



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS:**

**BACTERIAS MULTIRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN SETAS (*CLAVARIA BOTRYTIS*, *LUDWIGIA OCTOVALVIS*, *AMANITA RUBESCENS*, *AGARICUS BISPORUS*, *RUSSULA BREVIPES*, *HYPOMYCES LACTIFLUORUM*, *HYGROPHORUS CHRYSODON*, *CANTHARELLUS CIBARIUS*, *BOLETUS AESTIVALIS*)  
PARA CONSUMO HUMANO.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ELSA HERNÁNDEZ GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

**VOCAL:** M en C. Lucia Cornejo Barrera

**SECRETARIO:** QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez

**1er. SUPLENTE:** M en C. José Ignacio Páramo Ramírez

**2° SUPLENTE:** M en C. Raquel Ortega Muñoz

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. ANEXO DEL LAB 1A, DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

\_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: HERNÁNDEZ GARCÍA ELSA**

\_\_\_\_\_

---

1	Introducción.....	1
2	Marco teórico.....	3
2.1	Historia de los antibióticos.....	3
2.2	Mecanismos de acción de los antibióticos.....	4
2.3	Resistencia a los antibióticos.....	6
2.4	Factores involucrados en la aparición de multiresistencia en bacterias.....	18
2.5	Fenómeno de resistencia a nivel mundial.....	21
2.6	Hongos: Su importancia y su relación con el fenómeno de resistencia.....	22
3	Objetivos.....	24
4	Hipótesis.....	24
5	Metodología.....	26
6	Resultados y Análisis de resultados.....	29
6.1	Muestras de Hongos comestibles.....	29
6.2	Prueba de Susceptibilidad a antibióticos.....	30
6.3	Determinación porcentual de bacterias multiresistentes en muestras totales (Replica Plating).....	30
6.4	Perfiles de resistencia (Antibiograma).....	32
6.5	Caracterización de cepas.....	35
6.6	Extracción de DNA plasmídico.....	35
6.7	Curva de tolerancia a bromuro de etidio (BE).....	36
7	Conclusiones.....	39
8	Bibliografía.....	40
9	Anexos.....	45
	Anexo I.....	45
	Anexo II.....	47
	Anexo III.....	48

---

## **1 Introducción.**

Los hongos son apreciados en todo el mundo no solo por su textura y sabor, sino también por su valor nutricional y propiedades funcionales. Pueden ser ingeridos de diferentes maneras, tanto frescos como cocidos (Grangela et al., 2011).

Los hongos silvestres son ricos en minerales y contienen altos niveles de agua, proteínas, fibra e hidratos de carbono. Además, contienen bajos niveles de grasa. Las especies de hongos comestibles son altamente nutritivas llegando a compararse con la carne, los huevos y la leche. (Kalac, 2009)

La fuente principal que utilizan los hongos para obtener sus nutrientes es a través de material orgánico muerto. Por ejemplo, residuos de cosechas (agricultura), madera muerta y desechos de animales. Los hongos silvestres son importantes en el reciclamiento de diversos nutrientes. Asimismo, los hongos silvestres comestibles desempeñan un papel muy importante en la alimentación mundial. En México forman parte de una larga tradición etnomicológica que se remonta al periodo prehispánico. Fue uno de los alimentos más apreciados de la dieta rural en especial para la gente que vivía en las cercanías donde se desarrollaban. Además de ser parte de la dieta, también eran utilizados dentro del ámbito médico y ornamental (Zamora et al., 1995).

Actualmente, el nivel de importancia de los hongos se refleja en el ámbito económico. Estas especies son valuadas internacionalmente en \$23 billones de pesos cada año. Diferentes empresas privadas alrededor del mundo y, aprovechando el conocimiento tradicional que tienen los campesinos, hacen uso de este recurso natural a gran escala (Garibay et al., 2009).

Recientemente, se ha reportado en países de primer mundo la aparición del fenotipo de multirresistencia bacteriana en alimentos para consumo humano (White, et al., 2001). Al ser los hongos comestibles un producto que generalmente se consume en crudo, es importante considerar la posible presencia del fenotipo de resistencia en su flora natural microbiana. Existen diversos mecanismos involucrados en la aparición de bacterias multirresistentes tales como los elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) y, descritos más recientemente, las bombas de expulsión. Sin embargo, es importante resaltar el papel que juega la constante presión selectiva a la que son

sometidas las bacterias en su ambiente natural. Además, en México no existe una Norma Oficial que reglamente las dosis máximas presentes de trazas de antibióticos o siquiera una metodología que determine su concentración en los alimentos, aún cuando su presencia podría explicar el aumento de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos.

La presencia de cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos en hongos comestibles podría representar un grave problema de salud a nivel nacional y mundial. De esta manera, es de gran interés evaluar la posible presencia de bacterias resistentes a múltiples antibióticos en diferentes especies de hongos comestibles en la Ciudad de México.

## **2 Marco teórico**

### **2.1 Historia de los antibióticos**

La utilización de diferentes sustancias con propiedades antimicrobianas en el tratamiento de infecciones bacterianas no es una metodología nueva. Hace aproximadamente 2500 años en China se utilizaban plantas para el tratamiento del carbunco.

Paul Ehrlich, físico y químico alemán, ensayó en los primeros años del siglo XX la síntesis de compuestos capaces de atacar de manera selectiva a microorganismos infecciosos sin lesionar a los tejidos del huésped. Sus experimentos permitieron la creación del Salvarsán en 1909 el cual se utilizó como tratamiento selectivo contra la sífilis hasta la utilización de la penicilina años más tarde. En 1928 Alexander Fleming descubrió de forma accidental el primer antibiótico, la penicilina. Mientras trabajaba con diversas variedades de gérmenes causantes de infecciones supuradas, observó un hongo (*Penicillium sp*) capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias (FAO Animal Production and Health Paper, 2004).

No fue sino hasta 1940 que Florey y Chain utilizaron a la penicilina por primera vez en la clínica. Cuando se comenzó a utilizar la penicilina para tratar infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*, el 10% de los aislados eran resistentes al antibiótico. A los seis años los aislamientos de cepas resistentes representaban el 60%. En la actualidad representan más del 90% (Orman, 2006).

La utilización constante e irracional de los antibióticos, ya sea en el medio hospitalario, en la ganadería y/o en la comunidad, da lugar a la selección de bacterias resistentes. Este fenómeno muestra la importancia de llevar a cabo estudios en relación a la diseminación de resistencia en diversos ecosistemas, a fin de disminuir la aparición de cepas cada vez más resistentes.

## 2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antimicrobianos ejercen su acción de forma específica sobre alguna estructura o función microbiana. Poseen una elevada potencia biológica, es decir, inhiben o destruyen bacterias a muy baja concentración. Un antimicrobiano ideal por lo general muestra toxicidad selectiva (Jawetz, 2008). Los mecanismos de acción de la mayor parte de los antibióticos pueden ser clasificados en cuatro grupos (Figura 1):

- 1.- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 2.-Inhibición de las funciones de la membrana celular.
- 3.-Inhibición de la síntesis de proteínas.
- 4.-Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

1.-Inhibición de la síntesis de la pared celular. Las bacterias tienen una capa externa rígida denominada pared celular. La pared celular contiene un polímero químico llamado mucopéptido (peptidoglicano) que consta de polisacáridos y polipéptidos con múltiples enlaces cruzados. Los polisacáridos regularmente contienen aminoazúcares tales como N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico (este último sólo se encuentra en las bacterias). Los aminoazúcares se encuentran adheridos a cortas cadenas de péptidos. Los enlaces cruzados entre las cadenas del péptido, resultantes de las reacciones de transpeptidación efectuadas por varias enzimas, contribuyen a la rigidez final de la pared celular.

Todos los fármacos  $\beta$ -lactámicos son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular bacteriana e inhiben, por tanto, a las bacterias en fase de crecimiento. Estos antimicrobianos en general actúan interfiriendo las reacciones de transpeptidación, uniéndose a receptores enzimáticos que están situados en la cara externa de la membrana bacteriana denominadas PBP (proteínas de unión a penicilinas, por sus iniciales en inglés). Una vez adherido a uno o más receptores, la siguiente etapa tal vez implica retirar o inactivar a un inhibidor de enzimas autolíticas en la pared celular. Esto activa a la enzima lítica y si el ambiente es isotónico se produce la lisis (Forbes, 2007).



2.-Inhibición de las funciones de la membrana celular. El citoplasma de toda célula viviente está limitado por la membrana citoplásmica que sirve de barrera de permeabilidad selectiva y efectúa funciones de transporte activo que controla la composición interna de la célula. Si la integridad funcional de la membrana citoplásmica se altera, las macromoléculas y los iones son extruidos de la célula y sobreviene daño o muerte celular. Algunos antibióticos interfieren de manera selectiva con las funciones biosintéticas de las membranas citoplasmáticas, comportándose como detergentes catiónicos que desorganizan la membrana bacteriana. Generalmente son bactericidas, incluso sobre bacterias en fase estacionaria (Jawetz, 2008).

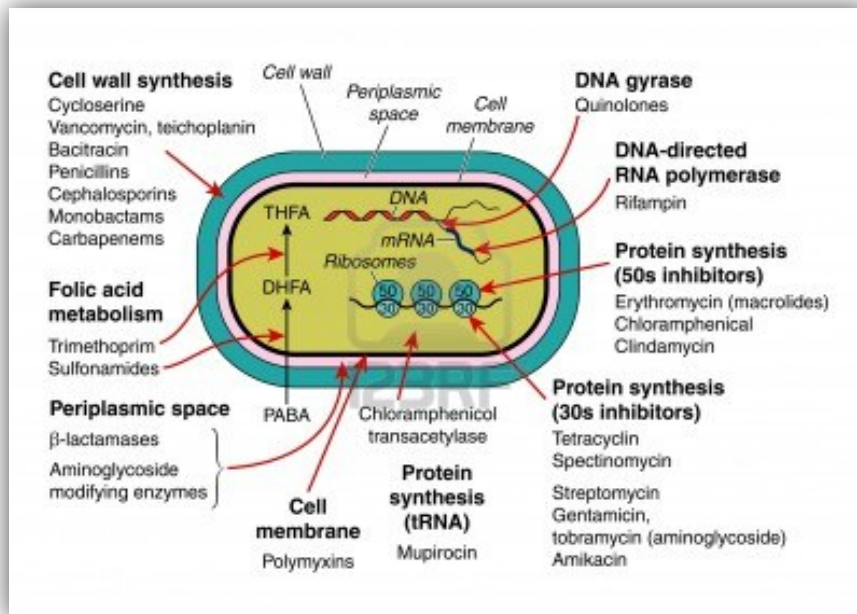
3.-Inhibición de la síntesis de proteínas. La síntesis comienza con la transcripción a RNAm de la información genética presente en el ADN del cromosoma bacteriano por intervención de una RNA polimerasa. El proceso se realiza en tres etapas: iniciación, elongación (que comprende tres fases: reconocimiento, transferencia y translocación) y terminación. El mejor mecanismo inhibitorio estudiado lo constituye el grupo de antibióticos denominado aminoglucósidos, siendo el mecanismo de estreptomicina el mejor conocido. Este antibiótico se une a la subunidad 30s del ribosoma de forma irreversible, alterando la fase de reconocimiento y distorsionando el codón. Por lo tanto, se detiene la síntesis de proteínas y/o se pueden llegar a formar proteínas defectuosas que, evidentemente, no son funcionales.

Otros antimicrobianos actúan sobre la subunidad 50s interfiriendo con la fase de transferencia o bloqueando la translocación. En general, los antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica son bacteriostáticos, excepto los aminoglucósidos y la mupirocina (Forbes, 2007).

4.-Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. Ejemplos de fármacos que actúan por inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos son las quinolonas y fluoroquinolonas que inhiben la síntesis del ADN microbiano al bloquear la ADN girasa o topoisomera II. Esta enzima es la que corta la doble hélice del ADN cromosómico en fragmentos que se superenrollan en sentido negativo para posteriormente proceder al sellado de los extremos de ADN que fueron cortados. La girasa del ADN consta de 4 subunidades (2 subunidades

a y 2 subunidades b). Las subunidades a son las causantes de los cortes y del nuevo cierre de los puntos de rotura, mientras que la subunidades b inducen los superenrollamientos negativos. Las quinolonas impedirán el cierre de los puntos de rotura anteriormente mencionados. También actúan sobre la Topoisomerasa IV (Barnes, 2008).

Otros antimicrobianos que inhiben la síntesis proteínica son la pirimetamina, rifampina, sulfonamidas, trimetoprim y trimetrexato.



**Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos**

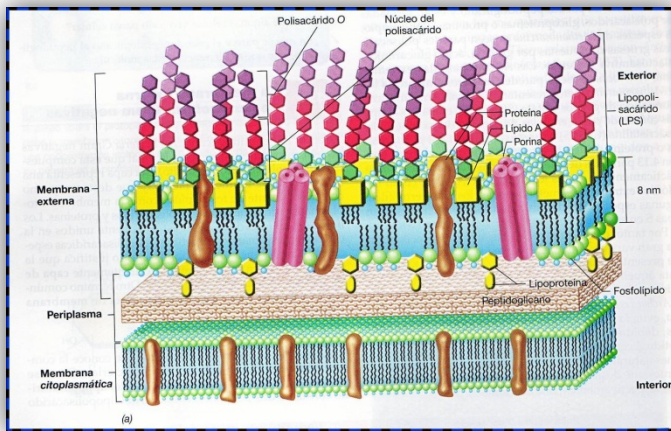
### 2.3 Resistencia a los antibióticos

#### Resistencia intrínseca

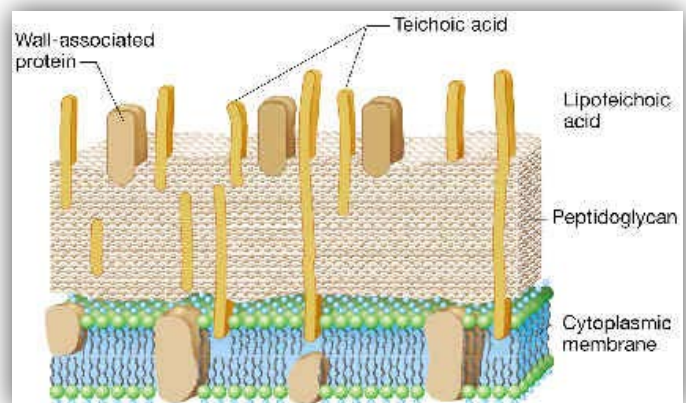
La resistencia intrínseca es resultado del estado genético, estructural o fisiológico de un microorganismo. Se considera que este tipo de resistencia es una característica natural y heredada en forma invariable y se asocia con la inmensa mayoría de las cepas que constituyen un grupo, un género o una especie de bacteria particular (Forbes, 2007).

Se reconocen dos tipos de estructuras características en las bacterias, bacterias Gram negativas (Figura 2) y bacterias Gram positivas (Figura 3). Entre sus formas de protección se encuentran la pared celular, los transportadores transmembranales (conformados por

porinas y bombas de expulsión) y la producción de enzimas capaces de desactivar penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos.



**Figura 2. Estructura de la pared celular Gram (-)**



**Figura 3. Estructura de la pared celular Gram (+)**

## Pared celular

Las bacterias Gram negativas tienen una capa de lipopolisacárido que actúa como barrera que limita la difusión de moléculas de antibiótico en la célula. Las bacterias Gram positivas en general retardan la penetración de sustancias hidrofílicas, catiónicas y compuestos antimicrobianos (Bower, 1999).

## Porinas

Las porinas se encuentran en la membrana externa y están presentes solo en bacterias Gram negativas. Tienen como función principal la regulación de la entrada y salida de diversas sustancias como nutrientes y moléculas tóxicas.

## Bombas de expulsión

Estos sistemas permiten transportar moléculas extrañas y/o tóxicas para la célula del citoplasma al espacio intermembranal y, posteriormente, al exterior de la célula. De esta manera, disminuye la concentración intracelular y, por lo tanto, en el caso de los antibióticos, la eficacia de los mismos.

Se distinguen 5 grandes familias, habitualmente denominadas por sus iniciales en inglés: MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-division), MATE (multidrug and toxin extrusion) y ABC (ATP-binding cassette). Las familias MFS, SMR y RND adquieren energía de la fuerza protón motriz; la familia MATE a través de iones sodio, mientras que la familia ABC utiliza directamente ATP. (Li, 2009).

### MFS (major facilitator superfamily)

La familia MFS es conocida por representar el mayor grupo de transportadores. Incluye transportadores como Bmr y Blt en *Bacillus subtilis*, MdfA en *E. coli*, LmrP en *Lactobacillus lactis* y NorA en *S. aureus*. Estos transportadores son antiportes es decir, utilizan la fuerza protón motriz para ejercer su función. Sin embargo, en bacterias Gram negativas los sistemas de expulsión MFS puede funcionar como sistemas tripartitas. Estos sistemas permiten que se exporten exitosamente sustratos a través de las dobles membranas de las bacterias Gram negativas a diferencia de varios transportadores MFS de un solo componente que puede exportar medicamentos sólo al periplasma haciéndolos menos eficientes (Li, 2009).

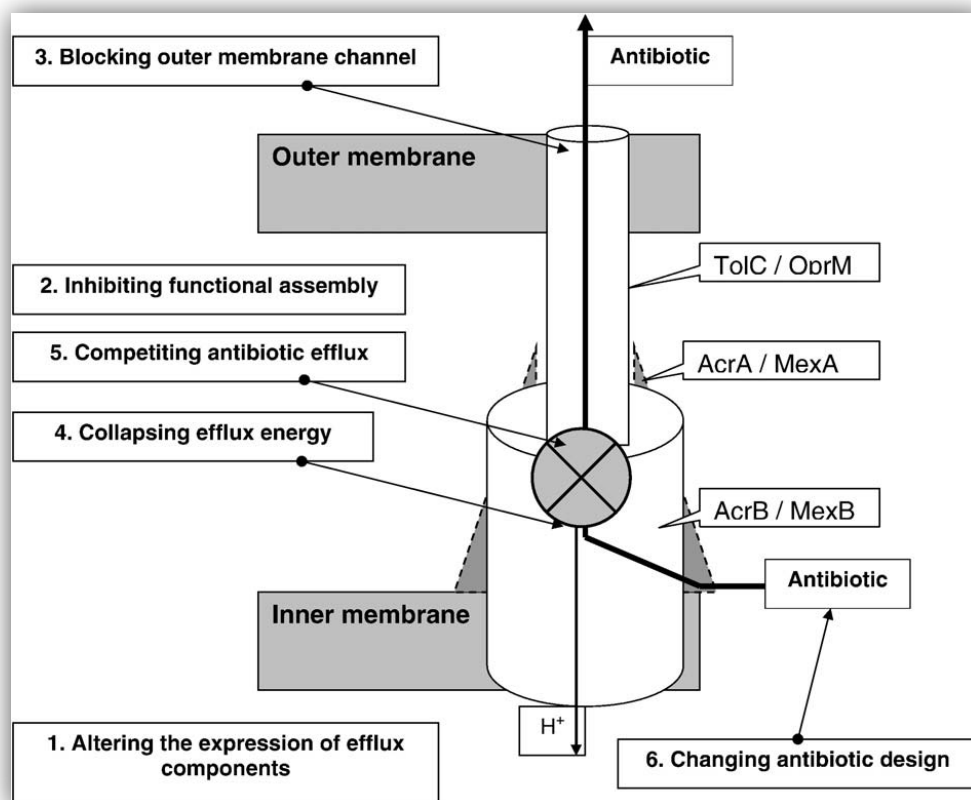
### SMR (small multidrug resistance)

Las proteínas SMR pueden estar codificadas tanto en el cromosoma de bacterias Gram negativas como en plásmidos, que pueden estar asociados con integrones. Estas proteínas representan a los transportadores de proteína más pequeños conocidos, conteniendo 4 pequeñas proteínas transmembranales que funcionan como un

homodímero. Son capaces de expulsar componentes catiónicos tales como sales cuaternarias de amonio y de bromuro de etidio (Li, 2009).

### RND (resistance-nodulation-division)

Los sistemas RND funcionan como antiportes protón/fármaco, y están particularmente extendidos entre bacterias Gram negativas que expulsan a una gran variedad de sustratos antibacteriales incluyendo varios antimicrobianos y agentes quimioterapéuticos. En años recientes se han puesto de manifiesto la expulsión de una gama muy amplia de agentes así como la estructura y los mecanismos de las bombas RND (Figura 4). Estos hallazgos han permitido dilucidar que estos transportadores RND (por ejemplo, AcrB y MexB) tienen un dominio periplásmico conformado por un complejo tripartita con una proteína periplásmica como adaptador o una membrana de fusión de proteína (Li, 2009).



**Figura 4. Esquema de bombas RND acrAB-ToIC/MexAB-OprM**

### MATE (multidrug and toxin extrusion)

La familia MATE está representada por NorM de *Vibrio parahaemolyticus*. Es una proteína con 12 hélices transmembranales que confiere resistencia a múltiples agentes tóxicos (incluyendo las fluoroquinolonas y el bromuro de etidio). Utiliza un sistema antiporte (Nikaido, 2009).

### ABC (ATP-binding cassette)

Los transportadores de la familia ABC exportan una amplia variedad de sustratos impulsados por la hidrólisis de ATP. A través de su dominio transmembranal pueden catalizar un protón dependiente de gradiente para la expulsión de fármacos generalmente encontrados en bacterias Gram positivas (Nikaido, 2009).

### Enzimas $\beta$ -lactamasas

Por último se menciona a las  $\beta$ -lactamasas como mecanismo intrínseco de protección contra compuestos tóxicos externos.

Estas enzimas abren el anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas y suprimen su actividad antimicrobiana. Algunas  $\beta$ -lactamasas son codificadas por plásmidos en tanto que otras son codificadas por los cromosomas bacterianos. Están ampliamente distribuidas tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas.

### Resistencia adquirida

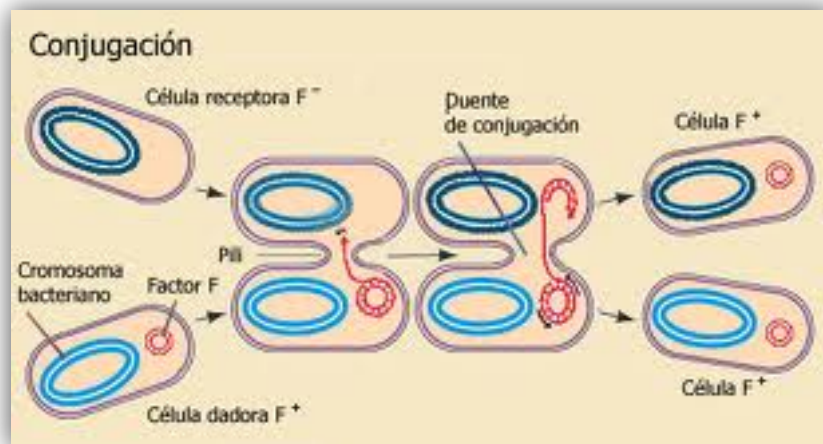
La resistencia a los antibióticos como resultado de la alteración fisiológica y estructural de las células a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo se conoce como resistencia adquirida. A diferencia de la resistencia intrínseca, la resistencia adquirida puede ser un rasgo asociado con algunas cepas de un grupo o especie de microorganismos (Forbes, 2007)

Los mecanismos de resistencia adquiridos están codificados en forma genética. Los métodos de adquisición son básicamente aquellos que permiten un cambio (mutación) o intercambio de genes a través de la transferencia horizontal de genes (THG). Este último mecanismo (THG) incluye los procesos de conjugación, transducción y transformación. Están mediados por plásmidos, transposones e integrones.

## Conjugación

La conjugación es un proceso de transferencia genética que requiere contacto de célula con célula (Figura 5). Este mecanismo requiere de una bacteria donante que contiene un plásmido conjugativo (Orman, 2006).

La naturaleza del contacto célula-célula no está bien caracterizado en todas las especies bacterianas. Sin embargo, en *E. coli* el contacto está mediado por un pili sexual. Este último se origina en el donante y establece un puente conjugativo que actúa como canal para la transferencia de ADN. El contacto entre ambas células comprende la movilización cromosómica. Una nueva cadena de ADN es producida por el donante y se transfiere al receptor, donde se sintetiza una cadena complementaria de la cadena del donante. La cantidad de ADN transferido depende de cuánto tiempo pueden mantener las células el contacto. En general solo se transfieren porciones del cromosoma. El ADN recién introducido estará disponible para recombinarse con el cromosoma receptor (Forbes, 2007).

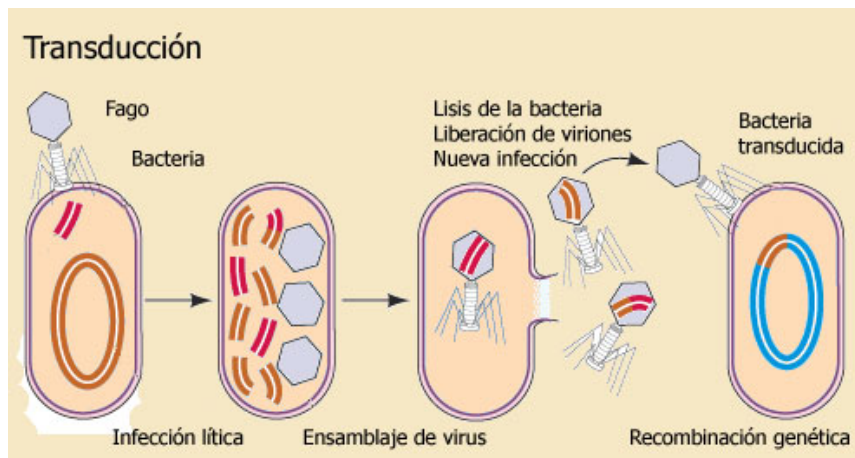


**Figura 5. Proceso de conjugación entre bacterias**

## Transducción

En la transducción (Figura 6), el ADN se transfiere de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago (virus que infectan bacterias). La transducción puede ser generalizada o especializada. En la transducción generalizada, un ADN bacteriano (cromosómico o plasmídico), pasa a formar parte del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma

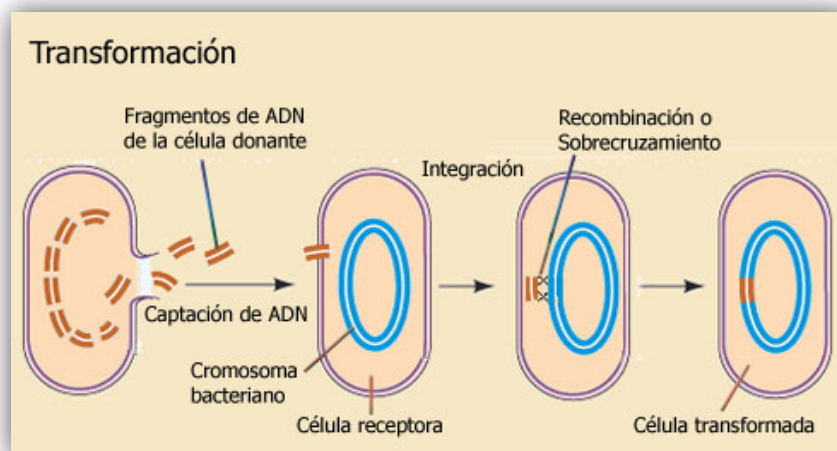
del virus. En la transducción especializada, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del virus (Orman, 2006).



**Figura 6. Proceso de transducción entre bacterias**

### Transformación

La transformación incluye la captación por la célula receptora del ADN que queda libre en el ambiente cuando otra célula bacteriana (donante) muere y sufre lisis (Figura 7). Este ADN existe en forma de fragmentos en el ambiente. Ciertas bacterias pueden captar este ADN libre y sufrir el proceso de transformación. Son denominadas como bacterias competentes. Una vez que el ADN donante, por lo general monocatenario, ingresa en la célula receptora, puede producirse la recombinación con el ADN homólogo de esta célula (Forbes, 2007).



**Figura 7. Proceso de transformación entre bacterias**



## Plásmidos

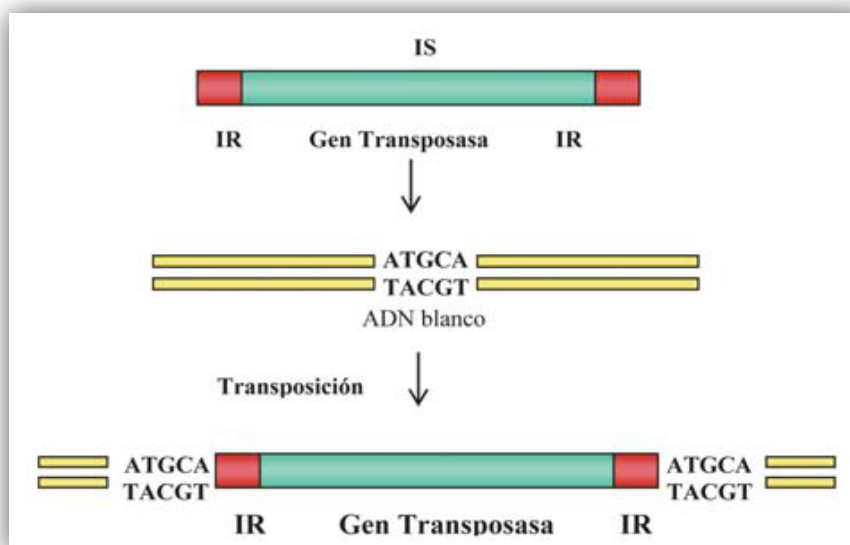
Son elementos genéticos relativamente pequeños que varían entre  $10^4$  a  $10^6$  pares de bases constituidos por ADN de doble cadena con forma circular. Son capaces de replicarse de manera autónoma al cromosoma bacteriano y pueden portar diferentes genes, entre ellos los de resistencia a antibióticos (Orman, 2006).

## Transposon

Los elementos transponibles fueron primeramente identificados como inserciones espontáneas en los operones bacterianos, ya que anulaban la transcripción o la traducción de los genes en los cuales se insertaban. A partir de entonces se caracterizaron diversos tipos de elementos transponibles como transposones simples o secuencias de inserción (IS), compuestos, replicativos y no replicativos (Fedoroff, 2013).

## Secuencias de inserción

Los elementos IS son constituyentes normales del cromosoma bacteriano y de los plásmidos. Son unidades autónomas, los cuales codifican para una proteína necesaria para la transposición: la transposasa. Comparten una estructura similar, en donde sus extremos tienen secuencias cortas repetidas e invertidas llamadas “inverted repeats” (IR) (secuencias repetidas inversas). Las IS contienen una única región codificante que codifica para transposasa y que se encuentra entre los dos IR (Figura 8). Cuando un elemento IS se transpone, se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción y se identifican por ser pequeñas secuencias que flanquean las IR (Orman, 2006).



### Figura 8. Secuencias de inserción y su transposición.

En la transposición de una IS se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción que se identifican como secuencias cortas directas que flanquean las IR.

#### Transposones compuestos

Los transposones compuestos están conformados por una región central que porta el gen marcador, flanqueada a ambos lados por elementos IS, pudiendo encontrarse en la misma orientación o invertida (Figura 9). En algunos casos los módulos del transposon son idénticos como es el caso de Tn9 (repeticiones directas de IS1) y de Tn903 (repeticiones invertidas de IS903). En otros casos, los módulos están relacionados pero no son idénticos, como en el caso de Tn10 y de Tn5. Los genes marcadores son usualmente genes de resistencia a antibióticos, como en el caso de Tn9 a cloranfenicol, en Tn10 a tetraciclina y en Tn903 y tn5 a kanamicina (Fedoroff, 2013).

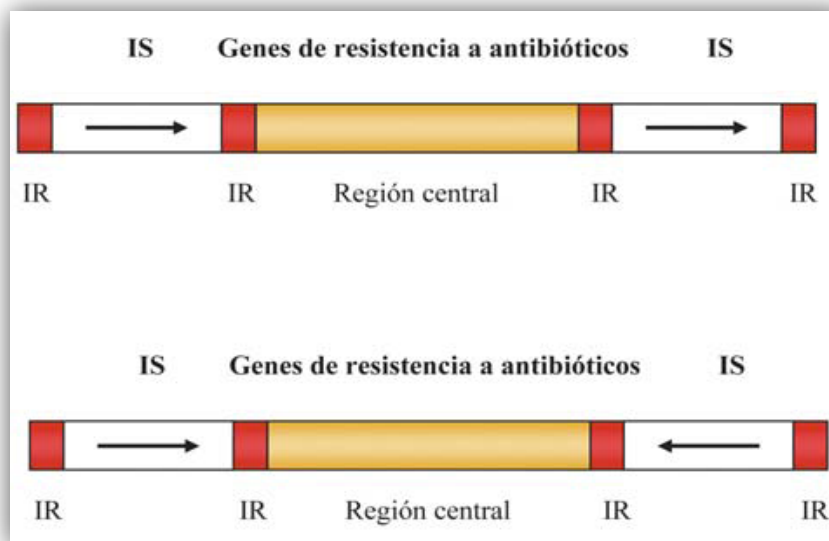


Figura 9. Transposones Compuestos.

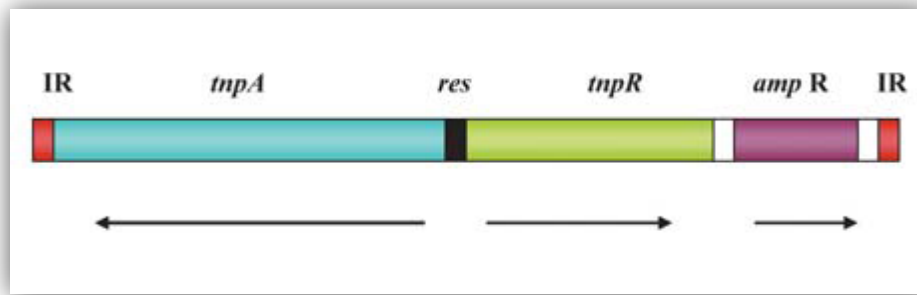
Parte superior: transposón compuesto con dos IS en la misma orientación, en la región central se encuentran los genes de resistencia a antibióticos.

Parte inferior: transposón compuesto con dos IS en orientación invertida

## Transposones replicativos

En la transposición replicativa, el elemento es duplicado durante la reacción; así, la unidad que se transpone es una copia del elemento original (Figura 10). De manera de que la transposición implica un aumento del número de copias del transposon. A este grupo pertenecen los transposones relacionados a TnA. La familia TnA está compuesta por transposones de gran tamaño, mayores a 5 Kb, entre los que Tn3 y Tn1000 son los más caracterizados.

Los transposones se componen de los genes para la transposición *tnpA* y *tnpR*, que codifican para transposasa y la resolvasa, respectivamente. Usualmente poseen genes de resistencia a antibióticos (Orman, 2006).



**Figura 10. Transposones replicativos.**

Esquema del transposón TnA. Los transposones de la familia TnA tienen secuencias IR en sus extremos, un sitio *res* interno y tres genes conocidos: *tnpA*, *tnpR* y el gen de resistencia a ampicilina *bla<sub>tem-1</sub>*. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

## Transposones no replicativos

Los transposones no replicativos son aquellos que se mueven como una entidad física directamente de un sitio a otro en forma conservada. Es el caso del fago Mu, que cuando infecta una célula se integra a su genoma por transposición no replicativa mientras que en el ciclo lítico el número de copias se amplifica por una transposición replicativa (Fedoroff, 2013).

## Integrón

Se pueden definir como elementos genéticos dinámicos, en el que por un mecanismo de recombinación sitio específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón (Hall, 1995).

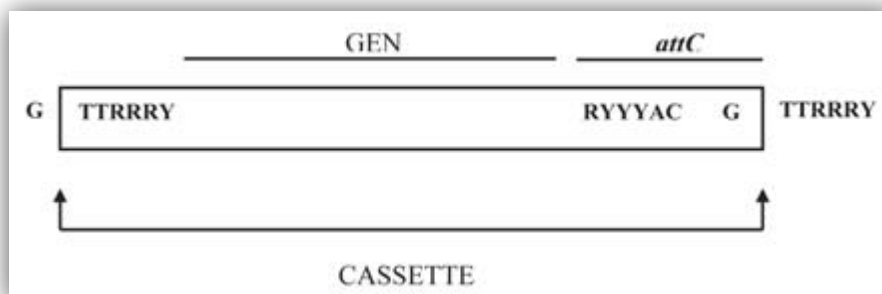
El Integrón más pequeño consiste de un gen, *intl*, que codifica para una recombinasa *attI*. Los integrones también pueden contener uno o más cassettes integrados en el sitio *attI*. Los cassettes consisten en un gen y un sitio de recombinación, los cuales pueden ensamblarse en arreglos en tándem y diseminarse a través de la población bacteriana por mecanismos de transferencia horizontal.

Los integrones y los cassettes se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias Gram negativas. Fueron encontrados en más de doce géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, en algunos miembros de la familia *Vibrionaceae*, *Pseudomonas*, *acinetobacter* y *Xanthomonas*, aunque también se han encontrado en bacterias Gram positivas como *Corynebacterium glutamicum* y *Mycobacterium fortuitum* (Nikaido, 2009).

### Genes en cassettes

Los genes en estructura de cassette normalmente incluyen dos componentes funcionales (Figura 11): el gen y el sitio de recombinación *attC* o elemento de 59 pares de bases (59-bp), localizado en el extremo 3' del gen (Hall, 1995).

Los cassettes en general se identifican por el nombre del gen que codifican y se les denomina con una letra a aquellos que contienen marcos abiertos de lectura de función desconocida.



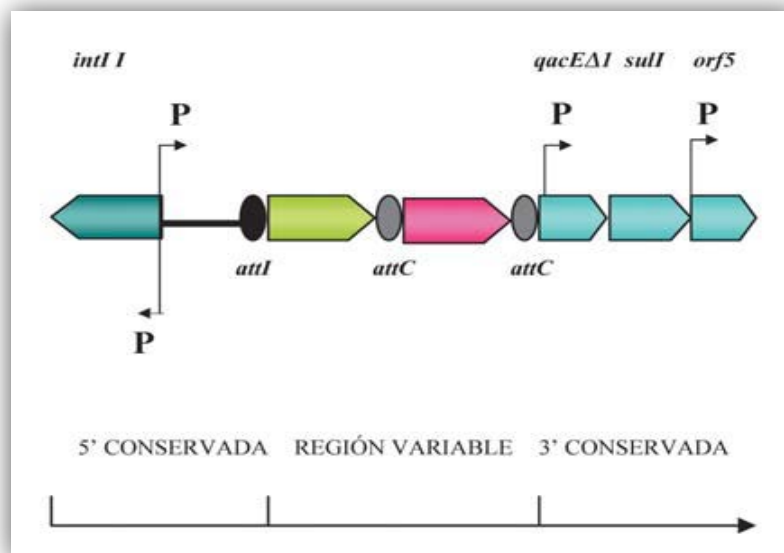
**Figura 11. Estructura de un gen con estructura de cassette.**

El cassette está formado por el gen y el sitio de recombinación *attC*. Las flechas señalan el inicio y el final del cassette, denotando los sitios por donde se realiza la recombinación sitio-especifico para la movilización del mismo.

### Estructura del integrón

Los integrones se clasifican de acuerdo a la secuencia de su integrasa (integrones de clase 1 o de clase 2). Cada gen *intI* está asociado con un sitio único *attI*.

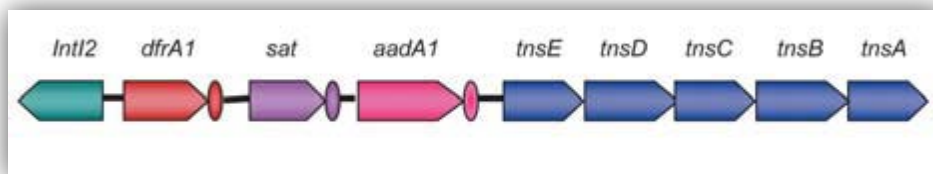
Los integrones de clase 1 están compuestos por tres regiones: dos segmentos conservados y una región variable que incluye los genes con estructura de cassettes (Figura 12).



**Figura 12. Estructura general de los integrones de clase 1.**

En la región 5' conservada se encuentra el gen de la integrasa *intI* 1, los promotores P y el sitio *attI* (óvalo negro). En la región variable se insertan los cassettes por un mecanismo de recombinación sitio-especifico. En la región 3' conservada se encuentran los genes *qacEΔ1*, gen de resistencia a antisépticos; *sulI*, que es un gen de resistencia a sulfonamidas y el *orf5* de función desconocida.

Los integrones de clase 2 se encuentran en Tn7 y derivados (Figura 13), portan en el extremo 3' conservado los genes *tns*, los cuales codifican para su transposición (Orman, 2006).



**Figura 13. Esquema de un integron de clase 2, el Tn7.**

El Integrón está compuesto por la integrasa de tipo 2 y los genes *dfrA1*, *sat* y *aadA1* que codifican para la resistencia, a trimetoprima, estreptotricina y estreptomycin-espectinomycin. En el extremo 3' conservado se encuentran los genes *tns E*, *D*, *C*, *B* y *A*, necesarios para transposición.

## **2.4 Factores involucrados en la aparición de multiresistencia en bacterias**

### Uso irracional de antibióticos

En años recientes, el amplio e inapropiado uso de agentes antimicrobianos en seres humanos (rubro clínico), en la medicina veterinaria, en la agricultura, en el uso doméstico y como desinfectantes en la industria de alimentos, han favorecido la aparición y diseminación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (Ghosh, 2007).

### Rubro clínico

Hoy en día, la resistencia a los antibióticos significa un incremento en el deterioro de la salud pública lo que conlleva al incremento de la morbilidad, mortalidad, a la prolongación de la hospitalización y al costo de los tratamientos (Lavilla et al., 2013)

En hospitales, el uso profiláctico de antibióticos antes de un procedimiento clínico es una práctica generalmente aceptada, cuando el riesgo de una infección bacteriana es alto. Usando un fármaco equivocadamente en el tratamiento de una infección, el usar una dosis menor de lo usual para asegurar la erradicación de los microorganismos o el empleo de antibióticos de amplio espectro, pueden contribuir al incremento de resistencia de las bacterias, que así pueden extenderse con gran facilidad a la población en general a través

de los centros hospitalarios, mediante el personal de los hospitales (enfermeras, doctores o incluso recepcionistas o conserjes). Los métodos de limpieza y desinfección inadecuados también pueden facilitar medios para la propagación de genes que portan resistencia.

#### Aplicación en la medicina veterinaria

En los últimos años, se ha marcado una creciente preocupación por el uso constante de antibióticos en los animales destinados al consumo humano. Particularmente, se utilizan los antibióticos en dosis subterapéuticas para incrementar el crecimiento de los animales. (Salisbury et al., 2002). El uso de antibióticos en los animales permite el incremento de peso en ellos. Sin embargo, este procedimiento conlleva a la selección de genes de resistencia en las bacterias y puede generar reservorios de genes de resistencia fácilmente transmisibles a través de la cadena alimenticia.

Aunque la tendencia mundial es la disminución de estas prácticas, no se vislumbra un eliminación total, ya que implica varias desventajas en el ámbito económico y ecológico principalmente. En Europa y Estados Unidos, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento ha sido prohibido. Sin embargo, en México, esta práctica sigue todavía en funcionamiento. Aunque el decremento podría significar una reducción en la incidencia de multiresistencia en bacterias, no resuelve el problema por sí mismo ya que dejar de utilizar un antibiótico temporalmente no ocasiona que los microorganismos resistentes desaparezcan así como tampoco su reserva genética ni que sus poblaciones se reduzcan a cero. Sin embargo, la disminución sería suficientemente razonable para retardar el desarrollo de estas bacterias (Salisbury et al., 2002).

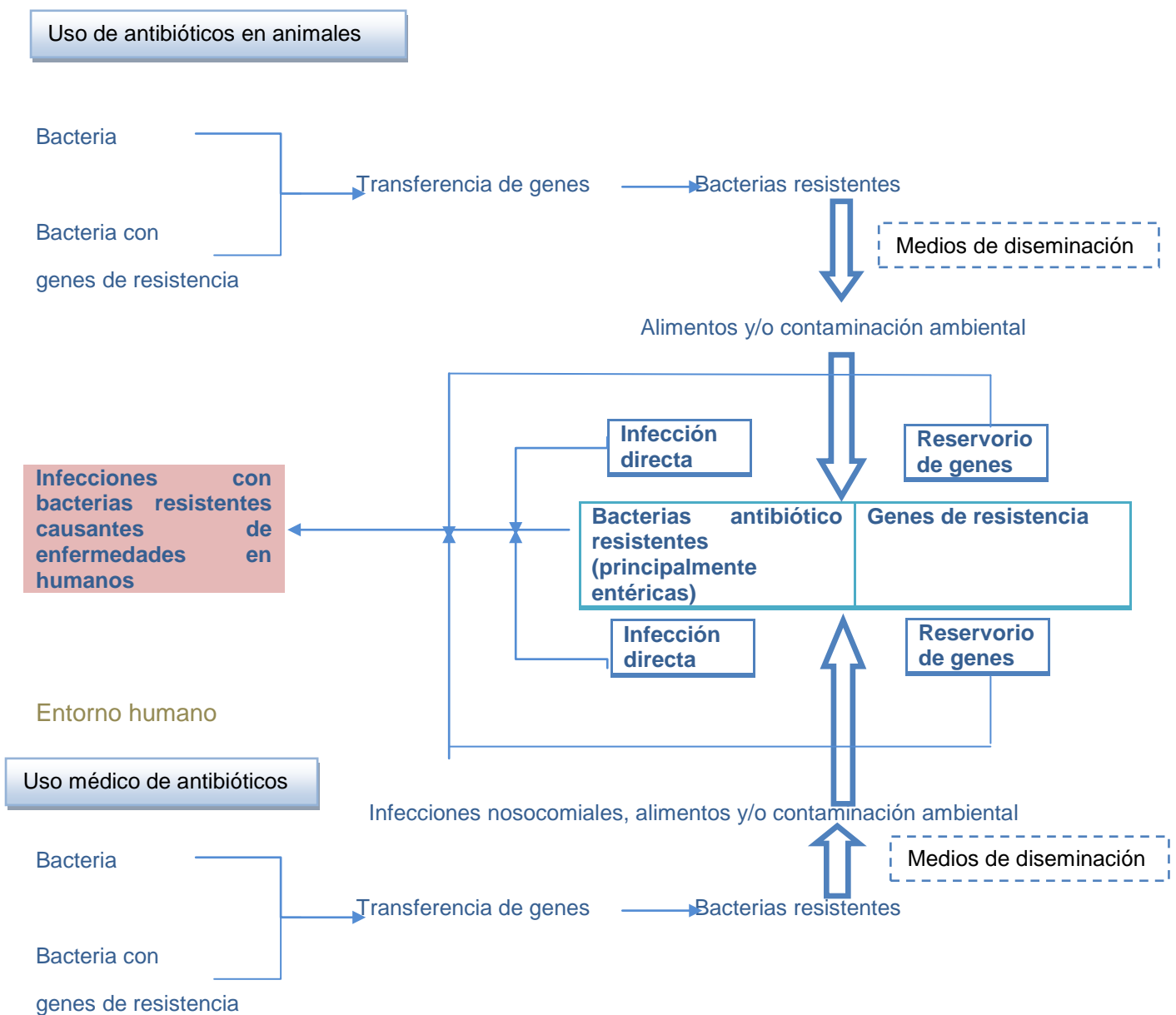
#### Aplicación en la agricultura

Los cultivos constantemente entran en contacto con factores estresantes como pesticidas y fertilizantes que son utilizados para favorecer el desarrollo y viabilidad de los sembradíos. No se puede olvidar el uso de aguas tratadas o residuales (permitidos desde los años 90) que pueden contener una gran variedad de patógenos microbianos y trazas de contaminantes químicos tales como antisépticos, filtros UV, fragancias sintéticas, antibióticos, drogas psiquiátricas, analgésicos, antiinflamatorios, hormonas, repelentes de insectos, pesticidas, surfactantes, metales pesados (Hg, Pb, Cd, Ni, principalmente), etc. Estas sustancias constituyen una fuente constante de presión selectiva sobre los microorganismos que se encuentran en el alimento y/o en el suelo de cultivo.

Los múltiples factores que convergen para generar reservorios de genes de resistencia por la constante presión selectiva que ejercen no pueden ser vistos como problemas individuales sino como una matriz en la que todos están interrelacionados.

El esquema 1 ilustra a grandes rasgos cómo los animales y los seres humanos están expuestos al mismo entorno en la adquisición de bacterias multiresistentes (Salisbury et al., 2002).

### Entorno de animales destinados al consumo humano



**Esquema 1. Diseminación de bacterias resistentes en animales y humanos**



## 2.5 Fenómeno de resistencia a nivel mundial

En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de bacterias resistentes a múltiples antibióticos en ambientes nunca antes previstos. Por ejemplo, se han identificado un número de serotipos de *Salmonella* resistentes en humanos en los EUA. Las especies más comunes fueron *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. newport*. Todas fueron relacionadas con la ingesta de alimentos contaminados tales como carne de pollo, carne de cerdo, carne de res, huevo, productos lácteos, frutas y vegetales (Hur, et al., 2012).

Otro rubro es el desarrollo de bacterias resistentes encontradas en la industria alimentaria. Básicamente, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, bacterias ácido lácticas y coliformes han presentado resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados tales como compuestos cuaternarios de amonio y cloruro de benzalconio (Langsrud et al., 2003).

En la rama agropecuaria, un ejemplo claro sería la identificación de poblaciones de enterococos aisladas a partir de pastos, resistentes a gentamicina, estreptomycin y en menor medida a vancomicina (Müller et al., 2001).

Generalmente los enterococos son bacterias que se encuentran en una gran variedad de hábitats. Desde el tracto gastro intestinal de seres humanos, aves, reptiles, insectos, hasta plantas, suelo y agua (Koluman et al., 2009). Dada su relación con varios ecosistemas, se explicaría su presencia en pastos y su portación de genes de resistencia al estar en contacto constante con factores estresantes (fertilizantes, pesticidas, aguas tratadas o residuales, etc), que ejercen presión selectiva sobre estas bacterias.

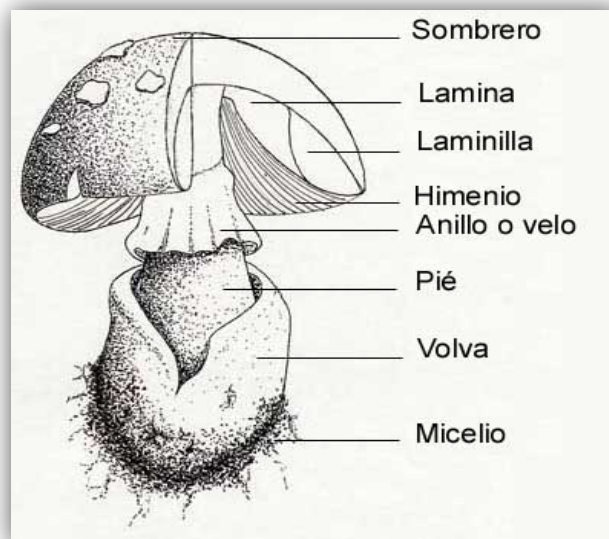
Todos los ejemplos planteados, muestran un panorama general de la dispersión del fenotipo de resistencia en variados ecosistemas y hábitats. Por ello, sería de interés evaluar alimentos que no hayan sido anteriormente analizados y que representen un riesgo potencial por su forma de consumo (cocción deficiente o sin cocción) como por ejemplo, los hongos comestibles.

## 2.6 Hongos: Su importancia y su relación con el fenómeno de resistencia

Los hongos siempre han estado presentes a lo largo del desarrollo de la civilización. Se estima que existen alrededor de 1.5 millones de especies de hongos, pero solo han sido caracterizados cerca de 74,000-120,000 especies (Garibay et al., 2009). En México se conocen al menos 220 especies comestibles. Siempre han tenido un papel fundamental en la dieta del pueblo mexicano, desde el periodo prehispánico hasta la actualidad, quedando registros en los códices indígenas y en las crónicas y escritos de la época de la Colonia. Su consumo incluso data desde hace 2000 años en países asiáticos, principalmente China.

Los hongos presentan una estructura formada por la ramificación y el entrecruzamiento de las hifas del micelio. A partir de este se desarrolla un conjunto de hifas aéreas ramificadas que aumentan de tamaño y se diferencian dando lugar a la formación de un cuerpo denominado seta. Entre ellos se encuentran los hongos comestibles (Curtis et al., 2008)

Los hongos comestibles son heterótrofos por lo que almacenan glucógeno y lípidos en lugar de almidón (plantas), obtienen sus nutrientes de material orgánico muerto, residuos de cosechas (agricultura), madera muerta y desechos de animales. Los hongos silvestres, se conforman por las siguientes estructuras (Figura 14):



**Figura 14. Morfología general de los hongos comestibles**

Sombrero: Fructificación carnosa agaricoide, es decir con un pileo o sombrero (Barbado, 2003).

Himenio: Está situado en la parte inferior del sombrero, formado por laminillas dispuestas a manera de radios, que van desde el pie hasta el borde externo del sombrero. Cuando el hongo es pequeño, el himenio está protegido por una fina membrana llamado velo, unido al sombrero y al pie (Barbado, 2003)

Micelio: Entre las laminillas se encuentran millones de esporas que, cuando germinan, dan lugar a unos hilos, filamentos o hifas que constituyen al micelio (Barbado, 2003)

Pié: Es la parte que brinda soporte al sombrero y su parte inferior esta unida al micelio o filamentos del hongo que crecen en el sustrato (Barbado, 2003).

Su relevancia es expresada tanto desde el punto de vista alimenticio como económico en nuestro país.

Entre sus propiedades como alimento se encuentran sus bajos niveles de grasa, contenido de aminoácidos esenciales, fibra y minerales (K, P, I, Ca, Mn y Fe). El que destaca de otras setas, es el champiñón (*Agaricus bisporus*) por la presencia de vitaminas B1 y B2 y ácido nicotínico. (Garibay et al., 2009)

En el ramo económico, las cadenas productivas de hongos comestibles han crecido en México y llegan a generar hasta 25 mil empleos. Los estudios recientes permitieron identificar que la producción comercial de hongos comestibles, medicinales y funcionales, en 2011, fue cercana a las 62 mil 374 toneladas (Martínez et al., 2011).

Actualmente, la cadena agroalimentaria emergente de los hongos comestibles, funcionales y medicinales en México representa un proceso biotecnológico rentable, controlado, intensivo, eficiente en la utilización de agua, adaptable al cambio climático y desarrollado a pequeña y gran escala, con importantes repercusiones sociales, ecológicas y económicas.

Durante el periodo 2000 a 2011, los investigadores del Colegio de Posgraduados y de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP) desarrollaron investigaciones socioeconómicas para entender las preferencias y percepciones de los consumidores, su nivel de consumo, el comportamiento histórico y actual de los precios, así como el impacto potencial del consumo de los hongos comestibles, funcionales y medicinales en la economía familiar.

Los resultados del estudio indicaron que se incrementó 9.8% el consumo de los hongos comestibles en la región central de México. En el 2003, el 49.4% de los consumidores urbanos manifestó comprar hongos comestibles, independientemente de su nivel social, mientras que en el 2007 la proporción fue del 59.2%. Todo lo anterior muestra la potencialidad de los hongos comestibles tanto en el sector alimenticio como en el económico (Martínez et al., 2011).

Sin embargo, su forma general de consumo (sin cocción) representa un riesgo serio de salud pública para quienes los adquieran. El escenario más probable para el desarrollo y dispersión del fenotipo sería el tracto intestinal. Si las bacterias que constituyen naturalmente a los hongos portan genes de resistencia, la dispersión e interacción del fenotipo de multirresistencia (mediante transferencia horizontal de genes) entre las bacterias presentes en el tracto intestinal (generalmente se encuentran bacterias entéricas que pueden ser patógenas) pueden poner en riesgo la vida de los consumidores.

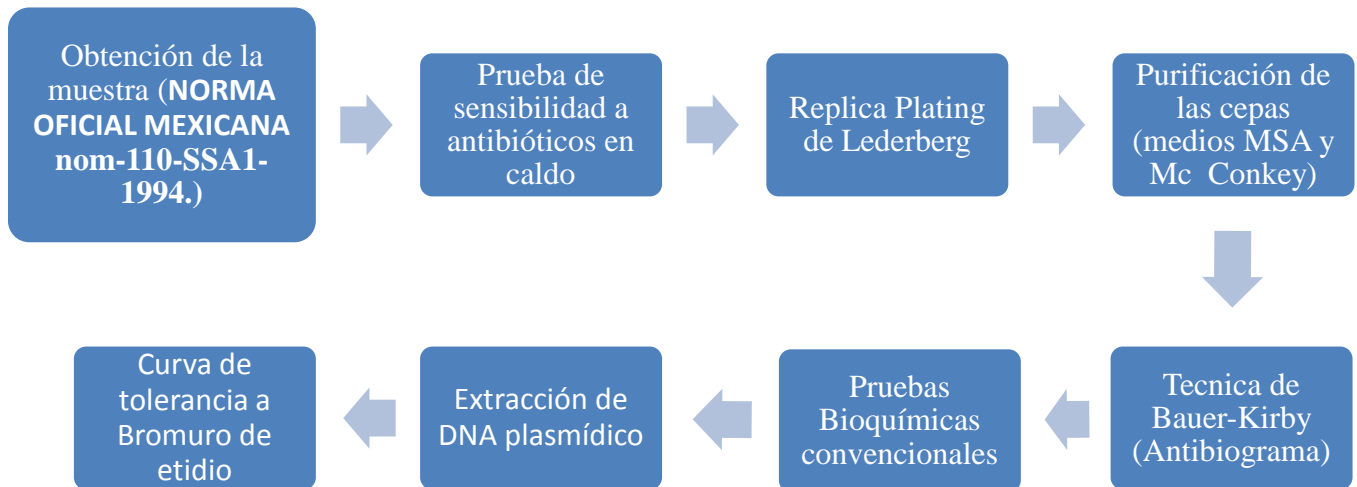
### **3 Objetivos**

- Búsqueda, aislamiento y caracterización de bacterias multirresistentes a antibióticos de setas para consumo humano
- Determinación de la resistencia a antibióticos mediante la técnica de Bauer-Kirby (antibiograma)
- Extracción de ADN plasmídico como posible mecanismo participativo de resistencia en bacterias
- Realizar una curva de tolerancia a bromuro de etidio para evaluar de manera cualitativa la sobreexpresión de bombas de expulsión como mecanismo de multirresistencia.

### **4 Hipótesis.**

Dada la amplia distribución de bacterias multirresistentes a antibióticos encontradas en diversos alimentos para consumo humano, se infiere la posibilidad de encontrar el fenotipo de resistencia bacteriana en diferentes especies de hongos.

## 5 Metodología



### 5.1 Obtención de la muestra para alimentos sólidos

Se pesaron 10 g de la muestra en una bolsa de plástico estéril. Se adicionó un volumen de 90 mL de caldo Luria. Posteriormente, se operó el homogeneizador peristáltico (Stomacher) de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión homogénea.

Una vez homogeneizada la muestra con la solución, se procedió a realizar diluciones de hasta  $10^{-10}$ . Posteriormente se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Así mismo, de cada muestra se eligieron las diluciones de  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  (conforme a la NOM-110) obteniendo un total de 6 cepas.

### 5.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Se incubaron 18 tubos (3 por cada cepa) con ampicilina, ceftriaxona y una mezcla o coctel (utilizando la concentración mínima inhibitorio de cada uno), a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Se eligieron las cepas que crecieron en la mezcla o coctel al desarrollarse en el medio más estresante (medio de cultivo + 2 antibióticos) considerándolas las más interesantes (en términos de multirresistencia) para realización de las siguientes pruebas.

### **5.3 Replica plating de Lederberg**

De cajas previamente incubadas (sin antibiótico) con desarrollo de colonias, se traspasaron a una tela de terciopelo, que a su vez se traspasa a cajas con antibiótico (6 con ampicilina y 6 con ceftriaxona). Se incubaron a 37°C, durante 24 h.

Se realizó un conteo de colonias desarrolladas en el agar con antibiótico y se comparó con el número de colonias desarrolladas en el agar nutritivo sin antibiótico. Con esto se obtuvo el porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos utilizados de la población total original.

### **5.4 Purificación de la muestra**

Se prepararon medios selectivos y diferenciales de agar sal manitol (MSA) para bacterias Gram (+) y agar Mc Conkey para bacterias Gram (-).

Se presentó crecimiento solo en medio Mc Conkey. Posteriormente, se realizaron tinciones de Gram para confirmar su pureza. Una vez verificada ésta, se procedió a la realización de las siguientes pruebas.

### **5.5 Técnica de Bauer-Kirby (Antibiograma)**

Se colocaron en cada caja con agar para antibiótico previamente inoculado, un sensidisco, que contiene una concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico (contienen un total de 12 antibióticos diferentes). Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 24h.

Se midió el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco (>1.5 Sensible al antibiótico, <1.5 Resistente al antibiótico) y se determinó su sensibilidad/resistencia a los diferentes antibióticos.

## 5.6 Pruebas Bioquímicas Convencionales

Las pruebas realizadas fueron las siguientes: prueba de motilidad, RMVP, citrato, indol, catalasa, oxidasa, ureasa, OF, escualina, Kligler y fermentación de los hidratos de carbono.

## 5.7 Extracción de ADN plasmídico

Se elaboró un electroferograma en gel de agarosa a partir de la extracción de plásmido de seis cepas puras utilizando el método de Birnboim y Doly más un marcador de pesos moleculares.

## 5.8 Curva de tolerancia a Bromuro de Etidio (BE) en microorganismos resistentes

Se midió la turbidez de seis cepas previamente resembradas en 3 mL de caldo Luria con el equipo Densimat que ajusta la concentración celular a unidades Mc Farland por el sistema CLSI.

Una vez determinada se ajustó a la concentración deseada ( $5 \times 10^6$  células/mL) por cada tubo. Posteriormente, se agregó a partir de un stock de bromuro de etidio, el volumen necesario para obtener la concentración requerida para cada cepa.

Las concentraciones empleadas de bromuro de etidio fueron las siguientes:

[ ]= 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800  $\mu\text{g/mL}$

En comparación, las siguientes concentraciones de bromuro de etidio fueron empleadas en la cepa sensible (*E. coli* ATCC 25992):

[ ]= 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 500, 600, 700, 800, 820, 830, 840, 850, 860, 870  $\mu\text{g/mL}$



Con un total de 31 tubos por cada cepa y 26 tubos para *E. coli* ATCC 25992 se incubaron a 37°C durante 24 h.



## 6 Resultados y Análisis de resultados

### 6.1 Muestras de Hongos comestibles

Las muestras fueron adquiridas en dos puestos distintos de un mercado popular de la Ciudad de México. Se tomaron 10 g por cada muestra, de acuerdo a la **Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y Dilución De Muestras De Alimentos Para Su Análisis Microbiológico** en condiciones de asepsia, sin ningún tipo de limpieza del hongo anterior a la toma de la muestra. En el Cuadro 1 se observan los tipos de hongos comestibles utilizados.

Muestras	Hongos	Nombre común	Nombre Científico
1		Hongo Escobeta Hongo Clavito Hongo mantecoso	<i>Clavaria botrytis</i> <i>Ludwigia octovalvis</i> <i>Amanita rubescens</i>
2		Champiñon Trompa de cochino Enchilado, trompa roja Gachupin Duraznillo o Amarillo Pambazo	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Russula brevipes</i> <i>Hypomyces lactifluorum</i> <i>Hygrophorus chrysodon</i> <i>Cantharellus cibarius</i> <i>Boletus aestivalis</i>

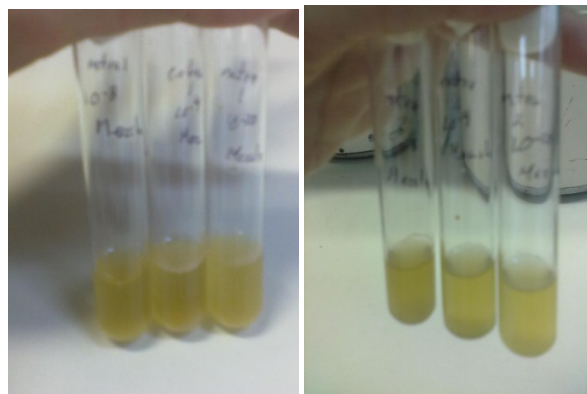
Cuadro 1. Muestras de hongos comestibles

## 6.2 Prueba de Susceptibilidad a antibióticos

Para la realización de esta prueba, se emplearon dos antibióticos (ampicilina y ceftriaxona). Se prepararon dos soluciones (uno por cada fármaco) y una solución que contenía la mezcla de ambos antibióticos. Cada uno de ellos con la concentración mínima inhibitoria (CMI) respectiva.

CMI de ampicilina: 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . CMI de ceftriaxona: 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$

En esta prueba se buscó determinar si las muestras seleccionadas poseían algún grado de tolerancia a antibióticos. El resultado fue claro, las seis muestras fueron capaces de tolerar cada uno de los antibióticos y también a la solución con la mezcla (Figura 15). Por lo que, en primera instancia, se puede decir que las muestras poseen bacterias con cierto grado de resistencia a antibióticos.

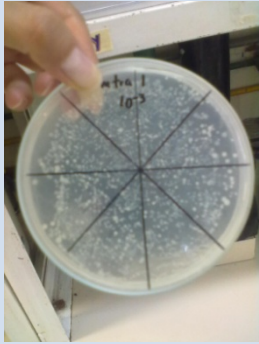
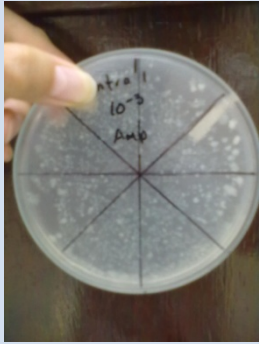



**Figura 15.** Presencia de turbidez en la mezcla de antibióticos (muestras 1- 6).

## 6.3 Determinación porcentual de bacterias multirresistentes en muestras totales (Replica Plating)

En esta prueba se cuantificó la proporción de resistencia de las muestras totales por el método de replica plating al comparar el número de colonias que crecen en un medio general con colonias que se desarrollan en un medio de cultivo más un antibiótico (Cuadro 2). Podemos determinar, al contar y comparar el número de colonias, el porcentaje de resistencia de la población bacteriana original. En el Cuadro 3, se puede observar que el promedio de porcentajes de resistencia fue de aproximadamente 50%. Este dato es

relativamente elevado y a pesar de que posteriormente se determinó que estas bacterias no son patógenas, se puede inferir que pueden actuar como reservorios de genes de resistencia, mismos que pueden generar serios problemas de salud pública.

Muestra	Crecimiento en agar nutritivo sin antibiótico	Crecimiento en agar nutritivo con ampicilina	Crecimiento en agar nutritivo con ceftriaxona
1			

**Cuadro 2. Crecimiento de bacterias resistentes**

Muestras	Sin antibiótico colonias totales (UFC)	Ampicilina colonias totales (UFC)	%Resistencia a ampicilina	Ceftriaxona colonias totales (UFC)	%Resistencia a ceftriaxona
1	~1752	~1216	69.40	~1336	76.25
2	~1608	~1168	72.63	~1280	79.60
3	~1480	~944	63.78	~888	60.00
4	~976	~800	81.96	~488	50.00
5	~1576	~1304	82.74	~712	45.17
6	~8120	~6520	80.29	~4960	61.08

**Cuadro 3. Porcentaje de bacterias resistentes en relación a la población bacteriana total.**

## 6.4 Perfiles de resistencia (Antibiograma)


Mediante el uso de sensidiscos adquiridos comercialmente (*anexo 1*), se pudo determinar la resistencia de las bacterias a cada uno de los 12 antibióticos utilizados.

En el [Gráfico 1](#), se puede observar que los perfiles por cepa se definen en el criterio de resistentes, al encontrarse en su mayoría halos de inhibición inferiores a 1.5 cm ([Cuadro 3](#)), incluso se puede observar la no existencia de halos para ampicilina (Am) y cefalotina (CF). En contraste para cloranfenicol (CPF), todas las cepas fueron susceptibles a este antibiótico (Halo de inhibición >1.5).

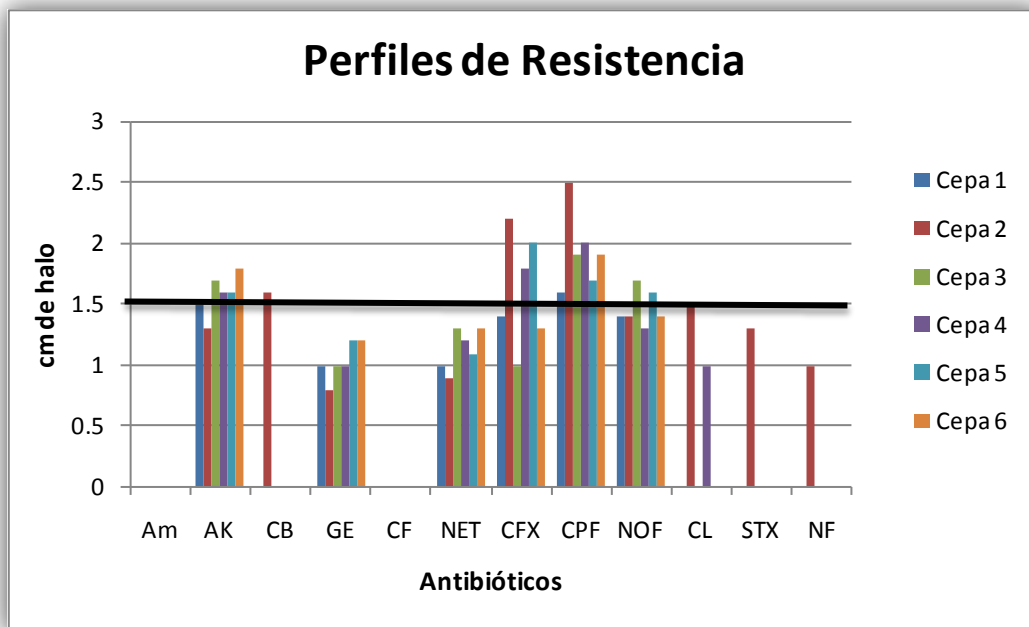
En total, el 77% corresponde a cepas resistentes y el 23% corresponde a cepas sensibles sumando en promedio resistencia a 8/12 antibióticos por cepa ([Gráfico 2](#)). Dado que el criterio de multirresistencia puede ser incluso a partir de 2 antibióticos (dependiendo de la referencia que se consulte), se les puede considerar como cepas multirresistentes.

En el [Gráfico 3](#) se puede observar tanto la sensibilidad como la resistencia de las seis cepas a cada antibiótico; mientras que los antibióticos ampicilina (Am), gentamicina (GE), cefalotina (CF), netilmicina (NET), sulfametoxazol/trimetoprim (STX) y nitrofurantoina (NF), presentaron la mayor ineficacia para inhibir a los microorganismos (halo de inhibición <1.5). cloranfenicol (CPF) y amikacina (AK) fueron los antibióticos más eficientes, el primero inhibió a todas las cepas y el segundo a cinco de las seis cepas.

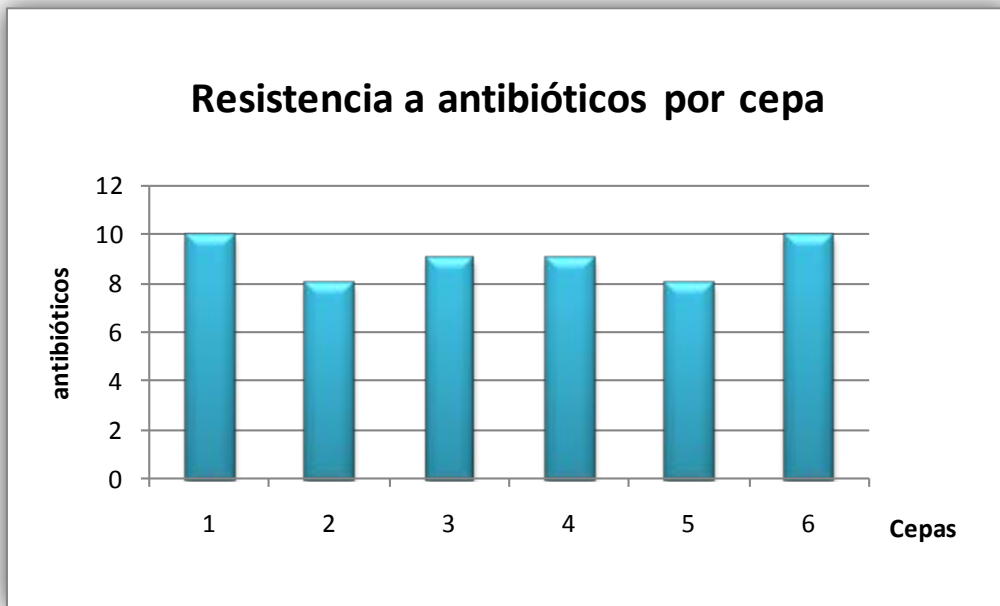
En el caso de las cefalosporinas es importante aclarar que aquellas de generación más reciente presentan mayor eficacia contra bacterias Gram (-). Esto explicaría por qué hubo resistencia a la cefalotina (CF) perteneciente a la 1ª generación, en comparación con la cefotaxima (CFX) perteneciente a la 3ª generación, que fue más eficiente como antibiótico.

Criterio de resistencia de acuerdo al fabricante del material	Figuras (cepas 1, 2 y 3)
<p>Halo de inhibición mayor a 1.5 cm (Halo&gt;1.5). Se le considera una cepa sensible al antibiótico.</p> <p>Halo de inhibición menor a 1.5 cm (Halo&lt;1.5). Se le considera una cepa resistente al antibiótico.</p>	

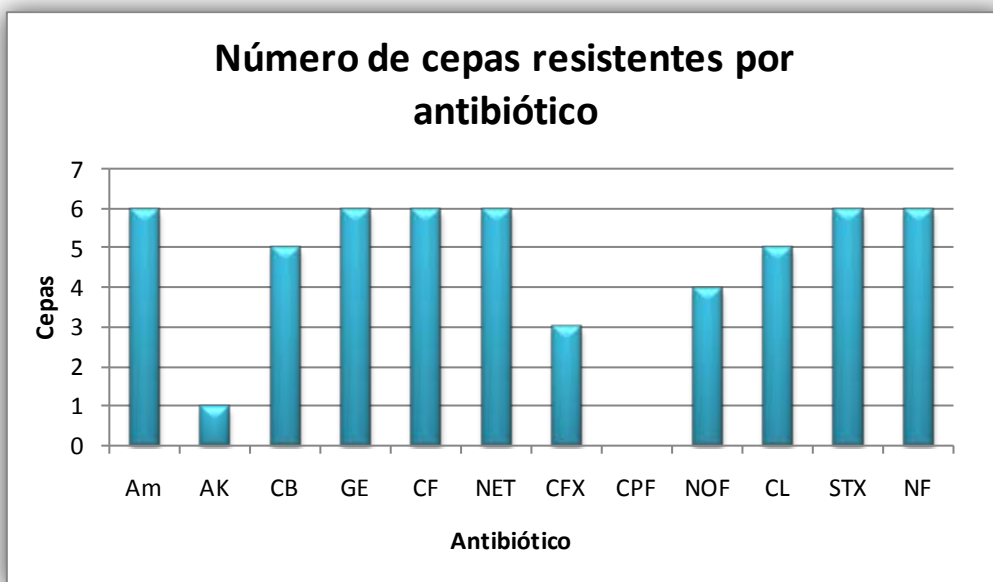
**Cuadro 4. Perfiles de resistencia por cepa**



**Grafico 1. Perfiles de Resistencia**



**Gráfico 2. Resistencia a antibióticos por cepa**



**Gráfico 3. Número de cepas resistentes por antibiótico**

## 6.5 Identificación de cepas

Las pruebas bioquímicas convencionales realizadas por cepa para la identificación de género y especie en bacterias Gram negativas mostraron los siguientes resultados:

Cepa	Género y especie
1	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>
3	<i>Actinobacillus suis</i>
4	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>
5	<i>Flavobacterium aquatile</i>
6	<i>Flavobacterium aquatile</i>

**Cuadro 5. Caracterización de cepas**

## 6.6 Extracción de DNA plasmídico

Se realizó una electroforesis para seis cepas puras más un marcador molecular (fago  $\lambda$  cortado con HIND III).

En la [Figura 16](#), el gel de agarosa muestra que las cepas 1, 2, 3, 5 y 6 presentan una banda cercana a 23.1 kb (marcador molecular) correspondiente al ADN cromosómico. Dado que no hay presencia de una banda inferior a 23.1 que correspondería a ADN plasmídico, se concluye que es probable que las cepas carezcan de dicho elemento genético.



**Figura 16. Electroferograma en gel de agarosa**

### **6.7 Curva de tolerancia a bromuro de etidio (BE)**

Se puede atribuir parte de la multirresistencia a sistemas inherentes de las bacterias, como la producción de enzimas ( $\beta$ -lactamasas) que degradan antibióticos  $\beta$ -lactámicos como cefalosporinas y penicilinas y también a la sobreexpresión de bombas de expulsión. Por ello, se decidió determinar cualitativamente la posible sobreexpresión de las bombas de expulsión mediante la capacidad de la bacteria de expulsar elementos tóxicos (del citoplasma al exterior de la célula), verificando su crecimiento a diferentes concentraciones de bromuro de etidio. Se prepararon 31 concentraciones en orden ascendente (ver metodología). El experimento se realizó en las seis cepas de estudio adicionando un control (cepa sensible a antibióticos *E. coli* ATCC 25992).

Se utilizó Agar Mc Conkey para asegurar que las bacterias son capaces de permanecer viables en un medio ambiente adverso utilizando una estría simple para cada



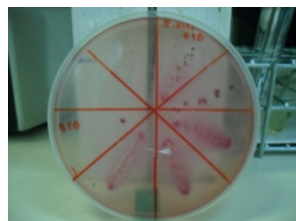
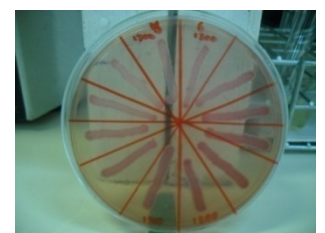
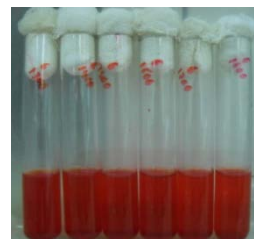
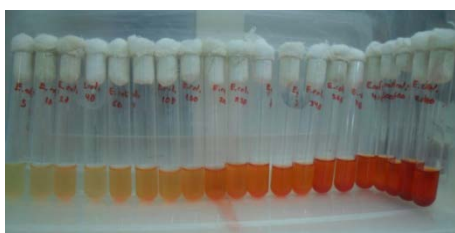
concentración realizada en todas las cepas, evitando de esta manera los resultados falsos-positivos al observarse desarrollo en los tubos, debido fundamentalmente a la turbidez generada por el BE a concentraciones altas (Figura 17) y, de esta forma obtener un resultado confiable.

Cepa sensible (*E. coli*): Fue capaz de tolerar una concentración de 860 µg/mL de BE. A concentraciones superiores no hubo crecimiento (Gráfico 4).

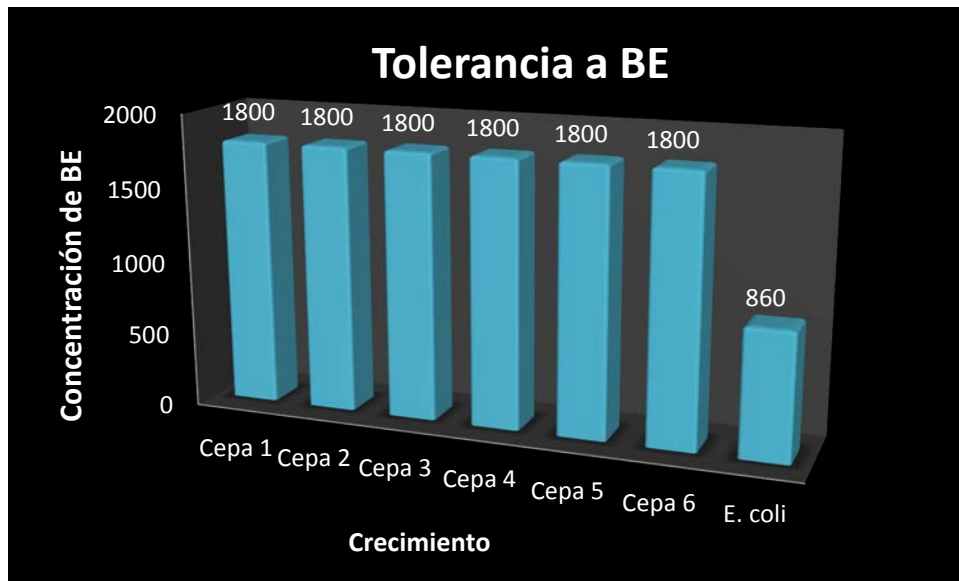
Cepas de estudio: a concentración de 1800 µg/mL de BE, las 6 cepas siguen siendo viables (Gráfico 4). Sin embargo, esta concentración no es la máxima tolerada por estas, al presentar desarrollo significativo en las cajas con agar (estrias), (Figura 17) se infirió por tanto su resistencia a concentraciones superiores de BE. No se realizaron porque a la concentración de 1800 µg/mL de BE, ya denotaban claramente su capacidad de expulsión de este elemento tóxico (el doble en comparación con la cepa sensible), principal objetivo de esta prueba.

Cepa 6 crecimiento a 1800 µg/mL de BE

*E. coli* crecimiento a 860 µg/mL



**Figura 17. Crecimiento en BE y Agar McConkey**



**Grafico 4. Curva de tolerancia a BE**

Al determinarse de forma cualitativa la sobreexpresión de las bombas de expulsión, se infiere que se encuentran sobreexpresadas al doblar fácilmente la concentración que tolera una cepa sensible a un compuesto tóxico (BE) siendo ésta incapaz de expulsarlo.

## 7 Conclusiones

- ✚ Se lograron aislar y caracterizar bacterias multirresistentes a antibióticos en muestras de hongos comerciales. Las poblaciones bacterianas totales presentaron, en promedio, 50% de resistencia a los antibióticos ampicilina y ceftriaxona (prueba de replica plating).
- ✚ Las cepas Gram negativas aisladas presentaron un perfil de multirresistencia a entre 8-12 antibióticos de manera simultánea.
- ✚ En total, fueron caracterizados 4 géneros de *Flavobacterium sp*, un género de *Acinetobacter sp* y un género de *Actinobacillus sp*.
- ✚ No se encontraron plásmidos, generalmente asociados al fenotipo de resistencia.
- ✚ Los resultados de la curva de resistencia a bromuro de etidio mostraron de manera cualitativa la sobreexpresión de las bombas de expulsión. De esta forma, se corrobora el papel crítico que juegan las bombas en el fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos.

## **Perspectivas**

Dado que solo se determinó cualitativamente la sobre expresión de bombas de expulsión, es necesario realizar estudios que nos permitan determinar cuantitativamente la sobre expresión de dichas bombas. Además, es recomendable realizar estudios de identificación de cuál o cuáles son las bombas principalmente involucradas en el desarrollo del fenotipo de multirresistencia.

## 8 Bibliografía

- Barbado, J. Hongos comestibles su empresa de fungicultura. Primera Edición. Editorial Albatros. Argentina. 2003. pp 18-19.
- Barnes, A., Massarini, A. Biología. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. D.F. México. 2008. pp 533-534.
- Bower, C., Daeschel, M. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*. 1999. 50: 33-44.
- Cancho Grande, B., García Falcón, M., Sima Gándara, J. El Uso de los Antibióticos en la Alimentación Animal: Perspectiva Actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2000. 3: 39-47.
- Estados Unidos Departamento de Agricultura. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO. 2004. [En línea].  
  
Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s02.htm> [Último acceso el 2 de julio de 2013]
- Fedoroff, N. Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution. Editorial Wiley-Blackwell. USA. 2013. pp 3-12.
- Forbes, D., Sahm, I., Weissfeld, A. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. D.F. México. 2007. pp 15, 163.
- García, M., Quintero, R. y Munguía, A. *Biotecnología Alimentaria*. Quinta reimpresión. Editorial Limusa Editores. D.F. México. 2004. pp. 353.
- Garibay, R., Cordova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estrada, A., Kong, A. Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for

indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*. 2009. 258: 122-131.

- Ghosh, S., LaPara, T. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria soil bacteria. *The ISMWE Journal*. 2007. 1: 191-203.
- Giamarellou, H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010. 365: 550-554.
- Grangela, C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*. 2011. 44: 1029-1035.
- Hall, R., Collis, C. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*. 1995. 15: 593-600.
- Hur, J., Jawale, C., Hwa lee, J. Antimicrobial resistance of salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International*. 2012. 45: 819-830.
- Jawetz, I. Genética microbiana. *Microbiología médica*. Manual Moderno. D.F. México. 2008. pp. 101-123.
- Jawetz, I. Quimioterapia antimicrobiana. *Microbiología médica*. Manual Moderno. D.F. México. 2008. pp. 171-205.
- Kalac, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms. *A Review. Food Chemistry*. 2009. 113: 9-16
- Klevens, R., Morrison, M. Desperately Seeking New Antibiotics. *Science*. 2007. 321: 1644-1645.
- Koluman, A., Sariye, L., Pinar, F. Occurrence and microbial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*. 2009. 20: 281-283.

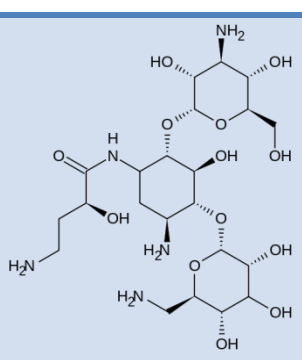
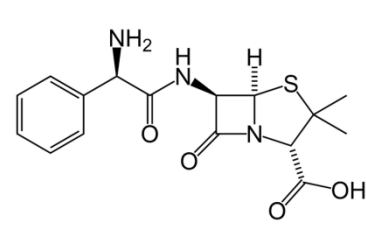
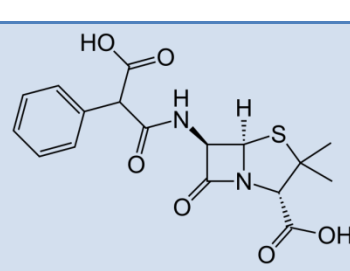
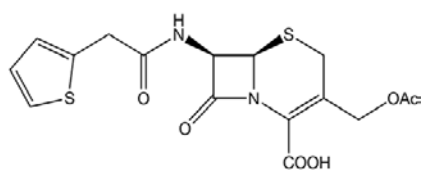
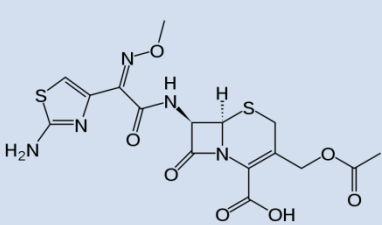
- Langsrud, S., Singh, M., Heir, E., Holck, A. Bacterial disinfectant resistance- a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003. 51: 283-290.
- Lavilla, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*. 2013. 161: 97-106.
- Lopez, M., Barcenilla, F., Amaya, R., Garnacho, J. Antibiotic multiresistance in critical care units. *Medicina Intensiva*. 2010. 35: 41-53.
- Mac Faddin, J. F. Gram Negativas. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Panamericana. Edo de México. 1993. pp. 227-258.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. 2011. Capítulo 6.1 pp 20.
- Michael N, M., Stuart B, L. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007. 128: 1037-1050.
- Michael, J., Alibert, S., Handzlick, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., Kononowicz, K., Pages, J. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS letters*. 2011. 585: 1682-1690.
- Moller, F. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Antimicrobial Agent*. 1999. 12: 279-285.
- Muñoz, I., Gomez, M., Aguera, A., Garcia, J., Molina, A., Fernández, A. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trends*. 2009. 28: 676-694.

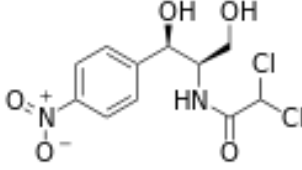
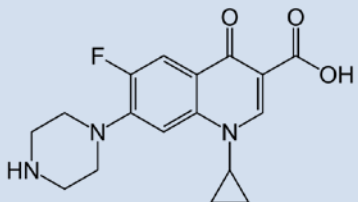
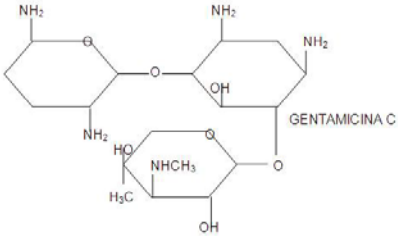
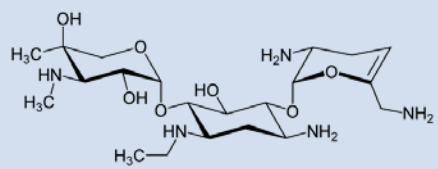
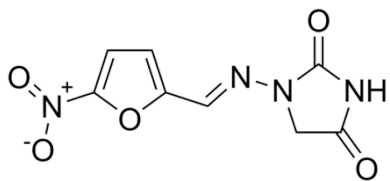
- Nikaido, H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu. Rev. Bioche.* 2009. 78: 119-146.
- Normark, B., Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine.* 2002. 252: 91-106.
- Orman, B. La Resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión. *Revista de la Facultad de Odontología (UBA).* 2006. 21: 13-19.
- Pérez, E. y Herrera, T. *Iconografía de Macromicetos de México.* Distrito Federal: UNAM. 1991. pp 11.
- Roger, G. *Antibiotic and Chemotherapy.* Ninth edition. Toronto: Elsevier Saunders. 2010. pp. 24-35.
- Salisbury, J., Nicholls, T., Lammerding, A., Turnidge, J., Nunn, M. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *Antimicrobial Agents.* 2002. 20: 153-164.
- Smole, S., Kurincic, M., Klancnik, A., Mavri, A. Campylobacter and its multi-resistance in the food chain. *Food Science & Technology.* 2011. 22: 91-98.
- Taubes, G. Desperately Seeking New Antibiotics. *Science.* 2008. 321: 1644-1645.
- White, D. The Isolation of Antibiotic-Resistant Salmonella from Retail Ground Meats. *The New England Journal of Medicine.* 2001. 345: 1147-1154.
- Zamora, M., Pascual, C. Natural production of wild edible mushrooms in the southwestern rural territory of Mexico City, Mexico. *Forest Ecology and Management.* 1995. 72: 13-20.

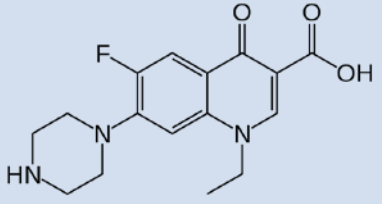
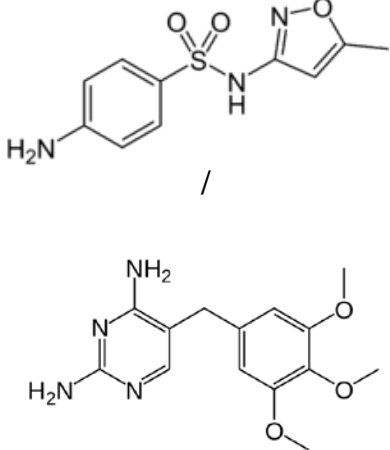


## 9 Anexos

### Anexo I

Nombre del antibiótico	abreviatura	Tipo y usos del antibiótico	Estructura química
<b>Amikacina</b>	AK	Tipo: aminoglucósido, Uso: contra bacterias Gram(-)	
<b>Ampicilina</b>	AM	Tipo: $\beta$ -lactámico, Uso: infecciones respiratorias	
<b>Cabernicilina</b>	CB	Tipo: Carboxipenicilina, Uso: genitourinaria	
<b>Cefalotina</b>	CF	Tipo: Cefalosporina, primera generación	
<b>Cefotaxima</b>	CFX	Tipo: Cefalosporina, tercera generación, Uso: infecciones respiratorias	

<b>Cloranfenicol</b>	CPF	Tipo: Inhibidor de síntesis de proteínas, Uso: cepas gastrointestinales	
<b>Ciprofloxacina</b>	CL	Tipo: Fluoroquinolona, Uso: enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación	
<b>Gentamicina</b>	GE	Tipo: Aminoglucósido, Uso: infecciones graves por bacterias G <sup>-</sup> no susceptibles a otros fármacos	
<b>Netilmicina</b>	NET	Tipo: aminoglucósido, Uso: infecciones urinarias y sistémicas	
<b>Nitrofurantoina</b>	NF	Tipo: inhibición de la pared celular, Uso: infecciones urinarias	

<b>Norfloxacin</b>	NOF	Tipo: Fluoroquinolona, Uso: enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación	
<b>Sulfametoxazol / trimetoprima</b>	STX	Tipo: Sulfonamida, Uso: infecciones urinarias y sistémicas	

**Cuadro 6. Características de los antibióticos**

**Anexo II**




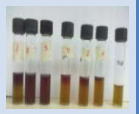


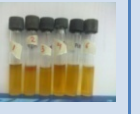
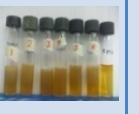

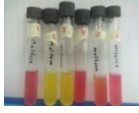
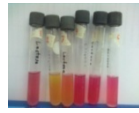
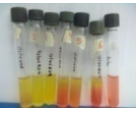
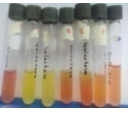
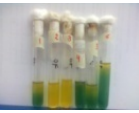

**Pruebas bioquímicas individuales por cepa**

Las pruebas bioquímicas convencionales realizadas para cada cepa mostraron los siguientes resultados:

Pruebas Realizadas	Citrato	Bilis Escualina	Manitol	MIO	SIM	Kligler	RMVP		Caldo Urea
Cepas									
1	+	-	-	+	-	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	+	+	-	-
3	+	+	+	+	-	+	-	-	-
4	+	-	-	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	-	+	-	-	-
6	+	-	-	+	-	+	-	-	-

Pruebas realizadas	Fermentación de carbohidratos				OF		Catalasa	Oxidasa
	Maltosa	Lactosa	Glucosa	Galactosa	Oxidación	Fermentación		
<b>Cepas</b>								
<b>1</b>	-	-	+	-	+	-	+	+
<b>2</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>	-	-	+	-	+	-	+	+
<b>5</b>	-	-	+	+	+	-	+	+
<b>6</b>	-	-	+	+	+	-	+	+

**Cuadro 7. Resultados de las Pruebas bioquímicas**

Citrato	Billis Escualina	Manitol	MIO	SIM	Kligler	RMVP		Urea
								
Fermentación de carbohidratos					OF		Catalasa	Oxidasa
Maltosa	Lactosa	Glucosa	Galactosa	Oxidación	Fermentación			
						---	---	

**Cuadro 8. Pruebas bioquímicas**

### Anexo III

<b>E. coli Colección americana de tipos de cultivo (ATCC) 25992</b>	
<b>Designación de la cepa</b>	FDA cepa Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]
<b>Aislamiento de la cepa</b>	Aislamiento clínico
<b>Cepa tipo</b>	no
<b>Propiedades antigénicas</b>	Serotipo 06, biotipo

**Cuadro 9. Caracterización de la cepa E. coli ATCC 25992**