



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**TESIS**

**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE  
INTEGRONES EN AISLADOS DE *Salmonella entérica*  
OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS  
EN EL ESTADO DE MICHOACÁN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**QUE PRESENTA  
ARACELI GABRIELA INOCENCIO VELÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**

**MORELIA MICHOACÁN ENERO DEL 2011**



**ESCUELA DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

## **DEDICATORIAS.**

*La presente Tesis la dedico con mucho cariño principalmente a mis padres: J. Socorro Inocencio y María Elena Velázquez, que en todo momento los llevo conmigo en donde quiera que se encuentren. Los amo con todo mi corazón.*

*También dedicada a mis hermanos: Jesús, Leticia, Miguel y Alejandro, gracias por sus consejos, cariño y comprensión cuando lo necesité, por sus deseos de que todo me salga bien y por creer en mí. Me han llenado de fuerza y voluntad para seguir adelante. Los quiero mucho.*

*A los mejores cuñados del mundo: Eutiquio Ortega y Esmeralda Gutiérrez, por apoyarme siempre.*

*A mis sobrinos que son muchos pero no se me olvidan, gracias por revivir momentos de mi infancia.*

*A la Química Judith Prieto, por tener siempre las palabras y consejos idóneos y por su apoyo incondicional.*

*A mis amigos: Meche, Chave, Elena, Yazmín, Betzy, Samanta, Ismeraí, Nallely, Robert, Denny, Jaime, Gaby, Sayuri, Víctor, Juve, Lira, Paco, Ramón, gracias por convivir conmigo momentos felices y tristes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Tengo tanto que agradecer que no sé por dónde empezar, pero me gustaría dar las gracias a todas las personas que han hecho posible este trabajo.*

*En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a los Doctores María Soledad Vázquez Garcidueñas y Gerardo Vázquez Marrufo, por la confianza depositada en mí persona, por haberme dado esta oportunidad y por hacerme partícipe de un equipo de trabajo muy encantador, por ser grandes personas, por su ayuda incondicional en todo momento, y por su asesoramiento, dedicación, amabilidad, comprensión, consejos e ideas profesionales expuestas para que esta tesis se llevara a cabo*

*A la Maestra Blanca Nateras Marín y a la Química Bertha Ballesteros Silva, por las explicaciones, correcciones y críticas constructivas hechas hacia este trabajo.*

*A la Doctora Virginia Robinson por esas charlas de la hora de la comida.*

*A las chicas y chicos del Laboratorio: Ana, Nallely, Idalia, Dulce, Saila, Lety, Iliana, Gaby Vázquez, Mina, Gaby López, Andrei, Daniel, Iván, Moisés, uff!!! Bueno que puedo decir, gracias por su espontaneidad, risas, charlas, consejos, por estar dispuestos siempre a ayudar con su compañerismo y profesionalismo, gracias también por todos los momentos agradables compartidos durante estos años.*

*A todos mis amigos que forman parte importante en mi vida y que no se me olvidan todos esos momentos que eh convivido con ustedes, muchas gracias por su apoyo y comprensión.*

*A toda mi familia en general, gracias por sus porras, que a pesar de las distancias me fueron de mucha utilidad para culminar esta etapa de mi vida, gracias por creer siempre en mí y estar presentes en diferentes momentos de mi vida.*

**EL PRESENTE TRABAJO DE REALIZÓ BAJO LA ASESORIA  
DEL D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**

**COMITÉ**

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

MFB. Blanca Nateras Marín

QFB. Bertha Ballesteros Silva

| CONTENIDO                   | PÁGINA |
|-----------------------------|--------|
| ÍNDICE GENERAL.....         | II     |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | IV     |
| ÍNDICE DE TABLAS.....       | VI     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....      | VII    |
| RESUMEN.....                | VIII   |

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                          | PÁGINA    |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>                                              | <b>1</b>  |
| 1.1 El Género <i>Salmonella</i> .....                                    | 1         |
| 1.1.1 Generalidades.....                                                 | 1         |
| 1.1.2 Nomenclatura.....                                                  | 1         |
| 1.1.3 Epidemiología y Patología.....                                     | 1         |
| 1.1.4 Resistencia a antimicrobianos en el género <i>Salmonella</i> ..... | 4         |
| 1.2 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....                    | 4         |
| 1.2.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....                      | 4         |
| 1.2.2 Mecanismos de intercambio genético.....                            | 5         |
| a) Conjugación.....                                                      | 5         |
| b) Transducción.....                                                     | 5         |
| c) Transformación.....                                                   | 5         |
| 1.2.3 Resistencia extracromosómica.....                                  | 5         |
| a) integrones de clase 1: estructura y función.....                      | 6         |
| 1.2.4 Multirresistencia y asociación con integrones de clase 1 .....     | 8         |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>                                            | <b>10</b> |
| <b>III. HIPÓTESIS.....</b>                                               | <b>10</b> |
| <b>IV. OBJETIVOS.....</b>                                                | <b>11</b> |
| IV.1 Objetivo general.....                                               | 11        |

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| IV.2 Objetivos específicos.....                                  | 11        |
| <b>V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>                           | <b>12</b> |
| <b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                               | <b>13</b> |
| VI.1 Material biológico.....                                     | 13        |
| VI.2 Aislamiento de cepas.....                                   | 13        |
| VI.3 Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos..... | 14        |
| VI.4 Extracción de ADN de células bacteriana.....                | 15        |
| VI. 5 Amplificación del ADN por PCR.....                         | 15        |
| <b>VII. RESULTADOS.....</b>                                      | <b>16</b> |
| VII.1 Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos..... | 16        |
| VII.2 Ensayos genéticos moleculares.....                         | 19        |
| <b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>                                      | <b>23</b> |
| <b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                       | <b>26</b> |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                   |                                         |
|-------------------|-----------------------------------------|
| ADN               | Ácido Desoxirribonucleico               |
| AK                | Amikacina                               |
| AM                | Ampicilina                              |
| ARN               | Ácido Ribonucleico                      |
| °C                | Grado Centígrado                        |
| CB                | Carbenicilina                           |
| CF                | Cefalotina                              |
| CL                | Cloranfenicol                           |
| CRO               | Ceftriaxona                             |
| CTX               | Cefotaxima                              |
| dATP              | Deoxinucleosido Trifosfato de Adenina   |
| dCTP              | Deoxinucleosido Trifosfato de Citocina  |
| dGTP              | Deoxinucleosido Trifosfato de Guanina   |
| dTTP              | Deoxinucleosido Trifosfato de Timina    |
| EDTA              | Ácido Etilendiamino Tetrácetico         |
| ETA               | Enfermedades Transmitidas por Alimentos |
| GE                | Gentamicina                             |
| H                 | Horas                                   |
| HE                | Agar Hektoen Entérico                   |
| Kb                | Kilobase                                |
| LBA               | Agar Luria Bertani                      |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloruro de Magnesio                     |
| Mm                | Milímetros                              |
| mM                | Milimolar                               |
| μL                | Micro litro                             |
| μm                | Micrómetro                              |
| NaCl              | Cloruro de Sodio                        |



RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE INTEGRONES EN AISLADOS DE *Salmonella enterica*  
OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN

---

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| NET      | Netilmicina                         |
| NF       | Nitrofurantoína                     |
| PCR      | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PEF      | Pefloxacin                          |
| Rpm      | Revoluciones por minuto             |
| SDS      | Sulfato Duodecil de Sodio           |
| Seg.     | Segundos                            |
| SS       | Agar Salmonella Shigella            |
| STX      | Trimetoprim Sulfametoxazol          |
| Tris-HCl | Tris-Ácido Clorhídrico              |
| UFC      | Unidades Formadoras de Colonias     |
| VIH      | Virus de Inmunodeficiencia Humana   |
| XLD      | Agar Xilosa Lisina Desoxicolato     |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                             | PAG |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla No. I. Serotipos de los aislados de <i>Salmonella enterica</i><br>utilizados en este estudio .....                                    | 1   |
| Tabla No. II. Antibióticos utilizados para la determinación de<br>sensibilidad antimicrobiana .....                                         | 14  |
| Tabla No. III. Relación entre multirresistencia y presencia de integrones<br>de clase 1 en los aislados de <i>Salmonella enterica</i> ..... | 22  |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                               | PAG |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Representación esquemática de la estructura de un integrón de clase 1 .....                         | 8   |
| Figura 2. Porcentaje de aislados de <i>Salmonella enterica</i> resistentes a los antibióticos probados .....  | 16  |
| Figura 3. Patrón de resistencia a antibióticos de los distintos serotipos de <i>Salmonella enterica</i> ..... | 18  |
| Figura 4. Porcentaje de aislados de <i>Salmonella enterica</i> que presentaron multirresistencia .....        | 19  |
| Figura 5. ADN total extraído de los aislados de <i>Salmonella enterica</i> .....                              | 20  |
| Figura 6. Detección de integrones clase 1 en los aislados de <i>Salmonella enterica</i> .....                 | 21  |
| Figura 7. Presencia de integrones de clase 1 en aislados de <i>Salmonella enterica</i> .....                  | 21  |

## RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades infecciosas transmitidas más frecuentemente por alimentos en casi todos los países industrializados. Los agentes causales son miembros del género *Salmonella*, responsables de causar un rango de enfermedades en el humano que pueden abarcar desde cuadros clínicos leves, como una gastroenteritis, hasta infecciones que comprometen la vida del paciente como la bacteremia. La gastroenteritis tiene altos niveles de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo como en países desarrollados.

La resistencia bacteriana es un fenómeno de gran importancia debido a que favorece el aumento del índice de morbilidad y mortalidad así como de los costos en los tratamientos, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo. El uso generalizado e indiscriminado de agentes antimicrobianos ha contribuido a la presencia de *Salmonella* con una susceptibilidad reducida a los antibióticos.

Los genes que confieren resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* son a menudo transportados en integrones, elementos móviles de DNA importantes en la transmisión y difusión de los factores determinantes de la resistencia a los antimicrobianos en dichas cepas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre la resistencia a antibióticos y la presencia de integrones clase 1 en aislados de *Salmonella enterica* provenientes del estado de Michoacán, para esto, se determinó la resistencia a 12 antibióticos mediante el método Kirby Bauer, y la detección de integrones de clase 1 se llevó a cabo mediante la amplificación PCR de la región conservada de integrones de clase 1.

En este estudio se utilizaron 127 aislados de *Salmonella enterica* provenientes de productos lácteos y cárnicos de diferentes municipios del Estado de Michoacán, con un total de 34 serotipos diferentes, encontrándose el siguiente porcentaje de aislados resistentes: Carbenicilina (39%), Cloranfenicol (27%), Ampicilina (26%), Trimetoprim sulfametoxazol (25%), Gentamicina (15%), Cefalotina (13%), Nitrofurantoína (9%), Amikacina (8%), Cefotaxima (8%), Netilmicina (6%), Pefloxacina (6%) y Ceftriaxona (4%). El 30% del total de los aislados resultaron multirresistentes, debido a que presentaron resistencia al menos a tres antibióticos. Dicha multirresistencia se observó en los serotipos *Tiphymurium*, *Anatum*, *Panamá*, *B* y *c1* en un 69%, 53%, 50%, 23% y 20%, respectivamente, mientras que para los serotipos *Vejle*, *Give* y *Agona* la multirresistencia se presentó en un 17%, 14% y 9%, respectivamente.

En la detección de integrones de clase 1 de un total de 119 aislados se encontró que el 65% de los aislados presentaron varios amplicones que oscilaron en un rango entre 200 y 4000 pb, distribuyéndose entre los serotipos *Derby*, con un 100%, *Vejle* con 80%, *B* y *Agona* con 70% para cada uno, *Anatum*, *Tiphymurium*, *Give*, *Panamá*, y *c1* con 62%, 60%, 57%, 50% y 40%, respectivamente.

Nuestros resultados muestran una amplia diseminación de resistencia a varios agentes antimicrobianos, así como una alta prevalencia de integrones de clase 1, lo que conlleva a un

serio problema de Salud Pública en el estado de Michoacán. No se sabe qué genes se encuentran implicados en la diseminación de dicha resistencia debido a que en este estudio sólo se detectó la presencia de integrones de clase 1 pero no se secuenciaron para saber qué genes formaban parte de dichos casetes.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El Género *Salmonella*

**1.1.1 Generalidades.** Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos de tamaño  $0.7 - 1.5 \times 2.5 \mu\text{m}$  pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son anaerobios facultativos, no forman esporas, bioquímicamente se caracterizan por no fermentar lactosa y por la producción de ácido a partir de glucosa, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, citrato de Simmons positivo, lisina y ornitina descarboxilasa positivo. También son capaces de reducir los nitratos a nitritos (Bergey, 2000; Hawley, 2004).

#### 1.1.2 Nomenclatura

El género *Salmonella* comprende a las especies *S. bongori* y *S. enterica*, reconociéndose seis subespecies de esta última (Tindall et al., 2005). Las especies de *Salmonella* se han dividido en distintos serotipos, establecidos con base en las diferencias en la porción de polisacárido de la capa de lipopolisacárido (antígeno O) y la porción de filamento del flagelo (antígeno H) presentes en la superficie celular de la bacteria (Voogt et al., 2002). En la actualidad se han descrito más de 2, 500 serotipos de *Salmonella*, encontrándose el 99% de estos dentro de la especie *S. enterica*, la cual contiene la mayoría de serotipos que son patógenos de humano (Popoff et al., 2001).

#### 1.1.3 Epidemiología y Patología

Un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados, aunque las estimaciones de enfermedades ocasionadas por alimentos contaminados son difíciles de realizar debido a distintas circunstancias, entre las que se encuentran las diferencias para definir una enfermedad diarreica aguda en distintos estudios, el hecho de que la mayoría de las enfermedades diarreicas no son reportadas a los sistemas de salud pública y debido a que pocas enfermedades pueden ser ligadas con seguridad a la comida ingerida (WHO, 2008). Uno de los agentes patógenos comúnmente asociados a alimentos contaminados es *Salmonella spp.* (WHO, 2008). La salmonelosis puede manifestarse mediante distintos síndromes que incluyen gastroenteritis, bacteremia, fiebre tifoidea e infecciones localizadas en ciertas áreas del cuerpo

(Darwin y Miller, 1999). La fiebre tifoidea es una manifestación única de enfermedad asociada con infección por *S. enterica* serotipo *Typhi*. La manifestación más común de salmonelosis no tifoidea es una gastroenteritis de leve a moderada, con presentación de diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Los síntomas de gastroenteritis aparecen normalmente entre las 6 a 72 h después de ingerir alimentos contaminados con la bacteria (Pegues et al., 2005) y aunque normalmente pueden remitir en un lapso de 2 a 7 días, se puede desarrollar septicemia e infecciones invasivas de órganos, originando problemas de salud más serios como osteomielitis, neumonía y meningitis (Cohen et al., 1987). Los grupos sociales más susceptibles a estas manifestaciones severas de la enfermedad son los niños, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas, las cuales requieren de terapia antimicrobiana para superar la enfermedad (Benenson and Chin, 1995). La salmonelosis es una enfermedad transmitida por alimentos contaminados que ha sido reportada durante décadas, sin embargo, dicho padecimiento se considera emergente debido a que en diversas partes del mundo se ha vuelto más frecuente. En las últimos 25 años el serotipo *Enteritidis* se ha vuelto predominante en el hemisferio Oriental y Europa, debido en gran parte al consumo de alimentos contaminados de origen animal, que incluyen pollos y huevos (WHO, 2002). Diversos factores han sido enumerados para que la salmonelosis, junto con otras enfermedades infecto-contagiosas, represente aún un riesgo para la salud y sea considerada como enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002). Entre estos factores se encuentran la globalización del tráfico de alimentos y la introducción accidental de patógenos en nuevas áreas geográficas. También se han considerado los cambios asociados a las poblaciones microbianas, lo que permite que surjan cepas más virulentas y con resistencia a antibióticos, o con la capacidad de sobrevivir a condiciones adversas (Gutiérrez-Cogco et al., 2000).

Otro factor importante es la movilidad internacional de personas expuestas a patógenos, por ejemplo, se estima que cerca del 90% de los casos de salmonelosis que se presentan en Suecia son importados de viajeros que fueron a lugares con alta incidencia del patógeno. Los cambios en la población humana, incluyendo modificaciones en la edad de la población, la alimentación deficiente y otras enfermedades como las infecciones por VIH, ocasionan una mayor susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* y otras bacterias patógenas. En el caso de los países en vías de desarrollo como México, los niños con alimentación deficiente son una población más

susceptible a las enfermedades transmitidas por alimentos. Los cambios en el estilo de vida son otro factor que favorece la transmisión de salmonelosis por alimentos, debido al incremento en el consumo de comida rápida en lugares con escasas condiciones de higiene. En México, los estudios sobre *Salmonella* y su importancia en la salud pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de esta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. En un primer reporte se encontró que el serotipo más comúnmente encontrado en los pacientes ingresados a los servicios de salud pública sin distinción de edad, fue *S. Typhimurium*, mientras que el serotipo menos frecuente fue *S. Ohio* (Gutiérrez-Cogco et al., 2000). Estudiando una población de 300 niños que cursaban un cuadro de diarrea, se encontró que *Salmonella enterica* estaba asociada a un 53.5% de casos de niños menores de 12 años, sola o en combinación con otros enteropatógenos (Paniagua et al., 2007). En dicho estudio, los serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron *Ohio* (28.3%), *Typhimurium* (16.3%), *Infantis* (8%), *Anatum* (0.6%) y *Newport* (0.3%). En uno de los estudios más amplios realizados en México, en el que se incluyeron 4 estados con distintas características socioeconómicas (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán) se aisló *Salmonella* del 12.3% (2, 893 muestras) de niños menores de 6 años con cuadro de diarrea y del 5.3% de niños asintomáticos (6, 685 muestras) (Zaidi et al., 2008). Los serotipos más comúnmente aislados de niños con padecimiento gastrointestinales fueron *Typhimurium* (22.2%) y *Enteritidis* (14.5%), encontrándose en menor proporción también los serotipos *Agona*, *Muenchen*, *Oranienburg*, *Anatum*, *Newport* y *Meleagridis*. El serotipo más abundante en carne de res fue el *Anatum* (17.7%), seguido del *Meleagridis* (13%). En este mismo estudio se encontró una alta incidencia de contaminación de carne de vaca por *Salmonella* (21.3%-36.4%) al analizar 1, 733 muestras de carne en expendios de venta al menudeo. En el caso del estado de Michoacán, la prevalencia de contaminación por *Salmonella* de dicho producto fue del 16%, encontrándose un 5.8% de prevalencia de la bacteria en casos de niños con episodios de diarrea y de aproximadamente 2% en muestras de niños asintomáticos. En particular, los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res en el estado de Michoacán son el *Typhimurium* (34.1%) y el *Derby* (24.4%), seguidos del *Anatum* (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción. En total, se han detectado 24 serotipos distintos contaminando carne de cerdo, res y pollo en el estado de Michoacán (A. Figueroa, Laboratorio Estatal de Salud Pública, comunicación personal).



**1.1.4. Resistencia a antimicrobianos en el género *Salmonella*.** La resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* es un problema cada vez mayor (Cabrera et al., 2006). Dicha resistencia es un fenómeno de gran importancia debido a que favorece el aumento del índice de morbilidad y mortalidad así como de los costos de los tratamientos, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo. El uso generalizado e indiscriminado de agentes antimicrobianos ha contribuido a la presencia de cepas de *Salmonella* con una susceptibilidad reducida a los antibióticos (Antunes et al., 2005). Estudios previos demuestran dicha resistencia, ya que de un total de 133 aislados de *Salmonella* recuperados de carne muestra que un 82% fueron resistentes al menos a un agente antimicrobiano, presentando resistencia a Tetraciclina, Estreptomicina, Trimetoprim Sulfametoxazol y Ampicilina. (Chen et al., 2004). En otro estudio, el fenotipo de resistencia más común fue para los antibióticos Ácido Nalidíxico, Tetraciclina, Estreptomicina, Trimetoprim Sulfametoxazol, y Ampicilina (Antunes et al., 2006). La resistencia a Sulfadiazina, Tetraciclina, Estreptomicina, Ampicilina, y Cloranfenicol fue reportada en otro estudio (Guerra et al., 2000).

## **1.2 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos**

**1.2.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos.** Las bacterias pueden manifestar resistencia a fármacos a través de diversos mecanismos. Algunas especies de bacterias son naturalmente resistentes a una o más clases de agentes antimicrobianos. La adquisición de resistencia puede ser originada por el mismo microorganismo, mediante errores en la replicación del ADN, los cuales generan mutaciones que solamente se difunden verticalmente, es decir, serán transmitidas de célula madre a célula hija (Tenover, 2006).

Las bacterias también desarrollan resistencia a través de la adquisición de nuevo material genético de otros microorganismos resistentes, a la cual se le denomina transferencia horizontal y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies o géneros bacterianos. Los mecanismos de intercambio genético incluyen conjugación, transducción y transformación. A través de dichos mecanismos muchas bacterias han adquirido resistencia a múltiples clases de agentes antimicrobianos, lo que origina la resistencia a tres o más clases de fármacos antimicrobianos (Tenover, 2006).

### 1.2.2 Mecanismos de intercambio genético.

La transferencia horizontal de distintos elementos génicos parece tener un papel muy importante, debido a que se lleva a cabo una diseminación y persistencia de la resistencia a antibióticos, favoreciendo así su transmisión, adquiriendo resistencia a varios agentes antimicrobianos. (Osterloh 2004)

**a) Conjugación.** Consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. Este tipo de transferencia se debe a estructuras genéticas que portan los microorganismos denominadas plásmidos. Este es probablemente el mecanismo más frecuente para intercambiar material genético, con el cual se adquieren una gran variedad de genes, que una vez en el interior de la bacteria pueden transferirse a otros plásmidos o integrarse al cromosoma.

**b) Transducción.** Consiste en la adquisición de material genético por la acción de un bacteriófago (virus) y permite adquirir una cantidad relativamente pequeña de ADN (40kb).

**c) Transformación.** La bacteria adquiere el ADN directamente del medio ambiente en circunstancias favorables a partir de otra bacteria que ha liberado su material genético. Este nuevo material genético se recombina con el cromosoma de la bacteria receptora en aquellas regiones donde hay suficiente homología y puede dar lugar a genes funcionales (Ortega, 2007).

### 1.2.3 Resistencia extracromosómica

El aumento de la resistencia a los agentes antimicrobianos puede ser debida a la transferencia de elementos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones (Sayah et al., 2005). Los plásmidos pueden llevar integrones de clase I, que son elementos móviles de DNA los cuales son importantes en la proliferación de la resistencia bacteriana a múltiples fármacos, especialmente entre las especies entéricas Gram negativas (Chen et al., 2004). Varios de los genes de resistencia a los antibióticos observada en bacterias Gram negativas son parte de un cassette de genes insertado en un integrón. Los cassettes más comunes contienen genes que confieren la resistencia

a una amplia variedad de agentes antimicrobianos, así como los genes que confieren resistencia a antisépticos y desinfectantes. Por lo tanto, la adquisición de integrones se considera la principal causa de resistencia múltiple en las bacterias Gram negativas, principalmente en bacterias entéricas (Antunes et al., 2006).

#### **a) Integrones de clase 1: estructura y función**

Los integrones se descubrieron a principios de la década de los años de 1980, se caracterizan por ser capaces de captar genes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos. Se encuentran ampliamente diseminados entre especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas (*Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*). Recientemente se ha descrito la presencia de éstos en bacteria Gram positivas como *Corynebacterium glutamicum*. (Sabaté y Prats, 2002). Los integrones pueden capturar genes (exógenos) e incorporarlos por un mecanismo de recombinación sitio-específica, denominándose cassettes de genes (Rao et al., 2008).

La clasificación de los integrones se basa en la secuencia de la integrasa. Actualmente, se conocen nueve clases. Los miembros de la clase 1, 2 y 3, contienen cassettes de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos; los de las clases 4, 5, 6 y 7, contienen cassettes de genes que no codifican la resistencia a los antimicrobianos; el integrón de clase 9 contiene un cassette genes de resistencia a antimicrobianos y otros cassettes de genes de función desconocida; mientras que el integrón de clase 8 no presenta ningún cassette de genes (Sabaté y Prats, 2002).

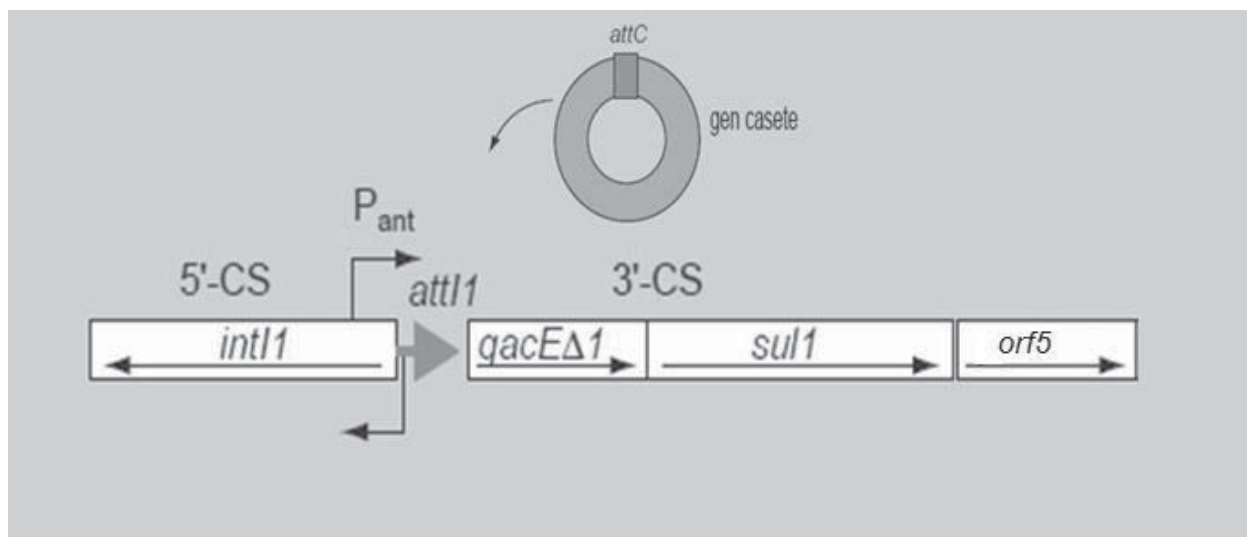
##### **Estructura de Integrones de Clase 1.**

Un integrón consta de tres regiones, dos regiones conservadas y una región variable (Ahmed et al., 2005). En el extremo 5' conservado se encuentra el gen *IntI* que codifica para una integrasa, adyacente a *IntI* se encuentra el sitio de recombinación sitio-específica *attI* en el que se integra el cassette, y por último un promotor ( $P_{ant}$ ) necesario para la expresión de los cassettes de genes integrados (Fig 1). En el extremo 3' conservado se localizan los genes *qacEΔI*, *SulI*, responsables de la resistencia a antisépticos y sulfonamidas respectivamente, además de un marco de lectura abierto (*orf5*). Entre las dos partes conservadas se localiza la región variable en tamaño y

composición, en el cual se insertan los cassettes génicos (Lévesque et al., 1995; Chang et al., 2000).

El lugar de recombinación sitio específica *attI* está formado por 65 pares de bases en el cual los genes capturados son integrados gracias a la acción de la integrasa (Int). Esta integrasa, de aproximadamente 1 kb, pertenece a la familia de las recombinasas (Fig. 1). En total, un integrón simple sin cassettes de genes incorporados posee un tamaño aproximado de 1.1 kb. Los cassettes de genes pueden aparecer como moléculas de ADN circular no replicativas, pero habitualmente se encuentran en los integrones como secuencias lineales, generalmente contienen un único gen y en posición 3' presentan una secuencia de recombinación específica de sitio conocida como *attC*, o también denominada elemento de 59 bases (59-be), a través de la que se efectúa su reconocimiento y movilización. Los cassettes son movilizados por la integrasa que reconoce el lugar *attC* del cassette de genes y el lugar receptor *attI* del integrón, permitiendo así la tanto la integración como la escisión de dichos cassettes.

La inserción y/o escisión de los cassettes dentro del integrón desempeña una función importante en la incorporación y formación de nuevas combinaciones de genes de resistencia a antimicrobianos. Los cassettes de genes normalmente no poseen promotores y son transcritos haciendo uso del promotor del integrón en un ARNm policistrónico que confiere una relativa disminución de la transcripción en los genes más distales.



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura de un integrón de clase 1.** Región 5' conservada caracterizada por el gen codificante de la integrasa (*intl1*) involucrada en la escisión e integración de los genes cassette, el lugar específico de recombinación (*attI1*) y un promotor ( $P_{ant}$ ) que permite la expresión de los genes cassette insertados. Región 3' conservada que incluye un gen de resistencia a antisépticos (*qacEΔ1*), un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*), y un marco de lectura abierto (*orf5*). La región variable es el o los genes cassette integrados por la integrasa, responsables de la resistencia a antimicrobianos (Sabaté y Prats, 2002; Recchia y Hall, 1995).

#### 1.2.4 Multirresistencia y asociación con integrones de clase 1

La aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos entre patógenos bacterianos es un ejemplo destacado que se ha observado en bacterias (Mazel 2006). A través de la incorporación en transposones y plásmidos, los integrones participan en la captura y difusión de genes de resistencia entre las bacterias. El hecho de que se estén confiriendo genes de resistencia a los antibióticos es comúnmente por el uso en el tratamiento de las infecciones humanas pueden ser adquirido por cepas que son capaces de albergar integrones lo cual puede potenciar las posibilidades de la selección por una variedad de diferentes antimicrobianos (Antunes et al., 2006).

Elementos genéticos móviles, que portan genes de resistencia, han sido previamente reportados en *Enterobacterias* como *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, y *Campylobacter spp.* (Cabrera et al., 2006). Los integrones de clase 1 son los que frecuentemente se encuentran en aislados clínicos, encontrándose de un 40 a un 70% en bacterias Gram negativas. (Gillings et al., 2008) constituyen una gran importancia en el desarrollo de la resistencia ante una variedad de

bacterias entéricas incluyendo al género *Salmonella*. (Cabrera et al., 2006). *Salmonella enterica* cuenta con cepas cada vez más resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, la rápida aparición y difusión de la multirresistencia parece estar asociada con la adquisición horizontal de genes, transportados a menudo en elementos móviles de ADN que codifican para varios genes específicos de resistencia. (Lynne et al., 2008). *Salmonella enterica* serovar *Tiphymurium* fagos DT104 y DT104b se asocian a menudo con la resistencia simultánea a cinco agentes antimicrobianos, ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclina, los determinantes correspondientes a tal multirresistencia se concentran en una parte del cromosoma bacteriano en donde dicho desarrollo ocurrió como resultado de los eventos de recombinación entre el ADN del plásmido y otros elementos genéticos móviles incluyendo integrones de clase 1. (Daly et al., 2004). Además en otro estudio se encontró que *Salmonella enterica* mostró que el 64% de las cepas presentaron multirresistencia, en donde *Salmonella Tiphymurium* fue el serotipo más frecuente, encontrándose altos niveles de resistencia a tetraciclina, espectinomycin, ampicilina y cloranfenicol. (Cabrera et al., 2006) *Salmonella Newport* posee cepas cada vez más resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, el incremento se encuentra asociado con la adquisición de múltiples genes de resistencia (Lynne et al., 2008).

## II. JUSTIFICACIÓN

La salmonelosis es un problema de salud pública de distribución mundial que aún permanece siendo una de las principales enfermedades gastrointestinales en los seres humanos asociada a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). El uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos contribuye al aumento de la resistencia bacteriana, dificultando los tratamientos y aumentando la morbilidad asociada a las infecciones causadas por *Salmonella enterica*.

En el estado de Michoacán no existen estudios previos sobre los tipos de elementos genéticos asociados a la resistencia múltiple a antibióticos en cepas de *S. enterica*. Este conocimiento es importante porque puede ser la base para diseñar estrategias que prevengan la diseminación de la resistencia a antibióticos. Por otra parte, el conocimiento de los factores genéticos asociados a la resistencia a antibióticos puede contribuir a mejorar los tratamientos, disminuyendo los costos asociados y la morbilidad.

## III. HIPÓTESIS

Los aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán presentan resistencia múltiple a antibióticos y dicha resistencia está asociada a la presencia de integrones de clase 1.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 Objetivo general

Determinar la relación entre la resistencia a antibióticos y la presencia de integrones clase 1 en aislados de *Salmonella enterica* obtenidos del estado de Michoacán.

### IV.2 Objetivos específicos

Evaluar la resistencia a 12 antibióticos de los distintos serotipos de *Salmonella enterica* aislados de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán

Detectar la presencia de integrones de clase 1 en los aislados de *Salmonella enterica* de interés.



## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivo de aislados de *Salmonella enterica*  
en medios selectivos (caldo Rappaport, agar  
XLD, agar SS, agar HE)



Determinación de la resistencia a los  
antibióticos mediante el método de  
Kirby Bauer



Extracción de ADN genómico



Amplificación por PCR utilizando  
iniciadores específicos para integrones  
de Clase I

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.1 Material biológico.

Para este trabajo se utilizaron un total de 127 aislados de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* provenientes de carne de animales y quesos de diferentes municipios del Estado de Michoacán colectados durante los años de 2008 y 2009 (Regalado, 2010). Las cepas previamente identificadas y serotipificadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública, fueron conservadas en agar francés a temperatura ambiente hasta su uso para realizar los estudios de sensibilidad antimicrobiana y análisis molecular.

**Tabla No. I. Serotipos de los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio**

| Serotipo                      | % de aislados | Serotipo                             | % de aislados |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
| <i>Salmonella</i> Tiphymurium | 20% (16/127)  | <i>Salmonella</i> Reading            | 3% (2/127)    |
| <i>Salmonella</i> Anatum      | 19% (15/127)  | <i>Salmonella</i> London             | 3% (2/127)    |
| <i>Salmonella</i> B.          | 16% (13/127)  | <i>Salmonella</i> E1 y E1 monofásica | 3% (2/127)    |
| <i>Salmonella</i> Agona       | 13% (11/127)  | Sin serotipo                         | 3% (2/127)    |
| <i>Salmonella</i> Give        | 9% (7/127)    | <i>Salmonella</i> Poona              | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Derby       | 8% (6/127)    | <i>Salmonella</i> Oranienburg        | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Vejle       | 8% (6/127)    | <i>Salmonella</i> Borismorbotficans  | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> c1          | 6% (5/127)    | <i>Salmonella</i> Enteritidis        | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Panama      | 5% (4/127)    | <i>Salmonella</i> Infantis           | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Havana      | 4% (3/127)    | <i>Salmonella</i> Meleagridis        | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Senftenberg | 4% (3/127)    | <i>Salmonella</i> 35                 | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Adelaide    | 4% (3/127)    | <i>Salmonella</i> Lockleaze          | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Newport     | 4% (3/127)    | <i>Salmonella</i> D monofasica       | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Muenster    | 4% (3/127)    | <i>Salmonella</i> Saintpaul          | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Sinfors     | 3% (2/127)    | <i>Salmonella</i> Sandiego           | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Muenchen    | 3% (2/127)    | <i>Salmonella</i> I                  | 1% (1/127)    |
| <i>Salmonella</i> Mbandaka    | 3% (2/127)    | <i>Salmonella</i> Weltevreden        | 1% (1/127)    |

### VI.2 Aislamiento de cepas.

Las bacterias conservadas fueron rescatadas mediante siembra en caldo Luria Bertani (LB), seguido de incubación a 37°C durante 24 h. El reaislamiento se realizó en el agar selectivo y diferencial para *Salmonella* (Agar Hektoen Entérico HE) incubando a 37°C durante 24 h.

Colonias aisladas no fermentadoras de lactosa se inocularon en Agar Luria Bertani (LBA) con incubación a 37°C durante 24 h.

### VI. 3 Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el método de difusión en placa (Método Kirby-Bauer) siguiendo las instrucciones descritas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se seleccionan de 3 a 4 colonias bacterianas aisladas crecidas durante 8 h a 37°C, se transfieren a un tubo con 3 ml de caldo Mueller Hinton estéril ajustando la turbidez del inóculo con la turbidez del estándar 0.5 de McFarland (equivalente aproximadamente de  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/ml), después se sumerge un hisopo estéril y se inocula en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de la placa de Agar Mueller Hinton, cuando el inóculo se ha secado (de 3 a 5 min) con una pinza estéril se toman los multidiscos (multidiscos Gram negativos, BIO-RAD) y se colocan presionando ligeramente sobre la superficie del inóculo en un tiempo menor de 15 minutos después de haber inoculado la placas, posteriormente las placas se incuban de 16 a 18 h a 37°C. La lectura del diámetro de la zona de inhibición resultante se reporta de acuerdo a las especificaciones del proveedor. (Tabla No. II)

**Tabla No. II Antibióticos utilizados para la determinación de sensibilidad antimicrobiana**

| Agente antimicrobiano            | Cantidad de antibiótico utilizada | Resistente (mm) | Intermedio (mm) | Sensible (mm) |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Amikacina (AK)                   | 30 µg                             | ≤ 14            | 15-16           | ≥ 17          |
| Ampicilina (AM)                  | 10 µg                             | ≤ 13            | 14-16           | ≥ 17          |
| Carbenicilina (CB)               | 100 µg                            | ≤ 19            | 20-22           | ≥ 23          |
| Cefalotina (CF)                  | 30 µg                             | ≤ 14            | 15-17           | ≥ 18          |
| Cefotaxima (CTX)                 | 30 µg                             | ≤ 14            | 15-22           | ≥ 23          |
| Ceftriaxona (CRO)                | 30 µg                             | ≤ 13            | 14-20           | ≥ 21          |
| Cloranfenicol (CL)               | 30 µg                             | ≤ 12            | 13-17           | ≥ 18          |
| Gentamicina (GE)                 | 10 µg                             | ≤ 12            | 13-14           | ≥ 15          |
| Netilmicina (NET)                | 30 µg                             | ≤ 12            | 13-14           | ≥ 15          |
| Nitrofurantoína (NF)             | 300 µg                            | ≤ 14            | 15-16           | ≥ 17          |
| Pefloxacin (PEF)                 | 5 µg                              | ≤ 14            | 15-22           | ≥ 23          |
| Trimetoprim-Sulfametoxazol (STX) | 25 µg                             | ≤ 10            | 11 a 15         | ≥ 16          |

(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2006). (Bio-Rad. Multidiscos Gram negativos. Instructivo de uso).

#### **VI.4 Extracción de ADN de células bacterianas**

Las colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo LBA durante 8 h a 37°C, se cosechan con ayuda de una espátula estéril y se colocan en un microtubo para agregar 400 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 50mM). Agitándose vigorosamente en vórtex durante 10 minutos. A continuación se agregan 400 µL de durante 5 minutos cloroformo agitándose en vórtex. Se centrifuga durante 10 minutos a 10, 000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio cuidando de no arrastrar la fase orgánica. Se extrae con 1 volumen de fenol-cloroformo, centrifugando durante 5 minutos a 10, 000y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. El ADN obtenido se precipita con 1 volumen de isopropanol frio incubando 10 minutos a -20°C y centrifugando durante 10 minutos a 10, 000 rpm, el sobrenadante se desecha y la pastilla se lava 2 veces con 250 µL de etanol 70% y se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en 1 volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 µL. La integridad del ADN obtenido se visualiza llevando a cabo una electroforesis en geles de agarosa al 1%, empleando técnicas convencionales (Sambrook y col., 2001). El ADN aislado se guarda a -20°C hasta su utilización.

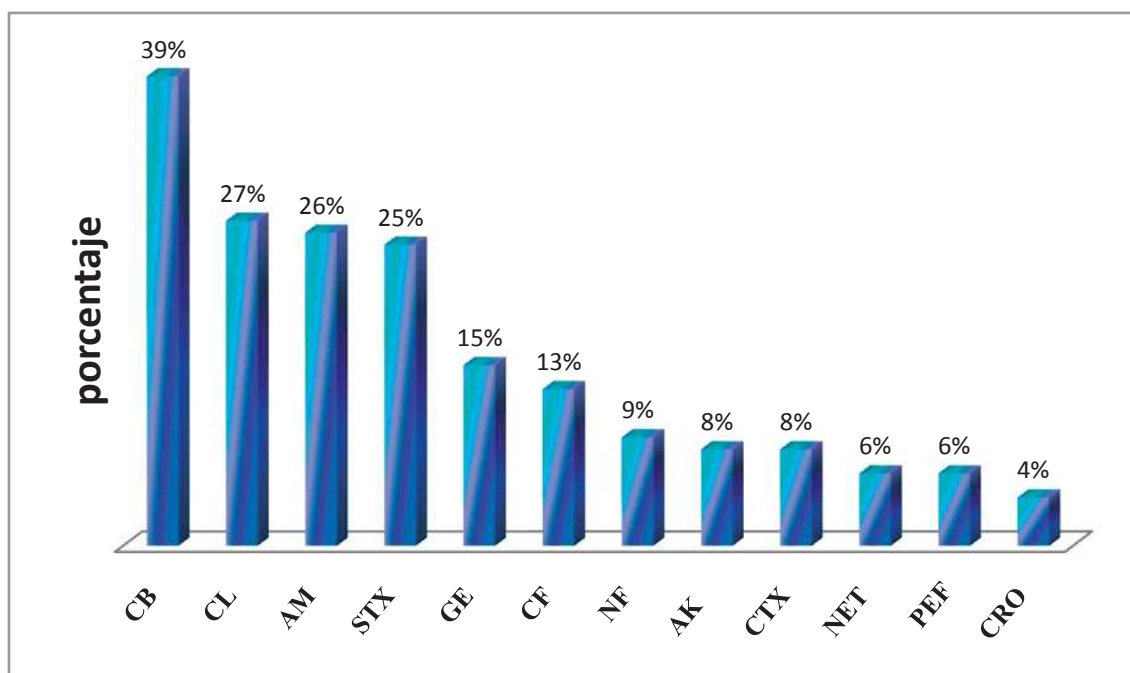
#### **VI. 5 Amplificación del ADN por PCR**

Se utilizó el par de iniciadores dirigidos a las regiones conservadas de integrones de clase 1: 5' CS (GGC ATC CAA GCA GCA AG) Y 3' CS (AAG CAG ACT TGA CCT GA) (Guerra et al., 2001) La composición de la mezcla de incubación para la PCR fue la siguiente: Tris-HCl pH 9.0 10 mM. MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 mM de cada iniciador, 0.5 U de Taq polimerasa y 25 ng de ADN en un volumen total de 25 µL. La Reacción de PCR se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR system 2700 de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos, desnaturalización a 94°C por 45 seg, alineamiento de iniciadores a 55°C por 45 seg, extensión a 72°C por 45 segundos. Una vez completados los 35 ciclos una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR obtenidos se visualizan en geles de agarosa al 1% empleando técnicas convencionales (Sambrook y col., 2001).

## VII. RESULTADOS.

### VII. 1 Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos.

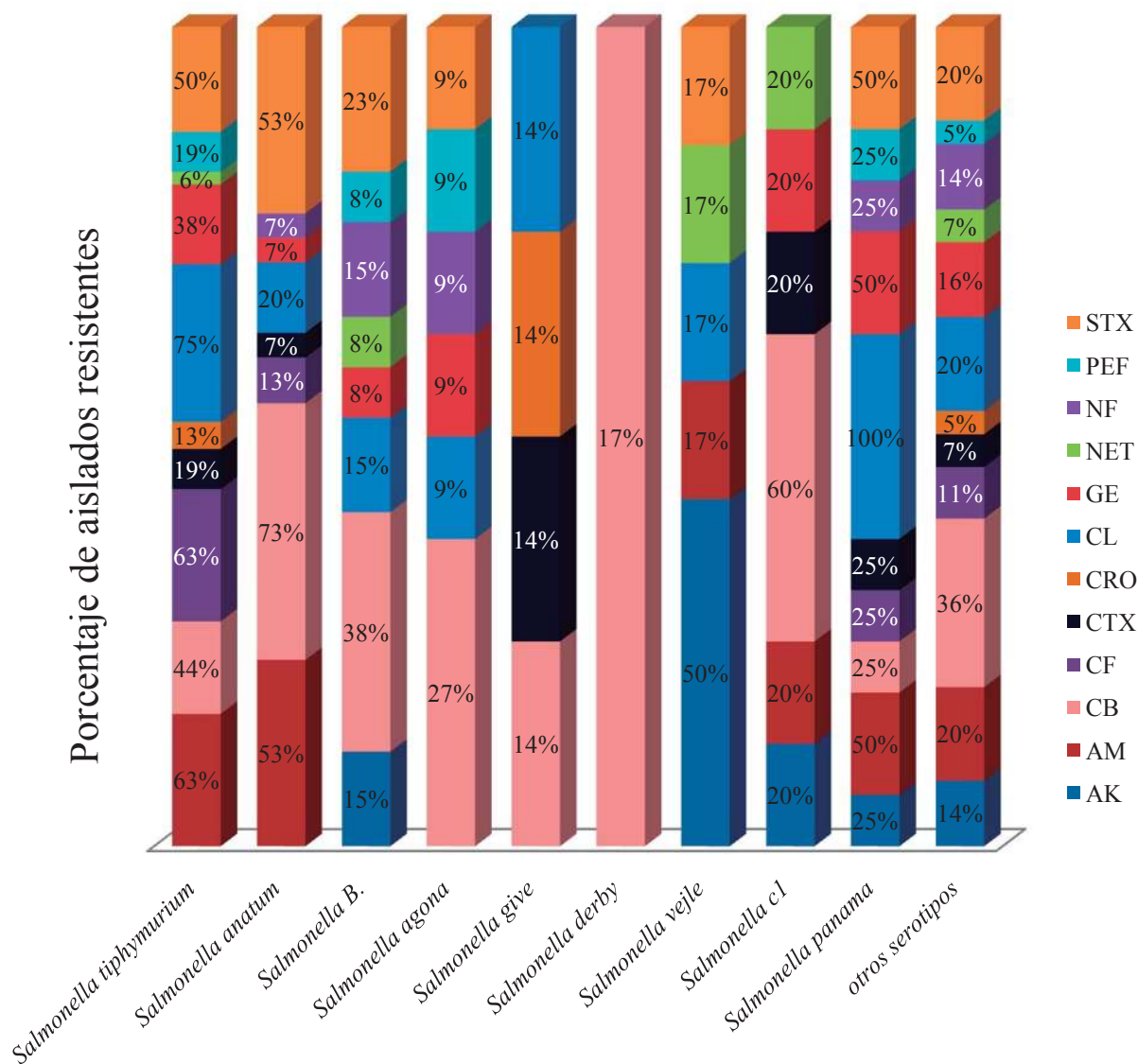
De los antibióticos probados en las cepas de estudio, aquellos en los cuales se observaron los mayores porcentajes de resistencia, por arriba del 20% de los aislados estudiados, fueron CB, CL, AM, STX, con 39%, 27%, 26% y 25%, respectivamente. El segundo grupo de antibióticos está conformado por aquellos en los cuales los porcentajes de resistencia fueron superiores al 10% pero inferiores al 20%; este fue el caso de GE y CF con 15% y 13%, respectivamente. Por último están los antibióticos en los cuales los porcentajes de resistencia fueron inferiores al 10%, encabezados por la NF con un 9%, seguido por AK y CTX con un 8%, NET y PEF con un 6%, y finalmente CRO 4% de resistencia en los aislados de estudio (Fig. No. 2).



**Figura 2. Porcentaje de aislados de *Salmonella enterica* resistentes a los antibióticos probados.** Clave: STX, Trimetoprim Sulfametoxazol; PEF, Pefloxacina; NF, Nitrofurantoina; NET, Netilmicina; GE, Gentamicina; CL, Cloranfenicol; CRO, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxima; CF, Cefalotina; CB, Carbenicilina; AM, Ampicilina; AK, Amikacina.

Los patrones de resistencia a antibióticos variaron de acuerdo a los distintos serotipos, distinguiéndose algunos con resistencia a la mayoría de antibióticos probados. Así, en el caso de aislados de *Salmonella Tiphymurium* y *Salmonella Panama* se encontró resistencia a 10 de los 12

antibióticos ensayados. En *Salmonella B* se presentó resistencia a 9 antibióticos y en *Salmonella Anatum* a 8, mientras que *Salmonella Agona* y *Salmonella c1* resultaron resistentes a 6 antibióticos. En otros casos las cepas fueron resistentes a menos de la mitad de los antibióticos evaluados. Por ejemplo, *Salmonella Vejle* fue resistente 5 antibióticos, *Salmonella Give* a 4 y por último *Salmonella Derby* sólo presentó resistencia a un antibiótico (Fig. No. 3). No obstante, es importante hacer notar que estos porcentajes están influenciados por el número de aislados de cada serotipo. Por ejemplo, en el caso de *S. Typhimurium* el número de aislados estudiados fue de 16, mientras que en el caso de *S. London* solo se estudiaron dos aislados.



**Figura 3. Patrón de resistencia a antibióticos de los distintos serotipos de *Salmonella enterica*.** La clave de los antibióticos es la misma que aparece en la Figura 1.

El 30% del total de los aislados estudiados fueron multirresistentes, debido a que presentaron resistencia al menos a tres antibióticos. Entre los serotipos el patrón de multirresistencia fue distinto, entre los que presentaron un mayor porcentaje de mutirresistencia están *Salmonella Tiphymurium* con un 69% de los aislados, *Salmonella Anatum* con 53% y *Salmonella Panama*

con 50%. Los serotipos con un porcentaje de multirresistencia menor al 50% pero mayor o igual al 20% fueron *Salmonella B* con 23%, *Salmonella c1* con 20%. Los serotipos *Salmonella Vejle* (17%), *Salmonella Give* (14%) presentaron multirresistencia superior al 10%, mientras que *Salmonella Agona* en un 9%. En el resto de los serotipos la multirresistencia se presentó en un 23% (Fig. No. 4).

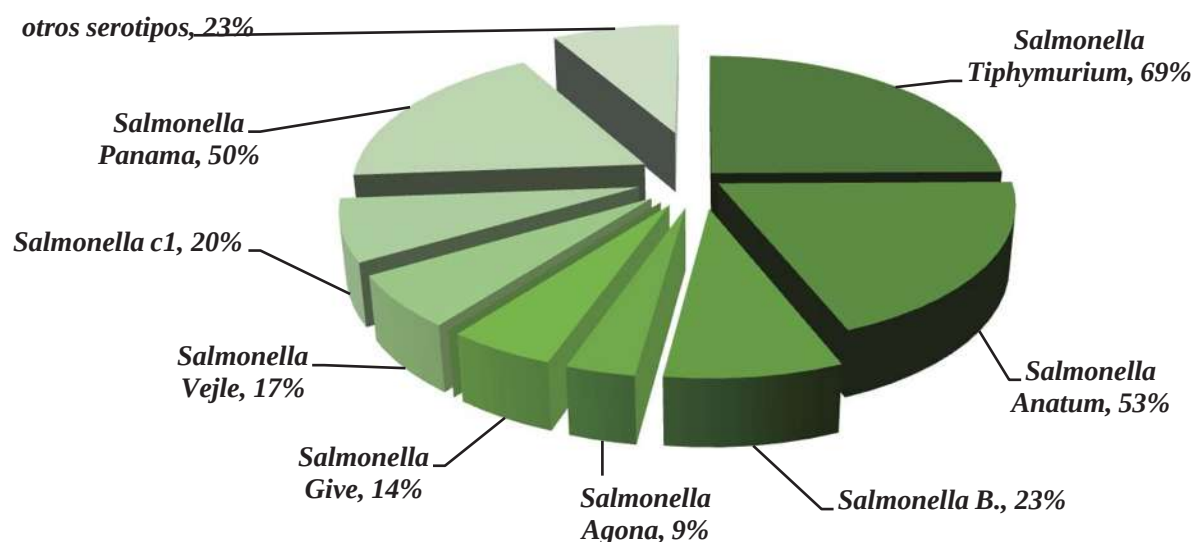


Figura 4. Porcentaje de aislados de *Salmonella enterica* que presentaron multirresistencia.

## VII. 2 Ensayos genético moleculares

El ADN extraído de las cepas de *Salmonella enterica* mostró buenos rendimientos e integridad (Fig. No. 5).

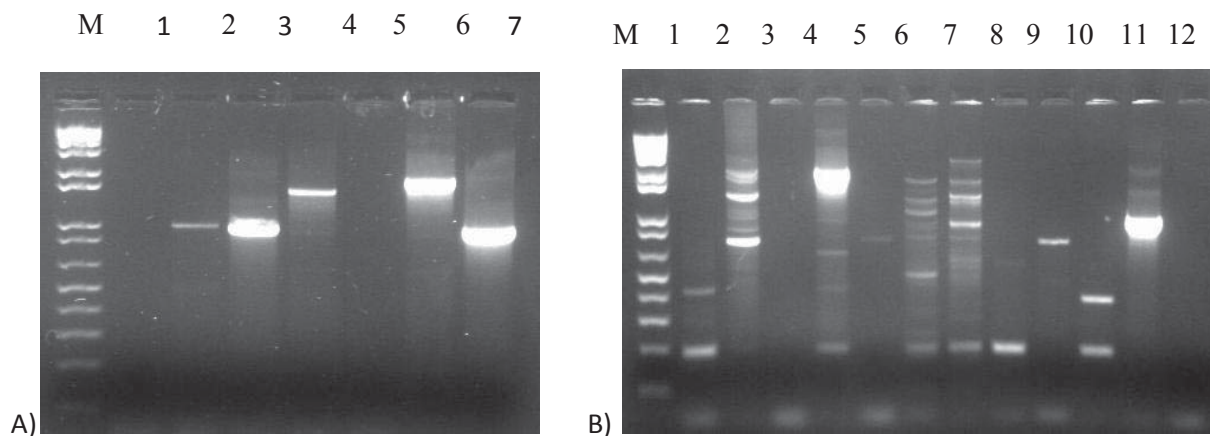




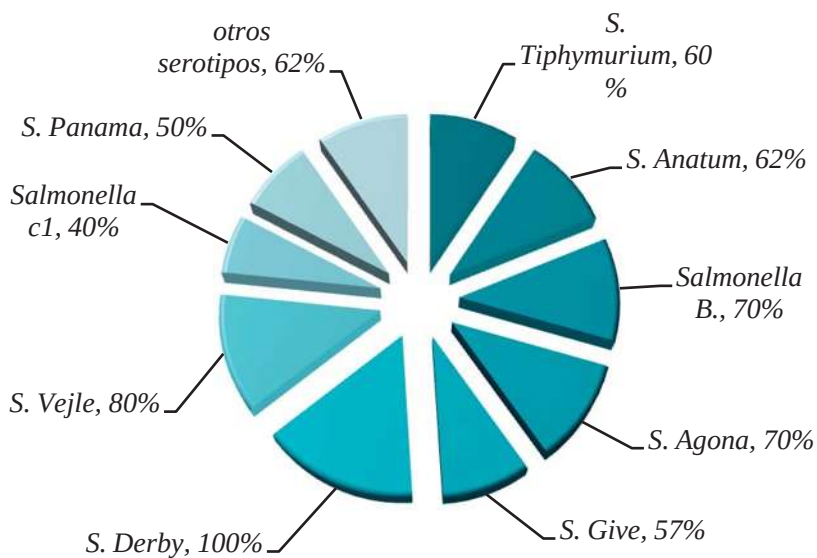
**Figura 5 ADN total extraído de los aislados de *Salmonella enterica*.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); carriles 1 a 5, ADN extraído de aislados bacterianos de *Salmonella enterica*.

De un total de 119 aislados de *Salmonella enterica* se detectó la presencia de integrones de Clase 1 en el 65%. El 29% presentó un solo producto de amplificación mientras que el 36% de los aislados presentaron varios amplicones que oscilaron entre los 200 y los 4000 pb,. El 35% de los aislados no presentaron producto de amplificación, indicando la ausencia de integrones clase 1 (Fig. No. 6).

El serotipo *Salmonella Derby* fue el que mostró el mayor porcentaje de cepas con presencia de integrones con un 100%, mientras que el serotipo *Salmonella c1* fue el que menor porcentaje de cepas presentó integrones clase 1 con un 40% (Fig. No. 7).



**Figura 6. Detección de integrones clase 1 en los aislados de *Salmonella enterica*.** Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio que muestran los amplicones obtenidos al emplear los iniciadores específicos para integrones de clase I. A) ejemplos de cepas de *S. enterica* que presentaron un de 0-1 amplicón. B) ejemplos de cepas que presentaron más de un amplicón. M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA)



**Figura 7. Presencia de integrones de clase 1 en aislados de *Salmonella enterica***

En un 23% de los 119 aislados de *Salmonella enterica* estudiados se encontró relación entre la multirresistencia a antibióticos y la presencia de integrones.

**Tabla No. III Relación entre la multirresistencia y presencia de integrones de clase 1 en los aislados de *Salmonella enterica***

| <b>Serotipo</b>        | <b>Porcentaje de aislados totales por Serotipo</b> | <b>multirresistencia</b> | <b>presencia de integrones</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Salmonella tiphymurium | 20%                                                | 69%                      | 60%                            |
| Salmonella anatum      | 19%                                                | 53%                      | 62%                            |
| Salmonella B.          | 16%                                                | 23%                      | 70%                            |
| Salmonella agona       | 13%                                                | 9%                       | 70%                            |
| Salmonella give        | 9%                                                 | 14%                      | 57%                            |
| Salmonella derby       | 8%                                                 | 0%                       | 100%                           |
| Salmonella vejle       | 8%                                                 | 17%                      | 80%                            |
| Salmonella c1          | 6%                                                 | 20%                      | 40%                            |
| Salmonella panama      | 5%                                                 | 50%                      | 50%                            |

## VIII. Discusión

En el presente trabajo se analizó la resistencia a antibióticos de aislados de *S. enterica* provenientes de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán. Este estudio es importante debido a que en el estado de Michoacán aun es limitado el conocimiento que se tiene en dicha área. El conocimiento sobre los patrones de resistencia a antibióticos de las cepas de estudio es importante desde el punto de vista de salud pública y también en el área epidemiológica. En el aspecto de salud pública el conocimiento sobre a cuales antibióticos son resistentes las cepas de *S. enterica* puede contribuir en el futuro a optimizar los tratamientos de pacientes con salmonelosis. Por otra parte, en relación a los aspectos epidemiológicos el presente trabajo puede ayudar a conocer los patrones de dispersión de resistencia a sobre distintas áreas geográficas del estado.

Nuestros datos muestran que el 39% de las cepas analizadas fueron resistentes a carbenicilina, un 27% a cloranfenicol, un 26% a ampicilina y un 25% a trimetoprim sulfametoxazol. Estos resultados coinciden con estudios previamente realizados en donde se reportan altos porcentajes de resistencia a dichos antibióticos (Chen et al., 2004; Antunes et al., 2006; Guerra et al., 2000). Así, en un estudio en el que se analizaron 25 Cepas de *S. enterica* serotipo *Enteritidis* se encontró que el 100% eran resistentes a ampicilina . (Sow-Gassama et al., 2007). Otro estudio realizado sobre distintos serotipos mostró un 92.5% de resistencia a trimetoprim sulfametoxazol, 57.5% a doxyciclina, y un 5% a Cloranfenicol, kanamicina y cotrimoxazol de un total de 40 cepas analizadas. (Mafu et al., 2009)

En este estudio se encontró que el 30% del total de los aislados analizados presentaron multirresistencia a los antibióticos probados. La resistencia múltiple a antibióticos muestra valores variables en los estudios realizados, en los que los porcentajes de multirresistencia del total de cepas estudiadas parecen variar de región en región y también de acuerdo al serotipo analizado. Así, en un estudio realizado con aislados de el principado de Asturias se encontró que de 333 cepas analizadas el 13% eran multirresistentes (Guerra et al., 2000), mientras que en otro caso en el que se evaluaron 1183 cepas aisladas en Portugal, el 21% presentó resistencia

múltiple (Antunes et al., 2006). Nuestro estudio presenta un porcentaje de cepas multirresistentes superior al de dichos trabajos, no obstante, se han reportado porcentajes aun mayores, como el caso del análisis de 30 cepas aisladas en Japon, en cual el 63% fueron mutirresistentes (Hamada et al., 2002).

En relación al serotipo, nuestros datos muestran que la multirresistencia fue mayor en los aislados del serotipo *Tiphymurium* con un 69%, seguido por el *Anatum* con un 53% y el *Panama* con un 50%. Porcentajes de multirresistencia superiores al 50% se han reportado previamente para el serotipo *Tiphymurium*, como el caso del estudio de Hamada et al. (2002) en el que 19 (63.3%) de 30 aislados presentaron dicha condición. Un estudio adicional con aislados de este serotipo documenta una multirresistencia del 45% de un total de 83 aislados (Guerra et al., 2000). En el caso del serotipo *S. Panama* se han reportado valores de multirresistencia del 23% para un total de 30 aislados (Guerra et al., 2000). Tomando en cuenta todos estos antecedentes, los porcentajes de multirresistencia encontrados en el presente trabajo para los serotipos mencionados se encuentran entre los más altos documentados a la fecha.

El estudio de integrones clase 1 es importante en enterobacterias en general y en *Salmonella* en particular debido a que estos elementos genéticos pueden estar relacionados con la resistencia múltiple a antibióticos y por su capacidad de movilizarse entre aislados. En este estudio se detectó la presencia de dichos elementos en un 65% de de 119 aislados estudiados. Como en el caso de la resistencia a antibióticos, la presencia de integrones clase I presenta una gran variedad de resultados. Así, mientras que en algunos reportes se detectan altos porcentajes de presencia de integrones en los aislados de estudio, por ejemplo del 75% (Antunes et al., 2006), en otros casos la presencia de estos elementos genéticos es considerablemente baja, por ejemplo del 11.4% (Ahmed et al., 2005). En nuestro estudio se encontró en mayor porcentaje de presencia de integrones de clase 1 en diversos serotipos de *Salmonella enterica* tales como: *Derby*, *Vejle*, *Anatum*, *Tiphymurium*, *Give*, *Panama* y *c1*. Otros estudios han mostrado la presencia de integrones en dichos serotipos (Daly et al., 2004; Rodríguez et al 2006)

En este trabajo encontramos que solo el 71% de las cepas multirresistentes mostraron la presencia de integrones clase I. Otros estudios han mostrado relaciones de 20% (Sow-Gassama et al., 2007). En aquellas cepas que fueron multirresistentes y no se encontraron integrones clase 1 es necesario buscar otro tipo de elementos genéticos. En la actualidad existen iniciadores para

buscar alrededor de 3 secuencias genéticas asociadas a la resistencia a sulfonamidas: sul1, sul2 y sul3. El gen sul1 normalmente se encuentra vinculado a consecuencia de su localización en integrones de clase 1, en cepas de casos clínicos con resistencia a múltiples antibióticos (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Hammerum et al., 2006, Antunes et al., 2005). Alrededor de 38 genes tet y otr responsables de la resistencia a Tetraciclinas, asociados a plásmidos, transposones simples o conjugativos e integrones que pueden transferirse así a otras bacterias comensales o patógenas. (Tafolla, 2009).

La alta multirresistencia y presencia de integrones de clase 1 aquí encontrados sugiere que serotipos del género *Salmonella* son reservorios importantes de resistencia a los antimicrobianos y que presentan un grave problema de Salud Pública. La transferencia horizontal de genes causantes de resistencia a antimicrobianos es de especial interés en patógenos humanos incluyendo a las enterobacterias.

## IX. Referencias Bibliográficas

1. **Ahmed** AM, Nakano H and Shimamoto T. 2005. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 371-374.
2. **Antunes** P, Machado J, Sousa JC and Peixe L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2 and sul3) in Portuguese *Salmonella enteric* strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 : 836-839
3. **Antunes** P, Machado J and Peixe L. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 297-304
4. **Bartlett** JMS and Stirling D. *Methods in molecular biology-PCR protocols*. 2da Edición. Humana Press. pp 3-6.
5. **Benenson** AS and Chin J. 1995. *Control of communicable diseases manual*. American Public Health Association.
6. **Bergey** DH and Hotl JG. 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9na Edición. pp 186-187.
7. **Bio-Rad**. Multidiscos Gram negativos. Instructivo de uso.
8. **Cabrera** R, Marco F, Vila J, Ruiz J, Gascón J. 2006. Class 1 integrons in *Salmonella* strains causing traveler's diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 : 1612-1613.
9. **Chang** C, Chang L, Chang Y, Lee T and Chang S. 2000. Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *J. Med. Microbiol*. 49: 1097-1102
10. **Chen** S, Zhao S, White GD, Schroeder MC, Lu R, Yang H, McDemott FP, Ayers S and Meng J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1-7

11. **Cohen** JI, Bartlett JA, and Corey GR. 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)*. 66: 349-388.
12. **Daly** M, Buckley J, Power E and Fanning S. 2004. Evidence for a chromosomally located third integron in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 1350-1352
13. **Darwin** KH, and Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiological Reviews*. 12: 405-428.
14. **Gillings** M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M and Stokes W. 2008. The evolution of Class 1 Integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 190: 5095-5100
15. **Guerra** B, Soto SM, Argüelles JM and Mendoza C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 1305-1308
16. **Gutiérrez-Cogco** L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.
17. **Hamada** K, Tsuji H and Oshima K. 2002. Identification and characterization of transferable integron-mediated antibiotic resistance among *Salmonella* serovar *Typhimurium* and *Salmonella* serovar *Infantis* isolates from 1991 to 2002. *J. Infect. Dis.* 55: 135-138.
18. **Hammerum** AM, Sandvang D, Andersen SR, Seyfarth AM, Porsbo LJ, Frimodt-Moller N, Heuer OE. 2006. Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol*. 106: 235-237
19. **Hawley**, L., Ruebush, M. 2004. *Microbiology and Immunology*. 67-69.



20. **Lévesque** C, Piché L, Larose C and Roy HP. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 185-191
21. **Lynne** AM, Clark-Rhodes BS, Bliven K, Zhao S and Foley SL. 2008. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* serovar *Newport* isolates from food animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52: 353-356
22. **Mafu** NC, Pironcheva G and Okoh AI. 2009. Genetic diversity and in vitro antibiotic susceptibility profile of *Salmonella* species isolated from domestic water and wastewater sources in the eastern cape province of South Africa. *African Journal of Biotechnology* 8: 1263-1269.
23. **Mazel** D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Publishing Group*. 4: 608-620
24. **Ortega-Cabrera** R. 2007. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* spp. Tesis de Doctoral. pp 21-23
25. **Osterloh** M. 2004. Transfer of antibiotic resistant genes between *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. McPherson College Division of Science and Technology. 12: 13-14.
26. **Paniagua** GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E and Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6:17.
27. **Pegues** DA, Ohl ME, and Miller SI. 2005. *Salmonella* species, including *Salmonella Typhi*. In *Principles and Practice of Infectious Diseases* No. 2. Edited by GL Mandell, JE Bennett, and R Dolin. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA. USA. pp. 2636-2654.
28. **Pérez-Tallero** E, Iglesias I. 2003. Tetraciclinas, sulfonamina y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 21: 520-529.

29. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. 26: 7-35
30. **Popoff** MY, Bockemuhl J, Brenner FW, and Gheeling LL. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology. 152: 907-909.
31. **Prescott** LM, Harley JP and Klein DA. 2004. Microbiología. 5ta Edición. Mc Graw Hill. pp 870-889
32. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
33. **Rao** S, Maddox W, Hoiem-Dalen P, Lanka S, and Weigel RM. 2008. Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. Journal of Clinical Microbiology 46: 916-920.
34. **Recchia** GD and Hall RM. 1995 Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology. 141: 3015-3027
35. **Regalado-Pineda** ID, 2010. Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* en productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán, México. Tesis en elaboración.
36. **Rodríguez** I, Martín MC, Mendoza MC and Rodicio MR. 2006. Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 58: 1124-1132
37. **Sabaté** M and Prats G. 2002. Structure and function of integrons. Enferm Infecc Microbiol Clin. 20: 341-345.
38. **Sambrook** J and Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring, USA.
39. **Sayah** RS, Kaneene JB, Johnson Y and Miller RA. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. Applied and Environmental Microbiology 71: 1394-1404

40. **Sow-Gassama A**, Wane-Aziz A, Diallo-Hadi M, Boye Bouh S and Kane-Aïdara A. 2007. Genotypic characterization of antibiotic-resistant *Salmonella Enteritidis* isolates in Dakar, Senegal. J Infect Developing Countries. 1: 284-288.
41. **Tafolla Muñoz I**. 2009. Caracterización genotípica de la resistencia a antibióticos y a metales en aislados clínicos de enterobacterias. Tesis de Maestría. 19-21
42. **Tenover FC**. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American Journal of Medicine. 119: S3-S10.
43. **Tindall BJ**, Grimont PAD, Garrity GM, and Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 521-524.
44. **Voogt N**, Wannet WJ, Nagelkerke NJ, and Henken AM. 2002. Differences between national reference laboratories of the European community in their ability to serotype *Salmonella* species. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21: 204-208.
45. **WHO**. 2002. Foodborne diseases, emerging. Geneva, World Health Organization. Fact Sheet N°124.
46. **WHO**. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, World Health Organization.
47. **Zaidi MB**, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, and Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerging Infectious Diseases. 14: 429-4353.