

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DEPTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA FACULTAD DE QUIMICA
UNAM**

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE
Salmonella enterica SEROTIPOS *enteritidis*, *typhi* y *gallinarum* AISLADAS
DE AVES Y HUMANOS.**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN
BIOQUIMICA CLINICA**

P R E S E N T A:

BIOLOGA EXP. CLAUDIA CÓRDOVA BARRIOS

A S E S O R:

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

MEXICO D.F. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Javier Cabiedes Contreras (INCMN "SZ")

Vocal: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios (F.Q. UNAM)

Secretario: Dr. Jesús Vázquez Navarrete (CENID-MICROBIOLOGIA, INIFAP)

1^{er}. Suplente: Dra. Margarita Carmolinga Ponce (CMNS XXI)

2^o suplente: Dr. Julio Granados Arriola (INCMN "SZ")

TRABAJO REALIZADO EN:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina,
Departamento de Microbiología y Parasitología en colaboración con el CENID-
Microbiología Animal INIFAP-SAGARPA, Departamento de Bacteriología y
Biología Molecular.

ASESOR DEL TEMA:



Dra. Yolanda López Vidal

SUSTENTANTE:



Biól. Exp. Claudia Cordova Barrios

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CENID-Microbiología Animal INIFAP, por la oportunidad que me brindo para realizar este trabajo de tesis dentro de proyecto: Desarrollo y evaluación de antígenos y pruebas moleculares para la detección de la salmonelosis y brucelosis en suero y carne de porcinos (clave: 12406), SAGARPA-CONACYT.

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por apoyarme y brindarme parte de su tiempo durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Dr. Jesús Vázquez Navarrete por brindarme y permitirme trabajar en su laboratorio como su gran apoyo incondicional. Muchas Gracias

DEDICATORIA:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por permitirme una formación profesional.

A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me brindan, por su comprensión, su mano amiga y sobre todo por el amor y cariño que siempre me brindan.

A mis dos grandes amores Claudita Aline y Jesús Sebastián que han sido mi motivo para poder seguir adelante y mi gran inspiración.

A Dios por permitirme dar un paso más en mi vida.

RESUMEN

Las bacterias patógenas como *Salmonella enteritidis* habitantes naturales del tracto intestinal de diversos animales incluyendo al hombre, esta comúnmente en heces fecales, agua y alimentos contaminados. La presencia de *Salmonella* está determinada por las condiciones biológicas y fisicoquímicas del ambiente que permite su supervivencia, desarrollando mecanismos de adaptación a condiciones ambientales adversas. El objetivo del proyecto fue determinar la presencia de los genes de la integrasa clase I y clase II y comparar el patrón de la multirresistencia antimicrobiana en aislamientos de *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. gallinarum* aisladas a partir de casos clínicos en humanos y aves. Se estudiaron 57 cepas de *S. enteritidis*, 2 de *S. gallinarum*, 3 de *S. typhi*, 1 de *Escherichia coli* que se utilizaron como cepas de referencia. Todas las bacterias fueron sometidas a pruebas bioquímicas para corroborar la especie, después fueron analizadas amplificando un fragmento de 500 pb de la subunidad 16s ribosomal. Posteriormente se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en placa de Kirby-Bauer utilizando discos con antibióticos para bacterias gram-negativas y un método automatizado. Para determinar la presencia de los genes de las integrasas clase I y II se utilizó ADN cromosomal de *S. enteritidis* por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis de patrón de resistencia antimicrobiana fue más alto para los siguientes antibióticos: nitrofurantoina (97.1%), gentamicina (88.6%), trimetropim/sulfametoxazol (57%), ampicilina (57%). Todas las cepas presentaron sensibilidad a cefotaxina, y levofloxacin. La presencia del integron clase I tiene un

fragmento amplificado de 1196pb y para el integrón clase II es de 1096 pb en cepas de *salmonella enteritidis*.

De los resultados obtenidos concluimos que existe una correlación entre el perfil de la resistencia antimicrobiana determinada con los métodos utilizados convencionalmente y la presencia de los genes de la integrasa que se localizan dentro de los integrones de clase I y clase II. El 50 o 60% de las cepas se mostro alguno de los dos integrones y un 10% no se encontró ninguno de los dos integrones aun presentando resistencia y el 30% no presento resistencia en ninguno de los dos integrones.

INDICE

Abreviaturas

I.- INTRODUCCION	1-2
1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	2-3
1.2. Clasificación de <i>S. enteritidis</i>	3-6
1.3. Características Fisiológicas de <i>Salmonella</i>	6-7
1.4. Enfermedades causadas por <i>Salmonella</i>	7-8
1.5. Patogenesis	9-14
1.6. Toxinas del género <i>Salmonella</i>	14-15
1.7. Aspectos epidemiológicos	15-16
1.8.-Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos	17
1.9.- Mecanismos de la resistencia antimicrobiana	18
1.10.-Resistencia antimicrobiana	19-20
1.11.- Estructuras genéticas de la resistencia antimicrobiana	20-22
1.12. Estructura y clasificación del integrón	22-26
1.13.- Métodos de estudio convencional y molecular del género <i>Salmonella</i> .	26-30
2.-JUSTIFICACION DEL PROYECTO	31
3.- HIPOTESIS	32
4.-OBJETIVOS GENERAL	33
4.2. Objetivos Específicos	33
5. MATERIALES Y METODOS	
5.1. Diagrama de flujo	34
5.2. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	35
5.3. Pruebas Bioquímicas practicadas a <i>S. enteritidis</i>	35-36
5.4.-Serotipificación de las cepas	36-37
5. 5. Pruebas de resistencia antimicrobiana	37-39
5.6. Purificación de ADN de <i>Salmonella</i>	40
5.7. Amplificación de la subunidad 16s de <i>S. enteritidis</i>	40
5.8. Amplificación de los genes de la integrasa tipo I y II	41

5.9. Análisis estadístico	41
6.- RESULTADOS	
6.1. Biotipificación de las cepas de <i>S. enteritidis</i>	42-44
6.2. Amplificación del fragmento del gene de la subunidad 16s de <i>S. enteritidis</i>	45
6.3.- Análisis de la resistencia antimicrobiana	46-49
6.4. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenidos con 57 cepas de <i>Salmonella</i>	49-54
6.5 Identificación de los Genes de la Integrasa Clase I y II.	54-55
6.6. Comparación de las cepas con presencia del integron clase I y II	56-57
6.7. Identificación del gene de la integrasa clase I	58
6.8. Identificación del gene de la integrasa clase II	59
7.- DISCUSIONES	60-64
8.- CONCLUSIONES	65
9.- PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	66
10.- REFERENCIAS	67-75
11.- ANEXOS	76-83

ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ag Vi Antígeno de virulencia

AK Amikacina

AM Ampicilina

AMP_c Adenosin monofosfato cíclico

APC antibióticos promotores de crecimiento

CB Carbenicilina

CF Cefalotina

CID Coagulación intravascular diseminada

CL Cloranfenicol

CMI Concentración mínima inhibitoria

CRO Ceftriaxona

CS Segmento conservado

CT Toxina colérica

CTX Cefatoxima

dNTP's Desoxirribonucleótidos trifosfato

DHI Diámetro del Halo de Inhibición

EDTA Ácido etilendiamionotetraacético

FNT Factor de necrosis tumoral

G Gramos

Ge Gentamicina

H Antígeno flagelar termolábil

H ₂ S	Ácido sulfhídrico
H	Horas
IS	Secuencias de inserción
Kb	Kilo pares de bases
KDa	kiloDalton
L	Litro
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LT	Toxina termolábil
M	Molar
min.	Minutos
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
nm	Nanometros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEF	Pefloxacina
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
RNAse	Enzima que degrada el ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodesil sulfato sódico
SEF	Fimbria de <i>Salmonella enteritidis</i>

Seg.	Segundo
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SS III	Sistema de secreción tipo III
STX	Trimetoprim-sulfametoxazol
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

El interés por incrementar el consumo de productos pecuarios nacionales libres de agentes microbianos potencialmente patógenos para el hombre como es el caso de *Salmonella*, obliga a la adquisición de prácticas de producción adecuadas además de técnicas de diagnóstico y tratamiento que generen productos libres de *salmonella* para evitar la presencia de portadores.

La salmonelosis es una enfermedad de origen alimentario, la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados por mal manejo o procedentes de animales enfermos¹. En este sentido, la Secretaría de Salud en México reporta anualmente más de 60,000 casos de salmonelosis, por tal motivo es una de las zoonosis más importantes².

Las bacterias del género *Salmonella* ocasionan grandes pérdidas económicas en la industria avícola y causan graves problemas en la salud pública además de que ciertos serotipos son capaces de producir gastroenteritis en humanos. Entre otras enfermedades endémicas sigue siendo un problema en la práctica veterinaria y humana.

El uso de antibióticos en la producción pecuaria ha tenido históricamente un enfoque doble; por un lado su empleo terapéutico y por otro, su empleo como promotores de crecimiento. La utilización de antibióticos en las explotaciones de aves presenta una característica común: su administración se realiza fundamentalmente por vía oral puesto que resulta más fácil en términos de manejo, tiempo y costo, aún cuando se trata de tratamientos que se deben repetir y prolongar en tiempo.

Existen varios antibióticos que son utilizados como promotores de crecimiento en la industria pecuaria con la finalidad de prevenir enfermedades bacterianas y mejorar el crecimiento de los animales que se explotan de forma intensiva como cerdos, aves y bovinos de leche entre otros.

Al principio no se plantearon restricciones para su uso y cualquier antibiótico, podía ser utilizado como promotor de crecimiento en la alimentación de los animales. Sin embargo el uso indiscriminado de los antibióticos, en medicina humana y animal, generó una gran resistencia de microorganismos causantes de enfermedades y por lo tanto la utilidad clínica de algunos antibióticos perdió eficacia.

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos por cambios en su material genético generando clonas resistentes, ya sean patógenas o saprofitas. Estas bacterias, una vez, modificadas pueden transmitir sus características por transmisión vertical o transferir sus genes de resistencia a otras especies bacterianas a través de una transmisión horizontal y de esta forma adquieren características para ocasionar infección en humanos y animales.³

1.1. Características del Género *Salmonella*

Determinar la especie y subespecie de este género se realiza por diferentes pruebas bioquímicas y por serotipificación. Este género bacteriano fermenta glucosa con producción de gas excepto *S. typhi*, no fermentan la lactosa, no producen indol, no degradan la urea y descarboxilan la lisina y la ornitina. Se desarrollan entre 8° y 45°C y a pHs que varían entre 4 y 8, no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C.^{4,5}

Las bacterias del género *Salmonella* crecen con rapidez en medios enriquecidos como caldo nutritivo, caldo tripticasa soya, caldo de Luria-Bertani (LB) así como en otros medios selectivos como caldo selenito, caldo tetrionato y medios diferenciales como agar MacConkey, sulfato de bismuto, verde brillante y medio *Salmonella-Shigella* (Fig. 1).



A.- *Salmonella* en agar MacConkey

B.- *Salmonella* en agar *Salmonella-Shigella*

Figura 1. A.-Cultivo de *Salmonella* en agar MacConkey colonias incoloras transparentes lactosa negativas y agar *Salmonella-Shigella*, B.- colonias con un centro negro, lo que indica que producen ácido sulfhídrico (H_2S).

1.2. Clasificación de *S. enteritidis*

Se describió por primera vez en 1880 por Ebert y después por Giffy. El nombre genérico salmonella fue propuesto por Lingniere en 1900 en honor a D.E.Salmon.

Se han llegado a identificar más de 2,400 serotipos según su estructura antigénica.

Los principales antígenos utilizados para la tipificación de salmonella son: Los

antígenos somáticos "O" que son parte del lipopolisacarido de la membrana externa similar a otras enterobacterias. El antígeno flagelar "H" termolábil es difásico porque existen en dos fases, una específica que es compartida por pocos microorganismos y reaccionan solo con antisueros homólogos y otra no específica que se comparte con muchos microorganismos y presentan reacción cruzada con antisueros homólogos⁶. Estos antígenos fueron clasificados por Kauffman-White⁷³ de acuerdo a la tabla 1 las *Salmonellas* se agrupan con base a antígenos "O" y los grupos son designados con letras mayúsculas A a I, además se lleva a cabo una subdivisión de los grupos principales en especies por la determinación de los antígenos restantes "O" y "H".⁷

TABLA 1. FÓRMULAS ANTIGÉNICAS SEGÚN ESQUEMA DE Kauffman-White

SEROVAR	ANTIGENOS SOMATICOS	ANTIGENOS FLAGELARES(H)	
	(O)	FASE I	FASE 2
GRUPO O:2(A)			
Paratyphi A	1, 2, 12	A	(1,5)
Nitra	2,12	g,m	-
Koessen	2,12	1,v	1,5
GRUPO O:4(B)			
Kisangani	1 4,(5) 12	A	2
Nakuru	,4,(5),12	B	1,2
Paratyphi B			
GRUPO O:9(D₁)			
Typhi	9,12(Vi)	D	-
Berta	1,9,12	[f],g, [t]	-
GRUPO O:3,10 (E₁)			
Anatum	3,10,(15),(15,34)	e,h	1,6
London	3,10,(15)	1,v	1,6

Esquemas de Kauffman-White. Primera columna indica el nombre de la serovariedad, la especie y subespecie a que pertenece con las siglas I, II,IIA,IV,V Y VI; la segunda columna indica los antígenos somáticos, los números indican el o los factores del antígeno "O" y se escriben separados por una coma, las serovariedades son organizados en grupos somáticos caracterizados por un factor "O" principal (subrayado) ; los factores "O" no subrayados o "H" entre corchetes pueden estar presentes o no; los factores "O" o "H" entre paréntesis aglutinan débilmente. El esquema Kauffmann-White presenta 67 grupos con el antígeno "O", que van desde el grupo A hasta la Z (O:1 hasta el O:67)⁵

Otra clasificación hecha por Swing y col. emplean los mismos tipos antigénicos, para el género *Salmonella* y proponen 3 especies conformada de la siguiente manera: *S. Choleraesuis*, *S. typhi* y *S. enteritidis* siendo la mayoría de los serotipos *Salmonella enteritidis*.

Las clasificaciones han sufrido varias modificaciones en los últimos años. El centro para el control de enfermedades de Atlanta E.U. ha dividido a este género en dos especies.

ESPECIE	SUBESPECIES
<i>Salmonella enterica</i> (6 subespecies)	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I);
	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II);
	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa);
	<i>Salmonella entérica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb);
	<i>Salmonella entérica</i> subesp. <i>houtanae</i> (IV);
	<i>Salmonella entérica</i> subesp. <i>indica</i> (VI);
<i>Salmonella bongori</i>	

Las bacterias del género *Salmonella typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis* y *S. choleraesuis* así como otras bacterias entéricas, poseen elementos móviles como plásmidos y transposones donde se localizan genes que codifican para la virulencia y la resistencia. En estas bacterias se han encontrado plásmidos de alto peso molecular (50 a 100 kb), en ellas se encuentran genes que codifican para toxinas así como genes que confieren multirresistencia a diferentes antibióticos (**Fig. 2**)^{6,7}.

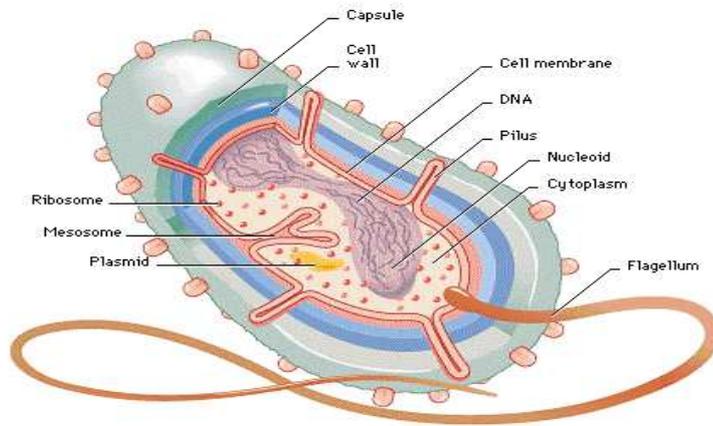


Figura 2.- Esquema de una enterobacteria.⁵⁰

1.3. Características Fisiológicas de *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de este género *Salmonella* son bacilos Gramnegativos que tienen 0.7 de ancho por 1.5 μm de largo generalmente son móviles por flagelos peritricos, excepto *S. gallinarum* y *S. Pullorum*, son anaerobios facultativos no esporulados.

Cuando se cultiva *Salmonella* en los medios de aislamiento primarios, ya sean diferenciales o selectivos, sus colonias son pequeñas, miden menos de 1mm de diámetro, de color gris claro o blanquecino, circulares, convexas, lisas y de bordes definidos.^{8, 9,10}

Cuando se cultivan en los medios de aislamiento que contienen como sustrato de diferenciación la lactosa, las colonias de *Salmonella* se observan como no

fermentadoras del carbohidrato, producen ácido y gas a partir de la glucosa, algunas especies como *Salmonella typhi*, son anaerobios facultativos.^{9, 11,12}

Producen ácido y gas a partir del manitol, dulcitol y sorbitol. Raramente utilizan en su metabolismo la lactosa, sacarosa, salicina o adonitol. La producción de indol es excepcional, no desaminan la fenilalanina ni hidrolizan la urea. Carecen de enzima citocromo-oxidasa, son ureasa, lipasa negativos; lisina y ornitina descarboxilasa positiva, habitualmente producen ácido sulfhídrico a partir de una fuente inorgánica de azufre, el tiosulfato. Como fuente de carbono la mayoría de los serotipos excluyendo a *Salmonella typhi* utilizan el citrato.

Las salmonellas toleran grandes cantidades de bilis y son resistentes a sustancias químicas como el verde brillante, tetracionato y desoxicolato de sodio que inhiben el crecimiento de otras bacterias intestinales, los cuales son incluidos en los medios de cultivo con el objetivo de aislar salmonellas.^{9,13}

1.4. Enfermedades causadas por *Salmonella*

La salmonellosis generalmente se manifiesta en dos formas principales: La gastroenteritis y la septicemia.

La gastroenteritis o intoxicación por alimentos es una infección restringida a la mucosa intestinal, causada por toxinas producidas por diversos serotipos del género *Salmonella*, siendo los más comunes *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. La capacidad infecciosa de una cepa se relaciona con su serotipo y el tamaño del inóculo, ya que la tasa de infección va desde 10^7 hasta 10^9 microorganismos aproximadamente y los

síntomas se manifiestan a las 18 horas después del consumo de alimento contaminado con este microorganismo.

Después de su ingestión por vía oral tiene que librar la respuesta inmune inespecífica del huésped, como el pH ácido del estómago, la perístasis y la flora normal; posteriormente se instala y coloniza el intestino para generar la enfermedad.^{14,15}

La septicemia. Conocida como salmonelosis o fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea, es causada por *S. typhi* y los serotipos *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* respectivamente.

La infección por *Salmonella* se da en dos fases: la puerta de entrada es la vía digestiva, donde el bacilo debe sobrepasar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica antes de adherirse e invadir las células del epitelio intestinal, penetran por medio de genes de virulencia en su interior, donde se multiplica y producen alteraciones histopatológicas.^{20,21}

Cuando la infección no se limita en la lámina propia las bacterias migran a la circulación hemática produciendo lesiones focales casi en cualquier tejido produciendo osteomielitis, neumonía, abscesos pulmonares, meningitis o endocarditis secundaria. Esta manifestación de salmonelosis se caracteriza por fiebre, escalofríos, anorexia y anemia. Generalmente la gastroenteritis es leve o incluso ausente.²²

1.5. PATOGENESIS

Las *Salmonellas* son microorganismos que producen varios factores de virulencia como son:

Los antígenos de superficie, factores que contribuyen a la invasividad, endotoxinas, citotoxinas y enterotoxinas. El papel de cada factor en la patogenia de la infección varía según el serotipo involucrado en la infección y el huésped, así muchos serotipos se adaptan y son huéspedes específicos.⁴¹

La capacidad infecciosa de una cepa se relaciona con su serotipo y el tamaño del inóculo. Se ha llegado a observar que una tasa de infección aproximadamente del 50% con 10^7 microorganismos, y la capacidad infecciosa aumenta a un 90% con 10^9 microorganismos⁶⁷. Los serotipos humanos que causan gastroenteritis como la *Salmonella* no tifoidicas se limitan en su infección a la mucosa intestinal y a los nódulos linfáticos regionales. Cuando la *Salmonella* llega a una distancia crítica de la célula las microvellosidades comienzan a sufrir un proceso llamado *ruffling* (ondulaciones), hasta que la bacteria y el enterocito quedan adheridos, esta etapa involucra varios tipos de pili o fimbrias, entre ellas la fimbria tipo 1, fimbria polar larga y la fimbria agregativa delgada. Entonces comienza la entrada de la *Salmonella* a través de las microvellosidades que ya fueron degeneradas y son rodeadas en una vacuola membranal que migra a la región basal de la célula, es decir a una capa delgada que se encuentra por debajo del enterocito. Mientras se lleva a cabo el proceso de internalización en el citoplasma, este va sufriendo degeneración, pero al igual que las microvellosidades se reparan posteriormente. La bacteria llega hasta la lámina propia que es la capa de sostén de tejido conectivo, la cual transporta sangre

y linfa, además de contener importantes elementos para la producción de anticuerpos (Ac) ya que participan en la respuesta inmune del intestino. En esta zona la bacteria estimula una reacción inflamatoria caracterizada por la presencia de un gran número de polimorfonucleares; muchos de los cuales portan la bacteria ya fagocitada, la cual resiste los niveles de hierro, bajo pH y óxido nítrico. Durante las siguientes 24 horas los enterocitos y el lumen quedan libres de la bacteria, pero persisten en la lámina propia y siguen multiplicándose. La respuesta inflamatoria también media la liberación de prostaglandina (PGE_2) estimulando la producción de Adenosin monofosfato cíclico (cAMP), lo que origina una secreción activa de líquidos y electrolitos a lo que comúnmente llamamos diarrea (**Fig.3**).^{16, 17, 18.}

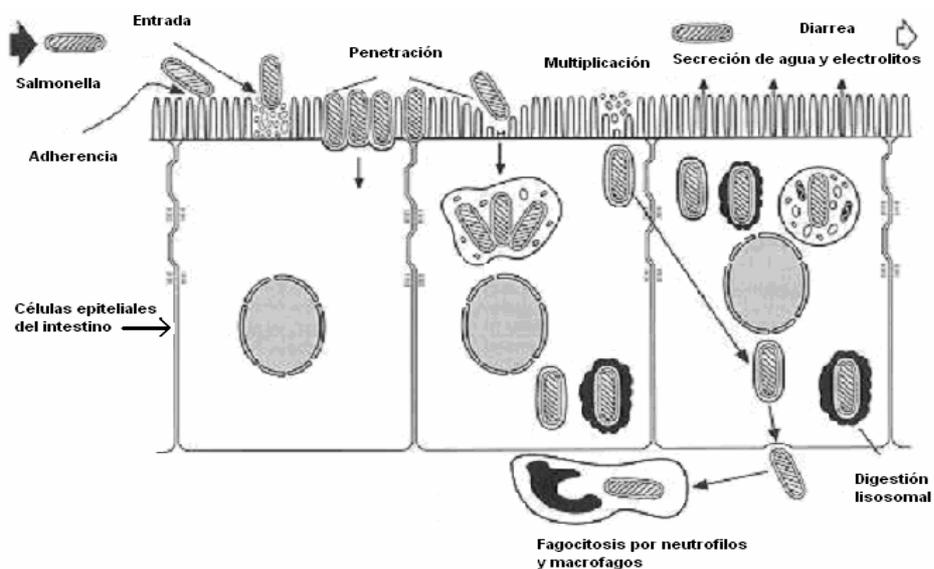


Figura 3.- Internalización de *Salmonella* con células epiteliales del intestino.⁷³

Los animales que desarrollan gastroenteritis aguda pueden morir debido al desequilibrio electrolítico que da como resultado una deshidratación y acidosis, en

ocasiones se presenta fiebre, dolor abdominal; la enfermedad dura alrededor de 4 días; aunque existen animales que sobreviven por periodos prolongados y desarrollan lesiones intestinales graves y septicemia.¹⁹ La patogenia de *Salmonella* se relaciona con varios genes cromosomales.

Los genes implicados en la virulencia de *Salmonella* son procedentes de especies lejanamente emparentadas, ofrece al organismo receptor una forma muy rápida de adquirir nuevas funciones. En este sentido, en bacterias del género *Salmonella* hasta el momento se han identificado cinco islas de patogenicidad, las cuales poseen varias características. La primera isla de patogenicidad (SPI-I) es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y posee una proporción de las bases nitrogenadas guanina y citosina (42%) diferente del resto del genoma de la *Salmonella* (52%). Puesto que el contenido en estas bases es bastante homogéneo a lo largo del cromosoma bacteriano, regiones con proporciones de bases atípicas denotan que han sido adquiridas por transferencia horizontal desde un organismo que tiene una composición de bases diferente. En segundo lugar, el tamaño, orden y orientación de los genes dentro de esta isla es muy similar a los genes de invasión contenidos en el plásmido de virulencia de las bacterias del género *Shigella* que causa disentería.²³

La isla de patogenicidad tipo 2 (SPI II) es necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica. Está localizada en el cromosoma de *S. typhimurium*, tiene un tamaño de 40 kb y tiene por lo menos 32 genes que codifican proteínas que son inyectadas dentro de células eucarióticas. Las proteínas son secretadas a través de un segundo sistema de secreción tipo III, evitando la fusión del fagosoma y el

lisosoma para que no se forme el fagolisosoma que puede digerir al microorganismo además es necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica.^{24,25,26, 27,28} .

La isla de patogenicidad tipo III (SPI- III) es un segmento de 17 kb en el cromosoma de *S. typhimurium* y está involucrada en la supervivencia dentro del macrófago. Esta isla de patogenicidad puede ser importante para que la bacteria sobreviva dentro del fagosoma de células infectadas. Una característica del fagosoma es su deficiencia en Mg^{2+} y éste es esencial para muchas bacterias, de tal manera que puede ser una vía por la cual se reduce la actividad del fagosoma evitando la fusión del fagolisosoma.^{24,27,28,29}

La isla de patogenicidad tipo 4 (SPI-IV) es un segmento de 25 kb, está involucrada en la supervivencia dentro del macrófago.²⁷

La isla de patogenicidad tipo 5 (SPI-V) se ha descrito en *S. dublin*, es un segmento de 7 kb localizado en el cromosoma y está involucrada en la enteropatogenicidad de esta bacteria.²⁴

Puesto que los plásmidos son fragmentos de DNA que se transmiten fácilmente entre bacterias, se sugiere que los genes de virulencia que se encuentran en plásmidos pueden moverse y transferirse entre diferentes especies de bacterias patógenas.

Los plásmidos de virulencia varían entre 50 y 100kb. Se han reportado en *S. dublin*, *S. gallinarum*, *S. polluron* y *S. abortusovis*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. En dichos plásmidos se pueden localizar genes que codifican para toxinas de la familia LT pero no han sido detectadas en *S. typhi*^{30,31}

El plásmido pKDSC50 tiene un tamaño de 49,503 bp en *S. enterica* serovar *cholerasuis* (cepa RF-1). Se han identificado 48 marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para varios factores de virulencia ³²

Los genes presentes en el plásmido de virulencia incluyen genes que codifican para el desarrollo intracelular, resistencia a la proteína C9 del complemento y a los macrófagos citotóxicos. Todos los plásmidos de virulencia contienen una región altamente conservada de 8 Kb, el cual contiene al operon *spv* (plásmidos de virulencia de *Salmonella*). Dentro de éste operon se encuentran 5 genes: *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD*. Esta región es la que causa el aumento de *Salmonella* durante la fase sistémica de la enfermedad. Los genes *spv* son regulados por *spvR* el cual es regulado por la proteína RpoS que controla la expresión de muchos genes en la fase estacionaria. Las bacterias del género *Salmonella* producen varias adhesinas entre las que se incluyen: Fimbrias tipo I codificadas por los genes *fim*, fimbrias codificadas por los genes *pef* las cuales están implicadas en la adherencia bacteriana de las células del epitelio intestinal las cuales son requeridas para la acumulación de líquidos, están localizadas en los plásmidos pSLT de 90 kb, la fimbria polar larga codificada por los genes *lpf* y la fimbria delgada agregativa codificada por los genes *agf*.

La fimbria codificada en el plásmido pSLT, regula la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos. La fimbria polar larga regula la agregación a las placas de Peyer.

El gene *rck* (resistencia a muerte por el complemento) codifica una proteína de la membrana externa que confiere resistencia a *S. typhimurium* contra la acción del

complemento, esta proteína actúa como adhesina y puede estar involucrada en la invasión de cultivos celulares.^{26,30}

La proteína que codifica el gene *rck* es similar a 2 proteínas de virulencia llamadas Ail de *Yersinia enterocolitica*, y PagC de *S. typhimurium*.

Los genes *pagC*, *ail* y *rck* codifican para una gran familia de proteínas de la membrana externa presentes en todas las bacterias gram-negativas. Hay otras proteínas en los *spv* que modulan la virulencia en *Salmonella*.

Existen también otras proteínas como la Sdi A la cual es una proteína sensible al quórum y esta proteína interviene en los mecanismos de comunicación intercelular y la proteína tip A que actúa como termosensor ayudando a regular los cambios en la expresión de los genes.³⁴

1.6. TOXINAS DEL GENERO SALMONELLA

Endotoxinas (LPS). Desempeñan un papel importante durante los estadios bacteriémicos de la fiebre entérica que presentan los pacientes con esta enfermedad. El LPS es el que determina la virulencia de *Salmonella* pero el lípido A activa a los macrófagos produciendo fiebre, leucocitosis e hipotensión. La endotoxina produce necrosis focal en el sitio en el que se encuentra colonizando la bacteria, causando ulcera que se producen en el intestino delgado.⁴¹

Enterotoxinas. La producción de enterotoxinas por *Salmonella* se manifiesta por cuadros diarreicos y afectan al intestino delgado. Estas enterotoxinas son parecidas a las toxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) de *E. coli* y su papel varía según la patogenicidad de los microorganismos.^{9, 41,44}

Citotoxinas. Están asociadas a la membrana externa bacteriana y juegan un papel importante en la invasión y destrucción de la célula hospedera, están relacionadas con los cambios citopáticos que aparecen en la gastroenteritis causada por bacterias del género *Salmonella*.^{41,44}

1.7. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

Huésped. *Salmonella enteritidis*, está ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves, insectos y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Las Salmonellas se pueden clasificar en tres grupos: a) las que no tienen preferencia por algún hospedero infectando tanto al hombre como a los animales, b) las que infectan solo al hombre *S. typhi*, *S. paratyphi*, c) las que están adaptadas a un hospedero en animales como: *S. abortusovis* (bovino), *S. abortusequi* (equino), *S. gallinarum* (aves)²²

Trasmisión. *Salmonella* es uno de los géneros bacterianos que se encuentran asociados a brotes de enfermedades de origen hídrico, ya que son aislados de agua fresca, agua dulce y agua salada, así como de alimentos contaminados con este microorganismo.²³ En estudios realizados se estima que se requiere de aproximadamente 1×10^6 o 1×10^8 bacterias para causar una enfermedad sintomática.

Estas bacterias son capaces de sobrevivir en condiciones de estrés por largos periodos, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo, en heces y agua

contaminada. El género *Salmonella* en condiciones de estrés sufre cambios en la expresión de sus genes y puede presentar recombinaciones homologas o reacomodos de su ADN causando la formación de duplicaciones, deleciones, transposiciones que producen nuevos tipos de Salmonellas más virulentas y resistentes.^{35,36}

Distribución. La salmonelosis es mundial, así *S. typhimurium* y *S. enteritidis* son los serotipos más prevalentes en el mundo. Existen también, algunos serotipos de diseminación limitada como *S. weltebreden* localizado solo en Asia. Por otro lado, *Salmonella* es el patógeno mas encontrado como causante de intoxicación alimentaría en países desarrollados y uno de los más frecuentes junto con *E. coli* y *Shigella* en países en desarrollo. Salmonella constituye la segunda causa de morbilidad en países en vías de desarrollo, después de los procesos respiratorios, donde la mayor parte de la intoxicación alimentaria tiene un origen bacteriano.³⁷

1.8. CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Se han descrito principalmente cuatro mecanismos de acción para los antibióticos, los cuales se especifican en la Figura 4.^{39,40,}

1- Inhibición de la síntesis de la pared celular.

Los fármacos que ejercen estos mecanismos, son principalmente: Penicilinas, Bacitracina, Cefalosporinas, Monobactamas, Carbapenemes, Cicloserina y Vancomicina, entre otros.

2- Inhibición de la función de la membrana celular.

Se citan con este mecanismo: Polimixinas, Polienos, Imidazoles.

3- Inhibición de la síntesis proteica.

Se ha demostrado que ejercen esta acción: Cloranfenicol, Tetraciclinas, Aminoglucósidos y Macrólidos, entre otros.⁴²

4.-Inhibición de la Síntesis de ácidos nucleícos.

Se destacan entre estos: Quinolonas, Sulfonamidas, Primitamina, Rifampicina y Trimetoprim

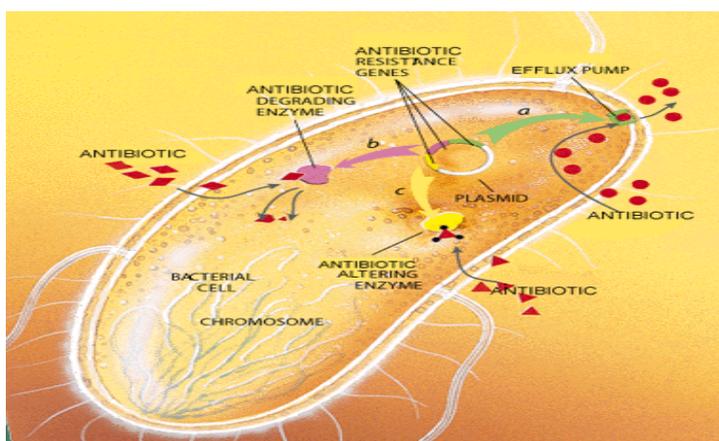


Fig. 4.- Esquema de bacterias que contienen genes de resistencia a varios antibióticos³⁸

1.9. MECANISMOS DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los principales mecanismos que presentan las bacterias para la resistencia a los antibióticos se agrupan en cuatro tipos:

a).- Interferencia mediante enzimas inactivadoras

Dentro de la bacteria se secretan enzimas que modifican los antibióticos y la inactivación se da por acción de las enzimas intracelulares que actúan sobre el cloranfenicol, aminoglucósidos, etc. Fuera de la bacteria por acción de enzimas extracelulares inactivan los antibióticos que actúan sobre la pared celular o sobre la membrana celular en el espacio periplásmico en el caso de las bacterias Gramnegativas

b).- Modificación química de la molécula.

Donde el antibiótico se une y de éste modo las bacterias pueden hacerse resistentes a macrólidos, o a lincosaminas, estreptograminas, etc.

c).- Disminución de la permeabilidad de la membrana celular al antibiótico

La membrana externa de la bacteria puede sufrir modificaciones en su composición y hacerse impermeable a pocos antibióticos, a muchos o a todos y se lleva a cabo por expulsión activa del antibiótico. El ejemplo más típico son las tetraciclinas.

d).- Esquiva el antibiótico. Hay síntesis de una nueva molécula blanco resistente a la unión con dicho antibiótico. De este modo, la bacteria sustituye total o parcialmente la enzima blanco por otra a la que no se puede unir el antibiótico (Fig.4)³⁸

1.10. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia microbiana es la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. El origen de la resistencia a los medicamentos puede ser genético o adquirido. La de origen genético se debe a cambios genéticos y procesos subsiguientes de selección por la drogas. Las de origen adquirido o natural se deben a la resistencia de las bacterias de una misma cepa o especie frente a los antibióticos que pueden ser beneficiosas porque pueden dar a los microorganismos una mayor capacidad para sobrevivir bajo condiciones medioambientales muy específicas.

Ambas pueden ser de origen cromosómico (mutaciones) y extracromosómicos, debido a elementos extracromosomales en las bacterias la adquisición de plásmidos, transposones, integrones estos genes mutados pueden pasar a otras bacterias de la misma o distinta especie por procesos de parasexualidad esto se hace horizontalmente, entre bacterias. Se conocen tres tipos de parasexualidad; las cuales son: conjugación transducción y transformación.

a).- Conjugación: El ADN se transfiere desde una bacteria donante a otra receptora la bacteria donadora transfiere una copia de material genético extracromosómico el cual puede ser ADN circular (plásmidos) o fragmentos de ADNs móviles que son llamados transposones e integrones.

b).-Transducción: El vector transportador de los genes de resistencia es un virus bacteriófago. Cuando el virus inyecta su ADN en una bacteria se integra en el cromosoma bacteriano quedando como un virus lisogénico.

C.- Transformación: Las bacterias capturan ADN libre del medio que puede proceder de otras bacterias muertas. Este proceso también está relativamente extendido y permite el intercambio entre especies y géneros diferentes, los genes de resistencia a antibióticos podrían proceder de las propias bacterias productoras de estos (fig.5) ⁴⁴

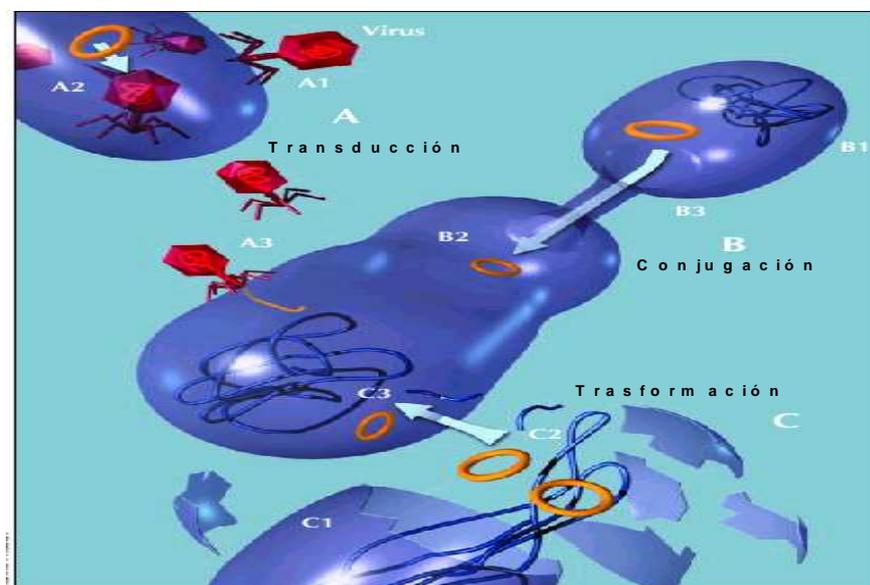


Fig.5. Mecanismos de resistencia microbiana⁴⁴

1.11. ESTRUCTURAS GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

a) Transposones

La existencia de elementos transponibles con información genética fue propuesta en los años cuarenta, cuando aún se ignoraba la naturaleza química del material genético al estudiar los mecanismos genéticos ligados a la pigmentación de espigas de maíz localizados por Bárbara McClintock (1902-1992). Gran parte de los genes

de resistencia localizados en plásmidos o el cromosoma están ubicados en transposones y tienen sus propias características, tales como la diseminación rápida dentro de una célula o entre células distintas. En 1974 se descubrió que los plásmidos contaban con la ayuda de estructuras llamadas transposones. Los transposones son segmentos de ADN incorporados en el ADN cromosómico que contiene un gen que codifica entre otras características, la síntesis de la enzima que cataliza la inserción del transposon a un nuevo sitio y es la responsable de su transferencia a otras estructuras portadoras de material genético y la resistencia a drogas. También tienen secuencias repetidas de cerca de 20-40 nucleótidos de largo pegadas a cada extremo. Las secuencias de inserción son cortas (60 a 150 pares de bases). Los transposones simples no tienen más genes que los necesarios para la transposición. Los transposones complejos son muchos más largos y pueden llevar genes adicionales. Los genes incorporados en los transposones complejos se conocen como "genes saltarines" dado que pueden moverse a lo largo del cromosoma y también de cromosoma en cromosoma (fig.6).⁴⁵

b) Integrones

Durante un tiempo se consideró que las bacterias ya habían revelado todos sus mecanismos de variabilidad genética. Sin embargo, recientemente se han encontrado otras estructuras llamadas integrones.

Un integrón es un elemento del genoma bacteriano que se caracteriza por la capacidad de capturar y expresar genes exógenos, la mayoría de los cuales

confieren resistencia a antibióticos. Las primeras descripciones se realizaron a fines de la década de los 80s y fueron Stokes y Hall, quienes propusieron este término; según la ubicación en el genoma de la bacteria, el integrón puede ser móvil si se encuentra en plásmidos o transposones, o fijo si está en el cromosoma. Los integrones han sido detectados principalmente en bacilos gram negativos, donde la familia *Enterobacteriaceae* es una de las más importantes, ya que incluye géneros que son patógenos para los animales y el ser humano, entre ellos el género *Salmonella*.⁴²

Los integrones son fragmentos de ADN donde se localizan en genes de resistencia y contienen promotores para expresar esos genes. Los integrones codifican una enzima llamada integrasa, responsable de la integración de los genes. La misma enzima no sólo captura genes de resistencia sino que también los libera. Los integrones mejor estudiados se sitúan sobre transposones y requieren incorporarse a material genético capaz de replicarse para poder dividirse y diseminarse.

Hay cuatro clases distintas de integrones que contienen diversos tipos de integrasas. Los integrones de la clase 1 son los más frecuentes en cepas de aislados clínicos, y se puede localizar en diferentes microorganismos.⁴³

1.12. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DEL INTEGRÓN

Todos los integrones están constituidos por tres regiones; dos son muy conservadas, 5'CS y 3'CS (5'3' conserved segments) que se sitúan en los extremos. Entre ellas se localiza una región central variable que contiene los genes estructurales, en la región

constante 5'CS se ubica la integrasa, una enzima que regula la inserción y escisión de genes de resistencia en sitios específicos. Según el tipo de integrasa que codifican los integrones, son clasificados en nueve clases: las clases Int1 a Int3 contienen genes de resistencia a antibióticos, las clases Int4 a Int7 contienen genes que no codifican para resistencia a antibióticos, la clase Int8 carece de genes en la región variable y la clase Int9 contiene un gen de resistencia a antibióticos y otros de función desconocida. Los integrones pueden contener múltiples cassettes (un gen de resistencia con un sitio attC) incorporados en una región variable, estos son denominados superintegrones (fig. 7).⁴⁴

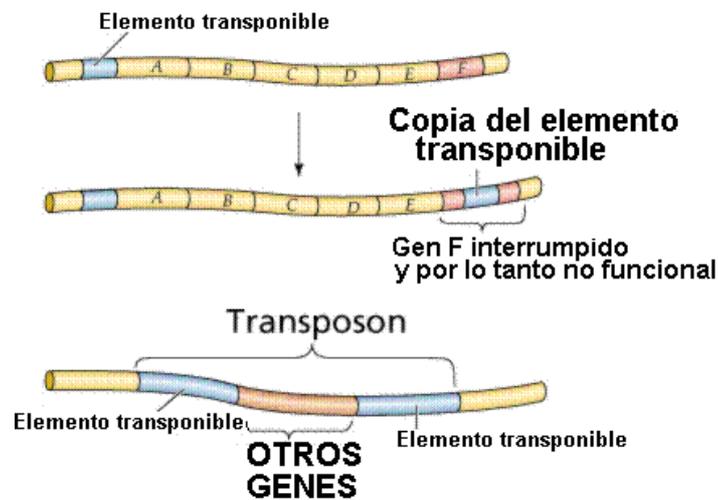


Fig. 6.- Esquema del transposon el cual genera intercambio de genes bacterianos en la naturaleza⁴⁰

a) Extremos 5'cs del integron

Este segmento de ADN tiene una longitud de 1,36Kb y está constituido por el gen *int1*, el cual codifica para la integrasa *int1*, proteína de 337 aminoácidos con un tamaño aproximado de 38 KDa; en seguida se encuentra un primer promotor (P_i) necesario para la expresión de la integrasa *Int1*, posteriormente se ubica el segundo promotor (P_c) requerido para la expresión de los cassettes génicos insertados en el integrón y por último en el extremo 3' del fragmento 5'CS se encuentra una zona receptora de 45 pb (*att1*), donde puede insertarse los cassettes (FIG. 7).⁴⁵

b) Región central variable

En esta se localizan los genes estructurales del integrón (genes de resistencia a antibióticos) los cuales son separados por una secuencia de bases denominada *attC* o zona de 59pb, estos sitios son muy variables en composición y tamaño, aunque muestran una constancia en sus extremos. En la región central se va a producir el mecanismo de escisión o inserción de genes de resistencia, pudiendo estar constituida hasta por 40 de ellos; el mecanismo es mediado por la integrasa, generalmente en la zona receptora (*att1*) se va integrando los cassettes génicos en una misma dirección determinada por la secuencia *attC*, de este modo, el último cassette insertado será el que ocupe la primera posición y por lo tanto se localiza más cercana al promotor, manifestando así una mejor expresión génica; sin embargo también es posible la escisión lo cual ocurre cuando la reacción se produce entre dos sitios del mismo replicón y se genera un círculo covalentemente cerrado no replicativo que consiste en un gen de resistencia y un sitio *attC* (FIG.7).⁴⁶

c) Extremo 3cs del integrón

Esta secuencia es menos conservada entre los integrones, tiene una longitud aproximada a 2 Kb; en ella se encuentran genes que confieren resistencia a los antibióticos, desinfectantes y antisépticos cuaternarios de amonio; después de estos genes se ubica un marco abierto de lectura (Orf5) cuya función se desconoce.^{47,48}

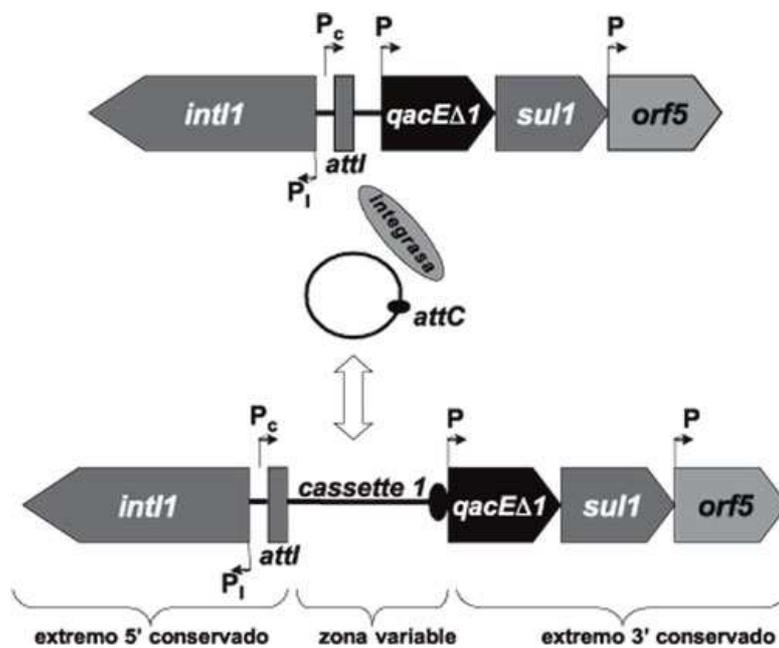


Fig. 7.-Estructura del integrón clase 1⁵⁰

Los integrones de clase 1 tienen elementos que codifican un sitio específico de recombinación (*int1*) de la familia de las integrasas en el que se puedan de insertar y recombinar elementos móviles en el DNA (genes cassettes) en sitios específicos con una secuencia GTTRRRY. El integrón también proporciona un sitio conservado 5', *att1*, en donde los genes cassettes se insertan preferencialmente. La mayoría de los genes cassettes contiene los genes que codifican para la resistencia a varios agentes antimicrobianos incluyendo el trimethoprim los aminoglicosidos y sulfamidas

sul1. Actualmente, se han identificado, cerca de 60 genes cassettes asociados a resistencia y los mismos cassettes se pueden encontrar en diversos integrones⁴⁷. Por ejemplo se han encontrado integrones clase I y II los cuales portan genes de resistencia para trimetoprim que inhiben selectivamente la dihidrofolato reductasa (DHFR), y así previenen la reducción del dihidrofolato a tetrahydrofolato. El mecanismo más común de la resistencia a trimetoprim en enterobacterias es la producción de un DHFR en un plásmido semejante a la enzima codificada en el cromosoma la cual es menos sensible a la inhibición por trimethoprim. Hay aproximadamente dieciséis enzimas resistentes a trimethoprim que se han identificado en enterobacterias y se han caracterizado en base a sus secuencias. Los genes que confieren resistencia para la mayoría de DHFRs son genes cassettes que se encuentran insertados en el sitio de recombinación del integron clase I e integron clase II, otra clase de genes cassettes encontrados con frecuencia en la región variable del integrón son las enzimas que modifican los aminoglicosidos por acetilación, adenilación o fosforilación.⁴⁸

1.13. MÉTODOS DE ESTUDIO CONVENCIONAL Y MOLECULAR DEL GÉNERO

***Salmonella*.**

Los métodos fenotípicos de caracterización bacteriana exploran propiedades bioquímicas y fisiológicas expresadas por los microorganismos; tienen como limitación inherente la capacidad de las bacterias de alterar la expresión debido a condiciones del cultivo o a mutaciones puntuales, muchas veces una fracción

considerable de cepas es fenotípicamente no tipificable, lo cual dificulta la clasificación.

a) Antibiograma.

La prueba de susceptibilidad se indica para cualquier microorganismo que esté involucrado en un proceso infeccioso, si la susceptibilidad no puede ser predeterminada el conocimiento de la identidad del microorganismo es importante.

Principalmente se indica cuando el germen causal pertenece a especies que pueden exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Estas pruebas son útiles en estudios de la epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos.⁵²

Existen tres categorías para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad, establecidas para cada bacteria frente a cada antibiótico, comparando la concentración inhibitoria mínima en cada caso con los puntos de corte establecidos:

- 1) Sensible: es aquel microorganismo capaz de responder al fármaco a la dosis recomendada.
- 2) Resistente: microorganismo que no responde al antibiótico cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección.
- 3) Sensible intermedia: aplicable a dos situaciones. Cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito para el tratamiento en dosis más altas por ser poco tóxico o porque se concentra en el sitio de infección y cepas con sensibilidad intermedia a antibióticos que por ser más tóxicos no pueden usarse en dosis más altas.

En este caso la categoría de sensibilidad intermedia sirve como una zona de transición entre cepas sensibles y cepas resistentes y previene pequeños errores causado por factores técnicos.⁵²

Esta técnica se realiza fácilmente en el laboratorio, no necesita de equipos sofisticados, los datos provienen directamente de los análisis de rutina, lo que la convierte en una técnica adecuada a pesar de que la variabilidad genética de la resistencia a los antibióticos y su débil poder discriminante constituyen desventajas para la misma.⁵²

b) Serotipificación.

Se basa en la presencia o ausencia de determinantes antigénicos somáticos, flagelares y capsulares que reaccionan con los antisueros específicos. Es simple y fácil de aplicar a pesar de ser muy costoso los antisueros específicos, aunque resulta trabajoso para las especies que tienen un gran número de variantes antigénicas como *Salmonella*.

c) Fagotipificación.

Método desarrollado para ciertos patógenos nosocomiales (*Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Salmonella*), basado en la susceptibilidad de cepas probadas a ser lisadas por un gran espectro de bacteriófagos seleccionados, por ofrecer un máximo de discriminación entre las cepas de una misma especie. Los fagos son difíciles de obtener, su uso se limita a los laboratorios de referencia.⁵³

d) Subunidad 16s ribosomal

Los métodos genotípicos detectan variaciones en la secuencia de ácidos nucleicos del microorganismo, analizan características mucho más estables que las fenotípicas y pueden ser más discriminatorios, ya que el genoma de cada cepa es único.⁵²

La secuencia de la pequeña subunidad (30S) del gene RNA ribosomal que posee una sola molécula de rRNA 16S, es altamente conservada. En las bacterias, este gen posee alrededor de 1,5 kb. Se ha propuesto los procariontes que pertenecen a la misma especie, tienen un 97% de secuencias idénticas en su rRNA 16S.⁵⁶

e) Análisis de plásmidos

Constituye el primer método genotípico de tipificación para el estudio de un brote epidémico por su mediana complejidad y puede realizarse en un laboratorio de investigación epidemiológica. Posee un alto poder de discriminación sobre todo cuando se usa en combinación con otros métodos de tipificación y una misma metodología puede ser aplicada a distintos géneros y especies bacterianas. La aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del DNA plasmídico es útil sobre todo en aquellas cepas con un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares.^{55,56}

f) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método "in vitro" para amplificar secuencias de ácidos nucleicos seleccionados (ADN o ARN). Consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización de ADN, unión de los primer o cebadores y extensión o polimerización del ADN mediante una enzima polimerasa. Dos oligonucleótidos (primer o cebadores) delimitan el segmento de

ADN que se va a amplificar. Ellos hibridizan cadenas opuestas y la síntesis ocurre simultáneamente en la región entre los cebadores, en dirección siempre de la región 5' a la 3' en las cadenas molde, mientras que en el sentido de las regiones 3' a la 5' de los cebadores, se irá formando la cadena nueva, complementaria de la cadena molde. Permite amplificar hasta una sola cadena de ADN, produciendo un aproximado de 10^6 copias de la original.^{57,58}

g) Polimórfico amplificado al azar (RAP DNA-PCR).

Este método consiste en el uso de iniciadores universales de aproximadamente 10 pb de longitud, los cuales tienen una baja especificidad de reconocimiento y se unen con afinidad a varios sitios del ADN cromosomal a bajas temperaturas de hibridación. Numerosos fragmentos de longitudes diferentes son generados y pueden ser analizados en geles de agarosa al 1%. Las cepas difieren en los sitios de unión al ADN con lo que se obtienen diferentes asociaciones de fragmentos, los que son considerados como genotipos diferentes. Esta técnica es de fácil implementación e interpretación. Amplifica el genoma completo, no se necesita el conocimiento previo de ninguna secuencia de ADN a ser amplificada y puede ser ajustada para la subtipificación de cualquier microorganismo, incluyendo *Salmonella*.^{54,55}

2. JUSTIFICACIÓN

En la medicina humana y veterinaria se utilizan de forma indiscriminada los antibióticos contra infecciones bacterianas y como promotores del crecimiento respectivamente. Por tal motivo, una gran variedad de microorganismos adquieren resistencia contra estos. El estudio de la resistencia antimicrobiana en bacterias del género *Salmonella* aisladas de casos clínicos de humanos y animales, servirá para establecer el fenotipo de estos aislamientos y por otro lado, estos resultados también serán de utilidad para el tratamiento adecuado de estos microorganismos patógenos.

3. HIPÓTESIS

La presencia de los genes los intrones clase I y II en *Salmonella enteritidis* se relaciona con la resistencia a múltiples antibióticos que son utilizados para el tratamiento de enfermedades en medicina humana y veterinaria, así como promotores del crecimiento en la industria pecuaria.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de los genes de la integrasa clase I y clase II correlacionando con el patrón de la multirresistencia antimicrobiana en aislamientos de *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. gallinarum* aisladas a partir de casos clínicos en humanos y aves.

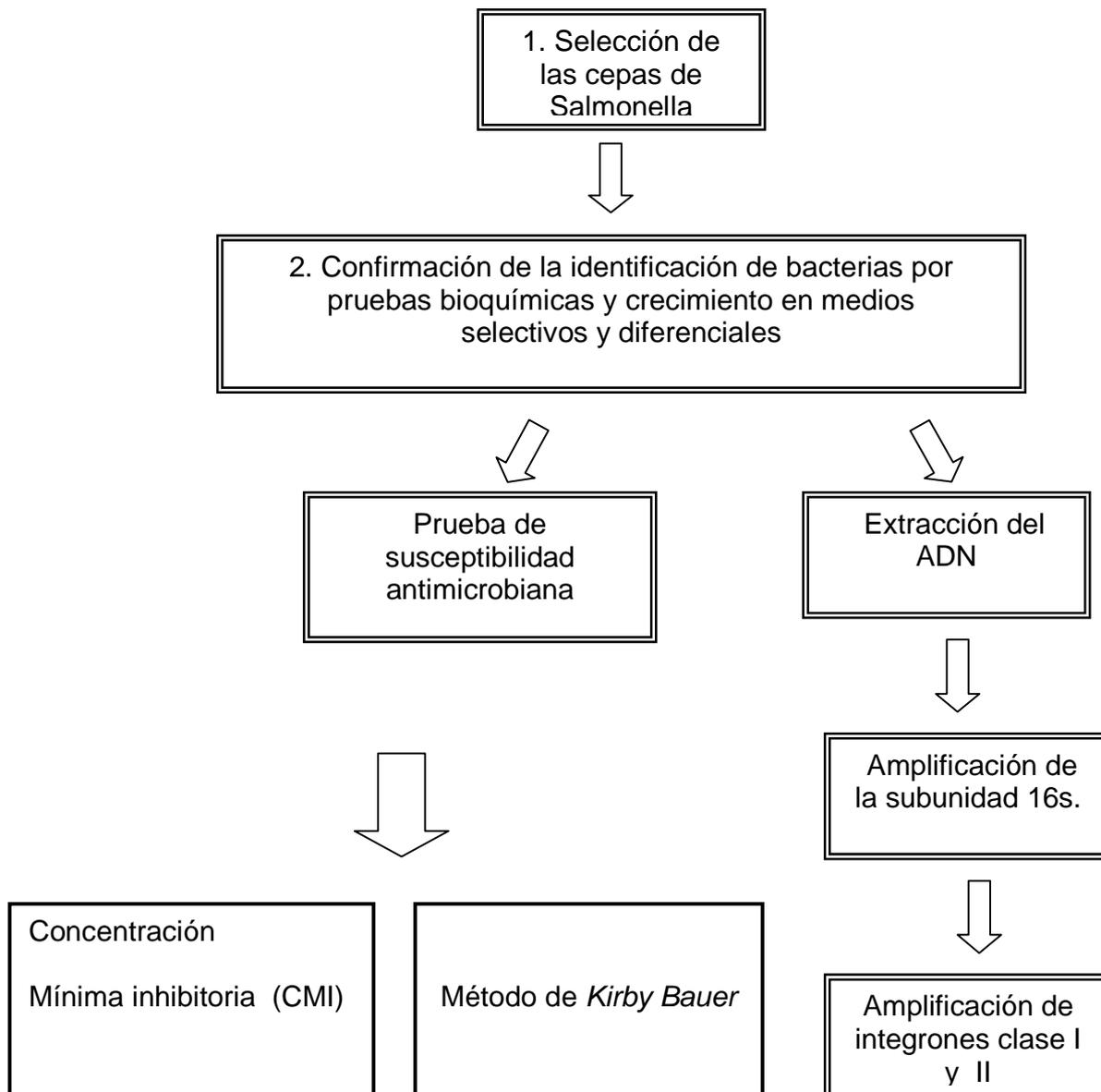
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el patrón de la resistencia antimicrobiana en cepas de *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. gallinarum*, utilizando antibióticos comerciales para bacterias gram negativas.
- 2 Determinar la concentración mínima inhibitoria en cepas de *S. enteritidis* *S. typhi*, *S. typhimurium* utilizando antibióticos para bacterias gram-negativas
- 3.-Determinar la presencia del gen de la subunidad 16s ribosomal en las cepas aisladas
- 4.-Determinar la presencia de los genes de la integrasa clase I y clase II.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diagrama de Flujo

A continuación se muestra un diagrama de flujo de la metodología que se llevó a cabo en la realización del presente trabajo. Posteriormente se hará mayor referencia a cada uno de los procedimientos.



5.2. Cepas utilizadas y condiciones de Cultivo.

Se estudiaron cincuenta y dos cepas de *S. enteritidis* aisladas en el Laboratorio de Biología Molecular de enterobacterias del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) además se utilizaron 2 cepas de *S. gallinarum* aisladas de aves, 3 de *S. typhi* aisladas de humanos. Todas las cepas fueron previamente serotipificadas con antisueros somáticos y flagelares ("O" y "H") y posteriormente fagotipificadas. Para determinar la sensibilidad antimicrobiana las bacterias se cultivaron en agar nutritivo, después fueron crecidas 4 h en caldo Mueller Hinton a 37°C y sembradas en agar Mueller Hinton durante 24 h a 37°C.⁵⁸

Como referencia se utilizaron *E. coli* H10407 enterotoxigénica, *E. coli* ATCC-9184 así como las cepas *E. coli* UB5201 y *E. coli* 679 donadas por la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria Santander España. Todas estas cepas poseen un plásmido con multiresistencia a varios antibióticos, como control negativo se utilizó una cepa de *B. canis* la cual carece de plásmidos y es resistente a ciclohexamida, bacitracina, polimixina B.

5.3. Pruebas bioquímicas practicadas a *Salmonella enteritidis*

Los aislamientos de *Salmonella sp* se sembraron en agar nutritivo, incubaron a 37°C por 24 h y posteriormente se sembraron en agar McConkey y se incubaron por 24 h a 37°C para eliminar probables contaminaciones y corroborar que no fermentan la lactosa.

La prueba bioquímica para determinar el género y especie se realizó por el método de microdilución. La prueba se realizó en microplacas de 96 pozos en un equipo automatizado (microscan). Los paneles contienen a las siguientes pruebas bioquímicas para bacterias Gram-negativas (tabla 2):

TABLA 2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A LAS CEPAS DE *S. enteritidis*

Glu	Raf	Ino	Ure	Lys	TSI	Cit	Cl
Suc	Rha	Ado	H ₂ S	Arg	Esc	Mal	Xi
Sor	Ara	Mel	Ind	Orn	VP	ONPG	Oxi

Pruebas Bioquímicas: Glu=glucose, Sur=sucrose, SOR= sorbitol, Raf= rafinosa , Rha= ramnosa, Ara= arabinosa, Ino= inositol, Ado= adonitol, Mel=melecitosa , Ure=urea, H₂S= ácido sulfhídrico, Ind=indol, Lys= lisina, Arg= arginina, Orn= ornitina, TSI=triple azúcar hierro, Esc=Esculina, VP= Voges-Praskauer, Cit=citrate, Mal=malonato,ONPG=Prueba de beta-galactosidasa Cl=carbohidrato de lactosa Xi= Xilosa, Oxi= oxidasa.

5.4. Serotipificación de las cepas

Todas las cepas de salmonella aisladas de aves y humanos fueron serotipificadas con antisueros polivalentes O:1,9,12 y antisueros flagelares de *Salmonella enteritidis*

a) Serotipificación somática

Esta se realizó utilizando antisueros para determinar la presencia del serogrupo O de Salmonella, la prueba se hizo mediante la técnica de aglutinación en placa, a partir de cultivos de 24 h en agar Tripticasa soya (TSA), incubados a 37°C. Después se obtuvo una colonia y se mezcló con solución salina fisiológica en una placa de vidrio cuadrada, posteriormente se agregaron 20 µl de antisuero somático, se mezcló suavemente durante 30 seg y la lectura de la prueba se realizó a los 3

minutos, en busca de la presencia o ausencia de aglutinación a través de un transluminador de luz blanca⁵⁸.

b) Serotipificación flagelar

Para corroborar el serotipo de *S. enteritidis* se realizó la prueba con antisueros contra diferentes factores flagelares, mediante la técnica de aglutinación en tubo. Después de incubar se realizó la lectura para observar las aglutinaciones flagelares en el fondo del tubo⁵⁸.

Los cultivos que aglutinaron sólo con una fase de los antisueros flagelares, se consideraron como una serovariedad monofásica de acuerdo al esquema de Kauffmann-White.

5.5. Pruebas de resistencia antimicrobiana

La susceptibilidad de las cepas de *Salmonella enteritidis* se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (Amp), Ampicilina/sulbactam (A/S), Piperacilina (Pi), cefaxolina (Cfz), Cefoxitina (Cfx), Ceforoxima (Crm), Cefotaxina (Cft), Gentamicina (Gm), Imipenem (Imp), Trimetropim-sultametoxazol (T/S), Ceftacidima (Caz), Aztreonam (Azt).

Se realizó por los métodos de difusión en agar (Kirby-Bauer) en los que se determinó el diámetro del halo de inhibición (DHI) y la dilución en microplaca con la que se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

a) Difusión en placa

Las bacterias fueron incubadas en agar nutritivo durante 18 h a 37°C con agitación orbital a 200 rpm, posteriormente se inocularon de 3 a 4 colonias de las bacterias en 5 ml de caldo luria bertani se incubo a 37 °C durante 2 hrs y se ajusto la turbidez con solución salina estéril con una concentración aproximada de 10^8 UFC/ml inocular la superficie de una placa con agar Mueller Hinton el hisopo se paso por toda la superficie se dejo secar 5 minutos posteriormente se colocaron sobre la superficie de cada una de las placas 8 discos de papel impregnados con concentraciones conocidas de antibiótico. Las bacterias se incubaron durante 24 h a 37°C y después se observaron las placas y se determinó el diámetro del halo de inhibición. La resistencia antimicrobiana se interpretó por ausencia de un halo de acuerdo a la tabla estándar NCCLS (*National Committee of Clinical Laboratory*) para bacterias Gram negativas la sensibilidad se determinó con la presencia de un halo, considerando un mayor efecto del antibiótico cuando el diámetro fue mayor⁵⁸.

TABLA 3.- DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN EN CEPAS DE *Salmonella*, DE ACUERDO A LAS TABLAS DE LA NCCLS

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN NCCLS	ZONA DE INHIBICION (mm)		
		RESISTENTE	INTERMEDIA	SUSCEPTIBLE
Ceftriaxona	30 mcg	13	14-17	18
Cloranfenicol	30 mcg	12	13-17	18
Pefloxacina	5 mcg	12	13-17	18
Cefotaxima	30 mcg	≤14	15-22	≥23
Ampicilina	10 mcg	≤11	12-13	≥14
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25mcg /23.75 mcg	≤10/12	11-15/13-14	≤16/≥15
Amicacina	30 mcg	≤14	15-16	≥17
Cefalotina	30 mcg	≤14	15-17	≥18
Gentamicina	10 mcg	≤12	13-14	≥15
Carbenicilina	10 mcg	≤13	-----	≤13
Nitrofurantoina	300 mcg	≤14	15-16	≥17

b) Dilución en microplaca

Se determinó para *S. enteritidis* por medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando 19 antibióticos para el método de microdilución en caldo (NCCLS, 2000). La prueba de susceptibilidad fue realizada en un sistema automatizado Sensititre para determinar la susceptibilidad antimicrobiana usando paneles diseñados por el sistema nacional de monitoreo de resistencia antimicrobiana (NARMS). En la tabla 3 se muestran los antibióticos utilizados.

Las bacterias fueron incubadas en medio de agar Mueller Hinton durante 18 h a 37 °C, posteriormente se preparó el inóculo conteniendo una concentración aproximada

de 3×10^8 UFC/ml y se adiciono la suspensión estándar de organismos sobre el panel. Posteriormente se incubó a 35 °C durante 24 h aproximadamente. La lectura de los paneles para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los organismos se determino en un equipo automatizado (microscan). Los paneles contienen los siguientes antibióticos para bacterias Gram-negativas: Ampicilina

5.6. Purificación de ADN de *Salmonella*

Se cultivaron las bacterias en 10 ml de caldo LB a 37°C durante 24 h, posteriormente se obtuvo el paquete bacteriano por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min y el DNA fue obtenido con una preparación comercial (equipo de extragene). El DNA fue visualizado en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. El DNA fue conservado a -20°C para utilizarlo en posteriores trabajos.

5.7. Amplificación de la subunidad 16s ribosomal

Para corroborar molecularmente los aislamientos de *Salmonella*, se determinó la subunidad 16s ribosomal utilizando los siguientes oligonucleótidos (^{5'}AGTTTGATCATGGCTCAG^{3'} Y ^{5'}TTACCGCGGCTGGCA^{3'})⁵⁹ específicos del gene 16srRNA, los cuales amplifican un fragmento de 500 pb. La PCR se preparó utilizando una mezcla comercial (PCR-Mix, de Invitrogen) la cual está compuesta por MgCl₂, amortiguador de PCR, DNA taq polimerasa y dNTPs. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 0.6 µl de cada oligonucleótido, 2 µl de DNA genómico

(15 µg/1µl) y 16.8 µl de PCR-Mix. La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización del DNA a 94°C por 40 seg, alineamiento a 54°C por 40 seg y extensión a 75°C por 40 seg, durante 35 ciclos y una extensión final a 75°C por 7 min. La reacción de PCR fue visualizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y analizados en un digitalizador de imágenes (UVP-II,USA).

5.8. Amplificación de los genes de la integrasa tipo I y II.

La PCR se realizó utilizando una mezcla comercial (PCR-Mix, *Invitrogen*) y las mismas cantidades y condiciones mencionadas anteriormente. Para determinar la presencia de los genes de la integrasa clase I y II se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: para el gene de la integrasa clase I: $5^{\text{GGCATCCAAGCAGCAAG}}^3$, $3^{\text{AAGCAGACTTGACCTGA}}^5$ y para el gene de la integrasa clase II se utilizaron $5^{\text{ATC GCA ATA GTT GGC GAGT}}^3$ y $5^{\text{GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC}}^3$ ^{61,62}

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 0.6 µl de cada oligonucleótido,

2 µl (15 µg/1µl) de DNA genómico (15 mg/1µl) y 16.8 µl de PCR-Mix. La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización del DNA a 94°C por 40 seg, alineamiento a 58°C por 40 seg y extensión a 75°C por 40 seg, durante 30 ciclos y una extensión final a 75°C por 7 min. La reacción de PCR fue visualizada en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y analizado en un digitalizador de imágenes (UVP-II,USA).⁶²

5.9. Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Medcalc. La comparación de los datos se hizo de acuerdo con el tipo y distribución de las variables. Para la estadística la prueba que se utilizó como medida de asociación fue Chi cuadrada. Se aceptó una $p < 0.05$ como significativa. En el ajuste con más de una variable IC de 95%.⁶⁴

6. RESULTADOS

6.1. Biotipificación de las cepas de *Salmonella enteritidis*

Se analizaron 52 cepas de *S. enteritidis*, 3 de *S. typhi*, 2 *S. gallinarum* y 3 de *E. coli* con un juego de pruebas bioquímicas en un equipo automatizado y todas presentaron una bioquímica típica a *salmonella enteritidis* a las 24 pruebas bioquímicas que se practicaron (**Tabla 4**) y las cepas fueron serotipificadas con antisueros contra factores somáticos (**O**) y flagelares (**H**).

TABALA 4. BIOQUÍMICA DE *Salmonella enteritidis* (24 PRUEBAS)

No	CEPAS	Gl	Su	So	Ra	Rh	Ar	Ino	Ad	Me	Ur	H ₂ S	Ind	Lys	Arg	Or	TSI	Es	VP	Cit	Ma	ON	Cl	Xi	Oxi
1	95793	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
2	95755	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	95773	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	95746	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	95736	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	95580	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	95568	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	95321	+	-	+	-	+		-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	95529	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	95235	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11	95233	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	9556	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13	94601	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14	94549	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
15	932014 M10	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
16	931407M8	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
17	931152 MB	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	92809B	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-		+	-	-	-	+	-	-	-	-
19	92277	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20	92248	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
21	92178HBC	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
22	921034H	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
23	92177	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	931034	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
25	931034	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
26	A-17	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
27	A-15	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
28	A11F8	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
29	A-9	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
30	A-5	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
31	A-4	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
32	SA93185	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
33	SA92245	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
34	SA92179	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
35	SA92181	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
36	SA91305	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
37	SA712A	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
38	SA3160196																								
39	SA 085	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

6.2. Amplificación del fragmento del gene de la subunidad 16s ribosomal

En la figura 8 se muestra la amplificación de un fragmento de 500 pb que corresponde a la subunidad 16s ribosomal con lo que se corroboró el 100% de las cepas de *Salmonella enteritidis* que se utilizaron. Todas las cepas, se analizaron por medio de la amplificación de la subunidad 16s ribosomal para corroborar el género bacteriano

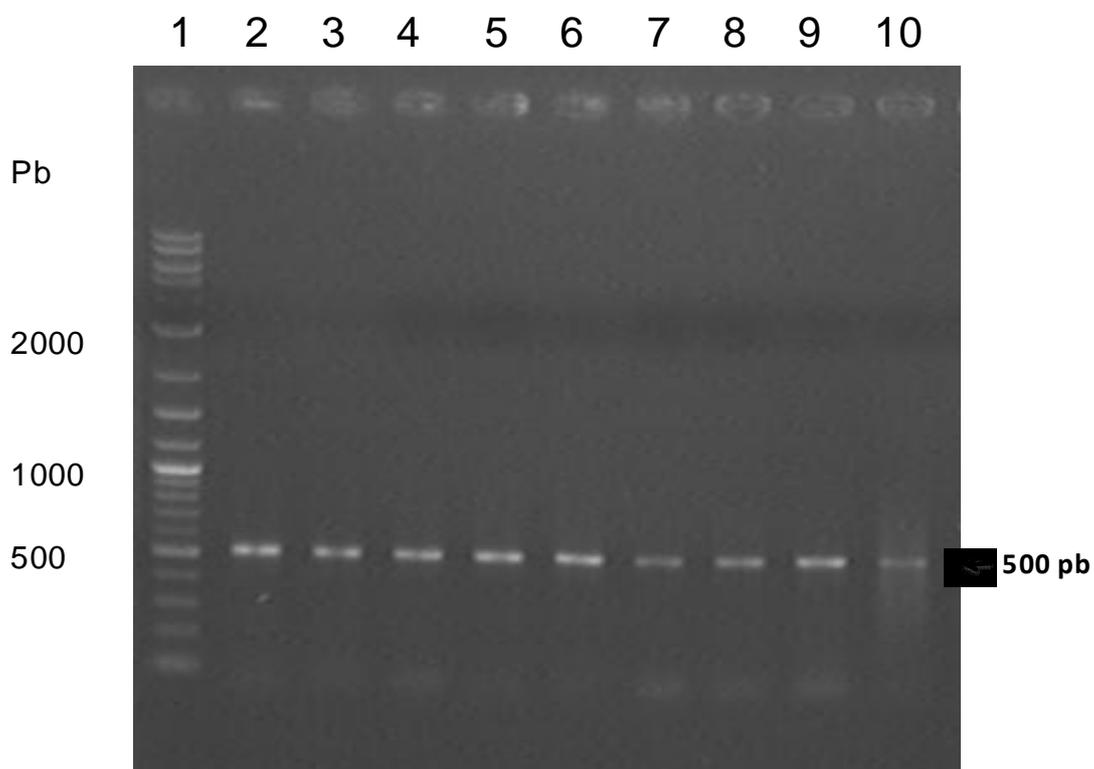
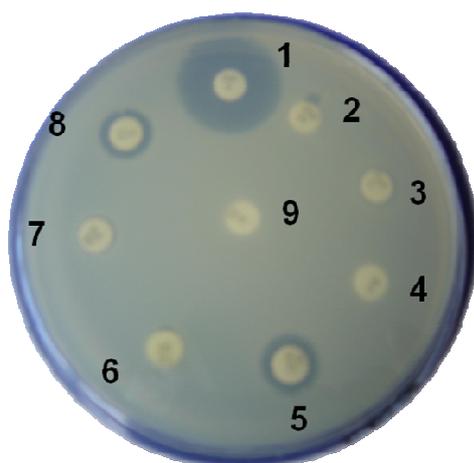


Figura 8. Amplificación de la subunidad 16s ribosomal en 8 cepas de *S. enteritidis*. Carril 1,MPM 2 ladder, carril 2, 95736; carril 3, 95580; carril 4, 95321; carril 5, SA92245F4; carril 6, T16F4; carril 7, MT-10; carril 8, *S.typhi* IMSS-1; carril 9, 932014; carril 10, 932014MCB.

6.3. Análisis de la resistencia antimicrobiana

En la tabla 5 se muestran el análisis de resistencia de 57 cepas de *Salmonella* y 3 cepas de *E. coli* así como el porcentaje de resistencia. Se observó mayor resistencia en los antibióticos nitrofurantoina 57 cepas (96.8%), carbenicilina 57 cepas (96.8%), gentamicina 55 cepas (88.7%), cefalotina 48 cepas (77.41%) y amikacina 46 cepas (74.19%) y en menor porcentaje fueron para trimetoprim/sulfametoxazol 35 cepas (56.5%), ampicilina 22 cepas (35.5%) y netilmicina 28 cepas (45.16), como se observa en la figura 9, y los antibióticos que inhibieron en mayor porcentaje el desarrollo de *Salmonella* fueron ceftriaxona 1 cepa (1.61%), cloranfenicol 1 cepa (1.61%), pefloxacina 2 cepas (3.22%), cefotaxima 3 cepas (4.83%) como se muestra en la figura 10 y en la tabla 5.

CEPA A5 DE *Salmonella enteritidis* CON MULTIRESISTENCIA A VARIOS ANTIBIÓTICOS.

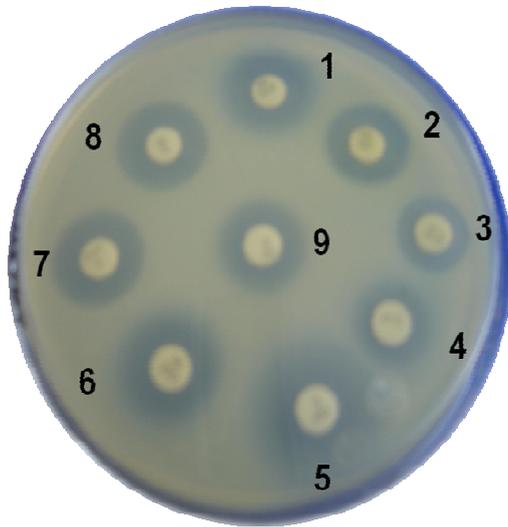


ANTIBIÓTICOS

1. Levofloxacina (LVX)
2. Carbenicilina (CB)
3. gentamicina (ge)
3. Ampicilina (AM)
4. Trimetoprim/sulfametoxazol (T/S)
5. Nitrofurantoina (NF)
6. Cefalotina (CF)
7. Ampicilina/sulbactam (A/S)
8. Aztreonam (AZT)
9. Piperacilina (PI)

Figura 9. Prueba de difusión en placa (Método de *Kirby-Bauer*)

CEPA 95746 DE *Salmonella enteritidis* CON SENSIBILIDAD A VARIOS ANTIBIÓTICOS.



ANTIBIÓTICOS

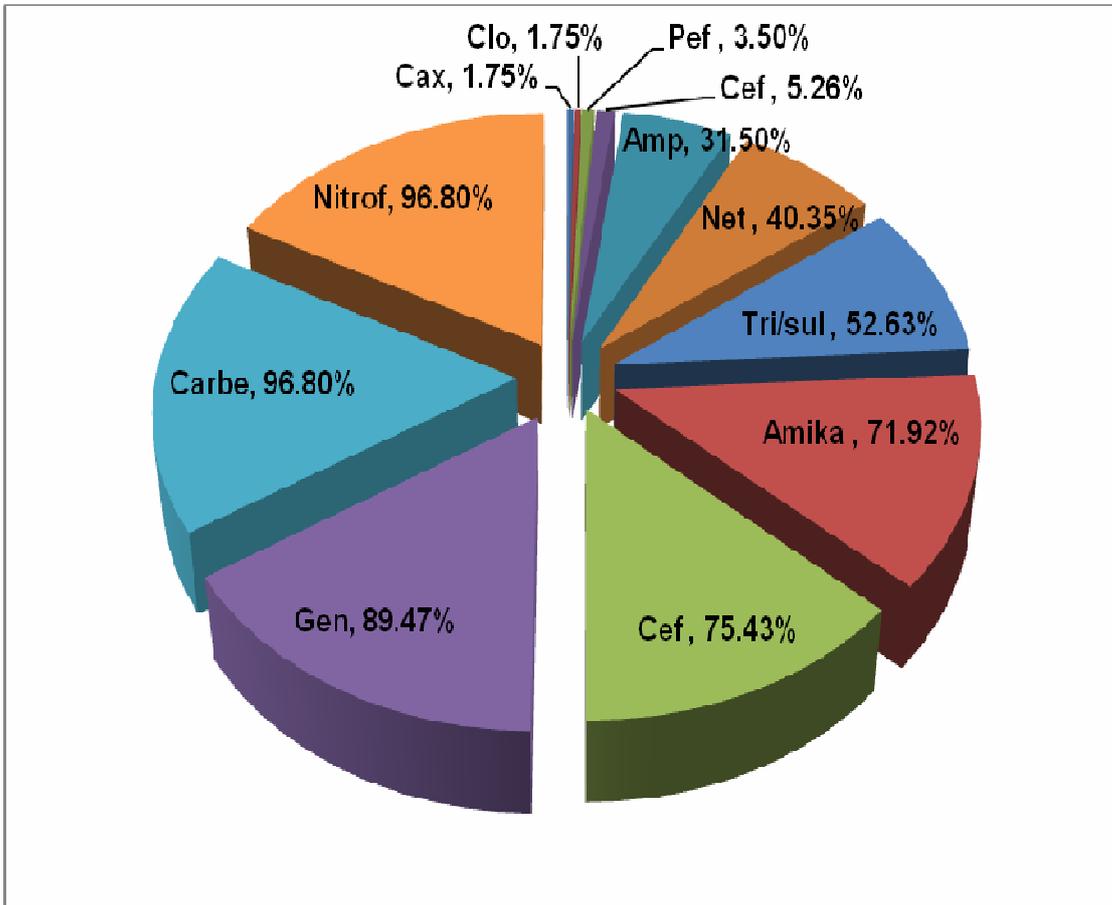
1. Levofloxacina (LVX)
2. Carbenicilina (CB)
3. Cloranfenicol(CL)
3. Ampicilina (AM)
4. Trimetoprim/sulfametoxazol (T/S)
5. Nitrofurantoina (NF)
6. Cefalotina (CF)
7. Ampicilina/sulbactam (A/S)
8. Aztreonam (AZT)
9. Piperacilina (Pi)

Figura 10. Prueba de difusión en placa (Método de *Kirbi-Bauer*)

TABLA 5. PORCENTAJE DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE 57 CEPAS DE *Salmonella* OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Antibióticos y punto de corte	Cepas Resistentes	Porcentaje de Resistencia
Ceftriaxona ≥ 13	1	1.75%
Cloranfenicol ≥ 12	1	1.75%
Pefloxacina ≥ 14	2	3.50%
Cefotaxima ≥ 14	3	5.26%
Ampicilina > 1	18	31.5%
Netilmicina ≥ 12	23	40.35%
Trimetoprim/sulfametoxazol ≥ 10	30	52.63%
Amikacina ≥ 14	41	71.92%
Cefalotina ≥ 14	43	75.43%
Gentamicina ≥ 12	51	89.47%
Carbenicilina ≥ 17	55	96.8%
Nitrofurantoina ≥ 14	55	96.8%

Los resultados observados indican que las cepas de *Salmonella* presentaron los porcentajes más bajos para ceftriaxona (1.75%), cloranfenicol (1.75%), pefloxacina (3.50%) cefotaxima (5.26%), ampicilina (31.5%), netilmicina (40.35%). Mientras que el patrón de resistencia con mayor porcentaje fue para nitrofurantoina y carbenicilina (96.8%), gentamicina (89.47%), cefalotina (75.43%), amikacina (71.92%) y trimetropim más sulfametoxazol (52.63%) como se muestra en la grafica 1.



Grafica 1.- Resistencia de las 60 cepas de *Salmonella* a diferentes antibióticos detectadas por el método de difusión en placa (*Kirby Bauer*⁵⁸).

6.4. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenidos con 57 cepas de *Salmonella*

En la tabla 6 se muestran, los datos de resistencia, sensibilidad y categoría intermedia obtenidos mediante la CMI, para 12 antibióticos probados

Se observó que de las 57 cepas de *Salmonella* analizadas, 34 presentaron resistencia a los antibióticos utilizados de éstas 8 presentaron resistencia a 2 o más antibióticos (multirresistentes) y 26 cepas de *Salmonella* presentaron resistencia a un antibiótico. El resto de las cepas de *Salmonella* 23 (40.32%) no presentó resistencia y fueron sensibles a los antibióticos utilizados en este ensayo.

También se muestra en la tabla 6-1 los resultados de las cepas de referencia utilizados durante esta prueba.

TABLA 6.- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) EN 57 CEPAS DE *Salmonella*

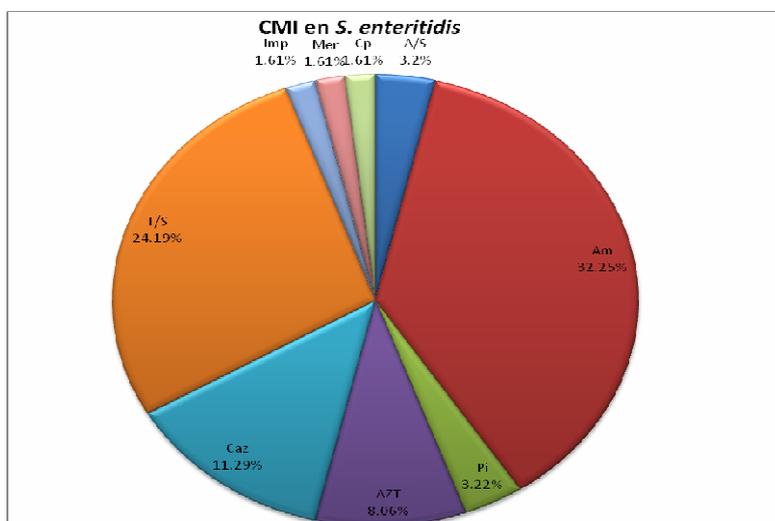
No	CEPAS	ORIGEN	A/S	AM	PI	AZT	CAZ	CAX	CFT	T/S	CP	LVX	IMP	MER	No Antib.
1	95793	AVES	S	S	S	R>16	R>16	S	I	R>2	S	S	S	S	3
2	95755	AVES	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
3	95746	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
4	95736	AVES	S	S	S	I	S	S	S	R>2	R>2	S	S	S	2
5	95580	AVES	S	S	S	I	S	I	I	R>2	S	S	S	S	1
6	95568	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	2
7	95321	AVES	S	S	S	I	R>16	I	S	S	S	S	S	S	1
8	95529	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
9	95233	AVES	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
10	94601	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
11	932014M10	AVES	S	S	S	S	R>16	I	I	R>2	S	S	S	S	2
12	931907M8	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
13	931152MB	AVES	S	S	S	S	R>16	I	I	S	S	S	S	S	1
14	92809B	AVES	S	S	S	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	1
15	92277	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
16	92248	AVES	S	S	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	1
17	92178HBC	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
18	921034H	AVES	S	S	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	1
19	92177	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
20	931034	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
21	A-17	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
22	A-15	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
23	A11F8	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
24	A-9	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
25	A-5	AVES	R>16	R>16	R>64	R>16	R>16	I	I	R>2	S	S	S	S	6
26	A-4	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
27	SA 93185	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
28	SA92245F4	AVES	S	R>16	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
29	SA92181	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
30	SA712SA	AVES	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
31	SA 085	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
32	SA 15	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
33	SA 011B	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
34	T26F4	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
35	T16F4	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
36	T14	AVES	S	S	S	R>16	I	S	S	S	S	S	S	S	1
37	MT27	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
38	MT15	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
39	MT14	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
40	MT13	AVES	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
41	MT10	AVES	R>16	R>16	I	S	S	S	S	S	S	S	R>8	R>8	4
42	JA-IV	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
43	FVB-1	AVES	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
44	FVA-1	AVES	I	R>16	R>64	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	3
45	95773	Humano	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
46	95235	Humano	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
47	9556	Humano	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
48	94549	Humano	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
49	SA92179	Humano	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
50	SA91305	Humano	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
51	SA3160196	Humano	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
52	S.e. f13	Humano	S	S	S	S	S	S	S	R>2	S	S	S	S	1
53	S.eF8	Humano	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
54	S.e. F4	Humano	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
55	S. typhi HI-01	Humano	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
56	S. typhi HI-02	Humano	S	R>16	S	S	R>16	S	S	S	S	S	S	S	2
57	S. typhi IMSS-1	Humano	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0

Abreviaturas: Plas: plásmidos, AK: amicacina, GE: gentamicina, CB: Carbenicilina, CL: cloranfenicol, Cro: ceftriaxona, AM: Ampicilina, STX: Trimetoprim/sulfametoxazol, CTX: cefotaxima, NET: netilmicina, PEF: pefloxacina, NF: Nitrofurantoina, CF: Cefalotina.

**TABLA 6-1. CEPAS DE REFERENCIA CON MULTIRRESISTENCIA
DIFUSIÓN EN PLACA (MÉTODO DE KIRBI-BAUER)**

No	CEPAS	ORIGEN	Plas	AK	GE	CB	CL	Cro	AM	STX	CTX	NET	PEF	NF	CF	No. RESIS.
1.	ETEC H10407	Humano	+	S	S	R	R	S	R	S	MS	S	S	S	S	3
2.	UB5201POX38	Humano	+	S	S	R	R	S	R	S	MS	S	S	S	R	4
3.	E. coli 679	Humano	+	S	S	R	R	S	R	R	MS	S	S	S	R	5
4.	ATCC-9184	Ave	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
5	<i>B. canis</i>	Perro	-	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	1

Por otro lado, el patrón de resistencia fue el siguiente: ampicilina/sulbactam 3.2%, ampicilina 32.25%, piperacilina 3.22%, aztreonam 8.6%, ceftacidima 11.29%, trimetropim/sulfametoxazol 24.19%, imipenem, meropenem y ciprofloxacina tuvieron una resistencia de 1.61% respectivamente (grafica 2).



Grafica 2.- Se muestran los porcentajes de resistencia de las 57 cepas de *S. enteritidis* con múltiples antibióticos, aislados de aves y humanos (CMI). Abreviaturas: Ampicilina/sulbactam (A/S); Ampicilina (AM); piperacilina (Pi); aztreonam (Azt) ceftacidima (Caz) Trimetoprim/sulfametoxazol (T/S); imipenem (imp), meropenem (mer) Ciprofloxacina (Cp).

En la tabla 7 se observa el comportamiento de las 57 cepas de *S. enteritidis* analizadas con cada uno de los antibióticos. Al aplicar la pruebas de chi-cuadrado se observó que existe una relación entre la susceptibilidad mostrada en las cepas de *S. enteritidis* y los antibióticos ($p < 0.05\%$). Los mayores porcentajes de resistencia de las cepas fueron: Ampicilina (27.8%), Aztreonam (7.8%), ceftacidima (10.7%) y trimetropim/sulfametoxazol (21.9%).

Otras cepas estudiadas mostraron bajo porcentaje de resistencia a: Ampicilina/sulbactam (3.2%), Piperacilina (1.64%), ciprofloxacina (1.64%), imipenem (1.64%) y meropenem (1.64%). No se observó resistencia a ceftriaxona, levofloxacina y cefotaxina. Sensibilidad intermedia la presentaron fundamentalmente para: cefotaxina (7.8%), ceftriaxona (7.8%), aztreonam (4.7%) y en menor porcentaje para ceftacidima (3.12%), piperacilina (3.28%) y ampicilina/sulbactam (1.6%).

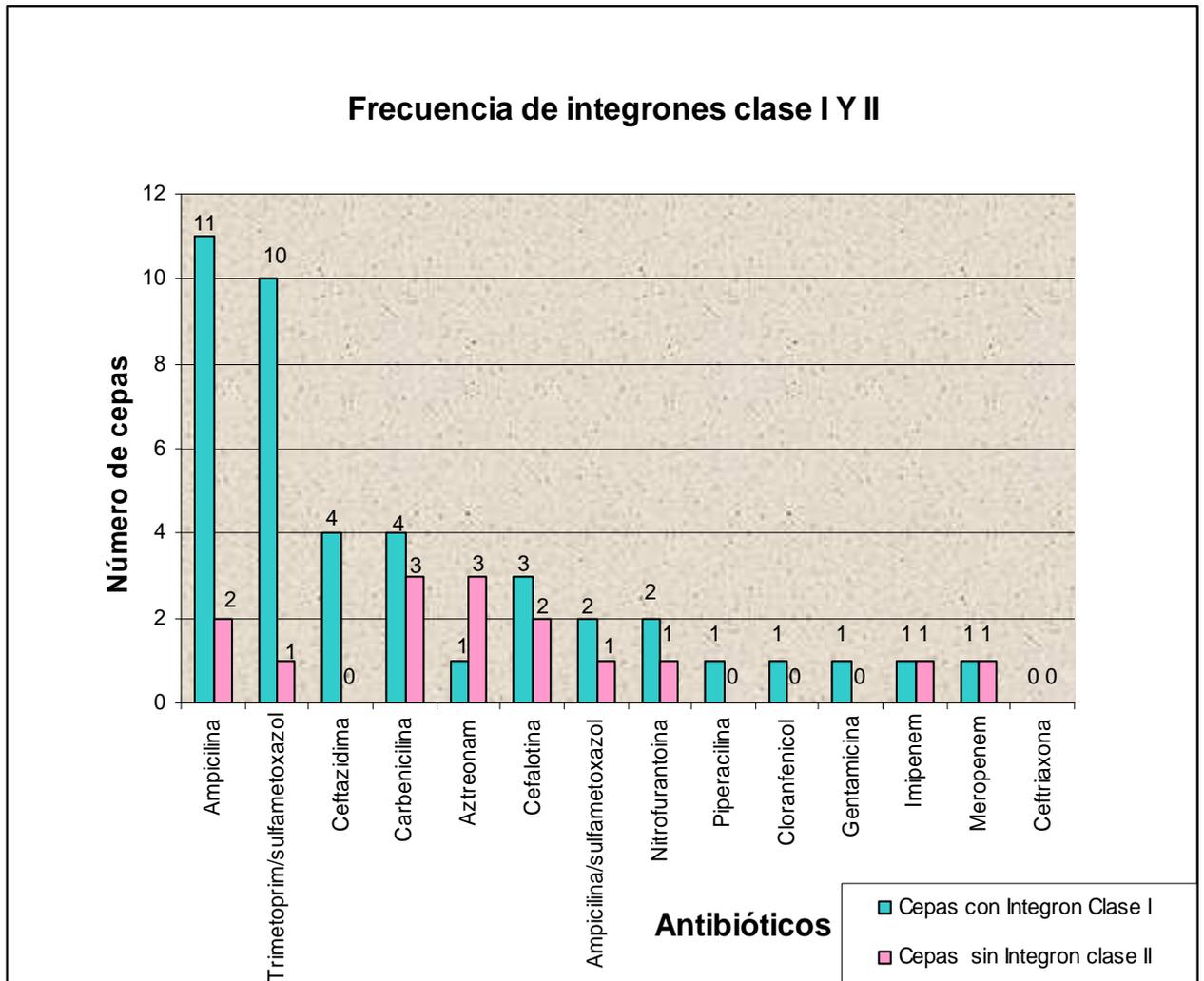
Los antibióticos a los que las cepas mostraron mayores porcentajes de sensibilidad fueron: ampicilina/sulbactam (95.2%), ciprofloxacina (98.36%), levofloxacina (100%), imipenem (98.36%), meropenem (98.36%).

TABLA 7. PORCENTAJES DE RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE *SALMONELLA* ESTUDIADAS (CMI).

Antimicrobiano	Resistente %	Intermedio %	Sensible %
Ampicilina/sulbactam (A/S)	3.2	1.6	95.2
Ampicilina (Am)	27.8	0	72.2
Piperacilina (pi)	1.64	3.28	95.08
Aztreonam (azt)	7.8	4.7	87.5
Ceftacidima (Caz)	10.7	3.12	85.9
Ceftriaxona (cax)	0	7.8	92.2
Trimetropim/sulfametoxazol (T/S)	21.9	0	78.9
Ciprofloxacina (CP)	1.64	0	98.36
Cefotaxina (Cf)	0	7.8	92.2
Levofloxacina (Lvx)	0	0	100
Imipenem (imp)	1.64	0	98.36
Meropenem (Mer)	1.64	0	98.36

6.5. Identificación de los Genes de la Integrasa Clase I y II.

En la gráfica 3 se puede observar la detección de integrones clase I y clase II frente a los antibióticos utilizados en cepas de *S. enteritidis*. Donde 22 cepas de *Salmonella* expresaron el gen de la integrasa clase I y 22 cepas expresaron el gen de la integrasa clase II, mostraron mayor resistencia a ampicilina, encontrándose 11 cepas con el integron clase I y 4 con el integron clase II. En trimetropim/sulfametoxazol se encontraron 10 cepas con el integron clase I y 1 cepa con el integron clase II, en ceftazidima se encontraron cuatro cepas con el integron clase I y ninguno con el integron clase II, en carbenicilina se encontraron cuatro cepas con el integron clase I y 3 con el integron clase II, en cefalotina se presentaron 3 cepas con el integron clase I y 2 cepas con el integron clase II pero aztreonam, piperacilina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, meropenem presentaron una cepa con el integron clase I, ampicilina/sulfametoxazol presentaron 2 cepas con el integron clase I, ampicilina sulfametoxazol, imipenem, meropenem presentaron una cepa con el integron clase II, y aztreonam trimetropim/sulfametoxazol presento 3 cepas con el integron clase II y ceftriaxona no presentó ninguno de los dos integrones.



Grafica 3.- Presencia de integrasas clase I y clase II en 41 aislamientos de *Salmonella* con un perfil de resistencia para antibiótico.

6.6. Comparación entre cepas con presencia del integrón clase I y II

De las 57 cepas de *Salmonella* analizadas, 40 cepas (70.17%) fueron resistentes, 12 cepas fueron multiresistente 8 presentaron el integrón clase I y 6 presentaron el integrón clase II de las 28 cepas con resistencia a un antibiótico presentaron 13(32.5%) presentaron integrones clase I y clase II. El análisis estadístico mostró diferencia significativa tanto para el integrón clase I como para el integrón clase II de las cepas multiresistente ($X^2 = 10.441$; $P < 0.05$; IC 95%).

El análisis estadístico no mostro diferencia significativa tanto para el integrón clase I y clase II en las cepas multirresistentes y las que presentaron resistencia a un antibiótico.

TABLA 8.- COMPARACIÓN DE CEPAS CON MULTIRRESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y PRESENCIA DE INTEGRONES CLASE I Y II.

No	CEPAS	Resistencia a los Antibióticos	Núm. de antibióticos	Amplificación la Subunidad ribosomal e Integrones		
				16S ribosomal	clase I	clase II
1.	95793	AZT , CAZ,T/S,	3	SI	NO	SI
2.	95755	T/S	1	SI	SI	NO
3.	95773	CB, AM	2	SI	SI	NO
4.	95736	T/S, CP	2	SI	SI	SI
5.	95580	T/S	1	SI	SI	SI
6.	95568	AM	1	SI	NO	NO
7.	95321	CAZ	1	SI	SI	SI
8.	95235	T/S	1	SI	SI	NO
9.	95233	T/S	1	SI	SI	NO
10.	9556	T/S	1	SI	SI	NO
11.	94601	AM	1	SI	NO	NO
12.	94549	AM	1	SI	NO	NO
13.	932014MCB	CAZ T/S	2	SI	SI	NO
14.	93152MB	CAZ	1	SI	SI	NO
15.	92809B	CAZ	1	SI	NO	SI
16.	92277	AM	1	SI	SI	NO
17.	92248	AZT	1	SI	NO	SI
18.	92178HBC	AM	1	SI	NO	SI
19.	921034H	AZT.	1	SI	NO	SI
20.	931034	AM	1	SI	SI	NO
21.	A6160196	AM	1	SI	NO	SI
22.	A-14	T/S	1	SI	SI	NO
23.	A-9	AM	1	SI	SI	NO
24.	A-5	A/S,AM, PI AZT, CAZ, T/S CL,NI, CF, CB.	10	SI	SI	NO
25.	SA92245F4	AM	1	SI	SI	SI
26.	SA92179	AM	1	SI	NO	SI
27.	SA91305	GM, CB, AM, NF, CF	5	SI	SI	NO
28.	SA712SA	T/S	1	SI	NO	SI
29.	SA3160196	Ninguno	0	SI	SI	NO
30.	SA 01B	CB, AM , NF, CF	4	SI	NO	SI
31.	T26F4	CB	1	SI	NO	SI
32.	T16F4	AM	1	SI	SI	SI
33.	T14	AZT	1	SI	NO	NO
34.	MT10	A/S, AM, IMP, MER	4	SI	SI	SI
35.	S.e. f13	T/S	1	SI	No	SI
36.	S.e F8	Ninguno	0	SI	No	SI
37.	S.e. F4	Ninguno	0	SI	No	SI
38.	S. typhi HI-01	AM,T/S	2	SI	SI	NO
39.	S. typhi HI-O2	AM, CRO, CF, CB.	4	SI	SI	SI
40.	S. typhimurium	AM, T/S	2	SI	NO	SI
41.	FVB-1	AM	1	SI	NO	NO
42.	FVA-1	AM,PI,T/S	3	SI	NO	NO
43.	JAIVB	AM	1	SI	NO	SI
Cepas Resistentes			40 presentaron resistencia	43presentaron subunidad 16s	22presentaron integron I	22presentaron integron II
<p>Abreviaturas: Ampicilina/sulbacatam(A/S); Ampicilina(AM); cefalotina(Cf); piperacilina(Pi); Trimetoprima/sulfametoxazol (T/S); Gentamicina(Gm); Ciprofloxacina(Cp); Tobramicina(To); amikacina(AK); imipenem(Im),aztreonam(AZT), Carbenicilina (CB), Nitrofurantoina (NF), Meropenem(MER), Cefalotina(CF), Cloranfenicol (Cl),Nitrofurantoina(NI),Ceftacidima (caz).</p>						

6.7. Identificación del gene de la Integrasa Clase I

En la figura 9 se muestra la amplificación de un fragmento de 1,196 pb que corresponde al gen de la integrasa tipo I en cepas de *S. enteritidis*. Dicho gen se asocia a genes cassettes que se encuentran en la región variable del integron.

De las 57 cepas de *S. enteritidis* analizadas, en 22 (38.59%) se encontró el gen de la integrasa tipo I (**Figura 8**). Dentro de estas cepas se encontraron varios que fueron resistentes a 10 antibióticos (**Tabla 7**).

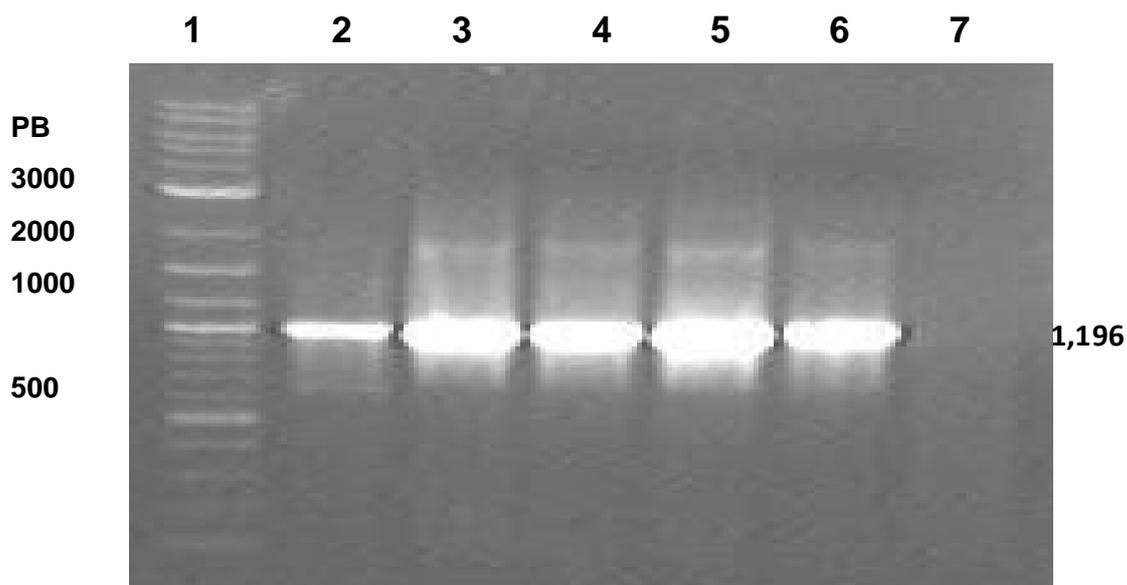


Figura. 9. Amplificación del gene de la integrasa clase I. carril 1 MPM 2 Log ladder, carril 2 *S. enteritidis* A-5, carril 3 *S. enteritidis* 95580, carril 4 *S. enteritidis* 95321, carril 5 *S. enteritidis* SA91305, carril 6 *S. enteritidis* MT10, carril 7 control Negativo.

6.8. Identificación del gene de la Integrasa Clase II

En la **figura 10** se muestran la amplificación de un fragmento de 1,096 pb que corresponde al gen de la integrasa Clase II en cepas de *S. enteritidis*. Dicho gen se asocia a genes cassettes que se encuentran en la región variable del integron.

De las 58 cepas de *S. enteritidis* analizadas en 22 (38.59%) se encontró el gen de la integrasa tipo II (**Figura 9**). Dentro de éstas la cepa A5 presento resistentes a 12 antibióticos (**Tabla 7**).

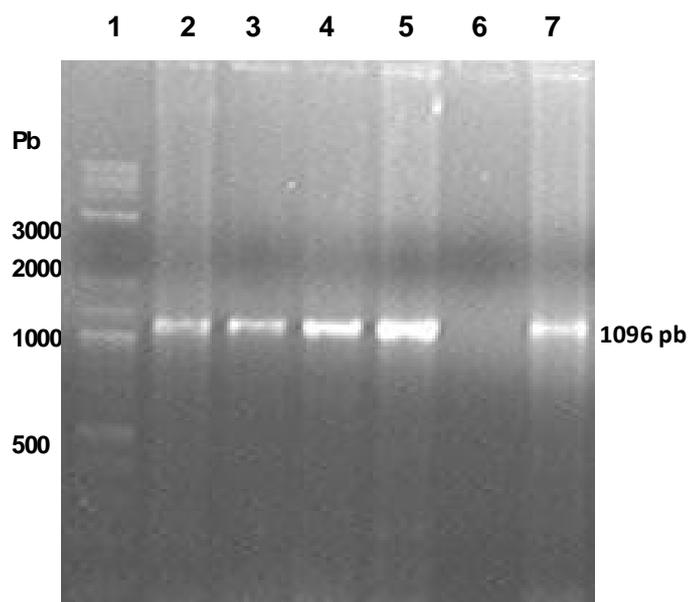


Figura.10.- Amplificación del gene de la integrasa clase II. Carril 1 MPM 2log ladder, En los carriles 2-5 y 7 corresponden a cepas de *S. enteritidis* carril 2 95793; carril 3 95736; carril 4 95736; carril 5 95321; carril 6 Control Negativo; Carril 7 T16 F4.

7. DISCUSION

Las enfermedades diarreicas siguen siendo una causa muy importante de morbilidad y mortalidad en el mundo y están clasificadas como la cuarta causa de muerte y la segunda causa por pérdidas productivas⁶⁴.

En México la Dirección General de Epidemiología reporta anualmente una incidencia de aproximadamente 76,000 casos de salmonelosis donde los serotipos que frecuentemente se aíslan son: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. derby*, *S. agona* y *S. anatum*; determinando además que en las muestras de origen humano, *S. enteritidis* ha sido el serotipo más frecuentemente aislado entre 1991 y 2000⁷⁰. Por lo que corresponde a este microorganismo, frecuentemente se asocia con intoxicaciones alimentaria sobre todo en lugares donde se manipulan alimentos para consumo general. Los alimentos más expuestos a una contaminación microbiana son aquellos que se consumen crudos o frescos como carne cruda, productos cárnicos, embutidos, pescados y mariscos, que no son debidamente preparados o almacenados⁶⁵.

El serotipo que se reporta con mayor frecuencia en problemas de salud pública a nivel mundial es *S. enteritidis*. Este microorganismo se aísla frecuentemente tanto de humanos como de animales ya que su hábitat es el tracto digestivo, por lo que la contaminación de alimentos derivados de la industria agrícola y pecuaria para humanos puede ser común. Por otro lado, estos microorganismos se pueden encontrar en partículas orgánicas que pululan en el medio ambiente y son un riesgo de contaminación alimentaria⁶⁵

La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un problema creciente en el ámbito mundial especialmente para países en desarrollo debido al uso indiscriminado de los antibióticos o drogas que se utilizan para uso humano, animal o vegetal. El incremento de la resistencia antimicrobiana se debe probablemente a la generación cepas resistentes.⁶⁶ La categoría para establecer que un microorganismo es resistente lo determina la NCCLS, y los clasifica en sensibles, intermedios y resistentes.

En el presente trabajo observamos que el patrón de resistencia antimicrobiana en las 57 cepas de *Salmonella* analizadas por el método de Kirby-Bauer (**Tabla 5**) y se observó que cefalotina (75.43%), gentamicina (89.47%), carbenicilina (96.8%) y a nitrofurantoina (96.8%) y en menor proporción ceftriaxona (1.75%) y cloranfenicol (1.75%), lo cual fue similar a lo reportado por otros autores²². En estas cepas de *S. enteritidis*, el cloranfenicol y la ceftriaxona mostraron poca resistencia. En el caso del cloranfenicol esto se puede explicar debido a que es una droga de elección para el tratamiento infecciones causadas por *S. typhi* como se describe en la literatura⁷².

En relación a la CMI, el análisis mostró que los porcentajes de resistencia fueron altos para trimetoprim/sulfametoxazol y ampicilina lo cual es explicable ya que son drogas que se utilizan con mayor frecuencia en la clínica. Las cepas analizadas no mostraron resistencia a ceftriaxona, cefotaxima y levofloxacin lo cual es entendible ya que los dos primeros son cefalosporinas de tercera generación (**Tabla 6**), lo cual coincide con resultados reportados por otros autores⁴⁸. Al analizar las 57 cepas de *Salmonella* se encontró que siete, portan integrasas para ambos integrones (**clase I y II**). El hecho de que estén presentes dichos integrones correlaciona con resistencia

antimicrobiana. Como se muestra en la **figuras 9 y 10**, así como en la **tabla 8**.^{46, 47,}

48

La cepa A-5 fue multirresistente a diez antibióticos pero solo presento el integrón clase I (**Tabla 8**), la multirresistencia en esta cepa se puede explicar ya que fue aislada de aves de postura y en la alimentación de estos animales se utilizan antibióticos en el alimento como promotores del crecimiento o bien para evitar enfermedades en las parvadas en producción, cabe mencionar que esta cepa porta además plásmidos de mediano y alto peso molecular (30 y 90 Kb)^{3,6}.

Por lo que corresponde a algunos de los antibióticos que se usan con frecuencia en medicina humana se encontraron 5 cepas que presentaron resistencia a aztreonam (Azt) que se clasifica como monobactamas y 7 cepas presentaron resistencia a ceftazidima (Caz) la cual es una cefalosporinas de tercera generación, ambos antibióticos pertenecen al grupo de los betalactámicos, lo cual se puede explicar ya que muchas enterobacterias producen β -lactamasas como las penicilinasas y cefalosporinasas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico^{59,55,65}. Con respecto a Trimetropin/sulfametoxazol (T/S) 15 cepas presentaron resistencia lo cual correlacionó con la presencia de integrón clase I (66.66%) e integrón clase II (40%), es interesante mencionar que el gene de resistencia para las sulfamidas (*suf1*) se encuentra en el integrón clase I⁷⁴. En el caso de ampicilina 20 cepas presentaron resistencia y el 55% de estas, correlacionaron con integrón clase I mientras que el 45% presentaron integrón clase II, lo que coincide con otros trabajos donde se han reportado aproximadamente 60 genes involucrados en la resistencia antimicrobiana en ambos integrones⁷⁴.

Como se menciono anteriormente la rápida diseminación de la resistencia antimicrobiana entre las poblaciones bacterianas se debe a la presencia de transposones y plásmidos. Los integrones son estructuras integradas en un transposon que tienen la capacidad de integrarse al genoma bacteriano presentando un tercer mecanismo que contribuye a propagar la resistencia de los antibióticos.^{62,63}

Es claro de que la integración de los determinantes de resistencia dentro del cromosoma bacteriano aumenta la resistencia antimicrobiana aún en ausencia de antibióticos⁶⁷. Actualmente el uso indiscriminado de los antibióticos en la industria pecuaria así como su uso terapéutico para prevenir infecciones en animales ha contribuido a aumentar la resistencia de patógenos que causan infecciones en humanos y animales. Por ejemplo, la propagación del serotipo *S. typhimurium* DT104 el cual es pentaresistente, causa un gran impacto en la salud pública, ya que el microorganismo se transmiten de animales a humanos por medio de alimentos contaminados.⁶⁷

De las 57 cepas de *S. enteritidis* que se estudiaron 5 (7.8%) presentaron resistencia a 1 antibiótico y no amplificaron ninguno de los dos integrones estudiados. Sin embargo, se debe considerar que existen otros mecanismos de resistencia o tal vez a la presencia de integrones en plásmidos conjugativos involucrados en la resistencia a los antibióticos⁶³.

La mayoría de las cepas presentaron integrones de Clase I, este tipo de integrones confieren resistencia a múltiples fármacos, teniendo aproximadamente 60 genes cassettes que se han descrito anteriormente, la mayoría de estos genes reportados codifican resistencia a antibióticos y a drogas que se utilizan como desinfectantes. El

integrón clase I confiere resistencia a: aminoglicosidos como la gentamicina, amikacina, Penicilinas, cefalosporinas, trimetoprim/sulfonamidas, Tetraciclina, Eritromicina, Cloranfenicol⁶⁹. Este tipo de integrón clase I se encuentra principalmente asociado con los plásmidos y el transposon 21.⁶⁸

El transporte de los integrones de clase II es por el Tn7, tiene la capacidad de portar genes con resistencia a antibióticos y la presencia de este tipo de transposon sirve para detectar resistencia a cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, sulfadiacina, trimetoprim, mercurio, amonio cuaternario, tetraciclina y estreptomicina.

Los resultados que encontraron en este trabajo coinciden con otros autores donde reportan que los integrones clase I y clase II están presentes tanto en *E.coli* como en *Salmonella* aislamientos de tanto de humanos como de animales, donde la mayoría presentan resistencia a 5 o más antibióticos. Los resultados de resistencia antimicrobiana que se observaron en los aislamientos de *S. enteritidis* de origen aviar y humano tiene importancia, sobre todo, si se considera el papel que juegan estos elementos genéticos en los mecanismos de resistencia entre los microorganismos.

8. CONCLUSIONES

1. Con pruebas bioquímicas en microplaca y serotipificación con antisueros somáticos (**O**) y flagelares (**H**) se confirmó que todas las cepas utilizadas para este trabajo pertenecen al género *Salmonella*; serotipos *S. enteritidis*, *S. typhi* y al género *Escherichia coli*.
2. El 100% de las cepas pertenecientes al género *Salmonella* amplificaron un fragmento 500 pb el cual corresponde a la subunidad 16s ribosomal, lo cual apoyó la confirmación del serotipo.
3. Mediante el método de Kirbi-Bauer se observó que las 57 cepas de *Salmonella* presentaron una resistencia que varió entre el 96.8% y 74.19% para los antibióticos nitrofurantoina, carbenicilina, gentamicina, cefalotina y amikacina. Mientras que, los antibióticos que inhibieron con mayor eficacia el desarrollo de *Salmonella* fueron ceftriaxona cloranfenicol, pefloxacina, cefotaxima ya que del total de cepas, entre el 1.61% y 3.22% presentaron resistencia a estos antibióticos.
4. El patrón de resistencia observado por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las 57 cepas de *Salmonella* fue mayor para los antibióticos trimetopim/sulfametoxazol (24.19%), Ampicilina (32.25%), ceftacidima (11.29%) y aztreonam (8.06%) como se muestra en la gráfica 2 ($p < 0.05\%$).
5. Las cepas de *Salmonella* presentaron multiresistencia antimicrobiana (43/57), 22 cepas (38.59%) amplificaron algún tipo de integrón (clase I y clase II). Con respecto a Trimetoprin/sulfametoxazol 10 cepas (17.54%) presentaron resistencia con integrón clase I y 8 (14.03%) amplificaron el integrón clase II.

9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

1. Identificar la presencia de integrasas en plásmidos, ya que se observó que la mayoría de las cepas estudiadas portan estos elementos genéticos.
2. Identificar la presencia de genes como *sul1* y β -lactámicos dentro de integrones (clase I y clase II) localizados ya sea en el cromosoma o en plásmidos, con la finalidad de correlacionar su resistencia antimicrobiana.
3. La caracterización de cepas de género *Salmonella* multirresistentes ayudara a un adecuado uso de los antibióticos tanto para la medicina humana como veterinaria.
4. El estudio molecular de microorganismos patógenos basado en la resistencia a las drogas, puede ayudar a estudios epidemiológicos ya que las bacterias mutan constantemente, debido a un uso indiscriminado de los antibióticos en medicina humana, veterinaria y la industria de los alimentos.

10. REFERENCIAS

- 1.-Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP. González AMC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México 2000;42:490-495.
- 2.- SAGARPA Campañas Zoosanitarias, Campaña Nacional contra la salmonelosis aviar. México D.F. 2003.
- 3.- Moreno, M.A. Las heras, A. Porrero, M.C. Teshager T. COL. Nuevos retos para el futuro de la Sanidad Porcina : El diseño de vacunas como alternativa al uso de antibacterianos. Depto de Patología Animal I. Facultad de Veterinaria , Madrid 2000.
- 4.- Lennete E. 1982. Microbiología Clínica. 3^{era} edición . Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
- 5.- Koneman, E. Allen, V.; Dowel, V.; Sommers H.(ed) 1998; Diagnóstico Microbiológico 3^a edición Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana.
- 6.-Vázquez NJ. Preparación de proteínas de la membrana externa en *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. Tesis de Doctorado FMVZ-UNAM. México D.F. 2003.
- 7.- Barrow PA, Lovell MA. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*. Infect. Immun. 1989;57: 3136-3141.
- 8.- Carrión EQ. Síndrome diarreico. En:Farreras P, Rozman C, editores.Medicina Interna.14ed. España:Harcourt;2000.p.213-22.

- 9.- Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 2a. Ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1999.p.298-305.
- 10.- Brooks GF, Morse SA, Butel JS. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16a. Ed. México: El Manual Moderno; 1999.p.267-82. Interna. 14ed. España: Harcourt; 2000.p.213-22.
- 11.- Valdés-Dapena MM. Enterobacterias. En: Llop. A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Ciudad de la Habana: Ciencias Médicas; 2001. P: 251-80.
- 12.- Miller SI, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin Enfermedades infecciosas: principios y prácticas. 4ªed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1997. p.2254-76.
- 13.- Keusch TG, Thea MD. Patógenos bacterianos entéricos invasivos que lesionan tejidos: diarrea hemorrágica y disentería. Ed. Schaechte M, Medoff G, Eisenstein BI,
- 14.- Goldsby A. Richard et al. "Immunology" 4ª Edition. Editorial W. H. Freeman and Company USA 1999 pp 580-581.
- 15.- Zinzer "Microbiología" 18ª Edición. Editorial Panamericana Argentina 1996 pp 713-717.
- 16.- Clarke C. Patogénesis of bacterial infections in animals. 2ª edition Ed. University Press/HMES, USA 1995 PP 134-150.
- 17.- Darwin K. Millery. Molecular basis on the interaction of salmonella with the instinal Mucosa molecular microbiologia Rev. 1999 vol 12 pp. 405-420.

18.- Wray C. and Wray A. "Salmonella in domestic animals" 1° Edition. Editorial CABI. USA 2000 pp 41-59, 83-99.

19.- Acha N. "Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales". 2° Edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington 1990 pp 158-165.

20.- Bäümler, A. 1997. The record of horizontal genes transfer in salmonella. Trends in microbial, 5:8

21.- Millema Y. 1998. Le Pouvoir pathogene des salmonellas: facteurs de virulence et modeles d`etude. Vet. Res. 29, p: 385-407.

22.- Mark H. B. Robert et.al. "El Manual Merck de Diagnóstico y Tratamiento" 10° Edición. Editorial Harcourt España 1999. p: 107-129, 167-170.

23.- Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. "Pathogenesis of bacterial infections in animals" Edited by Carlton I. Gyles and Charles O. Thoen . 2°ed. Iowa State University Press Ames USA 1993. p:134-153

24.- Clements M. Erikson S. Tezcan-Merdol D, Hinton JCD. Virulence gene regulation in Salmonella enterica. Ann. Med. 2001;1;33:178-185.

25.- Howard Ochman, Genes lost and genes found. Evolution of bacteria pathogenesis and symbiosis science may1 2001;292;5519.

26.- Abigail AS, Dixie DW. *Vibrio cholerae* the cause of cholera and *Salmonella* species,. Bacterial Pathogenesis :A Molecular Approach 2ndED. Asm Press Wahington (DC). 2002.

- 27.- Mecsas I, Strauss RJ. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence : Type III Secretion and Pathogenicity ISLANDS. *Emerg. Infct. Dis.* 1996;24:270-288.
- 28.- Galan JE, *Salmonella* interaction with Host Cell: Type III secretion at Work. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001;17:53-86.
- 29- Groisman EA, Blnac-Potard AB, UchiyaK. Pathogenicity island and the evolution of salmonella virulence. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements Edited by Kaper and Hacker . AMS, Washington , D.C. 1999:127-150.
- 30.- Vázquez NJ. Preparación de proteínas de la membrana externa en *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. Tesis de Doctorado FMVZ-UNAM. México D.F. 2003.
- 31.- Barrow PA, Lovell MA. Funtional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 1989;57: 3136-3141.
- 32.- Takeshi H., Nobuhiko O., Noriko N., Takatoshi K. Complete DNA Sequence and comparative Analysis of the 50-Kilobase Virulence Plasmid Of *Salmonella enterica* Serovar choleraesuis *Infect. Immun.*69,4:2612-2620. 2001.
- 33.- Groisman Eduardo A. Principles of Bacterial Patogénesis Academia Press, London. 2001.
- 34.- Scherer A. C., Miller I. S. Molecular Pathogenesis of *Salmonellae* Academic Press London, 2001.

- 35.- Know and Ricked S. 1998. induction of acid resistance of salmonella typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. environment. Microbiol*, 64:9 3458-3463
- 36.- Ng I, Liu S.L., Sanderson, K.E. 1999 Role of genomic rearrangements in producing new rybotypes of Salmonella typhi *J. Bacteriol* ., 181: 1, 3536-41.
- 37.- Perales y Audicana 1989. Semisolid media for isolation of salmonella spp. From coastel waters .*Appl. Enviroment. Microbiol*, 55:1,302-3033
- 38.- Enrique Iañez Pareja 1998 RECOMBINACIÓN Y RESTRICCIÓN
http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/24_micro.htm
- 39.-Brooks GF, Morse SA, Butel JS. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 16a. Ed. México: El Manual Moderno; 1999. p.267-82.
- 40.- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Microbiología médica*. 2da ed. USA; 1999.
- 41.- Falkow S, Mekalanos J. Bacilos entéricos y vibrios. En: Davis BD, Dulbeco R, Eisen HN, Ginsberg HS, editores. *Tratado de Microbiología*. 4ª ed. México: Salvat; 1996. p.541-66.
- 42.- Zwadyk P. Enterobacteriaceae: *Salmonella* y *Shigella* patógenos intestinales. En: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser Microbiología*. 20va ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1994. p.759-71.
- 43.- Ad Fluit, Maarten R. Visser, and Franz-Josef Schmitz 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance *Clin Microbiol Rev* 2001 vol. (4):836-871.
- 44.- Kevin L. Anderson Ph D. La resistencia de las bacterias a los antibióticos ¿un ejemplo apropiado de cambio evolutivo? *Creation Research Society Quarterly*, Vol. 41(4)318-326. 2005

- 45.- Fernandez-Alvarez M et.al “Asociación entre Integrones de clase I con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en Enterobacteriaceae” Española de Quimioterapia Rev 2003 Vol.16 pp 394-397.
- 46.- Caratoli Alexandara “Importance of integrons in the diffusion of resistance” IINRA, EDP, Science 2001 Vol.32 PP 243-259.
- 47.- Goldstein Cathy et.al “Incidence of Class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion Animals and exotic” Antimicrobial Agents and Chemotherapy Rev. 2001 vol.45 pp 723-726.
- 48.- Beatriz Guerra,¹ Sara Soto,¹ Santiago Cal,² and M. Carmen Mendoza¹ Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons among *Salmonella* Serotypes Antimicrobial Agents and Chemotherapy, August 2000, Vol. 44, No. 8 p: 2166-2169,
- 49.-Goening RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. Infect control Hosp. Epidemiol 1993; 14:595-600
- 50.- Vázquez N. Jesús “Clonación y caracterización de los genes que expresan una enterotoxina similar a LT en *Salmonella gallinarum*” Tesis de doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- UNAM. México D.F. 2003.
- 51.- González R. Gerardo et.al. “Integrones y Cassettes génicos de Resistencia: estructura y rol frente a los antimicrobianos”. Revista Médica de Chile, 2004 vol.132 p: 619-626
- 52.- National Committee for clinical Laboratory Standards. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; eighth informational Supplement M 1005 10(M2) 2000, p:14-21.
- 53.- Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Microbiology Methods 6th ed. London; Dufferworth 1989.

54.- Peter V. Adrian, Christopher J. Thomson, Keith P. Klugman, and Sebastian G. B. Amyes

55.-Maniatis T. Fritsch EF, Sambrook , J. Molecular Cloning A laboratory Manual 2nd . Ed. Cold Spring Harbor New York 1989.

56.- Davis Lg. Dibner MA. Battery JF. Basics Methods in Molecular biology. Elsevier Science Publishing Co, Inc.Amsterdam. TheNetherlands 1986.

57.- Lewin B. Genes V. Oxford University Press, Oxford England 1994.

58.- Díaz GR, Gamazo C, López GI. Manual práctico de microbiología 1° edición, Ed. Masson, Barcelona 1998.

59.- Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Situación actual de la Salmonella enteritidis, su distribución y posible origen. Proceedings of the forty-fifth western poultry disease conference, Cancún México. 1996:245-246

60.- Vosek, Olga M. Hebert, E.M.S. de Giori G. Rayar Fusot J. Secuencia Parcial del gen de 16s rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de queso artesanal . Laboratorio de Bromatologia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Agrimenura UNNE. Argentina.

61- Mamuka Kotetishvili, O.Colin Stine, Arnold Kreger, J. Glenn Morris,Jr. 2002. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental Salmonella Strains..Journal Of clinical Microbiology, pp: 626-16235.

62.- Goldstein C., Lee M D., Sanchez S., Hudson Ch., Phillips B., Register B., Grady M., Liebert C., Summers A.O., White D. G., Maurer J.J. 2001. Incidence of class I and II integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob Agents Chemother.45:3. 723-726.

- 63.- García Lobo, J.M., F. de la Cruz (1990): Mecanismos de formación de transposones bacterianos con resistencia a múltiples antibióticos. En: "Microbiología 1990", págs. 45-51. Universidad de Sevilla
- 64.- Murray R. Spiegel Estadística 2nda edición Ed. Mc Graw-Hill 1994
- 65.- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study . Lancet, 1997, 349:1436-1442.
- 66.- Who Global Saalm-Surv South America Working Group, Who Global Salm-surv. A Who global salm-surv Retrospective study Examining Salmonella serotypes in South America, 2000: Dominance of Salmonella serotype Enteritidis International conference of Emerging Infectious Diseases , Atlanta, 2000.
- 67.- Bennish MI, Levy Sb. Antimicrobial resistance of enteric Pathogens, En: Blaser MJ, Smith Pd, RaudinJL. Greenberg HB, Guerrant RL, editors, infections of the gastrointestinal tract , New York : Raven Press 1995 p. 1499-1523
- 68.- Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol.Rev.2001;14:836-871
- 69.- Levesque C. Piche L. Larose C. Roy P. PCR Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes.Antimicrob Agents Chemother 1995, 39:185-191.
- 70.- Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis OPS-OMS. Brotes y casos de ETA notificados en 1996 al sistema de información para la vigilancia epidemiológicas de las enfermedades transmitidas por alimentos (SIRVE-ETA) en línea.

71.- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México, 42, 6: 490-495. 2000

72.- Woodford N. and A. Hohnson. Molecular Bacteriology: Protocol and clinical Applications. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1998.

73.SBMS/ACADEMICSh[http://www.surrey.ac.uk/SBMS/ACADEMIC_homepage/mcfadden_johnjoe/img/salmonella-epithelial% 20interactions.jpg](http://www.surrey.ac.uk/SBMS/ACADEMIC_homepage/mcfadden_johnjoe/img/salmonella-epithelial%20interactions.jpg)

74.- Pérez-Trallero E. y Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol Enferm .Infecc. Microbiol Clín 2003;21(9):520-9

75.- Poppof, M. and Le Minor 1997 Antigenic Formulas of the salmonella serovars WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 7 ma revisión . Instituto Pasteur, Paris- France 151p.

11.- ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO Y MODO DE PREPARACIÓN

Agar Nutritivo

Fórmula por litro de agua

Componente	gramos
Caldo nutritivo.....	7.0
Extracto de levadura	1.0
Agar bacteriológico.....	15.0
Fosfato de potasio monobásico	1.3
Fosfato de potasio dibásico	3.7
Glicerol	2.0 mL

Modo de Preparación: Rehidratar los componentes señalados, aforar a un litro de agua destilada, calentar hasta su disolución y esterilizar en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Permitir que enfrié a 45°C aproximadamente y vaciar en cajas petri.

Luria Bertani

Medio de cultivo sólido sin inhibidores e indicadores para cualquier microorganismo.

Fórmula por litro de agua

Componente	gramos
Cloruro de sodio	10.0
Bacto triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0

PH 7.0

Modo de Preparación: Rehidratar los componentes señalados en un litro de agua destilada, y aforar a un litro, vaciar en tubos o botellas apropiadas y esterilizar en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Medio para diferenciación Bioquímica

Agar Citrato de Simmons

Fórmula por litro de agua

Componente	gramos
Agar bacteriológico	15.0
Azul de bromotimol	0.08
Citrato de sodio.....	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dihidrogenado de amonio.....	1.0
Fosfato dipotásico.....	1.0

Sulfato de magnesio 0.2

Modo de Preparación: Rehidratar 24.2g aforar a un litro de agua destilada, calentar hasta su disolución y distribuir en tubos; esterilizar en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Permitir que enfríen los tubos en posición inclinada

Agar de Mac Conkey

Medio selectivo usado para evaluar la capacidad de degradación de la lactosa.

Fórmula por litro de agua

Componente	Gramos
Agar	13.5
Cloruro de sodio	5.0
Cristal violeta	0.001
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Peptona	3.0
Peptona de gelatina	17.0
Rojo neutro	0.03

Modo de Preparación: Rehidratar 50g del medio aforar a un litro de agua destilada, calentar hasta su disolución y esterilizar en autoclave a 121°C a 15

libras de presión durante 15 minutos. Permitir que enfrié a 45°C aproximadamente y vaciar en cajas petri.

Agar para Salmonella y Shigella

Fórmula por litro de agua

Componente	Gramos
Agar	13.5
Citrato férrico de amonio	1.0
Citrato de sodio	8.5
Extracto de carne	5.0
Lactosa	10.0
Peptona	5.0
Rojo neutro	0.025
Sales biliares	8.5
Tiosulfato sódico	8.5
Verde brillante	0.00033

Modo de Preparación: Rehidratar 60g del medio aforar a un litro, de agua destilada, calentar hasta su disolución. No esterilizar en autoclave. Permitir que enfrié a 45°C aproximadamente y vaciar en cajas petri.

Agar Sulfito de Bismuto

Fórmula por litro de agua

Componente Gramos

Agar	20.0
Dextrosa	5.0
Extracto de carne	5.0
Fosfato disódico	4.0
Indicador de sulfito de bismuto	8.0
Peptona	10.0
Sulfato ferroso	0.3
Verde brillante	0.025

pH final 7.6

Modo de Preparación: Rehidratar 52g del medio aforar a un litro, de agua destilada, calentar hasta su disolución. No calentar por tiempo prolongado, NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Permitir que enfrié a 45°C aproximadamente y vaciar en cajas petri, una vez solidificado es importante PROTEGERLO DE LA LUZ.

Medio de Mantenimiento

Fórmula por litro de agua

Componente	gramos
Caldo nutritivo	7.0
Extracto de levadura	1.0
Agar bacteriológico	7.3
Fosfato de potasio monobásico	1.3
Fosfato de potasio dibásico	3.7
Glicerol 2.0 mL

Modo de Preparación: Rehidratar los componentes citados aforar a un litro, de agua destilada, calentar hasta su disolución y distribuir en tubos; esterilizar en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Permitir que enfrién los tubos en posición inclinada.

REACTIVOS y SOLUCIONES:

BROMURO DE ETIDIO (1ug/ml)

Bromuro de etidio 1.0ug
Agua destilada.....hasta 1 ml.

Pesar el bromuro de etidio con guantes por ser una sustancia cancerígena, disolver y almacenar la solución en un frasco oscuro envuelto con papel aluminio a temperatura ambiente.

Buffer TAE (Tris-HCl- ACETATO-EDTA) 1X

Trizma base4.84g
Ac. Acetico glacial. 1.14ml
EDTAdiNa0.5MpH8. 2ml
Agua bidestiladahasta
1000ml.
pH 8

Buffer de carga 2X (ADN)

SDS 0.5%

Glicerol 25%

Azul de bromofenol .0.05%

EDTA 12Mm

pH 8

Gel de Agarosa al 1% para electroforesis

Agarosa 1.0g

TAE 1X 100ml