina<br>Enoxacina<br>Levofloxacina<br>Norfloxacina<br>Ofloxacina        |
|   | Se cree que involucra interacciones directas entre el fármaco activo y el DNA, que produce la ruptura de la cadena de DNA                                  | Metronidazol   | Metronidazol  |
|   | Se une a la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA e inhibe la síntesis de mRNA  | Rifamicina   | Rifampicina   |
| E. Antimetabolitos                                    | Interfieren con la vía del ácido fólico al unirse a la enzima dihidropteroato sintetasa (Sulfonamidas) y a la dihidrofolato reductasa (trimetoprima)       | Sulfonamidas   | Sulfametoxazol<br>Sulfacetamida<br>Sulfadiazina<br>Sulfapiridina<br>Sulfasalazina |
|   |  | Trimetoprima   | Trimetoprim   |

## **2.2 Uso de los antibióticos**

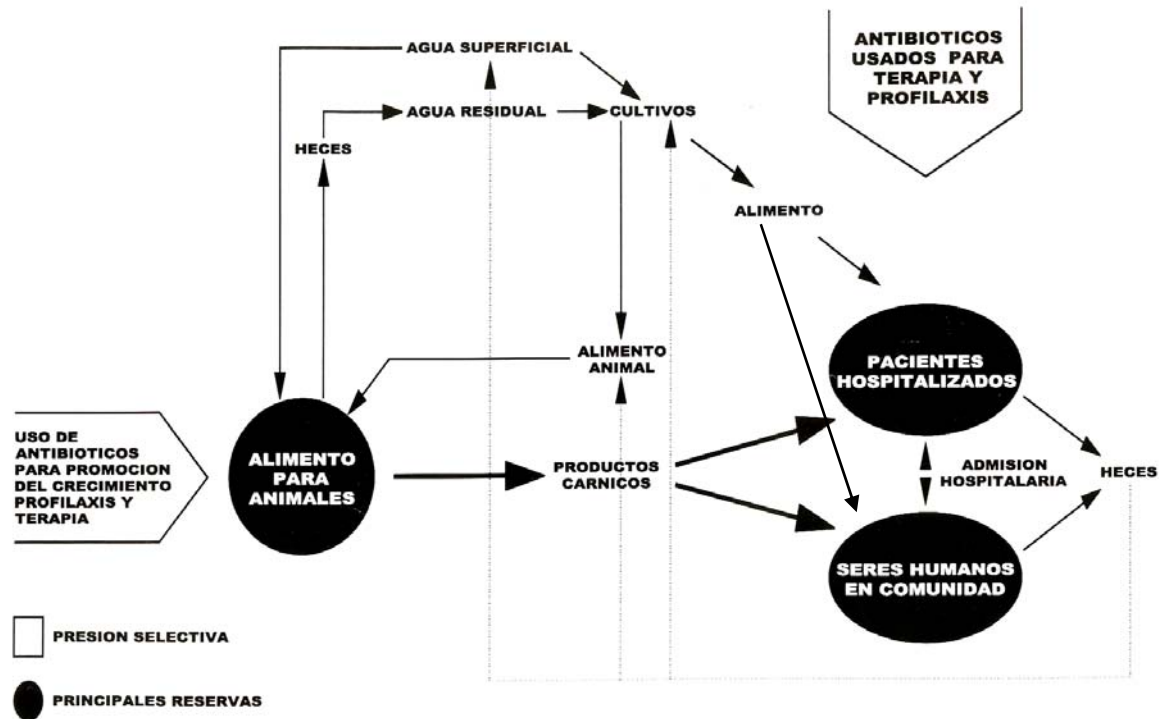
El uso de los agentes antimicrobianos es común en distintos ambientes como lo son :

- Medicina humana
- Medicina veterinaria
- Crianza de animales
- Agricultura
- Acuicultura

En la práctica de la crianza de animales (ganado, aves de corral), el uso de agentes antimicrobianos se emplea con varios fines:

- Quimioterapia (tratamiento de enfermedades)
- Profilaxis (prevención de enfermedades)
- Promotores del crecimiento (animales de engorda)

La práctica rutinaria del uso de agentes antimicrobianos es un factor importante en la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos, que subsecuentemente pueden ser transferidas de los animales al humano a través de la cadena alimenticia (Fig. 2 ) [3, 25, 47, 57, 61, 64, 66, 68].



**Fig. 2.** Relación entre bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia: presión selectiva, principales reservorios y rutas de transmisión [66].

### 2. 3 Antimicrobianos Promotores del Crecimiento

Los antimicrobianos promotores del crecimiento son adicionados al pienso de los animales para estimular su crecimiento (Tabla 4)

El mecanismo por el cual los antibióticos ejercen un efecto sobre el crecimiento de los animales no está totalmente definido; se cree que su efecto se debe a que reducen la flora normal del intestino (la cual compite con el hospedador por los



nutrientes) y a las bacterias dañinas del intestino (las cuales pueden reducir el funcionamiento por causar enfermedades subclínicas) [63, 12].

Los antibióticos son ahora utilizados rutinariamente como suplemento en el alimento para animales. Se ha estimado que dicha práctica en Estados Unidos ha contribuido a un ahorro de \$3.5 billones de dólares por año en la producción de carne de res, puerco, pollo y pavo. Si ésta práctica se eliminara o se redujera, incrementarían los costos de producción de carne y por lo tanto el costo de la carne [12].

#### **2. 4 Proporción de antibióticos utilizados en humanos y animales**

En el año de 1997 en la Unión Europea y Suiza se utilizaron 5 460 000 kg de antibióticos en humano, 3 465 000 kg en animales y 1 575 000 kg como antibióticos promotores del crecimiento [57]. En 1990 en Holanda se usaron 80 000 kg de antibiótico en humanos y 800 000 kg en animales [61]. En 1994 en Dinamarca se utilizaron 24 kg de vancomicina en terapia humana, comparada con 24 000 kg de avoparcina utilizada como aditivo en el alimento para animales. En Australia un promedio de 582 kg de vancomicina fue importada para propósitos médicos y 62 642 kg de avoparcina para el manejo de animales, por año [63, 65]. En el año 2001 se estimó que en Estados Unidos anualmente se utilizaron 29 millones de libras de agentes antimicrobianos en alimentos para animales, de los cuales 25 millones de libras fueron utilizadas con propósitos no terapéuticos [3].

**Tabla 4 :** Promotores de crecimiento autorizados y prohibidos o restringidos en México [11]

| <b>Clase</b>  | <b>Subclase</b>  | <b>Ingrediente activo de producto farmacéutico veterinario</b>  |   |
|---|--|---|---|
| Promotores de crecimiento y/o rendimiento               | Antibióticos   | Avoparcina<br>Avilamicina<br>Vancomicina<br>Teicoplanina<br>Bacitracina<br>Banbermicina<br>Tilosina<br>Espiramicina<br>Virginiamicina<br>Salinomicina de sodio<br>Flavofosfolipol |   |
|   | Sustancias obtenidas de organismos genéticamente modificados | Somatotropina bovina<br>Somatotropina porcina   |   |
|   | Beta agonistas   | Zilpaterol<br>Ractopamina   |   |
|   | Arsenicales  | Arseniato de sodio  |   |
|   | Probióticos  | Lactobacillus<br>Levaduras  |   |
|   | Otros  | Caseinato de sodio<br>Enzimas<br>Microorganismos ruminales<br>Metionina zinc<br>Cobre<br>Zinc<br>Cromo  |   |
| <b>Ingredientes activos prohibidos y/o restringidos</b> |  |   |   |
| <b>Clase</b>  | <b>Subclase</b>  | <b>Ingrediente activo</b>   | <b>Dictamen</b>   |
| Promotores de crecimiento                               | Agonistas beta adrenérgicos                                  | Clenbuterol   | Prohibido su empleo en animales destinados al consumo humano<br>Autorizado como broncodilatador en caballos |

### **3. Resistencia a los antibióticos**

Además de los diversos factores fisicoquímicos y ambientales que causan insensibilidad a los antibióticos, los enterococos poseen un amplio espectro de resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos (Tabla 5) [31, 35].

#### **3.1 Resistencia intrínseca**

La resistencia a los antimicrobianos que es el resultado del estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo se denomina resistencia intrínseca. Esta característica es una propiedad específica de organismos que constituyen un grupo, un género o una especie bacteriana en particular.

Los perfiles de resistencia intrínseca son marcadores útiles para ayudar a la identificación de ciertas bacterias o grupos bacterianos [15, 35 44]

#### **3.2 Resistencia adquirida**

La resistencia adquirida es causada por cambios en la composición genética habitual del microorganismo, lo que da como resultado alteraciones en la fisiología y en la estructura celular del microorganismo.

La resistencia adquirida puede ocurrir si están presentes dos prerequisites (i) El potencial genético de los microorganismos (acumulación de mutaciones en el DNA que finalmente trae como consecuencia la resistencia, o la adquisición de genes de resistencia transferidos de una célula donadora) y (ii) la presión selectiva de antibióticos (uso terapéutico y no terapéutico de antibióticos).

A diferencia de la resistencia intrínseca, la adquirida puede ser un rasgo asociado con solo algunas cepas de un grupo o especie de microorganismos, pero no con otros. Por consiguiente, la presencia de este tipo de resistencia es impredecible [15, 35, 44].

**Tabla 5:** Resistencia intrínseca y adquirida a diversos antimicrobianos presentada por *Enterococcus spp.* [5, 16, 20, 31, 35, 47, 57, 61]

| Resistencia intrínseca                                | Resistencia adquirida                     |
|---|---|
| Aminoglucosidos (bajo nivel)                          | Aminoglucósidos (alto nivel)              |
| Cefalosporinas  | Ampicilina –Penicilina                    |
| Lincosamidas (lincomicina y clindamicina)             | Cloranfenicol                             |
| Penicilinas resistentes a penicilinasas               | Glucopéptidos (Vancomicina, teicoplanina) |
| Polimixinas   | Macrólidos (Eritromicina)                 |
| Quinolonas (susceptibilidad intermedia o resistentes) | Tetraciclina                              |
|   | Trimetoprim- Sulfametoxazol               |

### 3.3 Resistencia cruzada

La resistencia cruzada implica resistencia por parte de los microorganismos hacia diferentes fármacos químicamente relacionados o con modos similares de enlace o de acción; los cuales son afectados de igual forma por el mismo mecanismo de resistencia microbiana [5, 60].

La resistencia cruzada existe entre antibióticos relacionados, utilizados terapéuticamente en humanos o animales (Tabla 6).

**Tabla 6:** Antibióticos utilizados en medicina veterinaria que provocan resistencia cruzada con antibióticos utilizados en medicina humana [3, 23, 35]

| Animales       | Humanos                     |
|----------------|-----------------------------|
| Lincomicina    | Clindaminina                |
| Virginiamicina | Quinupristina/dalfopristina |
| Avoparcina     | Vancomicina                 |
| Tilosina       | Eritromicina                |
| Avilamicina    | Evernimicina                |

### 3.4 Mecanismos de resistencia

Una bacteria puede adquirir resistencia a los antibióticos, ya sea experimentando mutaciones puntuales en su DNA, pero sobretodo, mediante conjugación (recibiendo plásmidos o transposones de resistencia) [19].

Los mecanismos básicos por los que una bacteria puede resistir al efecto de los antibióticos (Fig. 3) son los siguientes:

- Degradación enzimática o modificación del agente antimicrobiano: El modelo principal de este mecanismo alude a las  $\beta$ -lactamasas bacterianas, las cuales escinden el anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas, la región activa de estas moléculas, redituando una estructura abierta que no es reconocida por los receptores de las  $\beta$ -lactaminas (PFPs4). Otra clase de enzimas bacterianas agregan diferentes sustituyentes a la molécula original, redituando estructuras que no reconocen su sitio de acción [19].
- Disminución de la captación o acumulación del agente antimicrobiano: este mecanismo se debe a alteraciones en la membrana bacteriana por cambios en el número o las características de los canales de porinas que reducen la captación del fármaco y/o por contar con proteínas de membrana que funcionan como bombas de reflujo del antibiótico, ya que lo bombean fuera de la célula bacteriana después de haber ingresado; de esta forma se mantiene la concentración intracelular del antibiótico en un nivel suficientemente bajo como para que el procesamiento del DNA continúe relativamente sin alteraciones. Estas estrategias resultan particularmente eficaces en contra de antibióticos que requieren ingresar a la célula bacteriana para ejercer su acción bacteriostática o bactericida [15, 19].
- Modificación del sitio de acción: Esta alteración disminuye la capacidad del fármaco para unirse al blanco de acción. Por ejemplo la alteración de ribosomas en mutantes resistentes a estreptomicina, metilación del RNA

➤

ribosomal, que inhibe la unión de eritromicina, y alteración de las proteínas ligadoras de penicilina, que conducen a la resistencia de  $\beta$ -lactamas. Un mecanismo relacionado involucra la creación de un segundo blanco que permite al organismo el desvío del blanco susceptible [44].

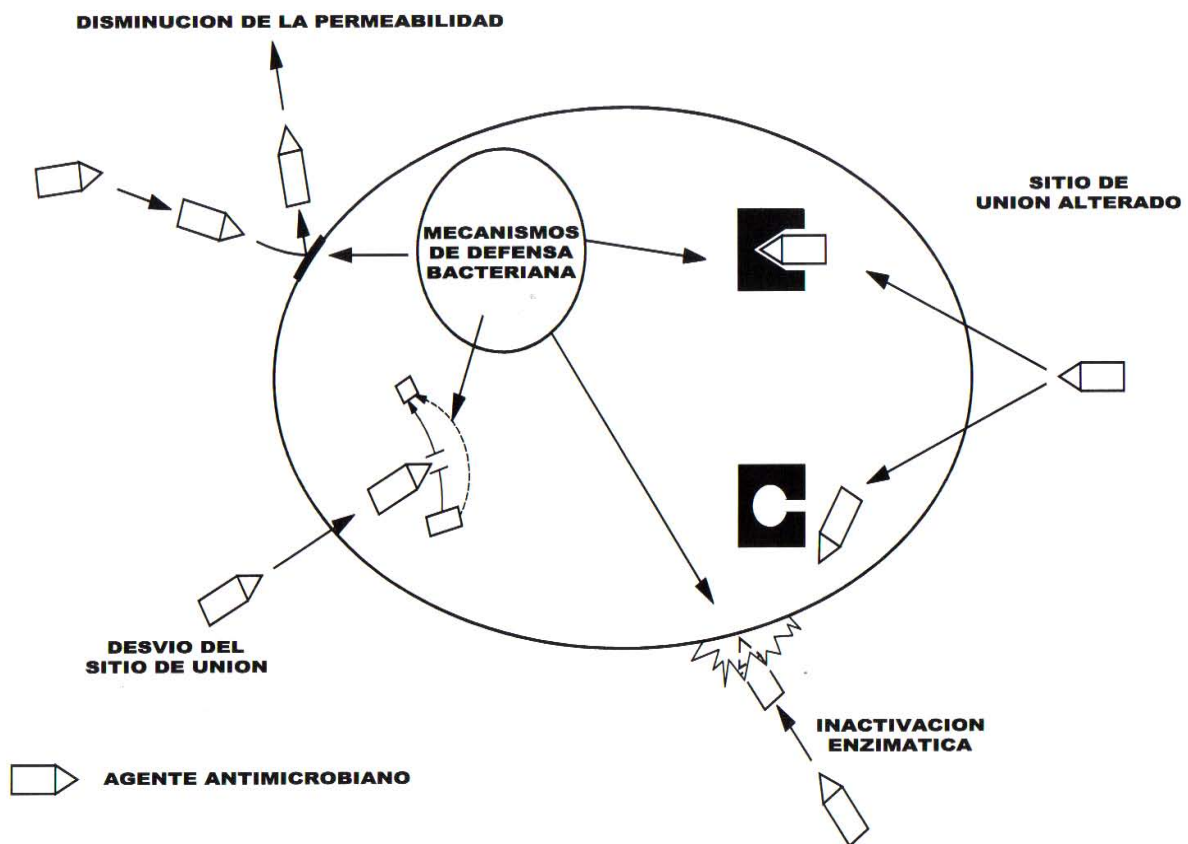


Fig. 3. Mecanismos básicos de resistencia bacteriana a los antibióticos [44].

## **4. Intercambio genético y diversidad genética**

Los cambios genéticos entre las cepas de procariotes están muy difundidas y contribuyen de manera importante a la notable diversidad genética.

El cambio genético en las bacterias se produce por tres mecanismos básicos: mutación, recombinación genética e intercambio genético entre las bacterias [5, 15].

### **4.1 Mutación**

Las mutaciones son cambios en la secuencia del DNA, o sea un cambio en el genotipo del organismo. Tradicionalmente las mutaciones ocurren en el DNA cromosomal, pero también pueden ocurrir en plásmidos o transposones. Las mutaciones incluyen sustituciones de bases, pérdida, inserción y reordenamiento de bases. Los cambios mutacionales en la secuencia pueden generarse de manera espontánea, quizá por un error durante la replicación del DNA. De modo alternativo, las mutaciones pueden ser inducidas por factores químicos o físicos (mutágenos) del medio ambiente, o por factores biológicos como la introducción de DNA extraño a la célula.

A través de la mutación pueden producirse diversos resultados que dependen del sitio y de la magnitud de la mutación. Por ejemplo una mutación puede ser tan



devastadora que sea letal para el organismo. En otros casos la mutación puede ser silenciosa, de modo que no se detecte ningún cambio en el fenotipo del organismo. De manera alternativa, la mutación suele dar como resultado un cambio manifestado en el fenotipo del organismo, lo que puede proporcionarle una ventaja en la supervivencia. Las mutaciones no letales se consideran estables si se transmiten de una generación a otra como parte integral del genotipo de la célula. Además los genes con mutaciones estables también pueden transferirse a otras bacterias por uno de los mecanismos de intercambio genético. En otros casos las mutaciones pueden perderse a través de los mecanismos de reparación de la célula, que restauran el fenotipo y genotipo originales, o perderse de manera espontánea durante los ciclos subsecuentes de replicación del DNA [5, 15, 44].

#### **4.2 Recombinación genética**

En el proceso de recombinación, algún segmento de DNA que se originó en una célula bacteriana (donante) entra en una segunda célula bacteriana (receptora) y es intercambiado con un segmento de DNA del genoma receptor. La recombinación puede ser legítima (homóloga), una consecuencia de la gran similitud en la secuencia del DNA donado y el receptor, o ilegítima (no homóloga), resultado de una recombinación catalizada por enzimas entre secuencias de DNA diferentes [5, 15].

### **4.3 Intercambio genético**

El intercambio genético entre bacterias se caracteriza por la transferencia de fragmentos relativamente pequeños de un genoma donador a una célula receptora. El intercambio genético está mediado por tres diferentes procesos que se diferencian por el modo de transferencia de DNA de una célula a otra. Estos procesos son transformación, transducción y conjugación [5, 18].

#### **4.3.1 Transformación**

La transformación incluye la captación por la célula receptora de DNA libre en el ambiente tras la muerte y lisis de otra célula bacteriana (donante). Este DNA, que constituyó el genoma de la célula muerta, existe como fragmentos en el ambiente. La captación de moléculas de DNA por la bacteria receptora es un proceso activo que requiere energía. No implica la entrada pasiva de moléculas de DNA a través de paredes celulares y membranas permeables. Por lo que la transformación solo ocurre en las células competentes que son capaces de funcionar como receptores en la transformación, ya que poseen el denominado factor de competencia (probablemente una proteína de la superficie celular o una enzima que interviene en la unión o captación de DNA) producido solo en momentos específicos durante el ciclo de crecimiento.

El proceso de transformación puede dividirse en varias etapas: 1) unión reversible de moléculas bicatenarias o de doble cadena de DNA a los sitios receptores de la superficie celular; 2) captación irreversible del DNA del donador; 3) conversión de las moléculas bicatenarias de DNA del donador en moléculas de cadena sencilla o monocatenarias por digestión nucleolítica de una cadena; 4) integración de toda o parte de la cadena sencilla de DNA del donador en el cromosoma del receptor y 5) segregación y expresión fenotípica del gen o genes donadores integrados en la célula recombinante (transformada).

El proceso de transformación desempeña un papel fundamental en el desarrollo de resistencia a los antibióticos en algunos organismos. Estos organismos incluyen *Haemophilus influenzae* y gonococos, los cuales son naturalmente transformables y hay organismos como *E. coli* y enterococos, los cuales pueden transformarse solo por manipulación en el laboratorio; además de la diseminación de genes que codifican los factores esenciales para otorgarle a un microorganismo la capacidad de causar enfermedad. El intercambio genético por transformación no se limita a los microorganismos de la misma especie [5, 15, 18, 44].

### **4.3.2 Transducción**

El proceso de la transducción está mediado por virus que infectan bacterias (bacteriófagos). En su ciclo de vida estos virus integran su DNA dentro del cromosoma de la célula bacteriana, donde se dirige la replicación y la expresión del DNA viral. Cuando la producción del DNA viral se completa, este se escinde (corta) del cromosoma bacteriano y se empaqueta dentro de envolturas proteicas. Los virus se liberan luego, cuando la célula bacteriana se lisa. En la transducción, el virus, no solo empaqueta su propio DNA, también puede empaquetar una porción del DNA de la bacteria donante. Se conocen dos tipos de transducción. 1) En la transducción generalizada, un segmento al azar o casi al azar de DNA bacteriano es envuelto durante la maduración del fago en vez del, o junto con el, cromosoma del fago en algunas partículas hijas denominadas partículas transductoras. Los fagos de transducción generalizada pueden de este modo transportar cualquier gen de la célula donadora a la célula receptora. 2) En la transducción especializada (también denominada transducción restringida), ocurre un evento de recombinación en el que intervienen el cromosoma hospedante y el material genético del fago, lo que da como resultado que el material genético del fago contenga un segmento de DNA bacteriano. Las partículas de transducción especializada de este modo siempre contienen tanto DNA bacteriano como del fago. La transducción especializada se denomina de esta manera porque un virus

determinado efectúa la transducción solo de los marcadores genéticos del hospedante que están localizados en una región pequeña del cromosoma bacteriano [15, 18].

### **4.3.3 Conjugación**

Este proceso se produce entre dos células vivas; durante la conjugación, el DNA es transferido de una célula donadora a una célula receptora a través de una conexión intracelular especializada o tubo de conjugación (Apéndices superficiales especializados que se denominan pili F). Con el contacto intracelular especializado, se emprende la movilización cromosómica que incluye la síntesis del DNA. Una nueva cadena de DNA es producida por el donante y pasa al receptor, donde se sintetiza una cadena complementaria a la cadena del donante. La síntesis del pili F está controlada por varios genes que se localizan en una molécula circular pequeña de DNA o minicromosoma denominado factor F. Las células que portan un factor F ( $F^+$ ) forman tubos de conjugación con células que no portan un factor F ( $F^-$ ); al conjugarse todas las células de la nueva población serán  $F^+$  (Fig. 4). El factor F puede existir en dos estados diferentes: 1) El estado autónomo, en el cual se duplica de manera independiente del cromosoma hospedante y 2) El estado integrado, en el cual está insertado de manera covalente en el cromosoma hospedante y se duplica junto con este.

El factor  $F^+$  se puede integrar en numerosos *loci* en el cromosoma de células donadoras, se cree que la integración del factor F está mediada por secuencias cortas de DNA denominados elementos *IS*. Una célula que porta un factor F integrado se denomina *Hfr* (alta frecuencia de recombinación). En el estado integrado, el factor F media la transferencia de un cromosoma de la célula *Hfr* a una célula receptora ( $F^-$ ).

Además del DNA cromosómico los genes codificados en elementos genéticos no cromosómicos, como los plásmidos y los transposones pueden transferirse por conjugación. El DNA del plásmido también puede incorporarse en el cromosoma de la célula huésped.

Al contrario de lo que sucede con los plásmidos, los transposones no existen en forma independiente dentro de la célula. Excepto cuando se están moviendo de un sitio a otro, los transposones deben estar incorporados en el cromosoma, en los plásmidos o en ambos.

Los enterococos contienen diversos plásmidos conjugativos para diversos huéspedes que intervienen en la transferencia y transmisión de genes de resistencia entre microorganismos Gram positivos. La conjugación puede ocurrir en el tracto intestinal, entre microorganismos no patógenos y patógenos [5, 7, 15, 18].

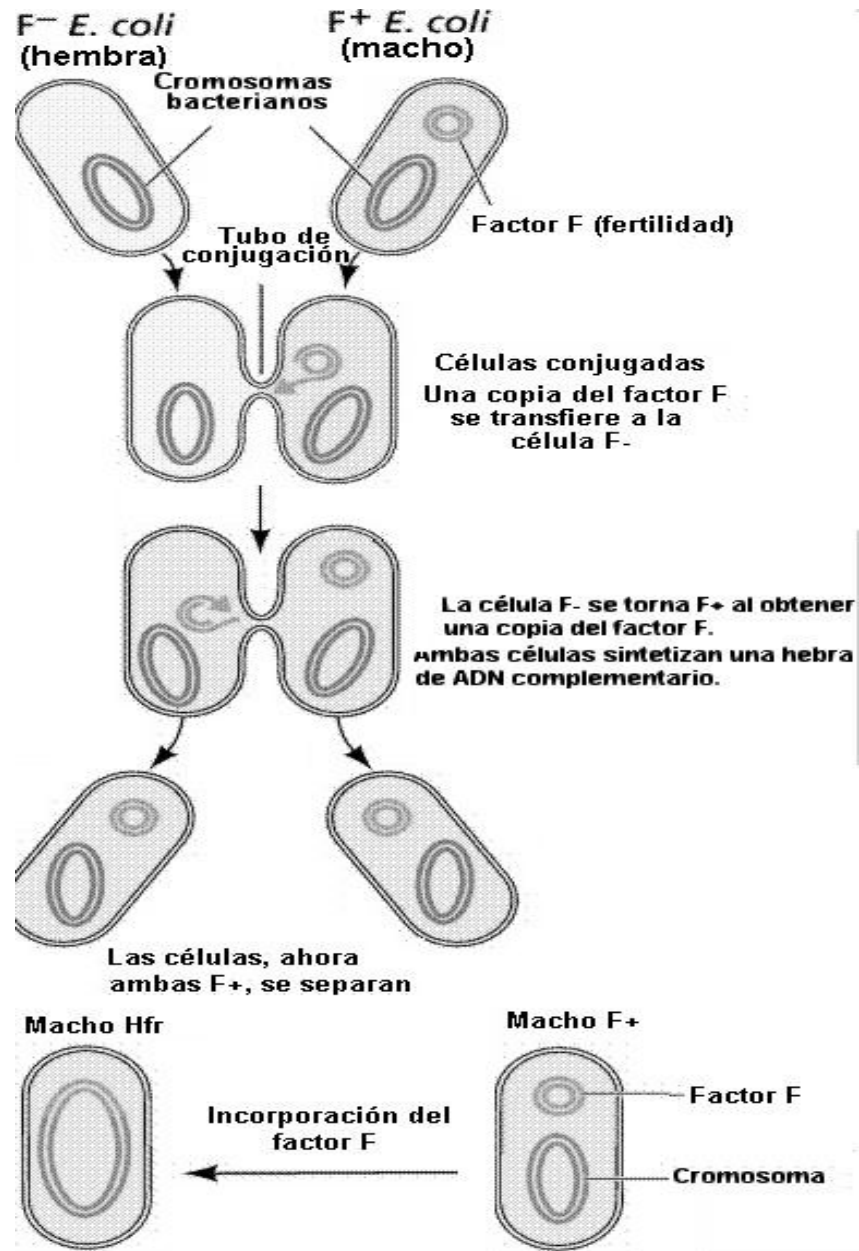


Fig. 4. Síntesis del pili F [21].

## **5. Elementos genéticos móviles**

El hallazgo de determinantes de resistencia con propiedades similares en organismos y ecosistemas notoriamente distintos sugiere la ocurrencia de un flujo genético entre células de diferentes comunidades microbianas.

Se han descubierto tres mecanismos de diseminación y adquisición de genes de resistencia (conjugación, transformación y transducción) a través de elementos genéticos móviles como son plásmidos, transposones, y genes cassettes en integrones [22, 25, 40].

### **5.1 Plásmidos**

Un plásmido es una unidad de material genético extracromosomal capaz de duplicarse independientemente; su replicación depende de las mismas enzimas que replican al cromosoma de la célula huésped, y se distribuye en las células hijas en la división celular, al mismo tiempo que el cromosoma del huésped. La mayoría de los plásmidos son prescindibles, esto es, no se requieren para la supervivencia de la célula en la que residen. En muchos casos, sin embargo, son esenciales en ciertas condiciones ambientales, como en presencia de un antibiótico.



Se han estudiado de manera extensa tres tipos principales de plásmidos: 1) Los plásmidos F y F', que son los factores de fertilidad de la conjugación; 2) Los plásmidos R, son plásmidos que portan genes de resistencia a antibióticos y otros fármacos antibacterianos; y 3) Los plásmidos Col, son plásmidos que codifican colicinas, que son proteínas que matan células sensibles de *E. coli*.

Los plásmidos pueden dividirse en dos grupos:

- 1) Los plásmidos conjugativos o transmisibles que median la transferencia de DNA por conjugación. Todos los plásmidos F y F', muchos plásmidos R y algunos plásmidos Col son conjugativos.
- 2) Los plásmidos no conjugativos o no transmisibles son aquellos que no median la transferencia de DNA por conjugación: Muchos plásmidos R y Col son no conjugativos [18, 24, 38, 53].

### **5.1.1 Plásmidos R**

Todos los plásmidos R conjugativos tienen al menos 2 componentes: el RTF (factor de transferencia de resistencia) y uno o más determinantes R. El RTF porta un juego de genes que intervienen en la transferencia conjugativa de los plásmidos entre bacterias y los determinantes R que son genes que pueden codificar para la resistencia a uno o más antimicrobianos (resistencia múltiple).

La naturaleza conjugativa de muchos plásmidos R tiene gran importancia en la rápida diseminación de genes de resistencia a antibióticos a través de bacterias patógenas, además que se transmiten entre especies y aún entre líneas genéricas [18, 24, 38, 53]. Un ejemplo de plásmido conjugativo multirresistente es el plásmido pRE25 obtenido de las cepas de *E. faecalis* aisladas de embutidos crudos, el cual era multirresistente a 12 antibióticos [58].

Resultados de estudios en Japón, señalan que en menos de 10 años las poblaciones naturales de bacterias ha evolucionado de frecuencias muy bajas (menos de 1%) de resistencia a antibióticos mediada por plásmidos R a una frecuencia relativamente alta (50-80%) [18].

## 5.2 Transposones

Los transposones son elementos genéticos (segmentos de DNA) capaces de moverse entre varias estructuras genéticas intracelularmente ( en las bacterias los transposones pueden moverse dentro de los plásmidos, desde un plásmido a un cromosoma o a otro plásmido) o entre células bacterianas (transposones conjugativos). La especificidad de la secuencia en el sitio de inserción suele ser escasa, y debido a esto los transposones a menudo parecen insertarse según un patrón aleatorio. Como muchas de estas inserciones rompen genes, los transposones frecuentemente causan mutaciones. El tamaño de los transposones

varía entre 2.000 y 50.000 pares de bases (pb). El tipo más frecuente de genes que llevan los transposones son aquellos que confieren resistencia a los antibióticos.

Los transposones bacterianos más sencillos son las secuencias de inserción o elementos IS. Miden menos de 1500 pb y solo contienen genes que intervienen en la promoción o la regulación de la transposición. Algunas veces dos elementos IS homólogos flanquean uno o varios genes funcionales para formar un transposón compuesto (Tn). La secuencia entre los elementos IS pueden entonces ser transpuesta por la actividad conjunta de los elementos que la flanquean. Otro grupo mayor de transposones, son los transposones complejos, consiste de elementos en donde la transposasa/resolvasa es codificada junto con otros genes como genes de resistencia a antibióticos dentro de una estructura flanqueada por repeticiones cortas invertidas.

Los transposones conjugativos presentes en los enterococos tienen un rango extremadamente amplio de transferencia al hospedador y de transposición de genes de resistencia a antibióticos [5, 9, 18, 24, 45, 55].

### **5.3 Integrones**

Las primeras pistas sobre la existencia de esta clase de elementos se obtuvieron estudiando el transposón Tn21. Analizando las funciones de recombinación de este elemento se observaron una clase de recombinantes sitio-específicos diferentes de los producidos por la transposasa e independientes de esta y de los extremos invertidos del transposón. El estudio de estos recombinantes y de las secuencias requeridas para su obtención, revelaron la presencia de un elemento independiente, denominado integrón dentro del transposón Tn21 [17].

El término integrón o elemento de integración fue propuesto por Stokes y Hall en 1989, aunque la actual definición fue introducida en 1995 por Hall y Collins [22].

Un integrón es un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específica se incorporan uno o un grupo de genes estructurales (generalmente genes de resistencia a antibióticos). Los integrones se encuentran en el DNA cromosomal como en el DNA extracromosomal [51, 17].

Hasta hoy se han identificado cuatro clase de integrones, que se distinguen por la integrasa que codifican. La mayoría de los integrones identificados pertenecen a la clase I [17, 67].

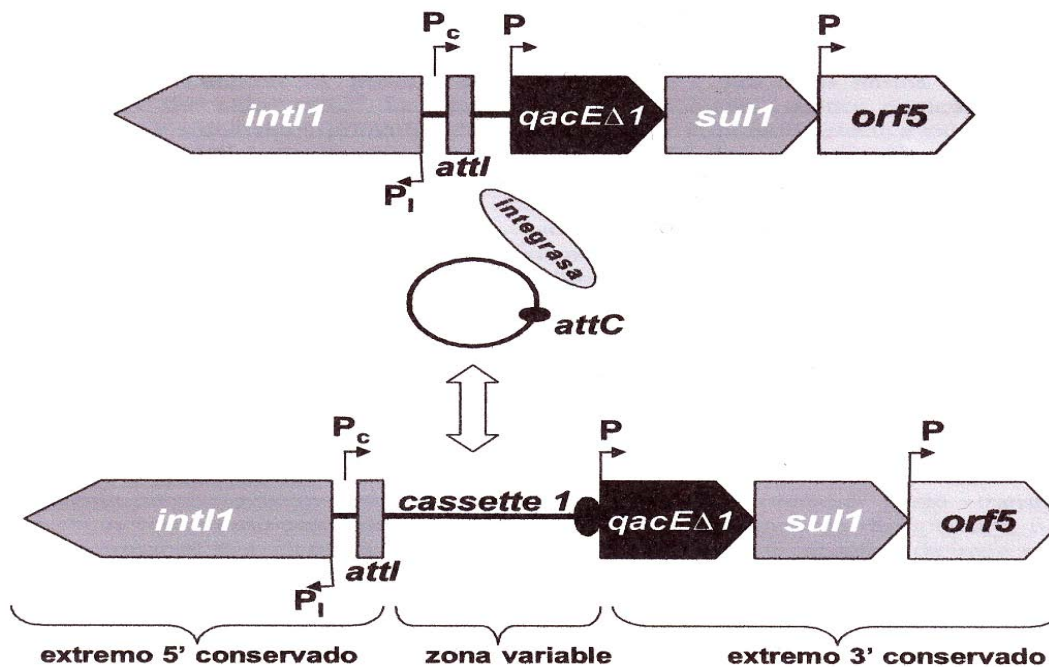
Los integrones presentan una estructura específica que consiste en dos segmentos conservados, el segmento 5' (5'-CS) y el segmento 3'(3'-CS), que se encuentran separados por una región central variable (Fig. 5) [51, 40].

En los integrones de clase I el segmento conservado 5' contiene el gen que codifica una recombinasa sitio específica, la integrasa (*int I*), esta enzima cataliza la recombinación sitio-específica entre dos secuencias cortas de DNA que pueden ser de dos clases: *attI* o *attC* denominadas también RHS (Recombination Hot Spots), que son sitios primarios de reconocimiento de la integrasa. En el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región con dos promotores divergentes ( $P_I-P_C$ ) que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales. El sitio de integración *attI* se localiza al lado 5' de la integrasa y marca la separación entre la región conservada 5' y la región central variable [17, 22, 26, 30, 40].

En el segmento conservado 3' se encuentra el gen *qacE $\Delta$ 1*, que codifica la resistencia a los antisépticos y desinfectantes (bromuro de etidio y compuestos cuaternarios de amonio), el gen *sull* que confiere resistencia a las sulfonamidas y un marco de lectura abierto (ERF), *orf5* [22, 40, 67].

En la región central variable se localizan los genes estructurales también llamados genes cassettes del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos) en número variable ( $In_0, In_1, In_2, \dots$ ). Los genes constitutivos en la región central están separados unos de otros por secuencias *attC*, también llamadas elementos de 59 pares de bases [17].

Se han caracterizado más de 70 diferentes genes cassettes de resistencia a antibióticos [50].

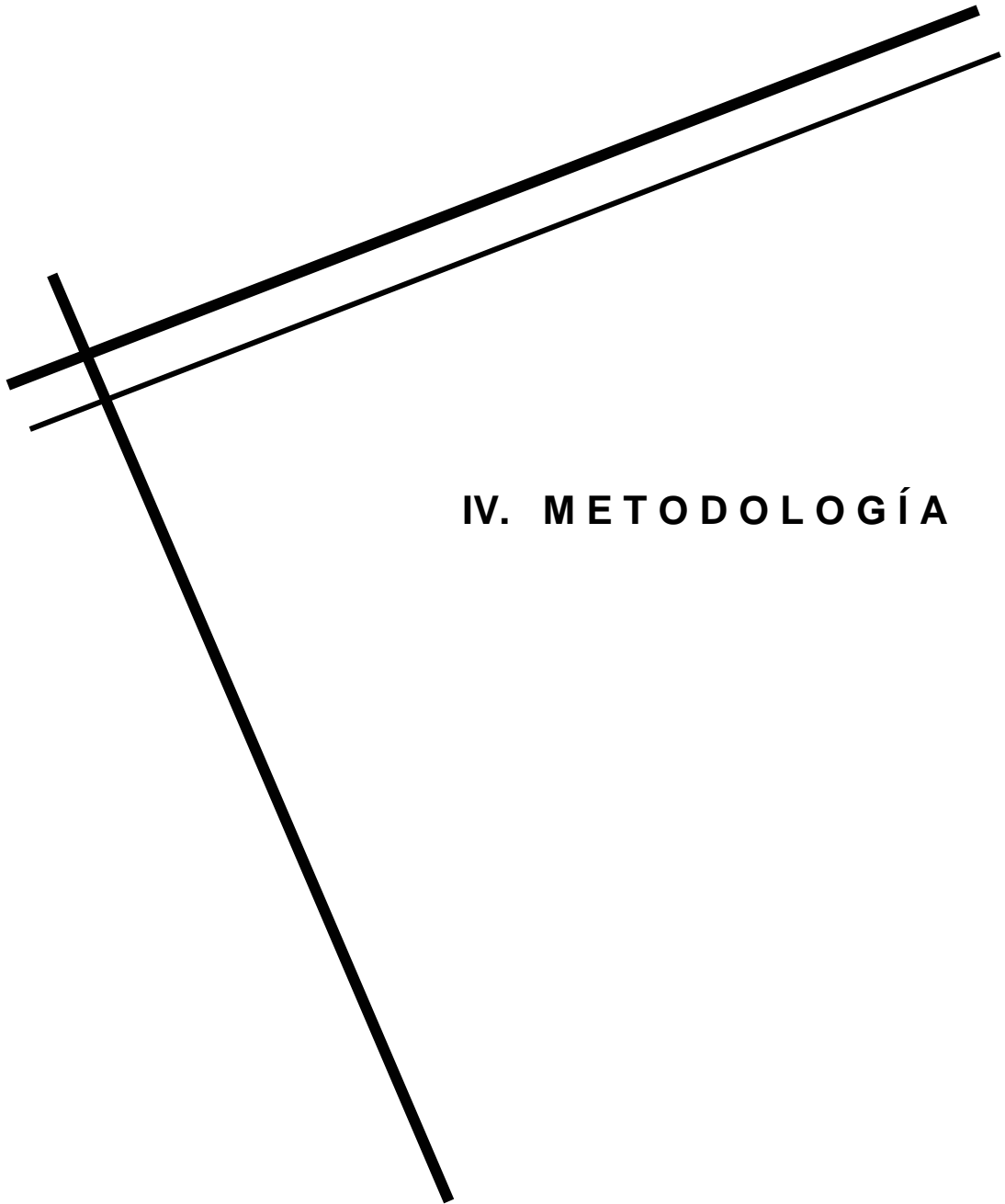


**Fig. 5.** Estructura básica de un integrón y de la adquisición de cassettes genéticos de resistencia. *IntI 1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los cassettes son integrados;  $P_i$ : promotor que transcribe la integrasa;  $P_c$ : promotor que dirige la transcripción de los cassettes integrados. *AttC*: sitio de recombinación del cassette genético.

### 5.3.1 Cassettes genéticos

Los cassettes genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen solo un marco de lectura abierto completo (orf) o región codificante. Además, formando parte de su estructura, a continuación del orf, existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o

sitio *attc*. Aunque se considera que los cassettes genéticos son elementos móviles, no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización. Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el cassette desde un integrón (Fig. 5). Esto indica que la recombinasa es necesaria para la integración de los cassettes, predominantemente dentro del sitio *attI* de otro integrón, aunque también es posible la recombinación entre dos sitios *attC*. Por este procedimiento se pueden generar integrones nuevos con cualquier combinación inimaginable de cassettes preexistentes [17, 22, 26].



## IV. METODOLOGÍA



## 1. Muestreo

Para la detección de *Streptococcus* resistentes a antibióticos, en este trabajo se utilizaron dos muestras de carne de pollo: carne molida de pollo e hígado de pollo. El muestreo de la carne molida de pollo se llevó a cabo en tres distintas cadenas de supermercados, mientras que los hígados de pollo se adquirieron en tres distintas pollerías, ambos muestreos se realizaron en la ciudad de México entre abril y junio del 2005. Las muestras se almacenaron en refrigeración y fueron procesadas 24 horas después del muestreo.

## 2. Aislamiento de *Streptococcus spp*

El aislamiento de estreptococos se realizó mediante la técnica descrita por R.H. Deibel y Paul A. Hartman en *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* [10].

Para el aislamiento de *Streptococcus spp* se utilizó la cuenta en placa en superficie.

De cada una de las muestras se hicieron cuatro diluciones en agua peptonada al 0.1%. Cada una de las diluciones se inoculó en placas con agar streptococcus (KF)<sup>1</sup>. Las placas se incubaron a 45°C durante 48 horas.

Para estudios posteriores se seleccionaron colonias características del género *Streptococcus*. Por cada muestra se seleccionaron 20 colonias.

### **3. Identificación presuntiva de *Enterococcus spp.***

#### **3.1 Siembra en caldo BHI**

Cada colonia se inoculó en 3 mL de caldo BHI<sup>2</sup> y se incubó a 37°C durante 24-48 horas.

Las cepas provenientes del caldo BHI se inocularon por estría en agar BHI<sup>2</sup>. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente se hicieron las siguientes pruebas:

#### **3. 2. Crecimiento en caldo BHI + 6.5% NaCl**

Las cepas aisladas se inocularon en caldo BHI + 6.5% NaCl<sup>2</sup>. La incubación se realizó a 37°C durante 24 - 48 horas.

Observación: El género *Enterococcus spp* crece en caldo BHI+6.5% NaCl.

### 3.3 Tinción de Gram

A cada una de las cepas se les realizó tinción de Gram.

Observación: Cocos Gram positivos agrupados en pares o en cadenas cortas.

### 3.4 Prueba de la catalasa<sup>9</sup> (Método del portaobjetos)

Se tomó una colonia de 18-24 horas de crecimiento en agar BHI y se colocó en un portaobjetos. Sobre la muestra se agregó una pequeña gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial [41].

Observación: La prueba es negativa para el género *Streptococcus spp.* ( No hay formación de burbujas).

Como control positivo se utilizó *M. luteus*

### 3.5 Siembra en Gelosa Sangre de Carnero

Las cepas provenientes de caldo BHI se inocularon por estría en Gelosa Sangre de Carnero. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### **4. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos**

Las cepas aisladas se inocularon en caldo BHI e incubaron durante 18-24 horas.

Para determinar la resistencia de las cepas aisladas a los antibióticos se realizó la prueba de susceptibilidad por difusión en discos en agar Mueller-Hinton <sup>3</sup>, inoculando 100 µl de cada cepa. A continuación se colocaron los multidiscos para bacterias Gram positivas marca BIO-RAD y se refrigeraron durante 10 minutos para facilitar la difusión de los antibióticos. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición y se interpretó la susceptibilidad a los antibióticos de acuerdo a parámetros establecidos <sup>11</sup>. Basándose en los halos de inhibición las cepas se clasificaron como Resistentes (R), Intermedias (I) o Susceptibles (S).

#### **5. Extracción de DNA total**

La extracción de DNA total se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Palumbi et al. (1991)

Con base en la prueba de susceptibilidad a antibióticos se seleccionaron cepas que fueron multirresistentes (9-12 antibióticos). Las cepas seleccionadas se cultivaron en 30 mL de caldo BHI con antibiótico 24 horas previas al procesamiento de las muestras, incubándolas a 37°C.

Para obtener las células, el cultivo se centrifugó por 15 minutos a 4 000 rpm. El pellet obtenido se trató con 2 mL de buffer de lisis <sup>6</sup> y arena estéril agitando durante 8 minutos. El sobrenadante se extrajo con un volumen igual de fenol equilibrado <sup>7</sup> centrifugando a 10 000 g's por 10 minutos a 4°C. A la fase acuosa se le adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a 10 000 g's durante 10 minutos a 4°C. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se le agregó un volumen igual de cloroformo, esta solución se centrifugó por 10 minutos a 10 000 g's a 4°C. El sobrenadante se mezcló con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 0.5 volúmenes de isopropanol, dejando reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo la solución se centrifugó a 10 000 g's durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con etanol al 70%, posteriormente se centrifugó a 10 000 g's por 10 minutos a temperatura ambiente. El etanol fue eliminado y el pellet se resuspendió en aproximadamente 30 µL de agua. Esta solución fue utilizada para detectar la presencia de integrones mediante la técnica de PCR. La cantidad y calidad de la extracción de DNA se estimó por electroforesis en gel de agarosa al 1% <sup>4</sup>.

## **6. Identificación de integrones por la técnica de PCR**

Para la identificación de integrones, se utilizó una técnica descrita en PCR Protocols a Guide to Methods and Applications [28].

Un  $\mu\text{L}$  de DNA (3 ng/ $\mu\text{L}$ ) se adicionó a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  de mezcla de PCR [20mM Tris (pH 8.3), 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5mM KCl, 50 $\mu\text{M}$  desoxirribonucleósidos trifosfato, 250 ng primers, 1U Taq polimerasa (Invitrogen)]. Se incluyó un control negativo sin DNA y un control positivo. La amplificación del DNA se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente ciclo térmico: desnaturalización de 3 minutos a 96°C, seguida por 30 ciclos de 15 segundos a 96°C, 30 segundos a 55°C, 90 segundos a 72°C, 10 minutos a 72°C. La mezcla se guardó a 4°C. Los productos de PCR se revelaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando como marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  (Hind III). El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) revelando con luz UV.

## **7. Identificación de especie**

La confirmación de género y la identificación de especie se llevó a cabo mediante un sistema comercial (Api 20 Strep), el cual cuenta con 20 ensayos bioquímicos<sup>10</sup>. Las cepas a probar se sembraron en placas de agar BHI 24 horas antes de la prueba a 34 °C.

Con ayuda de un hisopo se retiró todo el cultivo y se suspendió en 2 mL de medio de suspensión API<sup>5</sup> de manera tal que se obtuviera una turbidez superior a 4 McFarland. Esta suspensión se repartió en la primera mitad de la galería, el sobrenadante de la suspensión (aproximadamente 0.5 mL) se transfirió a otros 2 mL de medio de suspensión API, esta nueva suspensión se repartió en las cúpulas de la segunda mitad de la galería, las cuales posteriormente se sellaron con aceite de parafina. La galería se incubó a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas para una primer lectura y 24 horas para una segunda lectura.

La interpretación de las lecturas se llevó a cabo por medio de un software.



**V. RESULTADOS**



## **1. Aislamiento e identificación de *Enterococcus spp.***

En este estudio se aislaron y caracterizaron cepas de enterococos resistentes a diferentes antibióticos; las cepas se aislaron de carne molida de pollo e hígado de pollo de distinta procedencia. El muestreo se llevó a cabo en seis distintas tiendas (mercados y supermercados), en cada una de las cuales se realizaron dos muestreos.

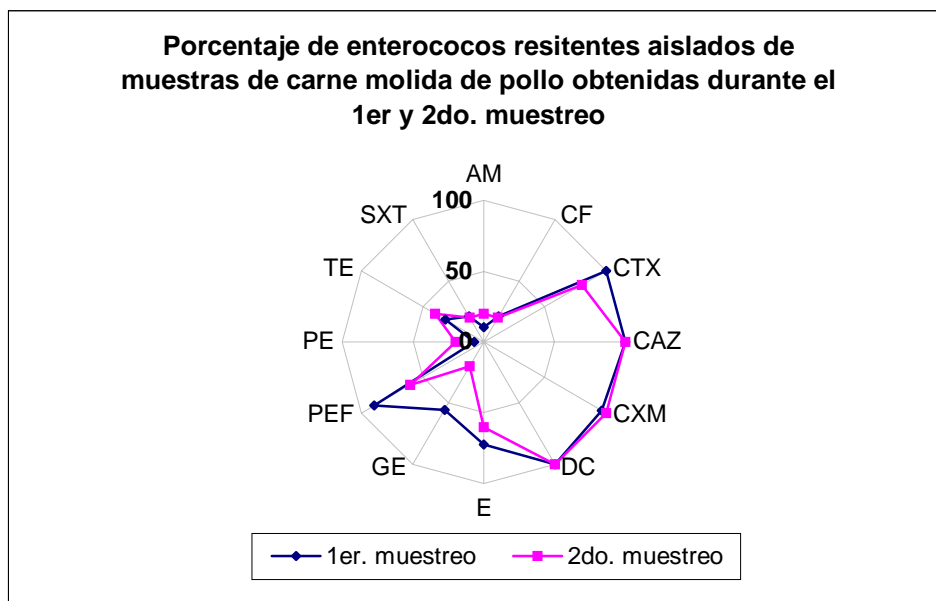
A partir de las 12 muestras de pollo se aisló un total de 103 cepas de enterococos, de las cuales 34 (33%) se aislaron de carne molida de pollo y 69 (67%) de hígado de pollo.

## **2. Susceptibilidad a los antibióticos**

A todas las cepas aisladas se les realizó la prueba de susceptibilidad a 12 antibióticos (Tabla 7 y 8).

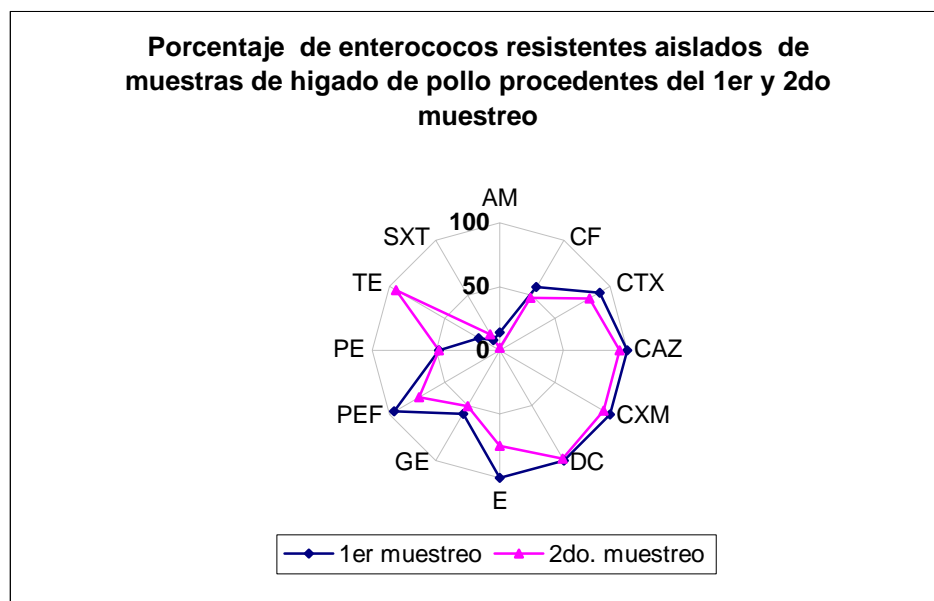
Al comparar entre los porcentajes de cepas de enterococos resistentes a distintos antibióticos aisladas de carne molida de pollo obtenidas durante el primer y segundo día de muestreo se encontró que: Todas las cepas mostraron el mismo patrón de resistencia o una pequeña variabilidad frente a la ceftazidima, cefuroxima y dicloxacilina; y el mismo patrón de susceptibilidad frente al trimetoprim-sulfametoxazol y a la cefalotina.

Se aisló un menor porcentaje de cepas resistentes a la cefotaxima, eritromicina, gentamicina y pefloxacina a partir de la carne molida adquirida en el segundo muestreo; destacando un 30% menos de cepas resistentes a estos dos últimos antibióticos. Aproximadamente 10% de las cepas aisladas de carne molida de pollo procedente del primer muestreo fue menos resistente a la ampicilina, penicilina y tetraciclina (Fig. 6).



**Fig. 6.** Porcentaje de cepas de enterococos resistentes a distintos antibióticos aisladas de muestras de carne molida de pollo obtenidas durante el primer y segundo día de muestreo.

Al comparar entre los porcentajes de cepas resistentes a los antibióticos probados, aisladas de hígado de pollo adquirido en el primer y segundo muestreo, se encontró: Una pequeña diferencia (0-9%) entre el número de enterococos resistentes a la mayoría de los antibióticos, siendo más resistentes las cepas aisladas de hígado de pollo obtenido del primer muestreo. A partir de hígado de pollo adquirido en el segundo muestreo se aislaron aproximadamente 20% menos de cepas resistentes tanto a la eritromicina como a la pefloxacina y 75% más de enterococos resistentes a la tetraciclina, en comparación con el porcentaje de cepas resistentes aisladas a partir de hígado de pollo proveniente del segundo muestreo (Fig. 7).



**Fig. 7.** Porcentaje de cepas de enterococos resistentes a distintos antibióticos aisladas de muestras de hígado de pollo obtenidas durante el primer y segundo día de muestreo.

Al comparar entre los porcentajes de cepas resistentes a los distintos antibióticos probados aisladas tanto de carne molida de pollo como de hígado de pollo obtenidas durante el primer y segundo día de muestreo, se encontró que: la variabilidad en el número de cepas resistentes entre cada una de las muestras fue de  $\leq 6\%$  para la ceftazidima, cefuroxima y dicloxacilina. Un comportamiento semejante se mostró frente a los antibióticos ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol en donde la diferencia de enterococos resistentes entre cada una de las muestras fue de  $\leq 10\%$ . Se obtuvo aproximadamente entre cada una de las muestras de 0-40% de cepas resistentes a la cefalotina, cefotaxima, eritromicina, gentamicina, pefloxacina y penicilina. La mayor discrepancia en el porcentaje de cepas aisladas, se dio frente a la tetraciclina, ya que se aisló entre 9-75% de cepas resistentes a partir de cada una de las muestras.

En general el mayor porcentaje de cepas resistentes se aisló a partir de las muestras de hígado de pollo obtenidas durante el primer día de muestreo, siendo el mayor porcentaje de estas cepas resistentes a ocho antibióticos (cefalotina, ceftazidima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, pefloxacina y penicilina); mientras que los enterococos aislados de carne molida de pollo procedente del segundo muestreo, mostraron la mayor proporción de cepas sensibles a cinco de los 12 antibióticos probados (cefalotina, cefotaxima, eritromicina, gentamicina y pefloxacina) (Fig. 8).

**Tabla 7:** Perfil de susceptibilidad de las cepas de enterococos aisladas de carne molida de pollo (primer y segundo muestreo).

A1 Carne molida de pollo supermercado 1 (Tienda 1)

A2 Carne molida de pollo supermercado 2 (Tienda 2)

C3 Carne molida de pollo supermercado 3 (Tienda 3)

| # de cepa | PE | DC | PEF | CXM | GE | CTX | SXT | TE | AM | E | CAZ | CF |
|-----------|----|----|-----|-----|----|-----|-----|----|----|---|-----|----|
| A1 1      | R  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | R | R   | I  |
| A1 2      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | I   | R  | R  | R | R   | I  |
| A1 3      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | I | R   | I  |
| A1 4      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | R   | R  | R  | S | R   | R  |
| A1 5      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | S  | R  | R | R   | I  |
| A1 6      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | I | R   | R  |
| A1 7      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | I | R   | R  |
| A1 8      | R  | R  | I   | R   | S  | R   | S   | R  | S  | S | R   | R  |
| A1 9      | S  | R  | I   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | S | R   | I  |
| A1 10     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | I | R   | I  |
| A1 11     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| A1 12     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| A1 13     | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A1 14     | S  | R  | I   | R   | S  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A1 15     | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 1      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | S  |
| A2 2      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | S  |
| A2 3      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | R | R   | I  |
| A2 4      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 5      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | I | R   | S  |
| A2 6      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 7      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 8      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 9      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 10     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 11     | S  | R  | R   | R   | S  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| A2 12     | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | I  | S  | R | R   | I  |
| A2 13     | S  | R  | R   | I   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| A2 14     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| C3 1      | R  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | R  | S | R   | R  |
| C3 2      | S  | R  | I   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| C3 3      | S  | R  | R   | R   | S  | R   | S   | S  | S  | R | R   | S  |
| C3 4      | S  | R  | R   | R   | S  | S   | R   | R  | S  | R | R   | I  |
| C3 5      | S  | R  | I   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | S | R   | I  |

PE, penicilina; DC, dicloxacilina; PEF, pefloxacina; CXM, cefuroxima; GE, gentamicina; CTX, cefotaxima; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; TE, tetraciclina; AM, ampicilina; E, eritromicina; CAZ, ceftazidima; CF, cefalotina; R, resistente; S, susceptible; I, intermedio

**Tabla 8:** Perfil de susceptibilidad de cepas de enterococos aisladas de hígado de pollo (primer y segundo muestreo)

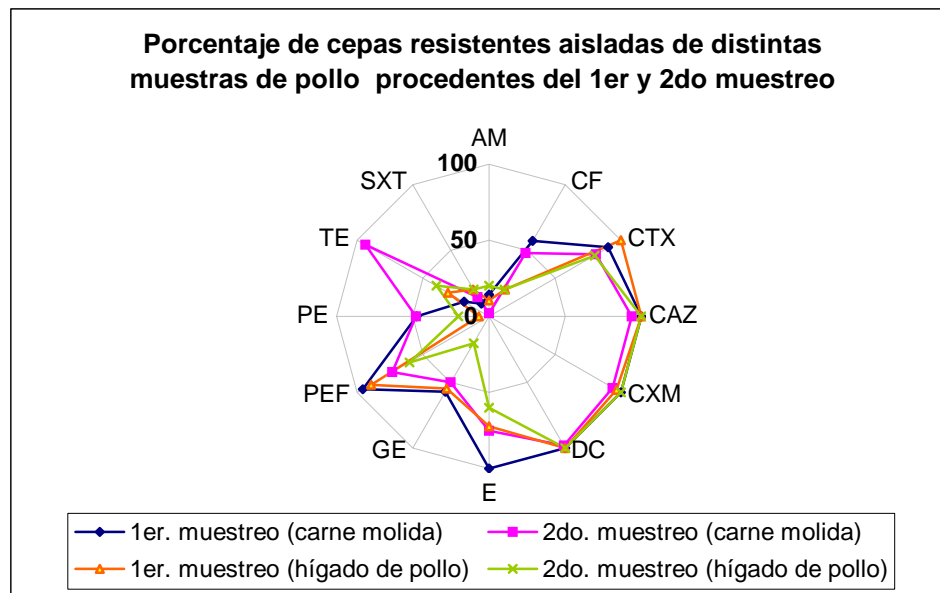
B1, D1 Hígado de pollo supermercado 4 (Tienda 4)

B2, D2 Hígado de pollo mercado 1 (Tienda 5)

D3 Hígado de pollo mercado 2 (Tienda 6)

| # de cepa | PE | DC | PEF | CXM | GE | CTX | SXT | TE | AM | E | CAZ | CF |
|-----------|----|----|-----|-----|----|-----|-----|----|----|---|-----|----|
| B1 1      | S  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |
| B1 2      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 3      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 4      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 5      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 6      | R  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |
| B1 7      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 8      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 9      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 10     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | I  |
| B1 11     | S  | R  | R   | R   | R  | S   | S   | S  | S  | R | R   | S  |
| B1 12     | S  | R  | S   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | R | R   | R  |
| B2 1      | R  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | R  | R | R   | R  |
| B2 2      | R  | R  | R   | R   | S  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 3      | R  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 4      | R  | R  | R   | R   | S  | I   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 5      | R  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 6      | R  | R  | R   | R   | S  | R   | R   | R  | R  | R | R   | R  |
| B2 7      | R  | R  | R   | R   | S  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 8      | R  | R  | R   | R   | I  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| B2 9      | R  | R  | R   | R   | S  | R   | S   | S  | R  | R | R   | R  |
| D1 1      | R  | R  | R   | R   | S  | R   | R   | R  | R  | R | R   | R  |
| D1 2      | R  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | S  | S  | R | R   | R  |
| D1 3      | S  | R  | I   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | R | R   | I  |
| D1 4      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | I | R   | I  |
| D1 5      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | R   | R  | S  | R | R   | S  |
| D1 6      | S  | R  | I   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| D1 7      | S  | R  | I   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| D1 8      | R  | R  | I   | R   | R  | S   | S   | R  | S  | I | R   | R  |
| D1 9      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |
| D1 10     | S  | R  | I   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| D1 11     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |
| D1 12     | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |
| D1 13     | S  | R  | I   | R   | I  | R   | S   | I  | S  | R | R   | S  |
| D1 14     | S  | R  | S   | R   | S  | R   | S   | R  | S  | S | R   | I  |
| D1 15     | S  | R  | R   | R   | I  | S   | S   | R  | S  | R | R   | I  |
| D2 1      | S  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | S  |
| D2 2      | R  | R  | R   | R   | R  | R   | S   | R  | S  | R | R   | R  |

|       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D2 3  | R | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | R |
| D2 4  | R | R | R | R | S | S | S | R | S | R | R | R |
| D2 5  | S | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | I |
| D2 6  | R | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | R |
| D2 7  | R | R | R | R | S | S | S | R | S | R | R | R |
| D2 8  | R | R | R | R | I | R | S | R | S | S | R | R |
| D2 9  | S | R | R | R | R | R | S | R | S | S | R | R |
| D2 10 | R | R | R | R | S | S | S | R | S | R | R | R |
| D2 11 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | R | R |
| D2 12 | S | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | S |
| D2 13 | S | R | R | R | I | R | S | R | S | S | R | I |
| D2 14 | R | R | R | R | I | S | S | R | S | R | R | I |
| D2 15 | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | R | R |
| D2 16 | R | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | R |
| D2 17 | R | R | R | R | S | R | S | R | S | R | R | R |
| D2 18 | R | R | R | R | S | R | S | R | S | S | R | R |
| D2 19 | S | S | R | S | S | S | S | R | S | R | I | S |
| D2 20 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | R | R |
| D3 1  | R | R | I | R | R | R | S | R | S | R | R | I |
| D3 2  | S | R | I | R | S | R | S | R | S | I | R | I |
| D3 3  | S | R | R | R | R | R | S | R | S | R | R | I |
| D3 4  | S | R | R | R | I | R | S | R | S | R | R | I |
| D3 5  | S | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | I |
| D3 6  | S | R | I | R | S | R | S | R | S | S | R | I |
| D3 7  | S | R | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S |
| D3 8  | R | R | R | R | R | R | S | R | S | I | R | I |
| D3 9  | S | R | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| D3 10 | R | R | I | R | R | R | S | R | S | R | R | I |
| D3 11 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | R | R |
| D3 12 | R | R | I | R | R | R | S | R | S | R | R | R |
| D3 13 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | R | R |



**Fig. 8.** Porcentaje de cepas de enterococos resistentes a distintos antibióticos aisladas de muestras de carne molida de pollo e hígado de pollo obtenidas durante el primer y segundo día de muestreo.

En la prueba de susceptibilidad a los antibióticos se obtuvo que las cepas de enterococos aisladas a partir de carne molida de pollo presentaron resistencia al menos a 4 de los 12 antibióticos probados, mientras que la mayoría de las cepas fue resistente a 6 (29%) y 7 (26%) antibióticos, solo una cepa (3%) fue resistente a 10 antibióticos. De las cepas aisladas a partir de hígado de pollo solo una cepa fue resistente a un antibiótico y dos a 3 antibióticos, el 96% de las cepas restantes fue resistente al menos a 5 antibióticos, la mayoría de las cepas presentaron resistencia a 7 (25%), 8 (26%) y 9 (22%) antibióticos; a diferencia de las cepas provenientes de carne molida de pollo un mayor porcentaje de cepas (10%) fue resistente a 10 antibióticos y 3% a 11 antibióticos.



De las 103 cepas aisladas ninguna fue resistente a los 12 antibióticos probados (Tabla 9).

**Tabla 9.** Número de antibióticos frente a los cuales cepas de enterococos presentaron resistencia.

| No. de antibióticos | Carne molida de pollo<br>(n= 34) | Hígado de pollo<br>(n= 69) | Total<br>(n= 103) |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------|
|                     | No. de cepas resistentes (%)     |                            |                   |
| 1                   | 0 (0)                            | 1 (1)                      | 1 (1)             |
| 2                   | 0 (0)                            | 0 (0)                      | 0 (0)             |
| 3                   | 0 (0)                            | 2 (3)                      | 2 (2)             |
| 4                   | 2 (6)                            | 0 (0)                      | 2 (2)             |
| 5                   | 2 (6)                            | 4 (6)                      | 6 (6)             |
| 6                   | 10 (29)                          | 3 (4)                      | 13 (13)           |
| 7                   | 9 (26)                           | 17 (25)                    | 26 (25)           |
| 8                   | 5 (15)                           | 18 (26)                    | 23 (22)           |
| 9                   | 5 (15)                           | 15 (22)                    | 20 (19)           |
| 10                  | 1 (3)                            | 7 (10)                     | 8 (8)             |
| 11                  | 0 (0)                            | 2 (3)                      | 2 (2)             |
| 12                  | 0 (0)                            | 0 (0)                      | 0 (0)             |

La prevalencia de enterococos resistentes a los antibióticos probados muestra que: Las cepas aisladas tanto de carne molida de pollo como de hígado de pollo fueron resistentes a la ceftazidima, cefuroxima y dicloxacilina en una frecuencia del 96-100%. Con un menor porcentaje de cepas resistentes, pero con porcentajes similares entre cepas provenientes de carne molida e hígado de pollo se encontraron que respectivamente 85 y 80% de las cepas fueron resistentes a la pefloxacina y 50 y 52% de las cepas fueron resistentes a la gentamicina. Un mayor porcentaje de cepas (13%) aisladas de hígado de pollo fue resistente a la

cefotaxima y eritromicina comparado con el porcentaje de cepas resistentes aisladas a partir de carne molida.

Las cepas aisladas a partir de carne molida presentaron mayor susceptibilidad frente a la penicilina (91%), ampicilina (88%) y trimetoprim-sulfametoxazol (76%); mientras que para las cepas provenientes de hígado de pollo la mayor susceptibilidad se presentó frente a la ampicilina (94%) y al trimetoprim-sulfametoxazol (88%) (Tabla 10).

La mayor variabilidad de cepas resistentes que se presentó frente a algún antibiótico fue la dada frente a la penicilina y a la tetraciclina, siendo las cepas aisladas a partir de hígado de pollo 39% mas resistentes a estos antibióticos que las aisladas a partir de carne molida de pollo (Tabla 10 y Fig. 9).

**Tabla 10.** Prevalencia de enterococos resistentes a los antibióticos, provenientes de carne molida de pollo e hígado de pollo

| Antibiótico                | Carne molida de pollo<br>(n= 34) |                   |                   | Hígado de pollo<br>(n= 69) |                   |                   |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
|                            | Susceptible<br>(%)               | Intermedio<br>(%) | Resistente<br>(%) | Susceptible<br>(%)         | Intermedio<br>(%) | Resistente<br>(%) |
| Ampicilina (AM)            | 88                               | 0                 | 12                | 94                         | 0                 | 6                 |
| Cefalotina (CF)            | 12                               | 68                | 20                | 11                         | 38                | 51                |
| Cefotaxima (CTX)           | 3                                | 0                 | 97                | 15                         | 1                 | 84                |
| Ceftazidima (CAZ)          | 0                                | 0                 | 100               | 3                          | 1                 | 96                |
| Cefuroxima (CXM)           | 0                                | 3                 | 97                | 4                          | 0                 | 96                |
| Dicloxacilina (DC)         | 0                                | 0                 | 100               | 1                          | 0                 | 99                |
| Eritromicina (E)           | 15                               | 15                | 70                | 11                         | 6                 | 83                |
| Gentamicina (GE)           | 15                               | 35                | 50                | 33                         | 15                | 52                |
| Pefloxacina (PEF)          | 0                                | 15                | 85                | 3                          | 17                | 80                |
| Penicilina (PE)            | 91                               | 0                 | 9                 | 52                         | 0                 | 48                |
| Tetraciclina (TE)          | 65                               | 3                 | 32                | 28                         | 1                 | 71                |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | 76                               | 3                 | 21                | 88                         | 0                 | 12                |

Al comparar el porcentaje de cepas de enterococos resistentes a diferentes antibióticos con base al grupo al cual pertenece cada uno de los antibióticos probados (Tabla 11) se encontró que:

El grupo de las penicilinas presentó la siguiente actividad: la ampicilina y la penicilina presentaron mayor actividad antibacteriana sobre las cepas provenientes de carne molida de pollo y solo la ampicilina presentó actividad sobre las cepas provenientes de hígado de pollo, mientras que la penicilina no tuvo efecto sobre la mitad de las cepas. La dicloxacilina ejerció un efecto nulo, ya que de 103 cepas probadas solo una fue sensible a este antibiótico.

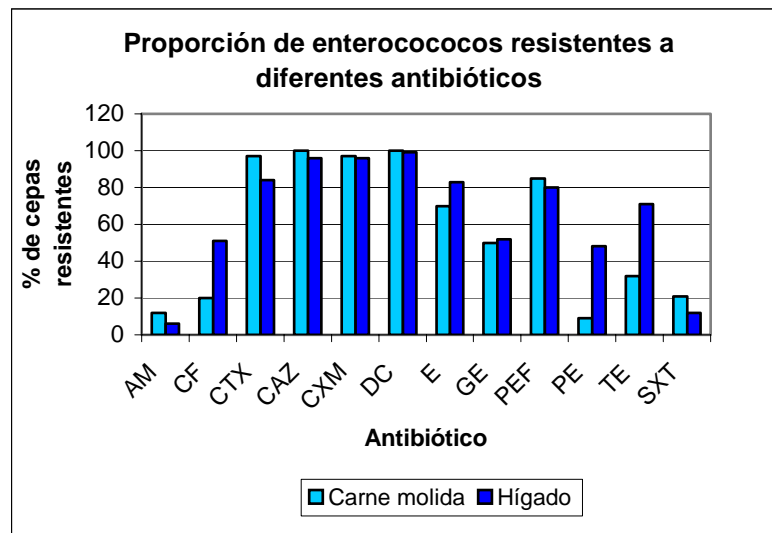
Del grupo de las cefalosporinas se observó que tres de los cuatro antibióticos probados (cefotaxima, ceftazidima y cefuroxima) tuvieron un efecto escaso, ya que la proporción de cepas resistentes a dichos antibióticos vario en un rango de 88-97%. La cefalotina tuvo efecto solo sobre el 10% de las cepas.

El aminoglucósido gentamicina no tuvo efecto sobre la mitad de las cepas; lo mismo sucedió para la tetraciclina, con la diferencia de que ésta presentó mayor efecto sobre las cepas provenientes de carne molida.

Del grupo de las quinolonas, la pefloxacina tuvo poca actividad frente a las cepas ya que el 80% de estas fue resistente a este antibiótico.

El trimetoprim-sulfametoxazol que pertenece al grupo de las sulfonamidas y trimetoprima presentó mayor efecto sobre las cepas de enterococos ya que solo el 15% de estas fue resistente.

Los antibióticos que presentaron mayor actividad antibacteriana sobre las cepas de enterococos fueron la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol. (Fig. 9)

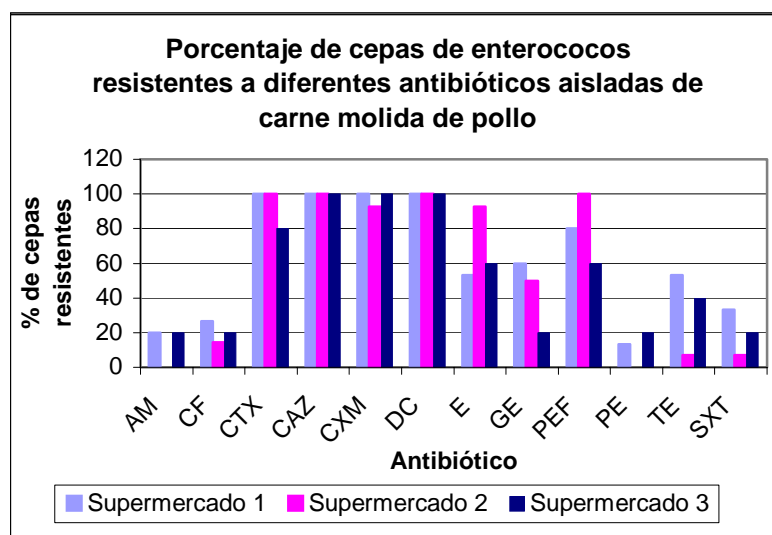


**Fig. 9.** Porcentaje de cepas de enterococos resistentes a los diferentes antibióticos en relación con el tipo de muestra.

Las cepas aisladas a partir de carne molida de pollo que se adquirió en el supermercado 1 presentaron mayor resistencia a los antibióticos; el supermercado 2 solo presentó un importante número de cepas resistentes a la eritromicina y a la pefloxacina; las cepas aisladas a partir de la carne molida adquirida en el supermercado 3 fueron mucho más sensibles a los antibióticos probados en comparación a los otros dos supermercados, estas cepas solo fueron ligeramente más resistentes a la penicilina (Fig. 10)

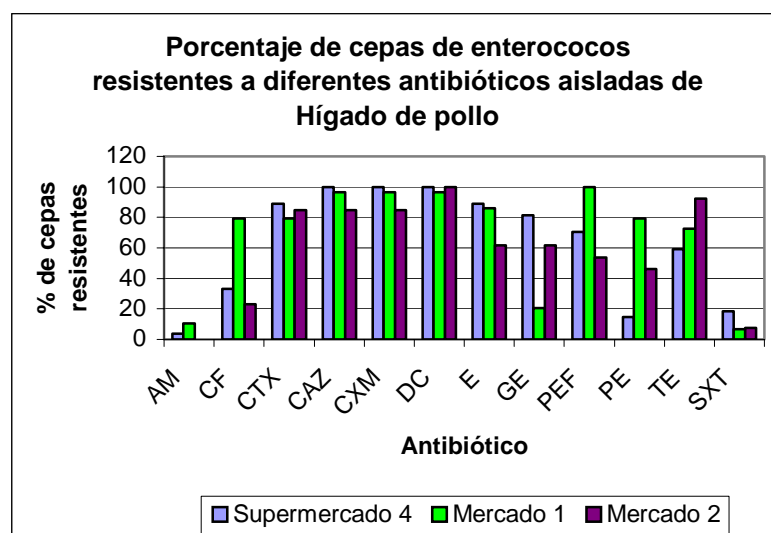
**Tabla 11 :** Actividad antimicrobiana sobre enterococos

| Antibiótico                     | Grupo                      | Carne molida (%) | Hígado (%) | Total (%) |
|---------------------------------|----------------------------|------------------|------------|-----------|
|                                 |                            | (n=34)           | ( n= 69)   | (n=103)   |
| <b>No. de cepas resistentes</b> |                            |                  |            |           |
| Ampicilina                      | Penicilinas                | 4 (12)           | 4 (6)      | 8 (8)     |
| Dicloxacilina                   | Penicilinas                | 34 (100)         | 68 (99)    | 102 (99)  |
| Penicilina                      | Penicilinas                | 3 (9)            | 33 (48)    | 36 (35)   |
| Cefalotina                      | Cefalosporinas             | 7 (21)           | 35 (51)    | 42 (41)   |
| Cefotaxima                      | Cefalosporinas             | 33 (97)          | 58 (84)    | 91 (88)   |
| Ceftazidima                     | Cefalosporinas             | 34 (100)         | 66 (96)    | 100 (97)  |
| Cefuroxima                      | Cefalosporinas             | 33 (97)          | 66 (96)    | 99 (96)   |
| Gentamicina                     | Aminoglucósidos            | 17 (50)          | 36 (52)    | 53 (51)   |
| Tetraciclina                    | Tetraciclinas              | 11 (32)          | 49 (71)    | 60 (58)   |
| Eritromicina                    | Macrólidos                 | 24 (70)          | 57 (83)    | 81 (79)   |
| Pefloxacina                     | Quinolonas                 | 29 (85)          | 55 (80)    | 84 (82)   |
| Trimetoprim-Sulfametoxazol      | Sulfonamidas y Trimetoprim | 7 (21)           | 8 (12)     | 15 (15)   |



**Fig. 10.** Proporción de enterococos resistentes a distintos antibióticos en relación con el sitio de muestreo.

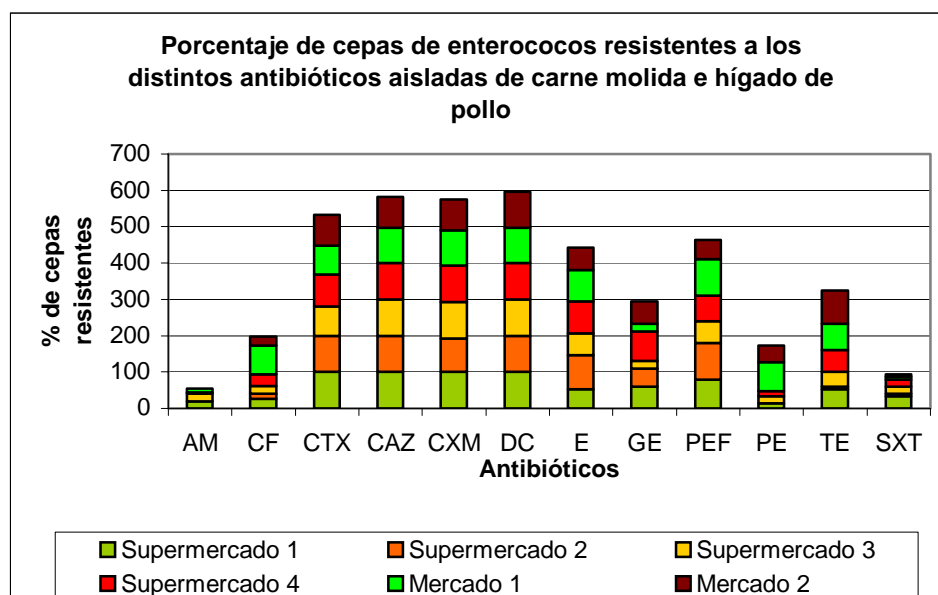
Las cepas aisladas a partir de hígado de pollo adquirido en el supermercado 4 presentaron el mayor porcentaje de cepas resistentes a 7 distintos antibióticos, sin embargo las cepas aisladas de hígado de pollo adquirido en el mercado 1 mostraron un importante número de cepas resistentes a la cefalotina, pefloxacina y penicilina, mientras que un mayor número de cepas aisladas de hígado de pollo procedente del mercado 2 fue resistente a la tetraciclina (Fig. 11).



**Fig. 11.** Proporción de enterococos resistentes a distintos antibióticos en relación con el sitio de muestreo.

Al comparar los distintos supermercados y mercados en donde se adquirieron la carne molida de pollo y el hígado de pollo, se encontró que la distribución de enterococos fue la siguiente: el supermercado 1 presentó el mayor porcentaje de cepas resistentes a seis distintos antibióticos (ampicilina, cefotaxima, ceftazidima,

cefuroxima, dicloxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol); las cepas aisladas de la carne molida adquirida en el supermercado 2 presentaron el mayor porcentaje de enterococos resistentes a cinco antibióticos (cefotaxima, ceftazidima, dicloxacilina, eritromicina, pefloxacina); los supermercados 3 y 4 presentaron el mayor porcentaje de cepas resistentes a cuatro distintos antibióticos, teniendo en común la resistencia a la ceftazidima, cefuroxima y dicloxacilina y difiriendo en el mayor porcentaje de cepas resistentes a la ampicilina y a la gentamicina respectivamente. Las cepas que se aislaron de hígado de pollo adquirido en el mercado 1 y 2 presentaron el menor porcentaje de cepas resistentes, ya que la mayoría de las cepas fue resistente solo a tres (cefalotina, pefloxacina, penicilina) y dos (dicloxacilina, penicilina) antibióticos respectivamente (Fig. 12).



**Fig. 12.** Proporción de enterococos resistentes a diferentes antibióticos aislados de carne molida de pollo e hígado de pollo procedentes de distintos sitios de muestreo (mercados y supermercados) .

### 3. Identificación de especie

Con base en la prueba de susceptibilidad a los antibióticos se seleccionaron 10 cepas de enterococos multirresistentes, cinco de las cepas se aislaron de carne molida de pollo y las otras cinco a partir de hígado de pollo.

Mediante una prueba comercial (Api 20 Strep) basada en 20 ensayos bioquímicos se confirmó el género y se identificó la especie de las 10 cepas multirresistentes previamente seleccionadas.

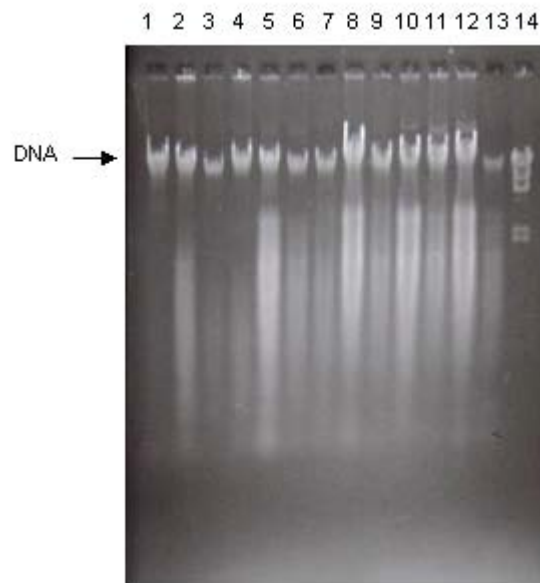
La interpretación de la lectura de las tiras Api 20 Strep se interpretó mediante un software.

Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia de especie fue la siguiente: *Enterococcus faecalis* (50%) y *Enterococcus faecium* (50%). La distribución de especie fue de 100% de *Enterococcus faecalis* en carne molida de pollo y 100% de *Enterococcus faecium* en hígado de pollo.

### 4. Presencia de integrones de clase 1

Para la búsqueda de integrones de clase 1 se extrajo el DNA total de aquellas cepas de enterococos que presentaron resistencia al mayor número de antibióticos probados; la calidad del DNA extraído se determinó por electroforesis (Fig. 13).



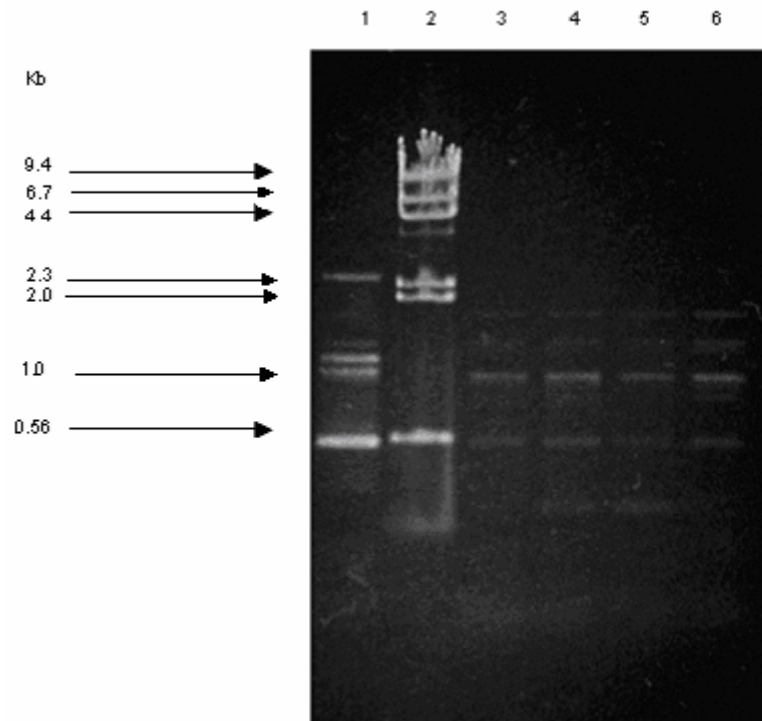


**Fig. 13.** Extracción de DNA. Las líneas 1-13 muestran respectivamente la calidad y concentración del DNA de las cepas A1 3, B1 6, D1 5, D2 6, D2 20, D3 11, A1 4, A1 5, A2 6, B2 9, D1 9, D1 12, D3 5. La línea 14 corresponde al marcador de pesos moleculares.

La presencia de integrones se determinó mediante la técnica de PCR usando los primers 5'-CS y 3'-CS, que amplifican la región variable de los integrones, determinando así el número y tamaño del integrón(es) presente(s).

Los productos de PCR mostraron la presencia de una banda brillante y definida en cada una de las muestras de DNA amplificadas, lo que sugiere la presencia de un solo integrón de clase 1 en cada una de éstas. El tamaño del amplicón en todos los casos fue de 1 Kb (Fig. 14)

En la Fig. 14 se observa en cada una de las muestras la presencia de otras tres bandas distintas a la ya citada, con la diferencia que estas bandas son menos brillantes y están menos definidas. El tamaño de cada una de estas bandas es de 2.1, 1.4 y 0.51 Kb.



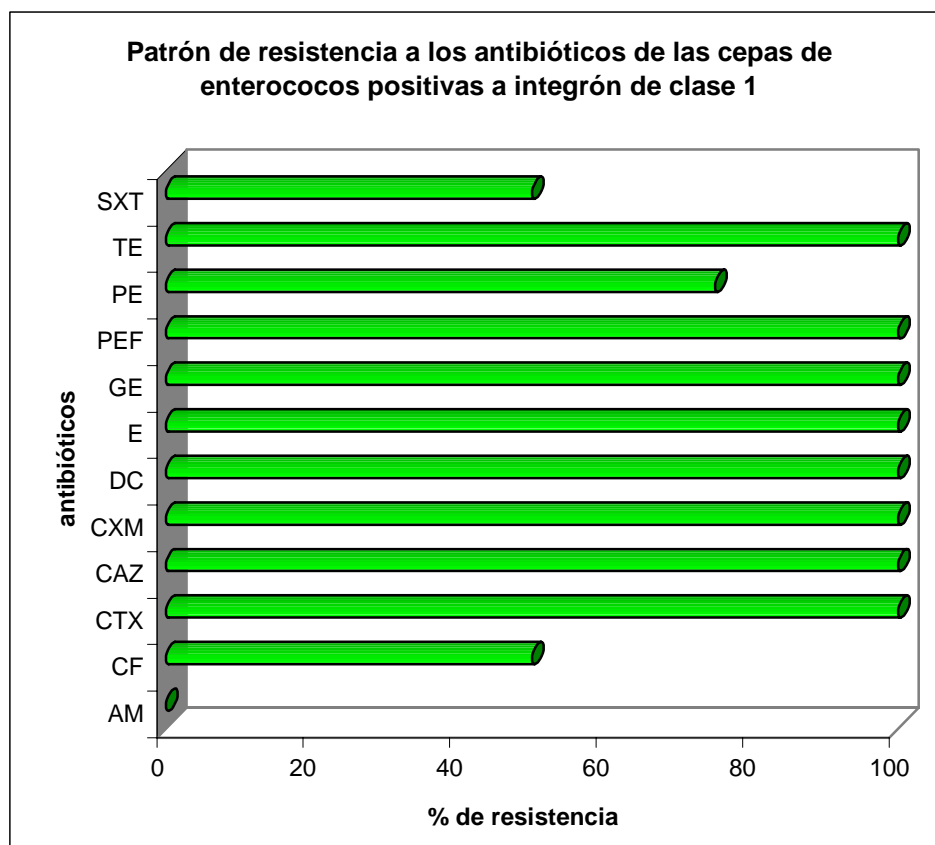
**Fig. 14.** PCR del DNA de enterococos aislados de muestras de carne de pollo, usando los primers 5'-CS y 3'-CS específicos para los integrones de clase 1. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Líneas 3, 4 y 6, *E. faecium*; línea 5, *E. faecalis*; línea 1, control positivo; línea 2, marcador de pesos moleculares.

De las cuatro cepas de enterococos que presentaron integrón, una de ellas pertenecía a la especie *E. faecalis*, la cual se aisló de carne molida de pollo y fue resistente a 10 de los 12 antibióticos probados; las tres cepas restantes pertenecían a la especie *E. faecium* y se aislaron de hígado de pollo, dos de estas cepas fueron resistentes a 10 antibióticos y una cepa fue resistente a 9 de los 12 antibióticos probados. Cabe señalar que cada una de las cepas que presentó integrón se aisló a partir de muestras de carne de pollo de diferente procedencia (Tabla 12).

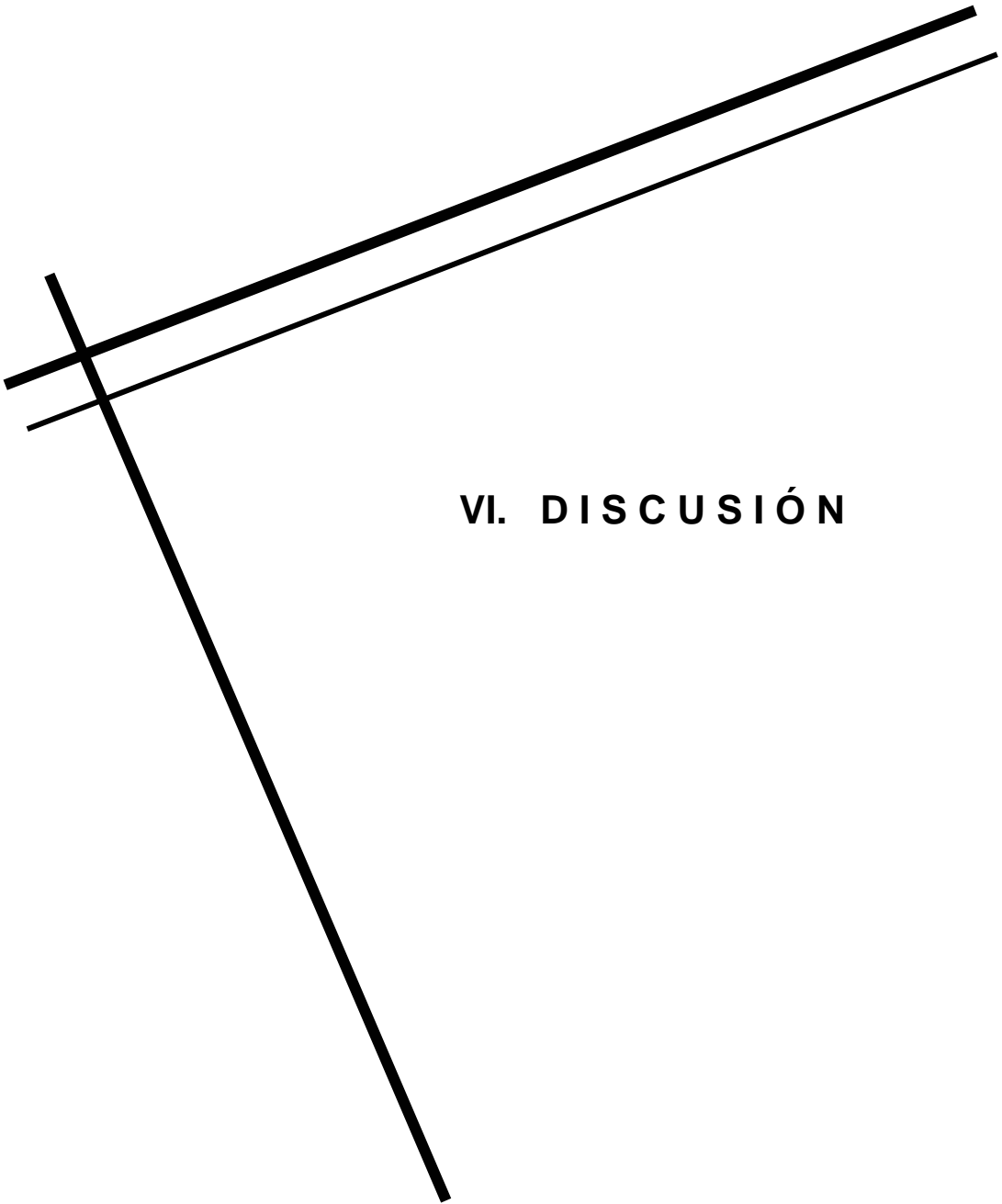
**Tabla 12.** Características fenotípicas y genotípicas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* provenientes de carne de pollo

| No. de cepa | Especie            | Antibióticos                       | Tamaño del amplicón (Kb) | Procedencia de la cepa | No. de tienda | Fecha de muestreo |
|-------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|-------------------|
| D3 11       | <i>E. faecium</i>  | CF,CTX,CAZ,CXM,DC,E,GE,PEF,PE,TE.  | 1                        | Hígado de pollo        | 6             | 26/06/05          |
| D1 5        | <i>E. faecium</i>  | CTX,CAZ,CXM,DC,E,GE,PEF,TE,SXT.    | 1                        | Hígado de pollo        | 4             | 26/06/05          |
| A1 1        | <i>E. faecalis</i> | CTX,CAZ,CXM,DC,E,GE,PEF,PE,TE,SXT. | 1                        | Carne molida de pollo  | 1             | 8/04/05           |
| D2 20       | <i>E. faecium</i>  | CF,CTX,CAZ,CXM,DC,E,GE,PEF,PE,TE.  | 1                        | Hígado de pollo        | 5             | 26/06/05          |

El patrón de resistencia que mostraron las cuatro cepas de enterococos en las cuales se identificó la presencia de integrones frente a los distintos antibióticos probados fue que el 100% de las cepas fue resistente a 8 de los 12 antibióticos probados (tetraciclina, pefloxacina, gentamicina, eritromicina, dicloxacilina, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima), mientras que el 75% de las cepas fue resistente a la penicilina y 50% fue resistente al trimetoprim-sulfametoxazol. Ninguna de las cepas fue resistente a la ampicilina (Fig.15)



**Fig. 15.** Muestra el porcentaje de cepas resistentes que presentaron integrones de clase 1, a 12 distintos antibióticos



**VI. DISCUSIÓN**

Los enterococos son la causa de serias enfermedades en el humano y se han convertido en uno de los principales problemas de infecciones nosocomiales debido a la adquisición de un gran número de determinantes de resistencia a antibióticos, lo que ha contribuido a su supervivencia y al mismo tiempo ha limitado las opciones terapéuticas [13].

En el presente estudio se investigó a la carne de pollo como una posible fuente de enterococos multirresistentes, capaces de transmitir sus genes de resistencia a otras cepas y convertirse en un foco de diseminación al humano.

Los enterococos han sido frecuentemente aislados de distintas muestras de alimentos como carnes, leche, embutidos y vegetales [1, 20, 29, 34, 47, 59]. En este estudio se utilizaron muestras de carne de pollo debido a que este es uno de los productos cárnicos de mayor consumo y por lo tanto de mayor producción en el país.

La presencia de enterococos en muestras de carne de pollo adquiridas en mercados y supermercados de la ciudad de México se hizo evidente al realizar en este estudio el aislamiento de un total de 103 cepas de estos microorganismos. La presencia de los enterococos en los alimentos puede deberse a que éstos forman parte de la flora intestinal de los animales lo que conduce a un alto potencial de contaminación de la carne en el momento del sacrificio [16]. Otro factor de contaminación puede ser el ambiente, debido a que los enterococos tienen la capacidad de colonizar diversos nichos por su gran capacidad de resistir y crecer en ambientes hostiles [20].

A menudo los enterococos han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en los alimentos, sin embargo ahora también se les considera como parte normal de la microflora de alimentos [36].

Un factor que contribuye a la patogenicidad de los enterococos se debe a su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su gran capacidad de adquirir resistencia a otros [16, 31, 35, 47, 61]. Por esta razón en este estudio se determinó la resistencia de las cepas de enterococos aisladas de carne molida de pollo e hígado de pollo a diversos antibióticos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio referentes a la prueba de susceptibilidad a antibióticos mostró que el 89% de las cepas de enterococos aisladas de carne de pollo (carne molida e hígado de pollo) fue resistente a 6 o más de los 12 antibióticos probados, esto indica que las cepas previamente estuvieron expuestas a estos antibióticos, o bien que adquirieron genes de resistencia [34].

Otros resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la prueba de susceptibilidad a antibióticos mostraron que las cepas de enterococos fueron ocasionalmente resistentes a la ampicilina (8%). Resultados semejantes se han obtenido en estudios en donde se han aislado cepas de enterococos a partir de alimentos de origen animal como carne de puerco, res, pavo, leche, jamón y embutidos; en estos estudios todas las cepas han sido susceptibles a este antibiótico [34, 37, 47].

Los mismos resultados se encontraron en cepas aisladas de muestras fecales de animales y humanos [32, 34]. Estos resultados difieren con lo obtenido por Thal et al. (1995) quienes observaron que el 67% de las cepas de enterococos aisladas de pollo provenientes de supermercado fueron resistentes a la ampicilina. Klare et al. (2003) mencionan que aproximadamente 60-80% de las cepas de *E. faecium* son resistentes a la ampicilina, mientras que  $\leq 2\%$  de las cepas de *E. faecalis* poseen esta resistencia.

El 35% de las cepas aisladas en este estudio presentaron resistencia frente a la penicilina, con una notable diferencia entre cepas provenientes de carne molida y de hígado de pollo, ya que los porcentajes de cepas resistentes fueron de 9% y 48% respectivamente. Diversos estudios han mostrado que en general los enterococos son susceptibles a la penicilina, la respuesta frente a este antibiótico ha sido en un rango del 0-9% de cepas resistentes [2, 29, 37, 47]. Un estudio que comparó la prevalencia de los niveles de resistencia entre las cepas de enterococos aisladas de carne de puerco de tres diferentes países (España, Dinamarca y Suiza) mostró que 9%, 21% y 6% respectivamente de las cepas de *E. faecium* fueron resistentes a la penicilina [2].

La resistencia que pueden presentar las cepas de enterococos frente a la penicilina y a la ampicilina es de gran importancia, ya que comúnmente estos antibióticos son la primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos [35,37].



La dicloxacilina no ejerció efecto en las cepas de enterococos, ya que 99% de estas fueron resistentes; este efecto se debe a que los enterococos poseen resistencia intrínseca frente al grupo de las penicilinas resistentes a penicilinasas [5].

La resistencia frente al grupo de las penicilinas presentada por las cepas de enterococos frecuentemente ocurre por la sobreproducción de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) y a la mutación de las formas de PBP-5 teniendo como consecuencia una menor afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [35, 65], otro mecanismo de resistencia menos frecuente es la destrucción enzimática de los antibióticos, ya que algunas cepas de enterococos producen  $\beta$ -lactamasas [15, 65].

Las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación probadas en este estudio ejercieron un efecto escaso sobre las cepas de enterococos, siendo >85% resistentes o exhibiendo una efectividad intermedia frente a estos antibióticos. Klein et al. (1998) probaron la efectividad de las cefalosporinas frente a cepas de enterococos, un total de 192 de 209 aislamientos fueron resistentes a la cefalotina o exhibieron una reacción intermedia frente a este antibiótico.

La baja efectividad de las cefalosporinas se explica porque los enterococos poseen resistencia intrínseca a estos antibióticos [16, 20, 29, 31, 61] por lo que no tienen una acción fiable contra estos microorganismos [43].

El mecanismo de resistencia contra las cefalosporinas se debe a la falta de proteínas de unión para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [15].

El 51% de los microorganismos aislados en este estudio presentaron resistencia a los aminoglucósidos específicamente a la gentamicina, mientras que un 25% presentó efectividad intermedia frente a este antibiótico. Khan et al. (2005) también encontraron porcentajes elevados de resistencia a la gentamicina (97%) y 3% de efectividad intermedia. Estos resultados difieren con lo descrito por Johnston y Jaykus (2004), Aarestrup et al. (2002), Peters et al (2003) y Klein et al. (1998); ellos encontraron que los porcentajes de cepas de enterococos resistentes variaba en un rango del 0-5%. van den Bogaard et al. (2002) encontraron que respectivamente el 44 y 40 % de cepas de enterococos provenientes de muestras fecales de aves y gallinas mostraron resistencia frente a la gentamicina, contrario a lo obtenido en muestras fecales de trabajadores de granjas en donde el porcentaje de cepas resistentes a la gentamicina variaba del 0-10%. Junco et al. (2005) mencionan que se ha descrito que el 43.9% de cepas aisladas de muestras clínicas en las Islas Canarias han sido resistentes a la gentamicina. En México está registrado el uso de la gentamicina en medicina veterinaria [11]. Este antibiótico es de importancia clínica, ya que en combinación con una sustancia activa contra la pared celular bacteriana como lo son la penicilina o la vancomicina poseen un efecto bactericida en infecciones graves como endocarditis, bacteremias o meningitis. La combinación de ambos antibióticos ejerce un efecto sinérgico en su acción y es ineficiente en presencia de resistencia a uno o a ambos componentes [8, 31, 35, 65].

El mecanismo de resistencia adquirida por los enterococos frente a los aminoglucósidos se debe la modificación enzimática, es decir, que el antibiótico es inactivado por enzimas del microorganismo que fosforilan, adenilan o acetilan grupos hidroxilo o amino específicos [8, 15, 32, 35]. La resistencia a la gentamicina denota el mismo efecto hacia tobramicina, amikacina, kanamicina y netilmicina, porque la enzima inactivante es bifuncional y modifica a todos estos aminoglucósidos [8].

De las cepas de enterococos aisladas en este estudio, el mayor porcentaje fue sensible a la tetraciclina (65%), mientras que el 32% fue resistente. Cepas aisladas de distintos alimentos muestran un comportamiento semejante, en donde el mayor porcentaje de cepas es susceptible a este antibiótico (60-100), mientras que del 0-40% son resistentes [29, 37, 47]. En otros estudios se obtuvo que del 63-94% de las cepas eran resistentes [2, 34]. El mismo fenómeno se observó en el estudio realizado por van den Bogaard et al. (2002), en el que la mayoría de las cepas de enterococos de muestras fecales de animales fueron resistentes a la tetraciclina (94-98%).

A menudo la resistencia a las tetraciclinas puede encontrarse en enterococos y es codificada por diferentes genes *tet* que son responsables de la protección ribosomal (reducción de la afinidad) o del mecanismo de flujo eferente (acumulación disminuida) [15,35].

Del grupo de los macrólidos la eritromicina ejerció baja actividad antimicrobiana contra las cepas de enterococos, ya que 87% de estas fueron resistentes o

presentaron efectividad intermedia. Peters et al. (2003) y Aarestrup et al. (2002) obtuvieron que 85% de *E. faecalis* aislados de carne de cerdo provenientes de Dinamarca fueron resistentes, mientras que solo el 17% lo fue para cepas provenientes de Suiza. En el mismo estudio se obtuvo que el 81, 86 y 6% de *E. faecium* fueron resistentes a la eritromicina, estas cepas provenían de Dinamarca, España y Suiza respectivamente. Khan et al. (2005) obtuvieron que el 57% de las cepas eran resistentes y 7% presentaron efectividad intermedia. Otros estudios han mostrado que el mayor porcentaje de cepas presentan resistencia intermedia frente a la eritromicina (52-57%), mientras que una menor proporción es resistente (3-30%) [29, 37, 47]. Cepas aisladas de muestras fecales de animales como gallinas, pollos y pavos mostraron gran variabilidad en la resistencia contra la eritromicina (37-98%) [56, 61]. Una de las muestras utilizadas por Strobberingh et al. (1999) en su estudio, fueron muestras fecales de humanos de 3 poblaciones, las cuales se encontraban en diferente grado de exposición con pavos (trabajadores de una granja de pavos, trabajadores de una planta procesadora de carne de pavo y residentes de una población suburbana); los porcentajes de cepas resistentes a la eritromicina fueron bajos para los enterococos provenientes de los trabajadores de la planta procesadora y para la población suburbana (21 y 28% respectivamente), en comparación con el 42% de cepas resistentes provenientes de las muestras fecales de los trabajadores de la granja.

La eritromicina crea resistencia cruzada con la tilosina, miembro de la familia de los macrólidos y antibiótico comúnmente usado en las aves de corral como

promotor del crecimiento, así como en la prescripción veterinaria. La tilosina ha sido consecuentemente asociada con la alta prevalencia de enterococos resistentes a macrólidos en la flora intestinal de cerdos y aves de corral. Varios estudios han mostrado que el alimento para pollos que contiene tilosina no solo incrementa los porcentajes de enterococos resistentes a la tilosina en la flora fecal de los animales expuestos a través del tiempo, sino también el número relativo de *E. faecium* del número total de enterococos presentes en la flora [4, 61].

En México están autorizados el uso de la tilosina y de la eritromicina como productos farmacéuticos veterinarios, además se autoriza el uso de la tilosina como antibiótico promotor del crecimiento [11].

El mecanismo de resistencia hacia los macrólidos por parte de los enterococos está mediado por el gen *erm* (B) que codifica para la producción de una enzima metilasa que modifica los sitios de unión a los ribosomas, otro mecanismo de resistencia hacia este antibiótico es la acumulación disminuida del fármaco [33, 35, 15].

82% de las cepas de enterococos fue resistentes a la pefloxacina, antibiótico que se clasifica dentro del grupo de las quinolonas, mientras que 16% mostró efectividad intermedia frente a dicho antibiótico. Estos resultados coinciden con lo publicado por Klare et al. (2003), en donde mencionan que la mayoría de las cepas de enterococos muestran solo susceptibilidad intermedia frente a las quinolonas y muchas de las cepas son resistentes.

El mecanismo de resistencia que presentan los enterococos frente a las quinolonas se basa en mutaciones en los genes *gyr A* (girasa) y *parC* (topoisomerasa IV), lo que produce cambios en las subunidades de la DNA girasa que son el blanco de la actividad de las quinolonas. Cuando los cambios son suficientes en cantidad o en calidad, las girasas ya no se unen a las quinolonas, de manera que el procesamiento del DNA continúa [15, 35].

Uno de los antibióticos con mayor efectividad en este estudio sobre las cepas de enterococos fue el trimetoprim-sulfametoxazol ya que 85% de las cepas fue susceptible a este antibiótico. La susceptibilidad a este antibiótico fue estudiada en enterococos aislados de muestras de carne de res, cerdo, pavo y leche, en donde el trimetoprim-sulfametoxazol ejerció efectividad en el 90-100% de las cepas [34, 37].

Con frecuencia los enterococos muestran susceptibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol mediante pruebas *in vitro*, pero estos fármacos no son eficaces para el tratamiento de la infección. Esta discrepancia se debe a que los enterococos pueden utilizar el folato exógeno disponible *in vivo* para eludir la actividad de sulfonamidas y trimetoprima, que son inhibidores de la vía del ácido fólico [5, 15].

El mecanismo de resistencia bacteriana hacia el trimetoprim-sulfametoxazol, se debe a la alteración en los blancos enzimáticos (dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa para las sulfonamidas y trimetoprima, respectivamente) que ya no se unen al antibiótico [15].

Uno de los posibles factores por el cual los enterococos aislados en este estudio presentaron multirresistencia a los antibióticos puede deberse al uso que se les da a estos en el comercio de animales, ya que comúnmente los antibióticos son utilizados como promotores del crecimiento. Los antibióticos promotores del crecimiento son o han sido utilizados en dosis subterapéuticas en niveles que pueden inducir los mecanismos de resistencia bacteriana y/o la selección para la resistencia de bacterias a antibióticos [35].

Distintas investigaciones de cepas de enterococos aisladas de heces de animales y de alimentos de origen animal, realizadas en distintos continentes y en múltiples ciudades, han confirmado la estrecha asociación que existe entre el uso de los antibióticos promotores del crecimiento y los altos niveles de resistencia por parte de las bacterias contra antibióticos de importancia médica. Esta asociación se ha investigado mas a menudo con la relación que existe entre el uso de la avoparcina y los enterococos resistentes a glicopéptidos, pero también se ha mostrado con otra clase de antimicrobianos [65,35].

De 1995 al 2000 en Dinamarca se aislaron enterococos de aves y cerdos y se probó la susceptibilidad a cuatro clases de agentes antimicrobianos utilizados como promotores del crecimiento; la suspensión de su uso marcó un notable decremento en la ocurrencia de la resistencia de los enterococos [1]. Otro estudio similar también realizado en Dinamarca muestra como a partir de 1995 año en el que fue suspendido el uso de la avoparcina como antibiótico promotor del crecimiento, la resistencia a glicopéptidos decreció de 23% en 1997 a 3% en 2002

y 2003, mientras que en 1998 se suspendió el uso de la tilosina y la resistencia a macrólidos decreció de 79% en 1997 a 23% en 2001 [27]. El mismo comportamiento mostraron cepas de enterococos aisladas de cerdos en Suiza en donde utilizaron tilosina como antibiótico promotor del crecimiento. El estudio realizado sugiere que la suspensión del uso de antibióticos como promotores del crecimiento tiene un efecto relativamente rápido en la disminución de la resistencia antimicrobiana [4].

Otro uso común de los antimicrobianos es como aditivo en el alimento para animales, éste es otro factor importante de riesgo para la presencia de nuevos genes de resistencia así como la presencia de patógenos multirresistentes [59].

Se observó variabilidad al comparar entre los porcentajes de cepas de enterococos resistentes a los antibióticos aisladas a partir de cada una de las muestras de pollo (carne molida e hígado) obtenidas durante los dos muestreos realizados en este estudio, esto se debe a que los muestreos de la carne se realizaron en distintas tiendas (mercados y supermercados), en cada una de las cuales las condiciones de higiene varían; incluyendo al personal, los congeladores, las superficies, los cuchillos, el molino de carne que a su vez también se utiliza para moler distintos tipos de carne. Klein et al. (1998) realizaron un estudio para determinar el patrón de resistencia de los enterococos a los antibióticos, el aislamiento de las bacterias se realizó a partir de carne de res y de puerco, en el estudio mencionado se tomaron medidas de higiene con la finalidad de minimizar el riesgo de



contaminación de la carne con enterococos del ambiente; antes de procesar la carne se examinaron las superficies de la planta procesadora de carne, para determinar si éstas estaban contaminadas con enterococos. Se detectó la presencia de enterococos en 7 de las 48 superficies analizadas.

Otro factor que pudo influir en la variabilidad de enterococos resistentes presentes en cada una de las muestras, son las condiciones en las que se criaron los animales hasta el momento de su sacrificio y la manipulación que se le dio a la carne hasta el momento en que fue distribuida al expendio. Si bien no se conoce la procedencia de la carne, se sabe que en México está autorizado el uso de un gran número de antimicrobianos para uso terapéutico y como promotores del crecimiento.

En el acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación el 12 de Julio del 2004, se clasificó a los productos farmacéuticos veterinarios de acuerdo al nivel de riesgo de sus ingredientes activos, y los antibióticos se encuentran clasificados dentro del grupo II, que lo conforman aquellos ingredientes activos de productos farmacéuticos veterinarios que para su comercialización requieren receta médica simple. Dentro del mismo grupo se encuentra la mayoría de los antibióticos promotores del crecimiento y la otra parte pertenecen al grupo III que son productos farmacéuticos veterinarios de libre venta en el país. Esto nos da un amplio panorama de la variedad y facilidad de adquirir productos farmacéuticos de uso veterinario para la crianza de animales para consumo humano en México y

como consecuencia ser uno de los factores implicados en la adquisición de resistencia por parte de las bacterias.

Otros resultados que se obtuvieron en este estudio fue la frecuencia de especie, de la cual el 50% de las cepas aisladas correspondían a *E. faecium* y el 50% restante correspondía a *E. faecalis*. Franz et al. (2003) mencionan que la especie predominante aislada de muestras de pollo fue *E. faecalis*. En el trabajo realizado por Thal et al. (1995) se aislaron 18 cepas de enterococos de 29 pollos congelados adquiridos en supermercados del sudeste de Michigan, 11 de las cepas pertenecían a *E. faecalis*, 3 a *E. faecium*, 3 a *E. gallinarum* y 1 a *E. casseliflavus*. Klein et al. (1998) aislaron cepas de enterococos de carne de cerdo y carne de res, encontrando que la especie predominante en ambos tipos de carne era *E. faecalis* (87%) y 4% correspondía a *E. faecium*. En otro estudio en donde las muestras eran de carne de cerdo adquiridas en distintas carnicerías, las especies predominantes fueron *E. faecium* y *E. faecalis* [16]. En alimentos como embutidos, jamón, carne y queso el mayor porcentaje de cepas aisladas correspondieron a *E. faecalis* (72%) y *E. faecium* (13%), con porcentajes menores se encontraron cepas como *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. avium* y *E. gallinarum* [47]. En alimentos de origen vegetal como apio, perejil, col, cilantro, espinacas se encontró que un total de 52% de enterococos correspondían a *E. faecium*, 21% a *E. faecalis* y el 27% restante correspondía a otras especies de *Enterococcus* [29].

También se han realizado aislamientos de enterococos provenientes de muestras fecales de distintos animales. Junco et al.(2005) aislaron cepas de enterococos a partir de muestras fecales de aves de corral y encontraron que el 63.6 % pertenecían a *E. faecalis*, 7.3% a *E. casseliflavus* y el porcentaje restante pertenecía a otras especies de enterococos. En muestras fecales de pavos se encontró que la especie predominante fue *E. faecium* seguida de *E. faecalis* [56]. Klein (2003) menciona que en el tracto gastrointestinal de animales como aves de corral, vacas y cerdos *E. faecium* es una especie frecuente, pero también se encuentra gran cantidad de especies de *E. faecalis* y *E. cecorum*.

El consumo de alimentos contaminados (especialmente de origen animal) puede ser un vehículo de transmisión de enterococos resistentes al humano, así como el medio ambiente incluyendo a la gente y a los animales; debido a que los enterococos resistentes a antibióticos pueden sobrevivir al paso gástrico, multiplicarse y colonizar el tracto gastrointestinal por un significativo periodo de tiempo, esto sustenta su presencia en el intestino, además de servir como reservorio de transmisión horizontal de los genes de resistencia a cepas comensales o bacterias patógenas de la microflora intestinal del humano [3, 23, 29].

Klare (2003), menciona que en China se reportó una epidemia causada por *E. faecium* resistente a la ampicilina y susceptible a la vancomicina, en la cual miles de cerdos domésticos murieron por un shock hemorrágico (del 24 de Julio al 31 de Agosto de 1998). Después (del 28 de Julio al 6 de Septiembre de 1998) 40

granjeros locales fueron hospitalizados con una severa enfermedad después del contacto con cerdos enfermos; 12 (30%) de estos pacientes murieron por paro respiratorio y shock. El aislamiento de *E. faecium* de los cerdos y humanos poseían idéntica susceptibilidad a los antibióticos [35].

El estudio realizado por Sorensen et al. (2001) demostró las consecuencias de la ingesta de enterococos resistentes a los glicopéptidos y a la estreptogramina aislados de carne de pollo y cerdo adquiridos en bodegas y carnicerías. Dieciocho voluntarios sanos ingirieron una suspensión de cepas de *E. faecium* en leche; grupos de seis voluntario ingirieron *E. faecium* resistente a glicopéptidos, resistentes a estreptogramina y susceptibles a glicopéptidos y estreptogramina respectivamente. Las muestras fueron colectadas antes de la exposición; y después de la ingesta las muestras se colectaron diariamente por una semana, a los 14 y 35 días. Al inicio del estudio ninguno de los sujetos estaba colonizado con *E. faecium* resistentes a glicopéptidos o a estreptogramina. Después de la ingesta de las cepas en estudio, estas mismas cepas se aislaron de las muestras fecales de todos los sujetos en varias concentraciones. Las cepas se aislaron de muestras fecales de 8 de los 12 sujetos en el día 6 posterior a la exposición y de uno de los 12 sujetos en el día 14. Todas las muestras fueron negativas en el día 35.

Estos estudios nos demuestran la transmisión de enterococos resistentes al humano a través de los alimentos y el ambiente, y su capacidad de sobrevivir al paso gástrico y multiplicarse.

Contrario a lo previamente descrito en un estudio se concluyó que probablemente no se asociaba el consumo de carne y la colonización intestinal con enterococos vancomicina resistentes (VRE), ya que se encontró la presencia de VRE en muestras fecales más a menudo en vegetarianos que en aquellos que no lo eran (9.7 contra 4.7%) [37]. Otro estudio mostró que en muestras fecales de 42 personas vegetarianas 23 fueron positivas a *E. faecium* y ninguna a VRE y de 62 personas no vegetarianas 32 fueron positivas a *E. faecium* y seis presentaban VRE [63]. Un estudio epidemiológico realizado en humanos sobre la frecuencia de bacterias resistentes en muestras fecales de vegetarianos y no vegetarianos muestra que no hay diferencia aparente en las bacterias resistentes a antibióticos entre los dos grupos. De hecho la multiresistencia a los antibióticos fue más común entre bacterias provenientes de vegetarianos que de los no vegetarianos [55]. Johnston y Jaykus (2004) encontraron que los vegetales son reservorio de cepas de enterococos que son resistentes a muchos antibióticos comúnmente utilizados, la distribución de la resistencia no fue significativamente diferente a lo reportado por cepas de *Enterococcus* aisladas de productos animales como aves de corral y cerdos. Sin embargo los productos de origen animal son usualmente cocidos previo a su consumo, lo cual teóricamente debería inactivar a la microflora nativa, incluyendo a los enterococos; mientras que los vegetales en muchas ocasiones se consumen crudos o sin el término de la cocción.

No todas las bacterias patógenas resistentes a antibióticos en humanos puede atribuirse al uso de estos medicamentos en la comida para animales; de hecho los

enterococos aislados de alimento no se consideran como la principal fuente de enterococos multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales, debido a que se ha reportado que no existe relación genética entre las cepas de enterococos aisladas de muestras clínicas con cepas aisladas de alimentos. Sin embargo ambas pueden mostrar el mismo patrón de resistencia a antibióticos, por su estrecha relación a ambientes en los que es común el uso de los antibióticos [37].

El uso inapropiado de los antimicrobianos en humanos es responsable del creciente nivel de resistencia en las bacterias [23].

En los hospitales existe un amplio uso de antibióticos especialmente en las unidades de cuidado intensivo, es aquí en donde se manifiesta un importante reservorio, ya que el amplio espectro de resistencia natural y adquirida que presentan los enterococos puede seleccionarse en estos nichos ecológicos. Al mismo tiempo en recientes años hay un cambio en el tipo de pacientes hospitalizados; debido al progreso médico más personas de edad avanzada y/o pacientes inmunocomprometidos están en los hospitales. Estos pacientes son susceptibles a las infecciones causadas por bacterias patógenas y también por bacterias de baja patogenicidad como los enterococos. Para prevenir estas infecciones a los pacientes se les dan antibióticos de diferentes clases los cuales selectivamente pueden favorecer por completo a los enterococos. Además de que muchas veces a los pacientes se les administra una gran cantidad de antibióticos por un prolongado periodo de tiempo o se les administra un antibiótico

inapropiado, lo cual también puede acrecentar la presión selectiva de las bacterias con resistencia natural o adquirida a los antibióticos.

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia frente a este gran uso de los antibióticos en los hospitales y otras áreas en las cuales los antibióticos son utilizados. Adicionalmente las cepas adoptadas en los hospitales pueden ser seleccionadas y diseminarse muy rápido en las clínicas las cuales pueden traer como consecuencia una epidemia de infecciones en varios pacientes, especialmente si ellos no están estrictamente aislados y/o si las medidas comunes de higiene no se aplican [35].

Las bacterias han desarrollado la habilidad para adquirir genes de resistencia a los antibióticos y subsecuentemente ser diseminados a diferentes especies de bacterias, este fenómeno se debe al gran uso que se les ha dado a los antibióticos en medicina humana, en medicina veterinaria, en la crianza de animales, en la agricultura y en la acuicultura [64, 68].

Los elementos genéticos móviles de DNA como transposones e integrones han contribuido a la rápida diseminación de la resistencia a los antibióticos. Estos elementos a menudo se diseminan por la incorporación en plásmidos y pueden moverse de los plásmidos al cromosoma [68].

La presencia de integrones y genes cassettes se ha descrito principalmente en bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y en el género *Pseudomonas* [67].

En el presente estudio se describió la presencia de integrones de clase 1 en bacterias Gram-positivas pertenecientes al género *Enterococcus*, aisladas de carne de pollo. White et al. (2001) reportaron la presencia de integrones de clase 1 en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de distintos tipos de carne (pollo, res, pavo y puerco), el tamaño de los amplicones variaba en un rango de 0.75 a 2.75 Kb. En el estudio realizado por Zhao et al. (2003) se utilizaron muestras de diversos alimentos importados de 38 países entre los que destacan Vietnam, México, Ecuador, Taiwán, Tailandia, India, Canadá, Dinamarca y Camboya; de donde se aislaron cepas de *Salmonella* y se detectó la presencia de integrones de clase 1 con un tamaño de 1.0 y 2.0 Kb en solo dos cepas resistentes a sulfametoxazol. Zhao et al. (2001) investigaron la presencia de integrones de clase 1 en cepas de *Salmonella enterica* Thyphimurium provenientes de diferentes manadas de cerdos, detectando la presencia de dos distintos integrones; el tamaño del amplicón para cada uno de los integrones fue de 1008 y 1133 pb. Guerra et al. (2000) investigaron la diseminación de integrones de clase 1 entre serotipos de *Salmonella*; en el 20% de las muestras (muestras clínicas, de cerdos y de aguas residuales) se detectó la presencia de los integrones, así como también la identificación de siete regiones variables que contenían uno o dos genes de resistencia a antibióticos; el tamaño de los amplicones variaba en un rango de 1000 – 2300 pb.

Otros estudios se han enfocado en la búsqueda de integrones de clase 1 sólo en muestras clínicas, en distintas partes del mundo de donde se han aislado



*Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*; el tamaño de la región variable de los integrones amplificada por PCR varió en el rango de 1.0 – 3.5 Kb [6, 14, 40, 49].

Otras bacterias detectadas en muestras clínicas pertenecían al género *Acinetobacter baumannii*, estas muestras se aislaron de hospitales del sur de África; 21/32 cepas multirresistentes contenían integrón de clase 1 con amplicones de 0.7 y 1.7 Kb [52].

La presencia de integrones de clase 1 también se ha demostrado en ambientes acuáticos (criadero de truchas de agua dulce) de donde Petersen et al. (2000) aislaron un total de 189 *Acinetobacter spp*, de las cuales se seleccionaron 12 cepas resistentes a sulfametoxazol y 12 cepas sensibles al mismo antibiótico, a estas 24 cepas se les determinó la presencia de integrones de clase 1, los cuales se detectaron en 5/24 cepas.

Los productos de PCR obtenidos en este estudio mostraron amplicones con un tamaño de 1.0 Kb en cuatro cepas de enterococos multirresistentes. En diversos estudios también se ha demostrado la presencia de amplicones de este mismo tamaño presentes en bacterias de distintos géneros. En estos mismos estudios también se ha buscado el tipo de genes insertados en la región variable de los integrones. Generalmente las bacterias que presentan integrones de clase 1 con una región variable de 1 Kb solo contienen un gen cassette que la mayoría de veces es el gen que codifica para la resistencia a aminoglucósidos [6, 14, 25, 40, 51, 64, 67, 68].

La resistencia hacia los aminoglucósidos es causada por enzimas que químicamente modifican la molécula del aminoglucósido. Estas enzimas pueden ser codificadas por una variedad de genes cassettes insertados en los integrones de clase 1. Los genes cassettes codifican para acetiltransferasas y por lo menos para una fosfotransferasa que modifican la molécula del aminoglucósido. Los genes cassettes que modifican a los aminoglucósidos se encuentran generalmente formando parte de los integrones de clase 1 [55].

En estudios en donde se ha aislado *Salmonella* de diversas muestras de alimentos como carnes, vegetales, especias y productos de origen animal, se ha encontrado la presencia de integrones de clase 1, con una región variable de 1 Kb, que contienen el gen *aadA* (aminoglucósido adeniltransferasa) que confiere resistencia a la estreptomicina [64, 68]. De muestras de animales de las cuales se han aislado cepas de *Salmonella enterica* y *E.coli* se han detectado integrones de clase 1 con un solo gen cassette (*aadA*) con un tamaño de 1 Kb [51, 67]. Los integrones de clase 1 presentes en cepas clínicas de *Salmonella* y *Klebsiella* mostraron una región variable de 1 Kb con la inserción del gen *ant(3'')-Ia* que codifica para la resistencia a estreptomicina/espectinomicina [40, 6, 25].

En el estudio realizado por Fonseca et al. (2005) se demostró la presencia de integrones de clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*; en dos de las cepas encontraron una región variable con un tamaño de 1 Kb, pero cada una de las cepas presentaba un gen distinto *aadA* y *aac*, ambos genes codifican para la resistencia a los aminoglucósidos.

La repetida presencia de genes cassettes que codifican para la resistencia a los aminoglucósidos en una región variable de 1 Kb presente en los integrones de clase 1 de diversos géneros de bacterias, sugiere la posible presencia de algún gen que codifique para la resistencia a aminoglucósidos en los integrones detectados en las cepas de enterococos que se aislaron en el presente estudio. Otro factor que contribuye a esta hipótesis es el hecho de que el 100% de las cepas mencionadas fueron resistentes al aminoglucósido gentamicina.

Los productos de PCR obtenidos en este estudio mostraron un tamaño de 2.1, 1.4, 1.0 y 0.51 Kb para cada uno de los DNAs; pero se sugiere que el amplicón de 1.0 Kb corresponde a la amplificación de la región variable del integrón de clase 1, por ser esta una banda definida e intensa. Las otras bandas observadas pueden ser producto de una amplificación inespecífica o por variables en la técnica de PCR (tiempo de amplificación, temperatura o número de ciclos); aunque no se descarta la posible presencia de más de un integrón en la misma cepa.

La presencia de más de un integrón en la misma cepa ha sido demostrada en los estudios realizados por Guerra et al. (2000), White et al. (2001) y Zhao et al. (2003) quienes detectaron la presencia de dos integrones en una cepa de *Salmonella*, en todos los casos el tamaño de los integrones fue de 1.0 y 1.2 Kb; cada uno de los cuales contenía un solo gen, *aadA* y *pse-1* respectivamente. En el estudio realizado por Plante et al. (2003) la cepa multirresistente *Enterobacter cloacae* fue positiva para tres integrones, los cuales presentaron un tamaño de 1600, 1700 y 3800 pb; el primer integrón contenía los genes cassettes *dfra1* y

*aadA1* que codifican para la resistencia al trimetoprim y a la estreptomicina/espectinomicina respectivamente; el segundo integrón era responsable de la resistencia a diversos aminoglucósidos por la presencia del gen *aadB* y responsable de la resistencia a la oxacilina (*oxa 9*). El tercer integrón contenía los genes *aacA4* que confieren resistencia a la amikacina, netilmicina y tobramicina, el gen *qacF* que confiere resistencia hacia los compuestos cuaternarios de amonio, el gen *cmIB* y *oxa 9* que respectivamente confieren resistencia al cloranfenicol y a la oxacilina.

El patrón de resistencia a los distintos antibióticos probados en este estudio mostraron que el 50% de las cepas en donde se detectó la presencia de integrones de clase 1 eran susceptibles al trimetoprim-sulfametoxazol . Siendo que el gen *sull* que codifica para la resistencia a la sulfonamida reside en el segmento conservado 3' de los integrones de clase 1, probablemente como resultado de que primero se insertó como un cassette que después comenzó a ser inmóvil debido a cambios en la secuencia flanqueada del DNA. En más de 70 integrones típicos de clase 1 aislados hasta ahora, la secuencia del gen *sul* es idéntica [55].

El hecho de que las cepas de enterococos positivas para el integrón de clase 1 aisladas en este estudio fueran susceptibles al trimetoprim-sulfametoxazol sugiere que el gen *sull* no se está expresando o no es funcional. Un fenómeno similar se observó en el estudio realizado por Zhao et al. (2003), en donde detectaron la presencia del gen *aadA* en la región variable del integrón de clase 1 presente en dos cepas de *Salmonella* las cuales eran susceptibles a la estreptomicina, siendo

que los genes detectados codifican para estreptomycin. Zhao et al. (2001) reportaron que el gen *aadA* presente en el integrón de *E.coli* 0111:NM era silencioso, además demostraron que este gen comenzaba a expresarse cuando el integrón se transfería por medio de la conjugación a una nueva bacteria hospedadora.

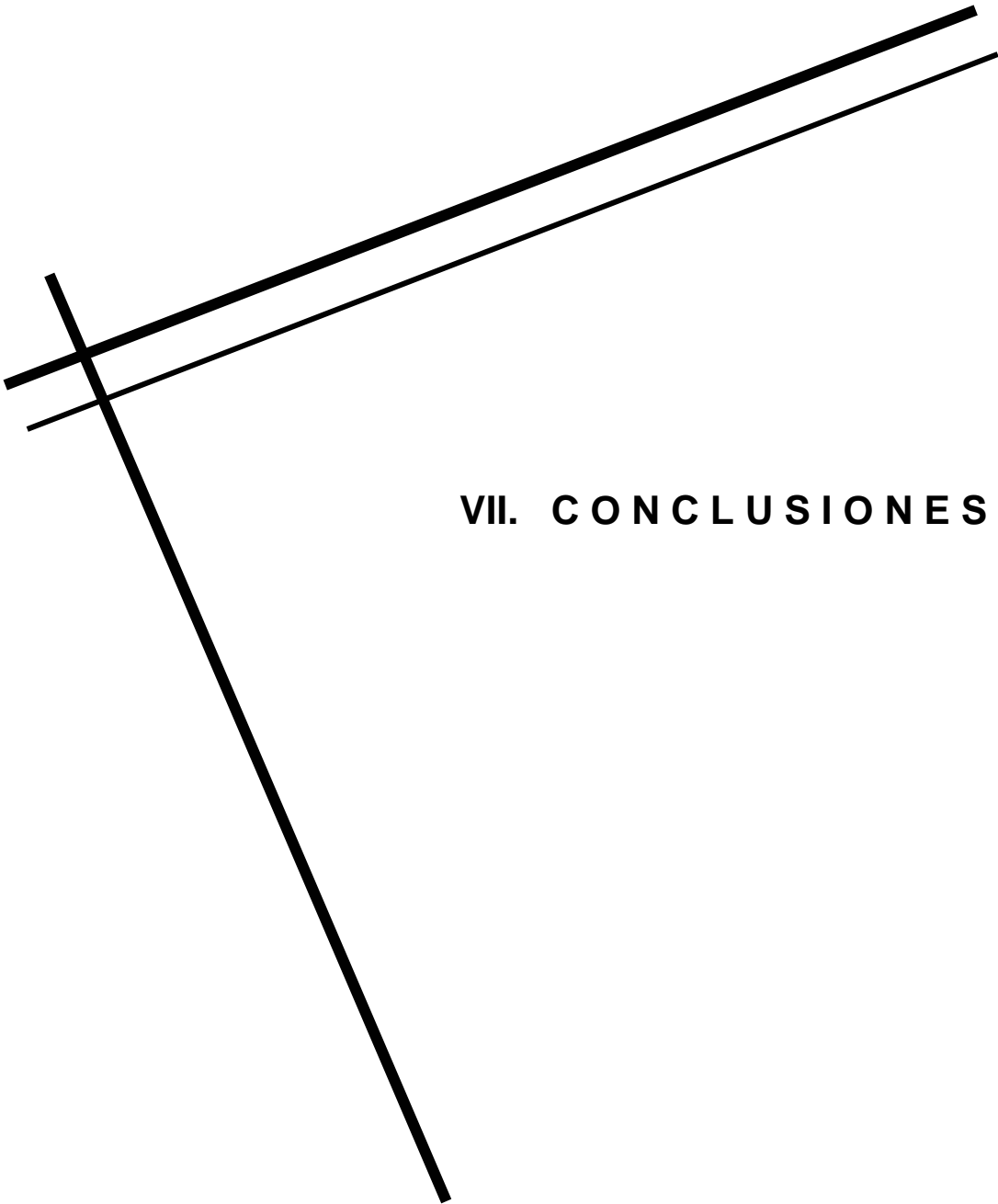
Otro fenómeno por el cual las bacterias fueron susceptibles al trimetoprim-sulfametoxazol puede deberse al efecto sinérgico que ejerce la combinación del trimetoprim con el sulfametoxazol, sugiriendo que las cepas probablemente son resistentes al sulfametoxazol, pero no lo son al trimetoprim y por lo tanto las cepas se volvieron sensibles al estar expuestas a la combinación de estos antibióticos. Mandell y Petri (1996) mencionan que las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina a pesar de que también lo son al trimetoprim o al sulfametoxazol por separado, pueden ser sensibles a ambos en combinación. La interacción sinérgica entre los componentes del preparado se advierte incluso en el caso de microorganismos resistentes a una sulfonamida o con resistencia a ella y resistencia moderada al trimetoprim. Sin embargo se produce un grado máximo de sinergismo cuando los microorganismos son sensibles a ambos componentes. La presencia de integrones en cepas aisladas en este estudio, así como su presencia en distintos ambientes y en distintas ciudades del mundo, refleja la gran capacidad de diseminación que tienen estos elementos genéticos, además de que en otros reportes se ha encontrado la misma estructura del integrón y los mismos

genes cassettes insertados en estos, los cuales han estado presentes en bacterias clínicas y ambientales.

La presencia de enterococos en alimentos, los cuáles contienen elementos genéticos móviles como lo son los integrones que inducen la resistencia a antibióticos, crea una mayor emergencia en cuanto a su potencial patogénico.

Es necesario que los antibióticos se empleen de forma apropiada tanto en los nosocomios como en la medicina humana y veterinaria, ya que su uso indiscriminado potencia el riesgo de la ocurrencia y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos o bien la diseminación de sus genes de resistencia.

Es necesario que en México se cuente con una reglamentación que establezca los lineamientos y criterios para la prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios y que descarte el uso veterinario tanto en medicina veterinaria como para la crianza de animales de aquellos antibióticos empleados en la terapia humana, o que creen resistencia cruzada con éstos; todo esto con la finalidad de disminuir el riesgo de la diseminación de la resistencia a los antibióticos, así mismo para evitar el uso indebido, los desvíos del uso y el abuso de los antibióticos.

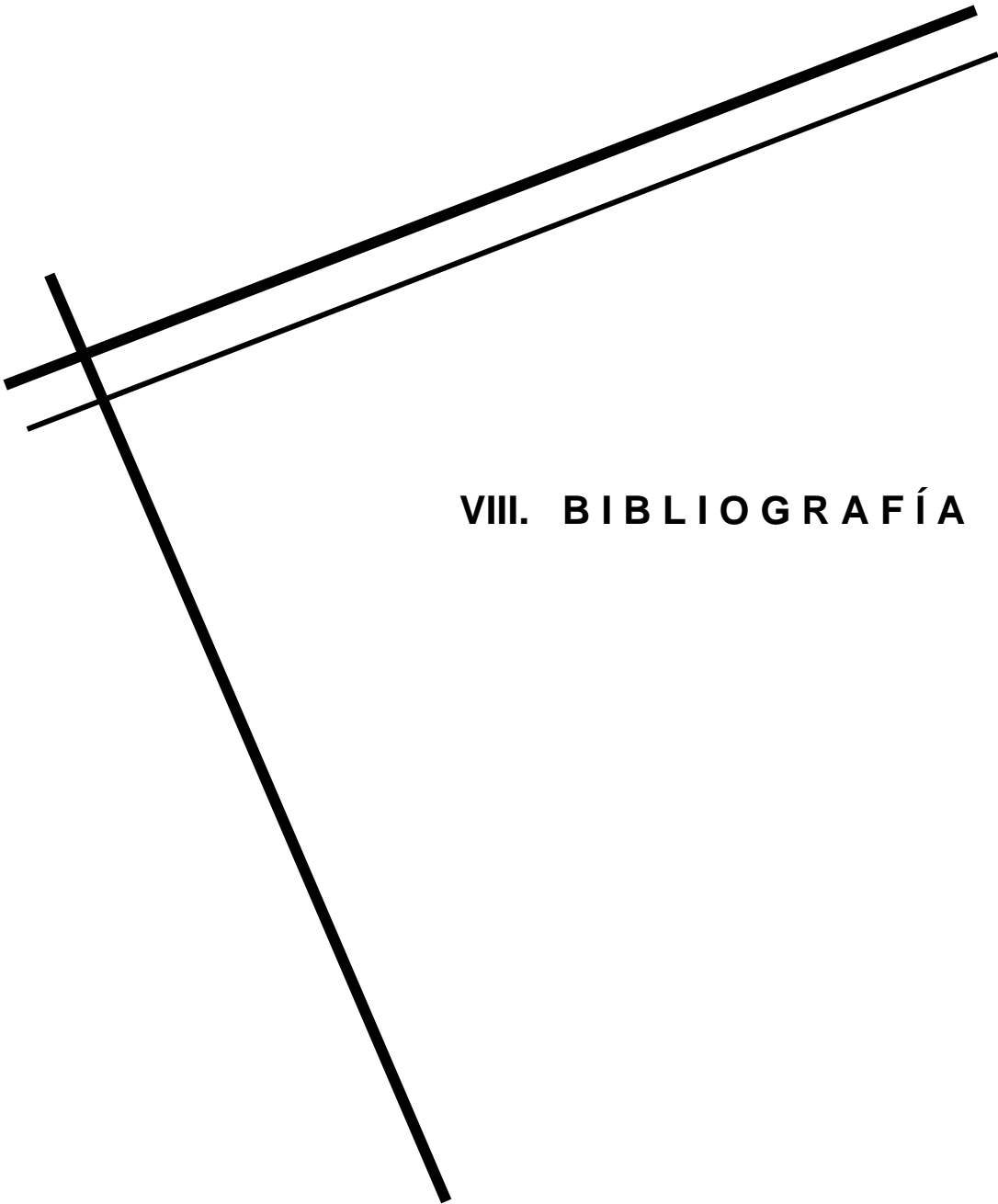


**VII. CONCLUSIONES**

- Las especies de enterococos aisladas de carne de pollo e hígado de pollo correspondieron a *E. faecalis* y *E. faecium* respectivamente.
- En total se aislaron 34 cepas de enterococos a partir de carne molida de pollo y 69 cepas a partir de hígado de pollo.
- Se encontró variabilidad en el número de cepas de enterococos resistentes a antibióticos aisladas a partir de distintas muestras de pollo (carne molida e hígado de pollo) obtenidas durante el primer muestreo, con respecto al número de cepas resistentes aisladas de muestras de pollo provenientes del segundo muestreo.
- A partir de las muestras de hígado de pollo obtenidas durante el primer muestreo, se obtuvo el mayor número de enterococos resistentes a 8 distintos antibióticos de los 12 probados.
- Del total de cepas aisladas tanto de carne molida de pollo como de hígado de pollo, el 95% de estas fueron resistentes al menos a 5 antibióticos; el mayor porcentaje de cepas (13%, 25%, 22%, y 19%) fueron resistentes a 6, 7, 8 y 9 antibióticos respectivamente; porcentajes menores de cepas fueron resistentes a 10 (6%), 5 (8%), 3 (2%), 4 (2%) y 11 (2%) antibióticos; solo una cepa fue resistente a un antibiótico y ninguna lo fue para los 12 antibióticos probados.
- Los antibióticos con mayor actividad antibacteriana contra las cepas de enterococos fueron la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol.



- Las muestras de carne molida de pollo que se adquirieron en el supermercado 1 presentaron el mayor número de enterococos resistentes a seis distintos antibióticos, mientras que de las muestras de hígado de pollo adquiridas en el supermercado 4 se aisló el mayor número de enterococos, siendo resistentes a siete antibióticos.
- Los resultados obtenidos en este estudio indican que la carne de pollo sirve como reservorio de enterococos multirresistentes a los antibióticos empleados comúnmente en medicina humana tanto para tratar infecciones causadas por enterococos como para tratar infecciones causadas por otras bacterias Gram-positivas o bacterias Gram-negativas.
- Cuatro cepas de enterococos presentaron integrón de clase 1, tres de estas cepas se aislaron de hígado de pollo
- Las cepas que presentaron integrón fueron multirresistentes a 9 y 10 antibióticos.



**VIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. **Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S., Bager, F.**, 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2054-2059.
2. **Aarestrup, F. M., Hasman, H., Jensen, L. B., Moreno, M., Herrero, I. A., Domínguez, L., Finn, M., Franklin, A.**, 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4127-4129.
3. **Anderson, A. D., Nelson, J. M., Rossiter, S., Angulo, F. J.**, 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial drug resistance.* **9**, 373-379.
4. **Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F. M., Frey, J., Nicolet, J.**, 2001. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4193-4195.
5. **Brooks, G. F., Morse, S. A., Butel, J. S.**, 1998. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 16va. ed. Ed. El manual moderno, México.
6. **Brown, A. W., Rankin, S. C., Platt, D.J.**, 2000. Detection and characterization of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 145-149.

7. **Chambers, H. F. y Sande, M. A.**, 1996. Fármacos antimicrobianos: consideraciones generales, 9na ed. En: Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), Las bases farmacológicas de la terapéutica, vol. 2. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 1095-1122.
8. **Chambers, H. F. y Sande, M. A.**, 1996. Fármacos antimicrobianos: aminoglucósidos, 9na ed. En: Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), Las bases farmacológicas de la terapéutica, vol. 2. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 1173-1192.
9. **Davies, J.**, 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
10. **Deibel, R. H. y Hartman, P. A.**, 1984. The enterococci, 2da. ed. En: Speack, M. L. (Ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of food. American public health association, Washington D. C., pp. 405-410.
11. **Diario Oficial de la Federación.** 2004. Acuerdo por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación, México. Julio.
12. **DuPont, H. L. y Steele J. H.**, 1987. Use of antimicrobial agents in animal feed: Implications for human health. *Rev. Infect. Dis.* **9**, 447-459.
13. **Eaton, T. J. y Gasson, M. J.**, 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1628-1635.

14. **Fonseca, E. L., Vieira, V. V., Cipriano, R., Vicente, A. C. P.**, 2005. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **44**, 303-309.
15. **Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S.**, 2004. Diagnóstico microbiológico, 11va ed. Ed. Médica panamericana, Argentina
16. **Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H.**, 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol. **88**, 105-122.
17. **García, J. M. L.**, 1999. Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos. Sociedad Española de Microbiología **28**, 18-22.
18. **Gardner, E. J., Simmons, M. J., Snustad, D. P.**, 2000. Principios de genética, 4ta. ed. Ed. Limusa Wiley, México, pp. 205-246.
19. **Garza, R. V., Gaona, V. E. G., Hernández, G. L., Perea, L. M. M.** Estreptograminas: un modelo interesante para hacerle frente a la resistencia bacteriana [Fecha de acceso: 23 Marzo 2006]. URL disponible en:  
<http://depa.pquim.UNAM.mx/bacteriología/pdfs/ART%20CDC.Estreptogramina.pdf>.
20. **Giraffa, G.**, 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiol. Rev. **26**, 163-171.
21. **González, C. A.**, Plásmidos [Fecha de acceso: 23 Marzo 2006]. URL disponible en:  
<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/LaCelula/Plasmidos.htm>.

22. **González, G. R., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., Domínguez, M.,** 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Med. Chile* **132**, 619-626.
23. **Gorbach, S. L.,** 2001. Antimicrobial use in animal feed- time to stop. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1202-1203.
24. **Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M.,** 2002. *Genética*, 7ma ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España, pp. 606-614.
25. Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza, M. C., 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2166-2169.
26. **Hall, R. M. y Collins, C. M.,** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site- specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**, 593-600.
27. **Hasman, H. y Aarestrup, F. M.,** 2005. Relationship between copper, glycopeptide, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 454-456.
28. **Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J.,** 1990. *PCR protocols a guide to methods and applications.* Academic Press. San Diego.

29. **Johnston, L. M. y Jaykus, L. A.**, 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3133-3137.
30. **Jones, M. E., Peters, E., Weersink, A. M., Fluit, A., Verhoef, J.**, 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* **349**, 1742-1743.
31. **Juliet, C.**, 2002. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. *Rev. Chil. Infect.* **19** (Supl.2), S111-115.
32. **Junco, T., Rodríguez, A., Barrasa, M., Martín, G.**, 2005. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strain isolated from poultry faeces. *Research Vet. Science* **78**, 33-38.
33. **Kapusnik-Uner, J. E., Sande, M. A., Chambers, H. F.**, 1996. Fármacos antimicrobianos: tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y diversos antibacterianos, 9na ed. En: Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, vol. 2. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 1193-1224.
34. **Khan, S. A., Nawaz, M. S., Khan, A. A., Hopper, S. L., Jones, R. A., Cerniglia, C. E.**, 2005. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol. Cell. Probes.* **19**, 27-34.

35. **Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Wener, G., Witte, W.,** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int. J. Food Microbiol. **88**, 269-290.
36. **Klein, G.,** 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Int. J. Food Microbiol. **88**, 123-131.
37. **Klein, G., Pack, A., Reuter, G.,** 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 1825-1830.
38. **Klug, W. S., Cummings, M. R.,** 1999. Conceptos de genética, 5ta ed. Ed. Prentice Hall, España, pp. 167-168.
39. **Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C.,** 1999. Diagnóstico microbiológico, 5ta. ed. Ed. Medica panamericana, Argentina, pp. 583-630.
40. **Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P. H.,** 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 185-191.
41. **Mac Faddin, J. F.,** 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Ed. Medica panamericana. Buenos Aires.

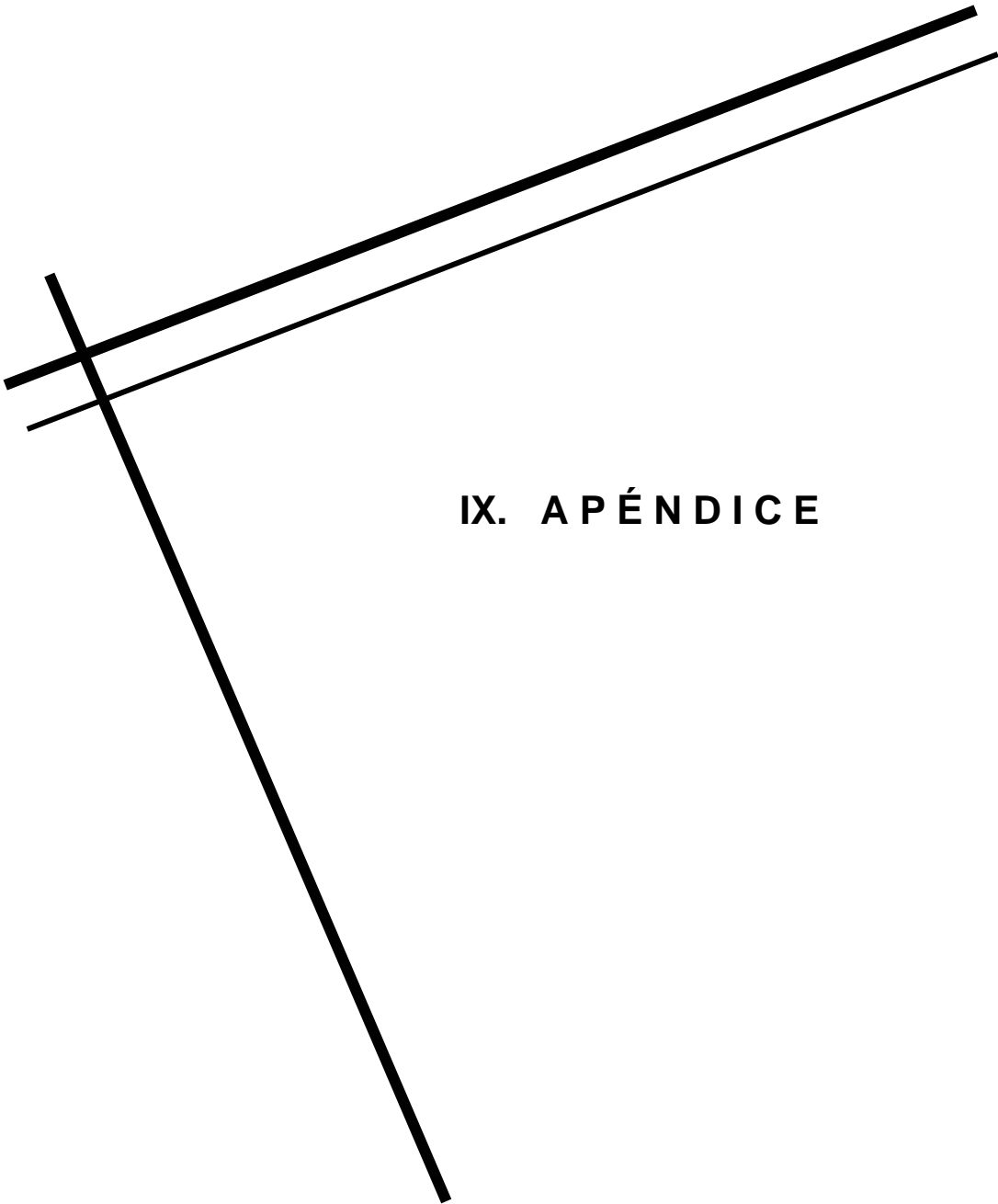


42. **Mandell, G. L. y Petri, W. A.**, 1996. Fármacos antimicrobianos: sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas y fármacos contra infecciones de vías urinarias, 9na ed. En: Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), Las bases farmacológicas de la terapéutica, vol. 2. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 1123-1140.
43. **Mandell, G. L. y Petri, W. A.**, 1996. Fármacos antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, 9na ed. En: Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.), Las bases farmacológicas de la terapéutica, vol. 2. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 1141-1172.
44. **Murray, B. E.**, 1991. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J. Infect. Dis.* **163**, 1185-1194.
45. **Nicholas, F. W.**, 1987. Genética veterinaria, Ed. Acribia Zaragoza, España. pp. 309-330.
46. **Palumbi, S., et al.**, 1991. Guide to PCR. Department of zoology and kewalo merine laboratory, University of Hawaii.
47. **Peters, J.**, Wichmann-Schaver, K. M. H., Klein, G., Ellerbroek, L., 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 311-314.
48. **Petersen, A., Gurdabassi, L., Dalsgaard, A., Olsen, J. E.**, 2000. Class I integrons containing a *dhfr I* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 73-76.

49. **Plante, I., Centrón, D., Roy, P.H.**, 2003. Direct sequencing and PCR mapping of integrons reveals multiple class 1 integrons in the multiresistant strain *Enterobacter cloacae* SCH88040794. FEMS Microbiol. Lett. **221**, 59-62.
50. **Rowe-Magnus, D. A. y Mazel, D.**, 2001. Integrons natural tools for bacterial genome evolution. Curr. Opin. Microbiol. **4**, 565-569.
51. **Sandvang, D., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B.**, 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **160**, 37-41.
52. **Segal, H., Thomas, R., Elisha, B. G.**, 2003. Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. Plasmid **49**, 169-178.
53. **Singer, M. y Berg, P.**, 1993. Genes y genoma una perspectiva cambiante, Ediciones omega, Barcelona, pp. 238-241.
54. **Sørensen, T. L., Blom, M., Monnet, D. L., Müller, N. F., Poulsen, R. L., Espersen, F.**, 2001. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistance *Enterococcus faecium* from chicken and pork. N. Engl. J. Med. **345**, 1161-1166.
55. **Sørum, H. y L' Abée-Lund, T. M.**, 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria- a result of interfering with the global web of bacterial genetics. Int. J. Food Microbiol. **78**, 43-56.

56. **Stobberingh, E., van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., Top, J., Willems, R.**, 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2215-2221.
57. **Teuber, M.**, 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 493-499.
58. **Teuber, M., Schwarz, F., Perreten, V.**, 2003. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 325-329.
59. **Thal, L. A., Chow, J. W., Mahayni, R., Bonilla, H., Perri, M. B., Donabedian, S. A., Silverman, J., Taber, S., Zervos, M. J.**, 1995. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2112-2115.
60. **Towner, K. J.**, 1995. The problem of resistance, 3ra. ed. En: Greenwood, D. (Ed.), *Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, New York, pp. 139-146.
61. **van den Bogaard, A. E., Willerns, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E. E.**, 2002. Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 497-505.

62. **Wegener, H. C.**, 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 439-445.
63. **Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B., Hammerum, A. M., Bager, F.**, 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging Infect. Dis.* **5**, 329-335.
64. **White, D. G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P.F., McDermott, S., Wagner, D. D., Meng, J.**, 2001. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1147-1154.
65. **Witte, W.**, 1999. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 1-9.
66. **Witte, W.**, 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997.
67. **Zhao, S., White, D. G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., Wagner, D., Gaines, S., Meng, J.**, 2001. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1558-1564.
68. **Zhao, S., Datta, A. R., Ayers, S., Friedman, S., Walker, R. D., White, D. G.**, 2003. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. *Int. J. Food Microbiol.* **84**, 87-92.



**IX. APÉNDICE**

## MEDIOS DE CULTIVO

### 1) *Streptococcus agar* (agar KF)

Fórmula por litro

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Peptona de proteasa No. 3 ----- | 10,0 g  |
| Extracto de levadura -----      | 10,0 g  |
| Cloruro de sodio -----          | 5,0 g   |
| Glicero fosfato de sodio -----  | 10,0 g  |
| Maltosa -----                   | 20,0 g  |
| Lactosa -----                   | 1,0 g   |
| Azida de sodio -----            | 0,4 g   |
| Púrpura de bromocresol -----    | 0,015 g |
| Agar -----                      | 20,0 g  |

Preparación: Disolver 76.4 g de polvo KF en 1L de agua destilada. Calentar agitando y que hierva durante 1 min. para disolver por completo. Calentar 5 min. adicionales. Antes de la solidificación del medio agregar una solución de TTC al 1%

## 2) Caldo Infusión cerebro-corazón (Caldo BHI)

Fórmula por litro

|   |        |
|---|--------|
| Extracto de cerebro, de corazón y peptona ----- | 27,5 g |
| D(+) glucosa -----                              | 2,0 g  |
| Cloruro de sodio -----                          | 5,0 g  |
| Hidrógeno fosfato di-sódico -----               | 2,5 g  |

Preparación del caldo BHI: Disolver 37 g de caldo BHI en 1 L de agua destilada.

Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C

Preparación de agar BHI: Disolver 37 g de caldo BHI y 20 g de agar en 1L de agua destilada. Calentar agitando y que hierva durante 1 min. para disolver por completo. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

Preparación de caldo BHI + 6.5% NaCl: Disolver 37 g de caldo BHI mas 60 g de NaCl en 1L de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C

### 3) Agar Mueller-Hinton

Fórmula por litro

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Polvo de extracto de carne ----- | 2,0 g  |
| Digerido ácido de caseína -----  | 17,5 g |
| Almidón -----                    | 1,5 g  |
| Agar -----                       | 17,0 g |

Preparación: Disolver 38,0 g de polvo Mueller-Hinton en 1 L de agua destilada, hervir por 1 min. para disolver por completo. Esterilizar en autoclave por 15 min. a 121°C

### 4) Gel de Agarosa 1%

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Agarosa -----            | 0,20 g |
| Tris-boratos (5 X) ----- | 2 mL   |
| Agua destilada -----     | 18 mL  |

Preparación: Disolver la agarosa en el volumen indicado de agua , calentar para disolver por completo y adicionar la solución de tris- boratos.



### 5) Medio de suspensión API

Fórmula por litro

|   |         |   |
|---|---------|---|
| L-cistina -----                         | 0,5     | g |
| Triptona (origen bovino/ porcino) ----- | 20      | g |
| Cloruro de sodio -----                  | 5       | g |
| Sulfito de sodio -----                  | 0,5     | g |
| Rojo de feno -----                      | 0,17    | g |
| pH                                      | 7.4-7.6 |   |

Preparación: Disolver los reactivos en 1 L de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

## **SOLUCIONES**

### **6) Buffer de lisis**

|             |        |
|-------------|--------|
| EDTA        | 100 mM |
| Tris pH 7.5 | 10 mM  |
| SDS         | 1%     |

Preparación: Mezclar los reactivos en el volumen de agua deseado y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### **7) Fenol equilibrado**

Preparación: El fenol se satura con dos volúmenes de agua, se agita y se espera a que se separen las fases, posteriormente se agregan dos volúmenes de tris pH 8 0.1M y se monitorea el pH hasta obtener un pH de 7. Una vez equilibrado se elimina el tris y se adiciona agua.

### 8) Buffer Tris- boratos (5X)

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Tris base pH 8 ----- | 54 g    |
| Ácido bórico -----   | 27,5 g  |
| EDTA -----           | 3,72 g  |
| Agua -----           | 1000 mL |

Preparación: Cada uno de los reactivos se disuelve en agua, y posteriormente se lleva a un volumen final de 1000 mL, se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS

### 9) Prueba de la catalasa

**Fundamento:** La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, la excepción principal es el *Streptococcus*.

La descomposición del peróxido de hidrógeno se produce a través de la acción de la catalasa. En la descomposición del peróxido de hidrógeno actúan dos moléculas, una molécula actúa como sustrato y la otra como donador. El sustrato reducido por los átomos de hidrógeno cedidos por el donador, da como resultado un sustrato reducido (dos moléculas de agua) y un donador oxidado (oxígeno).

## 10) Tiras Api 20 Strep

| Prueba bioquímica                                       | Fundamento  |
|---|---|
| Voges-Proskauer (VP)                                    | Determina la capacidad de algunos microorganismos para producir como producto final acetilmetilcarbinol (AMC, acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa.   |
| Hidrólisis de hipurato (HIP)                            | Determina la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar el hipurato de sodio (ácido hipúrico) a ácido benzoico y glicina por acción de la enzima hipurato hidrolasa (hipuricaza). La actividad enzimática se determina por detección de cualquier producto final, ácido benzoico o glicina.  |
| Hidrólisis de bilis y esculina (ESC)                    | Determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina y glucosa en presencia de bilis. La esculetina reacciona con una sal de hierro (III) para formar un complejo fenólico de color castaño oscuro negro. El citrato férrico es incorporado en el medio de bilis y esculina como indicador de la hidrólisis de esculina.  |
| Hidrólisis de pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYRA) | Detecta la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa (L-pirolglutamilaminopeptidasa). El sustrato L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida es hidrolizado por la enzima L-pirolglutamilaminopeptidasa a L-pirrolidona y $\beta$ -naftilamina libre; sustancia incolora. La $\beta$ -naftilamina reacciona con DMACA (p-dimetilaminocinamaldehído) el que actúa como un colorante acoplador diazo y forma un color rojo. |
| Prueba de la $\alpha$ -Galactosidasa ( $\alpha$ -GAL)   | Determina la presencia de la enzima $\alpha$ -galactosidasa.  |
| Prueba de la $\beta$ -Glucuronidasa ( $\beta$ GUR)      | Determina la presencia de la enzima $\beta$ -glucuronidasa.   |
| Prueba de la $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL)     | Determina la presencia o ausencia de la enzima $\beta$ -galactosidasa mediante el uso del compuesto orgánico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) o p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (PNPG). El reactivo ONPG incoloro es hidrolizado por la enzima $\beta$ -galactosidasa dando como productos galactosa y un compuesto cromógeno amarillo o-nitrofenol.  |
| Prueba de la fosfatasa alcalina (PAL)                   | Determina la capacidad de un microorganismo de producir la suficiente fosfatasa para hidrolizar el difosfato de fenoltaleína (PDP). El PDP es hidrolizado en presencia de la enzima fosfatasa, dando como resultado fenoltaleína libre la cual reacciona con un álcali para dar un cambio de color en el medio (rosa o rojo brillante).   |
| Prueba de leucina aminopeptidasa (LAP)                  | Detecta la presencia de la enzima leucina aminopeptidasa. La leucina- $\beta$ -naftilamida es hidrolizada por la leucina aminopeptidasa, para dar $\beta$ -naftilamina libre. El color aparece cuando se produce el grupo azo cromóforo -N= como resultado de la unión entre la naftilamina liberada enzimáticamente y el reactivo p-dimetilaminocinamaldehído.   |
| Prueba de hidrolasa (ADH)                               | Determina la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad.  |

|   |   |
|---|---|
| Prueba de fermentación de hidratos de carbono (D-ribosa, L-arabinosa, D-manitol, D-sorbitol, D-lactosa, D-trehalosa, inulina, D-rafinosa, almidon, Glicógeno) | Determina la capacidad de un microorganismo para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido y/o gas. |
|---|---|

## SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

### 11) Interpretación de la susceptibilidad a los antibióticos mediante la prueba de difusión en disco.

| Antibiótico        | Concentración (µg/ml) | Diámetro del halo de inhibición en mm |       |      |
|--------------------|-----------------------|---------------------------------------|-------|------|
|                    |                       | R                                     | I     | S    |
| Ampicilina (AM)    | 10                    | ≤ 16                                  |       | ≥ 17 |
| Cefalotina (CF)    | 30                    | ≤ 14                                  | 15-17 | ≥ 18 |
| Cefotaxima (CTX)   | 30                    | ≤ 14                                  |       | ≥ 15 |
| Ceftazidima (CAZ)  | 30                    | ≤ 14                                  | 15-17 | ≥ 18 |
| Cefuroxima (CXM)   | 30                    | ≤ 14                                  | 15-17 | ≥ 18 |
| Dicloxacilina (DC) | 1                     | ≤ 10                                  | 11-12 | ≥ 13 |
| Eritromicina (E)   | 15                    | ≤ 13                                  | 14-17 | ≥ 18 |
| Gentamicina (GE)   | 10                    | ≤ 12                                  | 13-14 | ≥ 15 |
| Pefloxacina (PEF)  | 5                     | ≤ 14                                  | 15-22 | ≥ 23 |
| Penicilina (PE)    | 10 U                  | ≤ 14                                  |       | ≥ 15 |
| Tetraciclina (TE)  | 30                    | ≤ 14                                  | 15-18 | ≥ 19 |
| Trimetoprim- (SXT) | 25                    | ≤ 10                                  | 11-15 | ≥ 16 |
| Sulfametoxazol     |                       |                                       |       |      |

R resistente, I intermedio, S susceptible