



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Prevalencia de resistencia bacteriana en becerras alimentadas con leche con y sin  
antibiótico.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable.

Presenta:

M. V. Z. María Magdalena Espinosa Muñoz

Dirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez.

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez.  
Presidente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales.  
Secretario

Dr. Feliciano Milián Suazo.  
Vocal

Dr. José Luis Romano Muñoz.  
Suplente

M.C. José Eduardo Salazar Vázquez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017  
México



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE**

Prevalencia de resistencia bacteriana en becerras alimentadas con leche con y sin  
antibiótico.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

**M.V.Z. María Magdalena Espinosa Muñoz**

Dirigida por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez.

Asesores

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Feliciano Milián Suazo.

Dr. José Luis Romano Muñoz.

M.C. José Eduardo Salazar Vázquez.

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017  
México

## AGRADECIMIENTOS

A los Ranchos Rincón del Paraíso y Fuentezuelas por haber brindado todas las facilidades para llevar a cabo esta investigación.

A los profesores y todo el personal docente de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## RESUMEN

La leche es uno de los alimentos más completos, cuyo uso en la alimentación humana ha ido en aumento, por lo que en la crianza de becerras se han buscado alternativas de alimentos para su desarrollo. Una opción ha sido el uso de leche de vacas tratadas, esta leche contiene residuos de antibióticos y es posible que pudiera causar una mayor prevalencia de la resistencia bacteriana. La finalidad de esta investigación fue evaluar el impacto en la crianza de becerras alimentadas de leche con residuos de antibióticos, acidificada y becerras criadas con leche sin antibióticos sobre la prevalencia de resistencia bacteriana a antibióticos en becerras. Para dicho estudio se llevó a cabo un seguimiento en dos unidades de producción láctea durante el período de crianza de las becerras, en una de ellas se utilizó la leche con residuos de antibióticos de las vacas en tratamiento (LCA), y en la otra se alimentó con leche sin residuos de antibióticos (LSA). El muestreo de heces se llevó a cabo a los 7, 15, 30 y 50 días promedio de edad de las becerras. La resistencia bacteriana está mediada por elementos genéticos móviles, por lo que se escogieron el Integrón 1 y el plásmido bla-CTX-M-2. El análisis del ADN obtenido de las muestras de heces se realizó por PCR punto final y la visualización del ADN y los productos se llevó en geles de agarosa al 2%. La prevalencia de la resistencia bacteriana para el grupo LCA inicialmente fue del 45% para Integrón 1 y de 30% en bla-CTX-M-2, mientras el grupo LSA presentó un 45% y 20% de resistencia bacteriana al Integrón 1 y CTX-M-2, respectivamente. Posteriormente se incrementó la prevalencia en ambos integrones; sin embargo, el grupo LCA presentó mayor prevalencia de resistencia bacteriana. Al final en la 4ª muestra en el caso del Integrón 1 se mantuvo con una prevalencia del 100% en las becerras alimentadas LCA y de 89% en el grupo LSA. En cuanto al CTX-M hubo una disminución en la prevalencia al 0% en LCA y al 10% en LSA. Los tratamientos antibióticos aplicados durante la crianza fue un total de 19 becerras tratadas (95%) en el grupo alimentado LCA y 17 becerras (85%) en LSA. La mortalidad fue de 0% en el lote criado con LCA y del 5% en el grupo alimentado LSA. La ganancia diaria de peso (GDP)  $528 \text{ g} \pm 0.17$  y el peso al destete fueron de  $70.95 \text{ g} \pm 11.26$  del grupo LCA en comparación con becerras alimentadas LSA la ganancia diaria de peso de  $792 \text{ g} \pm 0.10$  y peso al destete:  $92.05 \text{ g} \pm 4.45$ , con una diferencia estadística significativa en donde el grupo LSA presenta una menor prevalencia de resistencia bacteriana. La resistencia bacteriana mediante la identificación de integrón 1 fue observada en becerras alimentadas con leche con y sin antibióticos. No obstante, la prevalencia de resistencia bacteriana a antibióticos observada con respecto al Integrón 1, fue mayor en las becerras alimentadas con leche con residuos de antibióticos, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

**Palabras clave:** becerras, resistencia bacteriana.

## SUMMARY

Milk is one of the most complete foods, whose use in human feeding has been increasing, so that in the milk feeding of calves, food alternatives for their development have been sought. An option has been to use milk from treated cows, this milk contains antibiotic residues and it is possible that it could cause a higher prevalence of bacterial resistance. The purpose of this investigation was to assess and impact rearing calves fed with milk antibiotic residues, acidified milk and calves reared without antibiotics on the prevalence of bacterial resistance to antibiotics. This study was carried out a follow-up in two milk production units during the milk feeding period of the calves, in one of them the milk was used with antibiotic residues of the cows being treated (LCA), and on the other, it was fed with milk without antibiotic residues (LSA). Stool sampling was carried out at 7, 15, 30 and 50 days of age average of the calves. Bacterial resistance is mediated by mobile genetic elements, so Integron 1 and plasmid bla-CTX-M-2 were chosen as a bacterial resistance markers. DNA extraction was obtained from the stool samples and it was performed an endpoint PCR; the visualization of the DNA and PCR products was done in 2% agarose gels. Bacterial resistance prevalence for the LCA group was initially 45% for Integrón 1 and 30% for bla-CTX-M-2, while LSA group had 45% and 20% for bacterial resistance to Integrón 1 and CTX -M-2 respectively. Subsequently it is increment or prevalence to MBOs Integrons; however, the LCA group had a higher prevalence of bacterial resistance. Finally, last sampling showed that Integrón 1 had 100% prevalence in LCA group and 89% in LSA group. However, CTX-M decreased prevalence to 0% in LCA and 10% in LSA. Antibiotic treatments applied during milk feeding were 19 treated calves (95%) in the LCA fed group and 17 calves (85%) in LSA. Mortality was 0% in the LCA-raised batch and 5% in the LSA fed group. Daily weight gain (GDP) was  $528 \text{ g} \pm 0.17$  and weaning weight was  $70.95 \text{ g} \pm 11.26$  in calves fed with LCA, in contrast calves fed with LSA had a daily weight gain of  $792 \text{ g} \pm 0.10$  and weaning weight of  $92.05 \text{ g} \pm 4.45$ , in which a significant statistical difference was observed in LSA group, which had a lower prevalence of bacterial resistance. Bacterial resistance by identifying Integron 1 was observed in calves fed with milk without antibiotics. However, the higher prevalence of bacterial resistance to antibiotics with Integron 1 was observed in calves fed with antibiotic residues milk, in both cases the difference was not statistically significant.

**Keywords:** calves, bacterial resistance.

<b>ÍNDICE</b>	<b>pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	5
SUMMARY .....	6
I.- INTRODUCCIÓN. ....	1
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Crianza de becerras. ....	3
2.2 Calostro y leche.....	4
2.3 Fisiología digestiva del pre rumiante. ....	7
2.3.1 Digestión de la leche. ....	10
2.4 Microbiota gastrointestinal.....	11
2.5 Alimentación de la becerro. ....	14
2.6 Uso de leche antibiótica. ....	14
2.7 Antimicrobianos.....	15
2.8 Resistencia bacteriana. ....	18
2.9 Genoma bacteriano.....	21
2.9.1 Mecanismos de la resistencia bacteriana.....	21
2.9.2 Elementos genéticos implicados en la resistencia bacteriana.....	23
2.10 Sanitización de la leche.....	27
2.10.1 Pasteurización.....	27
2.10.2 Sanitización por rayos ultravioleta.....	28
2.10.3 Acidificación de la leche. ....	29
III.- JUSTIFICACIÓN. ....	32
IV.- HIPÓTESIS.....	33
V.- OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo general. ....	34

5.2 Objetivo específico.....	34
VI.- METODOLOGÍA.....	35
6.1 Lugar experimental.....	35
6.2 Animales experimentales y manejo.....	35
6.3 Muestreo.....	38
6.3.1 Toma de muestras.....	38
6.4 Técnicas moleculares.....	38
6.4.2 Amplificación por PCR en punto final de resistencia bacteriana.....	39
6.4.3.- Visualización de DNA de los productos de PCR en geles de agarosa.....	42
6.4.5 Análisis estadístico.....	43
6.4.6. Residuos biológicos.....	43
VII.- RESULTADOS.....	44
VIII.- DISCUSIÓN.....	51
IX.- CONCLUSIONES.....	55
X.- LITERATURA CITADA.....	56
XI.- Anexos.....	68
Anexo 1. Acidificación de la leche.....	68
Anexo 2. Amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	69

ÍNDICE DE CUADROS	pág.
1- Ocurrencia de enteropatógenos comunes en becerras. ....	4
2- Composición aproximada del calostro y de la leche en ganado Holstein. ....	5
3- Composición promedio de la leche de diferentes razas bovinas.....	6
4- Composición promedio de los nutrientes básicos de la leche de cabra, oveja y vaca. ....	6
5- Capacidades relativas de las divisiones del estómago del ternero en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica .....	10
6- Clasificación de los grupos bacterianos que colonizan el rumen del nacimiento al destete. ....	13
7- Principales mecanismos y sitios de acción de los principales antibióticos.....	17
8- Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes. ....	18
9- Nivel de pH óptimo y nivel de pH para la inactivación/inactividad de distintas bacterias de interés en la industria lechera. ....	30
10- Primers usados en este estudio. ....	40
11- Mezcla de reactivos para amplificación de PCR en punto final.....	41
12- Ciclo de amplificación de PCR punto final para la secuencia de Integrón 1 ..	41
13- Ciclo de amplificación de PCR punto final para la secuencia bla-CTX-M-2 ...	42
14- Peso al nacimiento, peso al destete y ganancia diaria de peso de las becerras alimentadas con leche con antibiótico y sin antibiótico en el período de crianza. .	44
15- Tratamientos y mortalidad de las becerras alimentadas con leche con antibiótico y sin antibiótico durante el período de crianza .....	45



16 - Prevalencia de la resistencia bacteriana, positivas a Integrón 1, bla-CTX-M de las becerras Holstein a las diferentes edades durante la crianza.....	48
17- El riesgo de presentar resistencia bacteriana a antibióticos, de acuerdo con la presencia de Integrón 1 y bla-CTX-M-2 .....	49

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
1- Relación de los compartimentos gástricos de la becerro .....	8
2- Representación esquemática de la estructura básica de un integrón .....	26
3- Alojamiento de las becerros en el área de crianza.....	36
4- Alojamiento de las becerros en el área de crianza .....	37
5- Prevalencia de los animales con resistencia bacteriana .....	47

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## I.- INTRODUCCIÓN.

El rápido aumento de la población y la creciente urbanización en México ha incrementado la demanda de alimentos de origen animal. Esto ha promovido un aumento en el consumo de la leche, incorporando un cambio en los hábitos de consumo hacia productos que contribuyan a mejorar las condiciones de alimentación y salud de la población. En la producción lechera, además de la leche, se obtienen otros productos como son quesos, yogures y leches industrializadas. En nuestro país se calcula que el consumo anual por persona en promedio es de 97 kg de leche (Secretaría Economía México, 2012).

En México la producción de leche ocupa el tercer lugar, dentro de la industria pecuaria productora de alimentos y la producción láctea se ha incrementado a través de los años; sin embargo, aunque la producción lechera ha ido en aumento año con año, no es autosuficiente para cubrir los requerimientos de leche de nuestra población y ha sido necesario importar la leche para cubrir dichos requerimientos. Aproximadamente se estima que la producción nacional cubre el 45.3% de las necesidades del país y el 54.7% es cubierto por las importaciones de leche y los diferentes productos lácteos (SAGARPA septiembre 2016). Por lo que, la cría de becerras para reemplazo debe hacerse de la manera más eficiente para mejorar la productividad del sector y así satisfacer la demanda del mercado.

La becerro que actualmente se encuentra en alguna etapa del proceso de crianza, en un período de 2 años se convertirá en una vaca en fase de producción. Por lo que la cría de becerras para reemplazo es, la operación más trascendente en la ganadería lechera, ya que es la etapa de mayor vulnerabilidad debido a que el mayor índice de mortalidad se presenta en este período, principalmente en el primer mes de vida. En la mayoría de los hatos lecheros, del 20% al 30% de los animales en producción se desechan, lo cual significa que se debe contar con suficientes

reemplazos para mantener constante el número de cabezas en el hato adulto (Gasque, 2008).

La leche entera es el mejor alimento para las becerras, por su riqueza en componentes nutritivos altamente asimilables, pero debido a su costo y uso en la alimentación humana se han buscado alternativas con sustitutos lácteos, los cuales no siempre reúnen los mejores componentes alimenticios (Garzón, 2007). Por otro lado, la leche de vacas tratadas puede ser dada a las terneras; sin embargo, existen estudios que reportan que los residuos de antibióticos pueden propiciar una selección de bacterias resistentes, ocasionando que los tratamientos con base en antibióticos que se dan en la etapa de crianza sean menos efectivos a través del tiempo (Blanco, 2012). Además, los antimicrobianos presentes en la leche pueden inducir alteración de la microbiota intestinal y desarrollo de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos (Ashraf *et al.*, 2009). La presente investigación tuvo como finalidad evaluar la prevalencia de excreción de bacterias resistentes a antibióticos en heces, en becerras alimentadas con leche con y sin residuos de antibióticos.

## II.- REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1 Crianza de becerras.

Una de las prácticas más importantes en la crianza de becerras es suministrar el calostro de primera calidad dentro las primeras horas de haber nacido (Van Horn *et al.*, 1999) y durante los tres primeros días (Radostis *et al.*, 2000). Este manejo es vital, para proporcionarle inmunidad pasiva contra los microorganismos comunes y patógenos del medio ambiente que le rodea (Van Horn *et al.*, 1999), además de un alto nivel de vitaminas liposolubles y aminoácidos esenciales (Morrow *et al.*, 1980).

A pesar de tener un buen manejo, las becerras están en constante desafío con el medio ambiente y pueden enfermarse, siendo las diarreas, neumonías y septicemia, las principales enfermedades de mayor incidencia en esta etapa (Hussain, 2011), dentro de estas, las diarreas son la principal causa de muerte (Radostis *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2006). Los agentes causales de diarreas más comunes en becerras se muestran en el Cuadro 1, en donde *Escherichia coli* es de los primeros (Radostis *et al.*, 2000).

**Cuadro 1- Ocurrencia de enteropatógenos comunes en becerras.**

<b>Agente causal</b>	<b>Edad de la becerro (días)</b>
<b>Enterotoxigénica <i>E. coli</i> (ETEC)</b>	<3
<b><i>Escherichia coli</i> (Adherente - difusa)</b>	20 – 30
<b>Rotavirus</b>	5 – 15
<b>Coronavirus</b>	5 – 21
<b>Otros virus (DVB, parvovirus)</b>	14 – 30
<b><i>Cryptosporidium</i></b>	5 – 35
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	5 – 42
<b><i>Clostridium perfringens</i> (B y C)</b>	5 – 15
<b><i>Eimeria</i> spp.</b>	>30

(Radostis *et al.*, 2000)

## **2.2 Calostro y leche.**

El calostro es la secreción obtenida de la glándula mamaria durante el período comprendido de 5 días antes a 5 días después del parto, contiene un alto contenido de inmunoglobulinas (anticuerpos), células somáticas, cloruro, presencia de eritrocitos y cuyo color va del amarillo al rosado (NOM 155 SCFI 2012). El calostro es esencial para las becerras, ya que tiene un efecto protector por la transferencia de inmunidad pasiva a través de los anticuerpos, los cuales son absorbidos en las primeras horas después del nacimiento (Morrow *et al.*, 1980; Van Horn *et al.*, 1999). Por otra parte, el calostro contiene un alto nivel de grasa soluble, vitaminas y aminoácidos esenciales en comparación con la leche (Cuadro 2) y además su composición cambia en pocos días (Morrow *et al.*, 1980).

**Cuadro 2- Composición aproximada del calostro y de la leche en ganado Holstein.**

<b>Constituyente</b>	<b>Calostro Día 1 (%)</b>	<b>Calostro Día 2 y 3 (%)</b>	<b>Leche (%)</b>
<b>Grasa</b>	6.0	3.5	3.50
<b>Sólidos no grasos</b>	22.3	12.5	8.80
<b>Proteína</b>	18.8	7.5	3.25
<b>Inmunoglobulinas</b>	13.1	1.0	0.09
<b>Lactosa</b>	2.5	4.0	4.60

(Morrow, 1980)

La leche es un líquido segregado por la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría y tiene la función de satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido (Alais, 2003). Por su composición química, la leche es uno de los fluidos más completos que existen, entre sus componentes el agua representa un 82% a 89.5% lo cual depende de la especie. Los sólidos totales de la leche alcanzan habitualmente la cifra de 12% hasta un 13% y los sólidos no grasos muy próximos al 9% (Agudelo y Bedoya, 2005). La proteína de la leche se clasifica en dos grandes grupos: caseínas (80%), la caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$  caseína) que es la proteína característica de la leche por no encontrarse en otros alimentos y las proteínas séricas (20%), donde encontramos a la albúmina y las globulinas (Alais, 2003). Además, la leche es una buena fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa (disacárido formado por glucosa y galactosa) constituyen un importante aporte energético (Agudelo y Bedoya, 2005). Por todo esto la leche es el mejor alimento para la crianza de las

becerras. No obstante, la composición de la leche varía principalmente por raza y especie animal, momento de la lactancia, clima y alimentación (Calvache, 2012). En los cuadros 3 y 4 se muestran los promedios de la composición de la leche de algunas razas de bovinos y otras especies animales.

**Cuadro 3- Composición promedio de la leche de diferentes razas bovinas.**

<b>Especie</b>	<b>Grasa %</b>	<b>Proteína %</b>	<b>Lactosa %</b>	<b>Cenizas %</b>
<b>Ayrshire</b>	4.1	3.6	4.7	0.7
<b>Suizo</b>	4.0	3.6	5.0	0.7
<b>Holstein</b>	3.5	3.1	4.9	0.7
<b>Jersey</b>	5.5	3.9	4.9	0.7
<b>Cebú</b>	4.9	3.9	5.1	0.8

(Pérez, 1978)

**Cuadro 4- Composición promedio de los nutrientes básicos de la leche de cabra, oveja y vaca.**

<b>Composición</b>	<b>Cabra</b>	<b>Oveja</b>	<b>Vaca</b>
<b>Grasa %</b>	3.8	7.9	3.6
<b>Sólidos no grasos %</b>	8.9	12.0	9.0
<b>Lactosa %</b>	4.1	4.9	4.7
<b>Proteína %</b>	3.4	6.2	3.2
<b>Albúmina, globulina %</b>	0.6	1.0	0.6
<b>Nitrógeno no proteico %</b>	0.4	0.8	0.2
<b>Cenizas %</b>	0.8	0.9	0.7
<b>Calorías /100 ml</b>	70	105	69

(Park *et al.*, 2007)



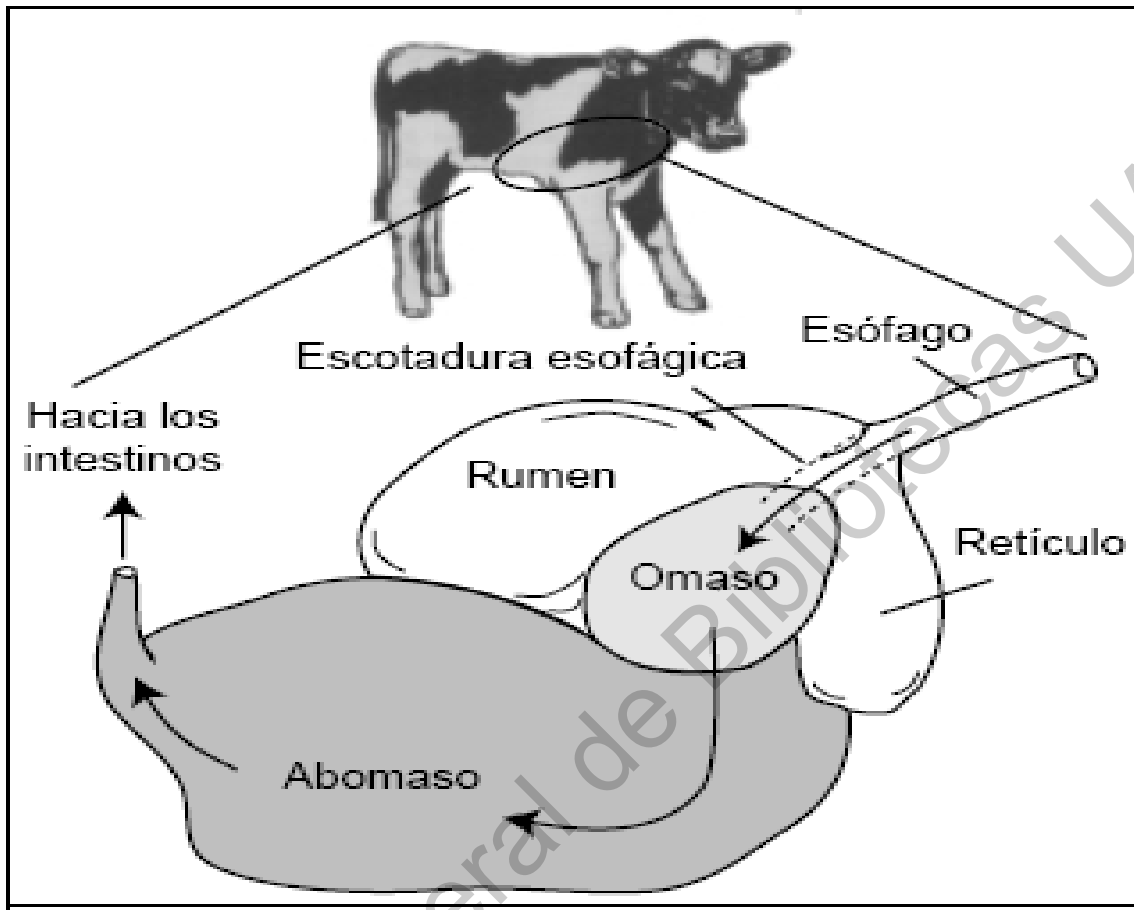
### 2.3 Fisiología digestiva del pre rumiante.

Al nacimiento, el rumiante tiene un aparato digestivo adaptado a una dieta láctea, por lo que estructuralmente su funcionamiento se asemeja al de un animal no rumiante. Durante las tres primeras semanas de vida, el ternero no utiliza los tres primeros compartimentos (rumen, retículo y omaso) (Garzón, 2007). El alimento líquido se dirige directamente al abomaso, a través de la gotera esofágica, que constituye una prolongación del esófago en forma de tubo, la cual se desvía hacia el retículo–rumen cuando se contrae, por lo que forma un solo conducto juntamente con el surco omasal y finaliza en el orificio abomasal (Pochón, 2001). La gotera esofágica al ser estimulada, los músculos de sus labios se cierran creando un canal casi perfecto que conecta al cardias con el canal omasal, permitiendo así que el calostro o la leche no pasen al rumen-retículo (Pochón, 2001; Reilling y Mattioli, 2003; Quigley, 2005; Correa, 2006). La leche pasa directamente desde el esófago al abomaso gracias al cierre de la gotera esofágica (Pochón, 2001; Reilling y Mattioli, 2003).

El ternero nace con la capacidad de digerir leche por métodos enzimáticos, por lo que el retículo, rumen y omaso no son funcionales durante esta etapa. En la Figura 1 se puede observar la relación de los compartimentos estomacales y la escotadura esofágica. La gotera esofágica (también conocida como surco reticular o escotadura esofágica) es una parte especializada en los rumiantes que ha sido definida como “estructura muscular”, que se extiende hacia abajo desde el cardias al omaso en la pared media del retículo (González *et al.*, 2009). Esta se compone de dos pliegues de tejido muscular, que se cierran en respuesta a la estimulación nerviosa, formando un “tubo” que dirige la leche o sustituto de leche directamente hacia el abomaso (Garzón, 2007).

El abomaso tiene un pH bajo que funciona como el estómago de los no rumiantes. El cierre de la gotera esofágica ocurre cuando los becerros son

estimulados a beber leche o sustituto de leche. La estimulación nerviosa para beber origina que el surco se cierre cuando el becerro succiona (Quigley, 2005).



**Figura 1- Relación de los compartimentos gástricos de la becerro y la escotadura esofágica (Garzón, 2007).**

El acto de succionar la mama o la mamadera, o aún el observar la mamadera o la preparación del alimento, inician este reflejo (Ruckebusch *et al.*, 1994; Quigley, 2005). Por otro lado, existen receptores en la faringe que responden a los componentes químicos de la leche, como lactosa, proteínas, minerales, y a su temperatura. Dichos estímulos son transmitidos al centro bulbar especialmente por el nervio trigémino. Las fibras eferentes son vagales y actúan estimulando los labios de la gotera e inhibiendo la motilidad de los divertículos. Se ha demostrado que

durante el mamado se libera un polipéptido intestinal vasoactivo (PIV) que relaja el esfínter retículo-omasal (Reilling y Mattioli, 2003). La distensión abomasal inhibe el reflejo de contracción de la gotera esofágica. La adrenalina, actúa relajando la musculatura de la gotera, inhibe el reflejo de cierre (Pochón, 2001). Estos factores deben tenerse en cuenta en la alimentación artificial de los terneros, a fin de evitar el suministro de una cantidad excesiva de leche, o de hacerlo bajo condiciones estresantes, que provoquen el pasaje de leche al retículo-rumen (Pochón, 2001; Reilling y Mattioli, 2003).

En las becerras criadas con leche se ha visto que el tamaño del rumen se va incrementando en proporción con el tamaño de su cuerpo (Cuadro 5), siendo importante que el animal tenga una dieta de leche para un rápido y eficiente crecimiento del rumen, lo cual le permitirá que al destete tenga la capacidad de contener grano, forrajes (Heinrichs, 2005) y la digestión fermentativa (Reilling y Mattioli, 2003).

El desarrollo del retículo, rumen y omaso se divide en tres períodos o fases (Ruckebusch *et al.*, 1994; Cunningham, 2003):

1- Fase de pre rumiante, entre el nacimiento y las tres semanas de vida. El animal es "lactante", posee sólo capacidad de digerir leche (Gasque, 2008). El abomaso constituye el estómago relacionado con el proceso digestivo, pues en esta fase la alimentación es con base en el uso de alimentos lácteos o sustitutos líquidos (Cunningham, 2003; Garzón, 2007), y depende de la absorción intestinal de glucosa para mantener un valor de glucemia (alrededor de 1 g/l), que es semejante al de un no rumiante (Reilling y Mattioli, 2003).

2- Fase de transición, entre las tres y las ocho semanas de vida. El animal comienza a ingerir pequeñas cantidades de alimento sólido y se van desarrollando gradualmente el retículo, rumen y omaso (Heinrichs, 2007), dando paso al inicio de la fermentación ruminal. Los valores de glucemia comienzan a disminuir mientras aumenta la concentración plasmática de ácidos grasos volátiles (AGV),

especialmente acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4) (Reilling y Mattioli, 2003). Esta fase continuará hasta en tanto sean ofrecidos alimentos lácteos al ternero (Garzón, 2007).

3- La fase de rumiante propiamente dicha es más o menos a las ocho semanas de vida. El retículo, rumen y omaso están bien desarrollados y permiten una digestión fermentativa propia del “rumiante” (Reilling y Mattioli, 2003). Esta fase se inicia con el destete de los animales y dura hasta el final de su vida (Garzón, 2007).

**Cuadro 5- Capacidades relativas de las divisiones pre-estómago del ternero en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica total.**

Edad	Retículo-rumen %	Omaso %	Abomaso %
Neonato	40	4	56
3 semanas	48	4	36
7 semanas	66	4	23
Adulto	85-90	3-5	8-9

(Reilling y Mattioli, 2003).

### 2.3.1 Digestión de la leche.

La leche posee una cantidad relativamente constante de lactosa (alrededor del 4.5%), y concentraciones más variables de proteínas (entre 3-4.5%) y grasa (entre 3-5%), que varían principalmente por diferencias entre razas, la alimentación o por el momento de la lactación (Reilling y Mattioli, 2003).

La digestión de la leche se lleva a cabo en el abomaso, la leche se coagula en pocos minutos por acción de la enzima renina, la cual es activada por el ácido

clorhídrico (Garzón, 2007) y convierte la caseína soluble junto con el calcio de la leche en un glóbulo o coágulo de paracaseinato de calcio (el cual es retenido en el abomaso); la lactosa y las proteínas solubles van hacia el intestino, en donde los enterocitos poseen lactasa y peptidasa, por medio de las cuales, la lactosa es degradada en glucosa y galactosa, y las proteínas son degradadas a proteínas menores. Esto demuestra la existencia de una buena actividad digestiva intestinal de mucosa, que se contrapone a la baja capacidad secretoria del páncreas y del hígado, la cual se va incrementando a partir de la segunda semana de edad (Reilling y Mattioli, 2003).

El coágulo retenido sufre la acción proteolítica de la renina que lentamente va liberando péptidos hacia el intestino. Por otro lado, la actividad lipolítica inicia con la lipasa salival que libera principalmente mono glicéridos y ácidos grasos libres que serán absorbidos por los enterocitos (Reilling y Mattioli, 2003).

A partir de las ocho semanas los compartimentos están bien desarrollados y permiten una digestión fermentativa propia del rumiante (Cunningham, 2003). En los sistemas de crianza intensivos la lactancia se extiende hasta 60 días, y durante la misma, el aparato digestivo debe desarrollarse para poder digerir posteriormente los carbohidratos estructurales (Blanco, 2012).

#### **2.4 Microbiota gastrointestinal.**

La microbiota es una comunidad de microorganismos que cohabitan en diferentes regiones anatómicas de individuos sanos, su composición es diversa y especializada, dependiendo de la región o tracto donde se localice (Sørum and Sunde, 2001; Guarner, 2007; La Rosa *et al.*, 2014).

Al nacimiento se considera que el neonato es estéril durante la vida intrauterina, sin embargo, la colonización del tubo digestivo comienza a las pocas horas del nacimiento, a partir de la microbiota de la vagina, del intestino, la piel de la madre y del medio ambiente en general (Rosmini *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2004). La microbiota gastrointestinal tiene un papel clave en el desarrollo del

sistema inmune y protección contra las enfermedades producidas por patógenos que causan diarreas (Oikonomou, 2013).

La microbiota gastrointestinal está compuesta por tres grupos: a) la microbiota autóctona que está determinada por el tipo de animal, b) los microorganismos que habitan a todos los integrantes de esa especie y comunidad y c) la microbiota transitoria en general, la cual proviene tanto del agua, alimentos y de otras partes del cuerpo, pero utilizan el tracto gastrointestinal solo en forma temporal (Schneider *et al.*, 2004).

En las crías artificiales, en especial cuando las crías son separadas de sus madres y alojadas en sistemas intensivos, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural está disminuida, dando como resultado que el intestino sea fácilmente colonizado por microorganismos patógenos. Desde el punto de vista de su relación con el hospedero, la microbiota gastrointestinal se puede agrupar en microorganismos benéficos, neutrales o peligrosos teniendo un efecto importante sobre la estructura, función y el metabolismo del intestino (Srikanth and Mc Cormick, 2008; Schneider *et al.*, 2004).

Por otro lado, la microbiota cambia de acuerdo con la alimentación y el medio ambiente en el que se están desarrollando las beceras. Entre los primeros colonizadores del tracto digestivo encontramos a las bacterias de las familias *Streptococcus* y *Enterococcus*, las cuales utilizan el oxígeno disponible favoreciendo un medio ambiente anaeróbico requerido por los *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (Malmuthuge, 2015). Rey *et al.* (2013), mencionan que al día 2, la comunidad bacteriana se compone principalmente de Proteobacterias (70%), Bacteroidetes (14%), y la familia dominante *Pasteurellaceae* (58%). Posteriormente, la población bacteriana cambia entre el día 2 y 3 probablemente debido a la comunidad pionera de microorganismos. La cual juega un papel muy importante en la maduración y desarrollo de otras bacterias de la microbiota, adicionalmente hay una disminución de Proteobacterias y un aumento de bacterias anaeróbicas.

Alrededor del día 12 aumentan los *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Streptococcus*. Aproximadamente en el día 15 se va incrementando la ingesta del alimento sólido y se detecta a la familia *Prevotella* como dominante y de aquí en adelante hay un cambio progresivo en la comunidad bacteriana tendiendo a ser como la de los animales adultos. No obstante, diferentes estudios han demostrado que las familias que colonizan el rumen de los becerros varían de acuerdo con la edad (Cuadro 6).

**Cuadro 6- Clasificación de los grupos bacterianos que colonizan el rumen del nacimiento al destete.**

	EDAD (días)				
	3	7	14	28	42
<b>FAMILIA</b>	%	%	%	%	%
<b>Proteobacteria</b>	46.6-70.4	16.9-18.7	6.45-16.9	1.8-27.6	12-27.6
<b>Bacteroidetes</b>	13.9-42.6	56.3-56.9	46-61.3	49.9-56.3	56.3-74
<b>Firmicutes</b>	5.05-13.9	13.9-17.5	13.9-34	13.9-42.1	10-13.9
<b>Actinobacteria</b>	0.05-4.9	0.55-4.9	0.95-4.9	0.25-4.9	4.9
<b>Fusobacteria</b>	4.7-5.55	4.7-5.30	0.2-0.55	0.2-0.3	0.2-0.4
<b>Spirochaetes</b>	0-0.4	0.1-0.4	0.4-2.60	0.4-0.85	0.4
<b>Fibrobacterias</b>	0-0.3	0-0.3	0.2-0.3	0.3-1.45	0.3-1.6
<b>Tenericutes</b>	0	0.80	0.20	0.90	0.95
<b>Elusimicrobia</b>	0	0	0.20	1.45	2.1
<b>Lentisphaerae</b>	0	0	0.15	0.20	0.31

(Yañez *et al.*, 2010)

## **2.5 Alimentación de la becerra.**

En forma natural una becerra de 40 kg consume alrededor de 8 a 10 L de leche, distribuidos en 10 a 15 tomas en el día (Anderson, 2008). No obstante, con la finalidad de incrementar la eficiencia productiva en la crianza de beceras se han venido utilizando cantidades limitadas de leche entera o sustitutos de leche en su alimentación durante períodos de lactancia cortos (Garzón, 2008), iniciando la administración de alimentos sólidos de manera temprana para favorecer el desarrollo de un rumen funcional. Por lo tanto, la manipulación de las dietas líquidas y sólidas determinará la eficiencia de la alimentación, en consecuencia, se pretende el desarrollo de un rumen funcional y la obtención de ritmos de crecimiento aceptables (Anderson, 2008; Blanco, 2012).

Jensen & Budde (2006) mencionan que al proporcionar alimentación con chupón a libre acceso semejando una forma más natural de alimentación, las beceras quedan satisfechas y no se maman entre ellas. Sin embargo, cuando son alimentadas con cantidades específicas de leche, horario fijo y con cubeta, las beceras parecen no quedar satisfechas y tienden a ir a mamar a sus compañeras (Anderson, 2008).

En este período de crianza, tanto los productos lácteos como los concentrados tipo iniciadores juegan un papel clave sobre el consumo, desarrollo ruminal y comportamiento productivo (Pochón, 2001, Relling y Mattioli, 2003).

## **2.6 Uso de leche antibiótica.**

La alta demanda de la leche para consumo humano ha ocasionado la reducción tanto de la cantidad de leche proporcionada a las beceras de reemplazo, así como la edad al destete en la etapa de crianza (Blanco, 2012; Gasque, 2008). Con el fin de lograr un ahorro en el consumo y costo de producción en esta etapa



se ha estimulado el uso de leche de las vacas en tratamiento y sustitutos de leche (Blanco, 2012).

Por otro lado, en las unidades de producción lechera se separa la leche proveniente de vacas enfermas por la presencia de antibióticos, debido a que no puede ser procesada para consumo humano por el riesgo de provocar diferentes trastornos en la salud (NOM 243-2010), tales como: alergias, superinfecciones, retrasos en el diagnóstico del agente causal. Además, existe la aparición de microorganismos antibiótico-resistentes, los cuales necesitan cada vez mayores concentraciones y diferentes tipos de antibióticos (Toro, 2011). La leche producida por las vacas enfermas y en tratamiento con antibióticos es separada y se conoce como leche antibiótica.

Los antibióticos contenidos en la leche pueden actuar como promotores del crecimiento cuando se alimenta a las beceras con ella, desde luego dichas dosis de antibióticos no son controladas pues varían dependiendo el número de casos de vacas y tratamientos proporcionados (Langford *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de leche antibiótica permite bajar costos de producción, promueve el crecimiento de la beceras e inclusive disminuye la presentación de enfermedades (Anderson, 2008; Langford *et al.*, 2003).

## **2.7 Antimicrobianos.**

Los antimicrobianos son sustancias que han ayudado a la prevención y el combate de las enfermedades bacterianas (Errecaide, 2004), utilizándose de manera terapéutica y como promotores del crecimiento (Anderson, 2008; Langford *et al.*, 2003).

El objetivo principal del uso de antimicrobianos es controlar y disminuir el número de microorganismos patógenos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los microorganismos (Seija,

2006). Las drogas antibacterianas no son efectivas contra todos los microorganismos, el espectro de actividad es el resultado de varios factores, cada uno de ellos con diferentes propiedades físicas, químicas, espectro antibacteriano y mecanismo de acción (Fernández *et al.*, 2003). Los antibióticos tienen diferentes formas de acción, inhibiendo diversos procesos metabólicos esenciales para la supervivencia de los microorganismos, ya sea que bloquee una enzima o un sustrato no presente en las células eucariotas (Martínez y Sánchez, 2007). Dentro las diversas regiones de ataque de los antimicrobianos tenemos a la pared bacteriana, membrana bacteriana, síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos (Errecalde, 2004). Algunas de las principales familias de fármacos y su modo de acción se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7- Principales mecanismos y sitios de acción de los principales antibióticos**

Sitio de acción	Inhibición enzimática	Fijación a sustrato	Otros mecanismos	Efecto inhibitorio o lesivo
<b>mur A</b>	Fosfomicina			Síntesis peptidoglucano
<b>alr (racemasa), ddl (ligasa) murG</b>	Cicloserina	(Ramoplanina)		Síntesis peptidoglucano
<b>Transglucosilasas</b>		Glucopéptidos (Ramoplanina)		Síntesis peptidoglucano
<b>Transpeptidasas</b>	Betalactámicos	Glucopéptidos		Síntesis peptidoglucano
<b>Fosfatasa del difosfato de undecaprenilo</b>		Bacitracina		Síntesis peptidoglucano
<b>ARNr 16S (centro de decodificación)</b>	Aminoglucósidos Tetraciclinas			Síntesis proteica
<b>ARNr 23S Peptidil-transferasa</b>	Cloranfenicol, linezolid, clindamicina, estreptograminas (retapamulina)			Síntesis proteica
<b>Túnel Dominio II</b>	Macrólidos, cetólidos estreptograminas Cetólidos			
<b>ARNr Proteínas ribosómicas</b>		Ácido Fusídico	Nitrofurantoína	Síntesis proteica Síntesis proteica
<b>Sintetasa de Isoleucil-ARNt</b>	Mupirocina			Síntesis proteica
<b>Girasa topoisomerasa IV</b>	Quinolonas			Síntesis ADN ARNm
<b>ARN polimerasa ADN dependiente</b>	Rifamicina (tiacumicina B)			Síntesis ARNm
<b>Sintetasa de dihidropteroato</b>	Sulfamidas			Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
<b>Reductasa de dihidrofolato</b>	Trimetroprima			Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
<b>ADN</b>			Nitrofurantoína	Lesión directa del ADN
<b>Ácidos nucleicos y proteínas</b>			Metronidazol y análogos	Lesión directa de ácidos nucleicos y proteínas
<b>Membrana externa de Gram negativos</b>			Colistina	Desestructuración de la membrana interna
<b>Membrana citoplasmática</b>			Daptomicina, posiblemente nuevos glucopéptidos (dalbavancina)	Permeabilización de la membrana citoplasmática

**ADN: ácido desoxirribonucleico, ARN: ácido ribonucleico, ARNm: ARN mensajero, ARNr: ARN ribosómico**  
**Los antibióticos entre paréntesis se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico**

(Martínez y Sánchez, 2007)

Con el descubrimiento de la penicilina se inició la era en donde se desarrollo la producción de nuevos antibióticos, sin embargo, ha surgido un problema de resistencia a los mismos, la aparición de microorganismos con mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción de los antibióticos se ha presentado unos pocos años después como se detalla en el Cuadro 8. No obstante, la producción de nuevos antimicrobianos ha aumentado, pero esta se ha visto rebasada por la rápida aparición de resistencia (Fernández, 2003).

**Cuadro 8- Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes.**

<b>Droga</b>	<b>Descubrimiento</b>	<b>Uso clínico</b>	<b>Resistencia clínica</b>
<b>Penicilina</b>	1928	1943	1954
<b>Estreptomina</b>	1944	1944	1956
<b>Tetraciclina</b>	1946	1942	1956
<b>Eritromicina</b>	1952	1955	1956
<b>Vancomicina</b>	1956	1972	1994
<b>Gentamicina</b>	1963	1967	1968
<b>Fluoroquinolonas</b>	1978	1982	1985

(Errecalde, 2004)

## **2.8 Resistencia bacteriana.**

La resistencia a los antimicrobianos se define, desde el punto de vista médico, como la ausencia de respuesta clínica a la administración de los antibióticos. El efecto adverso se registra de manera característica como un fracaso en el tratamiento (Puig, 2011), es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico (Fernández *et al.*, 2003).

En la naturaleza se encuentran bacterias que son de manera natural o intrínseca, resistentes a los antibióticos, y bacterias que de manera adquirida pueden llegar a ser resistentes a uno o varios anti-microorganismos, ya sea debido a mutaciones en diversos genes, o a la adquisición de material genético heterólogo (Fuchs, 1994; Stokes and Gilling, 2011). Las bacterias han desarrollado un sofisticado mecanismo genético para evadir la acción de los antimicrobianos. Los genes involucrados en la resistencia se localizan en el cromosoma y en elementos genéticos móviles, extra cromosómicos como son los plásmidos, transposones e integrones (Stokes and Gilling, 2011), esto último no sólo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De tal manera que una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 1994; Jawetz, 2011).

Por otro lado, existen estudios (Schenck and Callery, 1998; Sørsum and Sunde, 2001; Rosmini *et al.*, 2004; Brunton *et al.*, 2014) manifestando que el consumo de leche con antibióticos puede aumentar la resistencia bacteriana a los mismos.

Lukasova y Sustackova (2003) señalan que el nivel de resistencia ha aumentado no sólo en bacterias patógenas sino también en bacterias comensales, por lo que constituyen un reservorio de genes resistentes para bacterias patógenas. El monitoreo de la prevalencia de resistencia en bacterias indicadoras como *E. coli* y *Enterococcus* spp. en poblaciones de animales sanos hace factible comparar la prevalencia de resistencia y detectar transferencias de bacterias o genes resistentes desde animales a humanos o viceversa. De Verdier *et al.* (2012), mencionan como un factor de importancia para la resistencia de antibióticos a los terneros destetados alimentados con leche de vacas tratadas con antimicrobianos, y han propuesto que los residuos antibióticos de dicha leche podrían seleccionar la resistencia en la microbiota gastrointestinal de los terneros. Por lo tanto, es preocupante que el uso

de leche con antibióticos pueda incrementar la resistencia de las bacterias excretadas (Schneider *et al.*, 2004).

Brunton *et al.* (2014) encontraron que la proporción de *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* resistentes aislados fue significativamente mayor en terneros alimentados con leche con residuos de antibiótico ya sea pasteurizada y sin pasteurizar, que en los terneros que recibieron leche sin residuos de antibiótico ya sea pasteurizada o sin pasteurizar. El 30% de los terneros enfermos sistémicamente con diarrea tienen bacteremia, predominantemente debido a la *Escherichia coli* (Constable, 2004; Radostis *et al.*, 2000). La resistencia a antibióticos podría aumentar el número de diarreas difíciles de tratar en la etapa de crianza.

Algunas cepas bacterianas son resistentes a varios antibióticos lo que se conoce como “resistencia múltiple” adquirida y limita el uso de muchos antibióticos en forma importante (Ashraf *et al.*, 2009). En el campo de la microbiología se han desarrollado diferentes pruebas de laboratorio, como las tiras E-test, discos impregnados con antibiótico, placas de microtitulación etc., para identificar de manera convencional el patrón de resistencia a los antibióticos y los posibles mecanismos de resistencia (Errecalde, 2004; Garza Ramos *et al.*, 2009). En relación con el empleo de métodos moleculares para detectar los mecanismos de resistencia, éstos se desarrollan mediante diferentes estrategias de hibridación, lo cual consiste en la identificación de una secuencia específica de ADN (gen que codifica a una resistencia) mediante el reconocimiento de la secuencia homóloga en el ADN en varias muestras clínicas o bacterianas, actualmente se utilizan nucleótidos marcados con fluorescencia que permite una secuenciación de ADN automatizada y de alto rendimiento (Garza Ramos *et al.*, 2009). En estudios con animales salvajes y de zoológico, se hicieron aislamientos bacterianos y se probaron con sensidiscos observando resistencia bacteriana a dos o más agentes antimicrobianos (Ahmed *et al.*, 2007). Estos estudios sugieren una amplia

distribución de la resistencia bacteriana a antibióticos en el ambiente natural (Ahmed *et al.*, 2007; Fuchs, 1994).

## **2.9 Genoma bacteriano.**

La información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida, en la mayor parte de los genomas procariotas en el denominado cromosoma bacteriano (>90% tiene un cromosoma), que es una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, circular y superenrollado, cerrado por enlace covalente y ubicado en una región llamada nucleoide (Jawetz, 2011; Sánchez *et al.*, 2012); además, algunas bacterias tienen un ADN extra cromosómico, también circular y cerrado, denominado ADN plasmídico por estar contenido en los plásmidos (Betancor *et al.*, 2008). El número de plásmidos puede variar de una sola copia de este hasta algunos cientos por célula, no son esenciales para la vida de la bacteria; sin embargo, poseen información genética importante para ellas; por ejemplo, los genes que codifican las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos (Sánchez *et al.*, 2012), contiene además otros elementos genéticos, secuencias de ADN con capacidad intrínseca de cambiar de posición dentro del genoma llamados transposones (Martínez, 2007) y los integrones que son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos, se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie (González *et al.*, 2009).

### **2.9.1 Mecanismos de la resistencia bacteriana.**

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos, según sea el grupo del antibiótico y la especie bacteriana (Alós, 2015; Garza Ramos *et al.*, 2009).

No hay evidencia de que las mutaciones sean el resultado de la resistencia a los agentes antimicrobianos por exposición a una droga en particular, son eventos que ocurren al azar durante las terapias, simplemente representan una multiplicación selectiva de microorganismos mutantes resistentes presentes desde el inicio de la infección o una cepa resistente introducida del medio ambiente (Jawetz, 2011). Los antibióticos matan a las bacterias sensibles e influyen directamente los mecanismos de variación genética (mutación, recombinación, transposición, intercambio de genes). Concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden facilitar el proceso de resistencia a antibióticos, por ejemplo, favoreciendo la transferencia y recombinación genética (Alós, 2015).

La adquisición de la resistencia a los agentes antimicrobianos ha aparecido por cambios genéticos cromosómicos que son el resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un antimicrobiano determinado o genéticos extra cromosómicos llamados plasmidios o episomas, seguidos de un proceso de selección (Jawetz, 2011). Es una transmisión dinámica que genera plasticidad en los genomas, dando propiedades patogénicas a muchos agentes infecciosos, previamente inocuos (Moreno *et al.*, 2009).

El material genético y los plasmidios pueden ser transferidos de un microorganismo a otro mediante procesos diferentes a la replicación, lo que permite variabilidad genética y evolución bacteriana, se da por medio de la transferencia horizontal la cual tiene los siguientes mecanismos (Jawetz, 2011; Moreno *et al.*, 2009):

- 1) Transducción. - el plasmidio de ADN está encerrado en un virus bacteriano y transferido por el virus a otra bacteria de la misma especie, ejemplo la producción de beta lactamasa a una cepa no productora de la enzima (Jawetz, 2011).



- 2) Transformación. - el ADN desnudo pasa de una célula de una especie a otra célula alterando su genotipo (Goodman y Gilman, 1975; Jawetz, 2011; Sánchez *et al.*, 2012).
- 3) Conjugación. - ocurre una transferencia unilateral de material entre las bacterias del mismo género o diferente, esta transferencia está mediada por un factor de fertilidad (F) que resulta en la extensión de los cabellos sexuales de la célula donadora (F<sup>+</sup>) al receptor. El plásmido, episoma o algún otro ADN es transferido a través de estos túbulos de proteína del donador al receptor. Una serie de genes estrechamente ligados determina cada uno la resistencia a un medicamento, pudiendo entonces transferirse de una bacteria resistente a una susceptible. Dicho factor de transferencia (FTR) constituye el método más común de diseminación de la resistencia a múltiples medicamentos entre diversos géneros de bacterias gram negativas (Jawetz, 2011; Moreno *et al.*, 2009).
- 4) Translocación o transposición. - intercambio de secuencias cortas de ADN entre un plasmidio y otro, y una porción de cromosoma bacteriano dentro de alguna célula bacteriana (Jawetz, 2011; Moreno *et al.*, 2009).

La resistencia a agentes antimicrobianos se produce por mutación o por la adquisición de genes localizados en diferentes elementos de transmisión horizontal (ETH) como plásmidos, transposones o integrones, capaces de transmitirse entre microorganismos de la misma o distinta especie. El aumento de la resistencia a un determinado antibiótico puede ser debido a la diseminación de un clon o de un ETH entre distintas cepas (Coll *et al.*, 2005; González *et al.*, 2009; Jawetz, 2011).

### **2.9.2 Elementos genéticos implicados en la resistencia bacteriana.**

Los transposones son cadenas cortas de ADN que pueden moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula (Sánchez,

2012), conocidos como genes saltarines, pueden “saltar” desde un plásmido al cromosoma bacteriano, y desde un plásmido a otro plásmido o a bacteriófagos (Errecalde, 2004). Los transposones no se pueden replicar, pero codifican una enzima (transposasa) que les permite transferirse entre diferentes elementos del genoma bacteriano (Martínez, 2006), con lo cual puede causar mutaciones en el cromosoma bacteriano o modificar el ADN de sus inmediaciones, arrastrando un gen codificador, rompiéndolo por la mitad o haciendo que desaparezca del todo, lo que permite que en estos lugares se pueda producir recombinación con genes de ADN del mismo cromosoma con genes foráneos, provocando la reorganización del genoma (Sánchez, 2012). Un rasgo central y peligroso de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples drogas, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite, por transferencia de este último, la adquisición de multirresistencia por parte de la bacteria receptora (Errecalde, 2004).

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de ADN superenrollado de cadena doble que se replican autónomamente en las células hospederas, variando desde 1 hasta 1.000 kilo bases (kb), en forma de un círculo cerrado y en menor proporción en forma lineal, pero sin proteínas asociadas (Sánchez, 2012). Cuando codifican resistencias se los denomina plásmidos R. En general, los plásmidos codifican características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma. Pueden ser transferidos entre bacterias del mismo o de diferentes géneros. Un plásmido puede ser incorporado por un virus y transferido a otra bacteria, así como pasar de una célula a otra por conjugación (Errecalde, 2004).

Los integrones son sistemas de recombinación específicos de sitio responsables del reconocimiento, captura y expresión de casetes (elementos móviles constituidos por un gen carente de promotor y un lugar de recombinación específico conocido como elemento 59 bp). De manera general, los integrones se

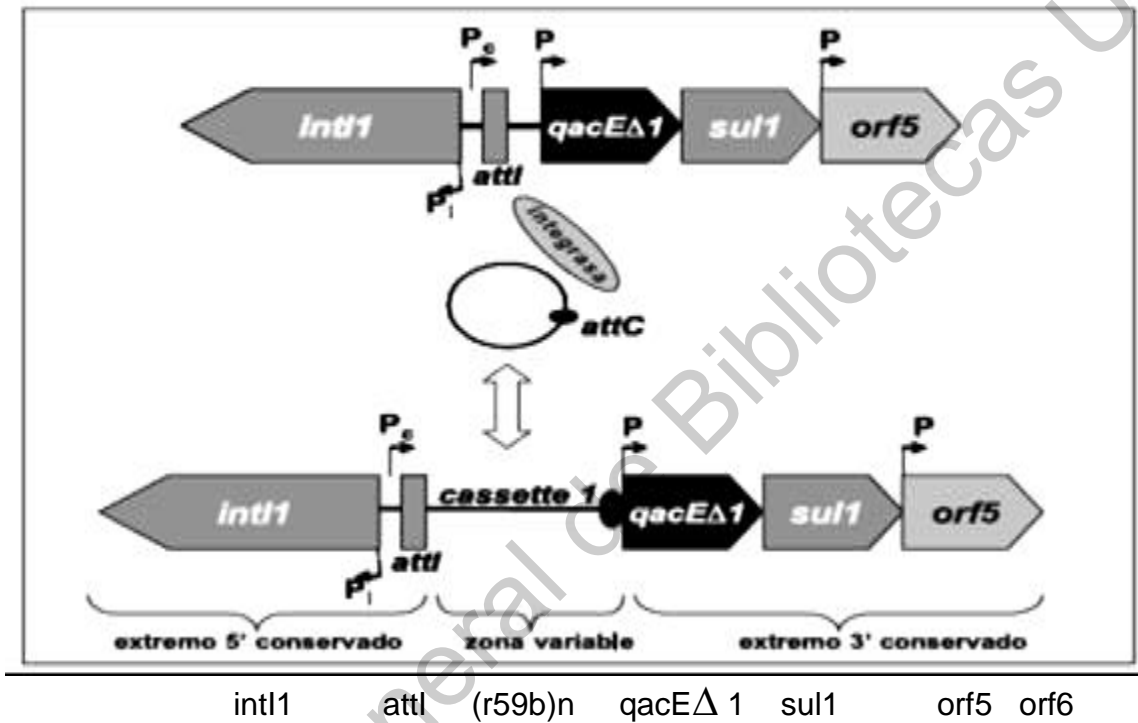
han dividido operativamente en integrones de resistencia (IR) y superintegrones (SI). Los IR se encuentran comúnmente formando parte de transposones y/o plásmidos (Coque, 2005).

Los integrones no pueden realizar autotransposición, pero frecuentemente se asocian con secuencias de inserción, o bien a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra-especies (Sánchez, 2012).

El integrón se puede definir como un elemento genético dinámico (García, 1999), está compuesto de tres regiones, dos regiones laterales invariables y una central variable (Errecalde, 2004; Boucher, 2007) en la cual porta una combinación de genes estructurales organizados como un operón ó casete genético (García, 1999). El denominado casete genético es un elemento que incluye un gen y un sitio recombinante (Errecalde, 2004), los integrones pueden llevar de 1 a 6 casetes genéticos de un grupo de cerca de 100 casetes y la mayoría codifican para resistencia a antibióticos (Giillings, 2008). Los genes en casete son quienes presentan la capacidad de movilizarse, están compuestos de ADN circular y se encuentran libres en el citoplasma (Ortega y Zurita, 2013). Para asegurar la expresión de los casetes genéticos son insertados en un integrón funcional el cual contiene uno o dos promotores, embebidos en el gen de la integrasa o la secuencia *attI*, orientados hacia el sitio de recombinación (Ortega y Zurita, 2013).

La estructura de los casetes consta de dos elementos funcionales: un marco de lectura abierto (open reading frame, *orf*), que frecuentemente carece de promotor, y un sitio de recombinación *attC* o elemento 59 pb, de tamaño y secuencias variables (Bennet, 1999; Ortega y Zurita, 2013), que contiene dos secuencias palindrómicas imperfectas, las cuales son reconocidas por la integrasa para iniciar la recombinación (Ortega y Zurita, 2013).

Donde r 59b representa al casete de genes de resistencia y n es el número de casete integrado en este sitio (Bennet, 1999). Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de casetes genéticos de resistencia (González, 2004), la composición de un integrón se puede ver gráficamente en la figura 2.



**Figura 2- Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y la adquisición de casetes genéticos de resistencia. Int1 gen que codifica la integrasa; attI sitio de recombinación del integrón (lugar de integración de los casetes); P1 promotor que transcribe la integrasa; Pc promotor que dirige la transcripción de los casetes y attC sitio de recombinación del casete genético (González, 2004)**

La región *qacE* determina resistencia a cuaternarios de amonio y la región *sul1* resistencia a sulfonamidas (Gillings, 2008).

Los integrones juegan un papel muy importante en el problema de la resistencia a antibióticos porque pueden capturar y expresar una gran diversidad de genes de resistencia, se localizan en elementos móviles de ADN es por esto que tienen una rápida diseminación y se pueden encontrar en bacterias del medio ambiente, enterobacterias G<sup>-</sup> y más recientemente en G<sup>+</sup> (Coque, 2005; Gillings, 2008).

## **2.10 Sanitización de la leche.**

En la industria lechera, las vacas en producción pueden presentar algún período de mastitis, las cuales son tratadas con antibióticos, siendo esta leche no apta para consumo humano. No obstante, esta leche es usada para alimentar a las becerras (Langford *et al.*, 2003). Del total de la leche producida, normalmente del 2 a 5% está contaminada con residuos inhibidores, además de bacterias y para utilizarla en la alimentación de las becerras en crianza, se debe procurar sanitizarla ó purificarla, es decir, que no sea perjudicial para su salud, ya sea pasteurizándola, acidificándola o dando un tratamiento de rayos ultravioleta para bajar la carga bacteriana, sobre todo de patógenos (Anderson, 2008; Gasque, 2008; Crook *et al.*, 2013).

### **2.10.1 Pasteurización**

La pasteurización comprende una exposición suficiente tanto en tiempo como en temperatura para destruir o frenar el crecimiento de microorganismos patógenos, inhibiendo la actividad enzimática, matando las bacterias productoras de enfermedades y reteniendo aún las propiedades deseadas de la leche. Stable *et al.* (2004) observaron la eficacia de la pasteurización como control de bacterias patógenas, tales como *Mycobacterium paratuberculosis* y 4 tipos de *Mycoplasma*

(*bovis, californicum, canadense*, serogroup 7) en leche de descarte tratada a 65.5°C por 30 minutos. Existen diferentes tipos de pasteurización:

1) Lenta, LTLT (Low Temperature, Long Time, se lleva a cabo a 63 °C durante 30 min,

2) Rápida, HTST (High Temperature, Short Time) que va de 72 a 75 °C durante 15 seg,

3) Alta (ultra Pasteurización) que va de 82-83 °C de 2-3 seg,

4) Esterilización UHT (Ultra High Temperature) que va de 88-110 °C de 1-2 seg.

Técnicamente, la pasteurización a 63 °C se efectúa en tanques cerrados, provistos de agitadores; las pasteurizaciones rápidas a temperaturas elevadas (HTST), se hacen en cambiadores de calor tubulares o de placas (Jawetz, 2011; NOM 243-2010).

### **2.10.2 Sanitización por rayos ultravioleta.**

Los rayos ultravioletas son usados para disminuir la carga bacteriana, su modo de acción es a nivel del DNA, formando nuevos enlaces entre nucleótidos adyacentes causando la formación de dímeros de timina casi siempre, lo que impide la replicación, la capacidad de infectar y eventualmente la muerte (González, *et al.*, 2009; Crook *et al.*, 2013). Buenos resultados se han obtenido en la desinfección de agua por este método y aun cuando en la leche hay variaciones por la cantidad de sólidos suspendidos, proteína, grasa presentes y opacidad de la leche es efectivo (Crook *et al.*, 2013).

### 2.10.3 Acidificación de la leche.

La acidificación es un método de conservación de los alimentos, lo hace estable y no necesita refrigeración (Clayton *et al.*, 2014). Además de prevenir la proliferación de bacterias, contribuye a mantener la calidad deseada de un producto. Por lo que es una alternativa en la crianza de beceras (Anderson, 2008; Gasque, 2008). Esta se puede llevar a cabo utilizando diferentes ácidos que varían en su capacidad para inhibir y matar a las bacterias, levaduras y hongos. El ácido acético, el fórmico, el potásico y otros han sido estudiados para su utilización como conservadores de alimentos para ganado que se almacenan por poco tiempo (Samaniego y Pedroza, 2013). El ácido fórmico es conocido también con el nombre de ácido metanoico constituido por un carbono H-COOH, es la sustancia que algunos insectos, abejas y hormigas, inyectan cuando pican o muerden. Este es considerado un ácido fuerte, líquido, incoloro, olor irritante, punto de ebullición de 100.7 °C y punto de fusión de 8.4 °C, soluble en agua (Requena, 2001). El uso del ácido fórmico está permitido en la industria alimenticia como conservador en algunos alimentos y ensilados.

Anderson (2008) evaluó el ácido acético, fórmico y potásico sobre la carga total de microorganismos aeróbicos, bacterias Gram negativas, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus spp* coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*), levaduras y hongos. De todos estos el ácido fórmico resultó ser el mejor conservador observado que mata las bacterias de tipo coliforme en 1–2 horas y al *Staphylococcus aureus* en 4-6 horas, por lo que se recomienda preparar la leche acidificada por lo menos 8 horas antes de darla a las beceras, después de ese tiempo de haberla acidificado tiene un pH de 4.1 y disminuye hasta un 90% del crecimiento de la población de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y se logra el 100% a las 48 horas. Concluyendo que el uso de leche no apta para consumo humano puede conservarse con la acidificación de una manera viable, además usándose en la crianza de beceras, a libre acceso con chupón, imitando

el amamantamiento natural, mejora el desarrollo corporal, reduce las enfermedades y la mano de obra. Los resultados obtenidos con la acidificación de la leche y el crecimiento bacteriano los podemos observar en el Cuadro 9.

**Cuadro 9- Nivel de pH óptimo y nivel de pH para la inactivación/inactividad de distintas bacterias de interés en la industria lechera, bajo condiciones de laboratorio.**

	Óptimo	Rango	Inactivación/inactividad
<i>Bacillus cereus</i>		4.3 – 9.3	< 4.3 y > 9.3
<i>Clostridium perfringens</i>	6.0 – 7.0	5.5 – 9.0	<5.0 y > 8.3
<i>Clostridium botulinum</i>		4.6 – 9.0	<4.6 y 9.0
<i>Escherichia coli</i> (STEC) y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	6.0 – 7.0	4.4 – 9.0	< 4.4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5.8 – 6.6	4.4 – 6.8	< 4.4
<i>Listeria monocytogenes</i>	7	4.4 – 9.4	< 4.4
<i>Mycobacterium avium</i> , paraTB /Jn's	6.0 – 7.0	5.0 – 7.0	< 5.0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	6.6 – 7.0	5.6 – 8.0	< 5.6
<i>Salmonella spp.</i>	7.0 – 7.5	3.8 – 9.5	< 4.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.0 – 7.5	4.2 – 9.3	< 4.2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7.8	6.5 – 8.3	< 4.5
<i>Vibrio cholerae</i>	7.6	5.0 – 9.6	< 4.5
<i>Mycoplasma spp.</i>	7.8	5.0 – 7.0	< 5.0

(Anderson, 2008)



De igual manera, las becerras alimentadas con leche a libre acceso en las primeras semanas y adicionándoles después heno picado tienen un mejor desarrollo ruminal, alcanzando un peso mayor que con la forma tradicional de crianza (Jasper and Weary, 2002).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### III.- JUSTIFICACIÓN.

La leche antibiótica acidificada a libre acceso en la crianza ha sido utilizada principalmente en Canadá desde hace más de 6 años con buenos resultados, observando ganancias de peso de hasta 1 kg por día (Anderson, 2008). No obstante, existen reportes en donde se han aislado bacterias multi resistentes a antibióticos en heces de becerros alimentados con leche de desecho pasteurizada y no pasteurizada (Brunton *et al.*, 2014; Edrington *et al.*, 2012), en donde la presencia de Integrón 1 como promotor de multi resistencia es importante (Ashraf, 2009). Brunton *et al.* (2014) encontraron presencia de bacterias resistentes en cantidad un poco mayor en las becerras que fueron alimentadas con leche con antibiótico en comparación con las alimentadas con leche pura o sin antibiótico.

El manejo en crianza de becerras en México se da con sustituto de leche, leche sin antibiótico o leche con residuos de antibióticos. Sin embargo, no hay estudios que reporten que el consumo de leche con antibióticos afecte la prevalencia de resistencia bacteriana, lo cual podría disminuir el efecto de los antibióticos cuando hay infecciones durante esta etapa. Esta investigación tiene como finalidad estudiar la presencia de la resistencia bacteriana por medio del Integrón 1 y bla-CTX-M-2 en becerros alimentados con leche con residuos de antibióticos.

#### **IV.- HIPÓTESIS.**

La alimentación de las becerras en crianza con leche de retiro (con residuos de antibiótico) incrementa la excreción de enterobacterias resistentes a antibióticos, en comparación con las becerras criadas con leche libre de antibióticos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V.- OBJETIVOS.

### **5.1 Objetivo general.**

Evaluar el impacto de la crianza de becerras alimentadas de leche con residuos de antibióticos, acidificada y becerras criadas con leche sin antibióticos sobre la prevalencia de resistencia bacteriana a antibióticos en becerras.

### **5.2 Objetivo específico.**

Evaluar por medio de técnicas moleculares la excreción de resistencia bacteriana mediada por Integrón 1 y bla-CTX-M-2, las cuales se ha visto que transmiten resistencia a antibióticos.

## VI.- METODOLOGÍA

### 6.1 Lugar experimental

El trabajo de investigación se llevó a cabo en dos unidades productoras de leche. A continuación, se describe cada unidad de producción:

Unidad de producción 1.- Rincón del Paraíso, situado en el municipio de San Felipe en el estado de Guanajuato, con clima semiárido templado sin estación invernal definida. La temperatura media anual es de 16.7°C con máximas de 23.4°C y mínimas de 9°C. La precipitación anual promedio es de 473 mm (INEGI 2009).

Unidad de producción 2.- Fuentezuelas, situado en el municipio de Tequisquiapan, estado de Querétaro con clima semiárido, templado. La temperatura media anual es de 18°C con máximas de 28°C y mínimas de 6°C. La precipitación anual promedio es de 538 mm (INEGI, 2009).

### 6.2 Animales experimentales y manejo.

Unidad de producción 1.- Las veinte becerras se alojaron en el área de crianza en jaulas individuales, entre cada dos jaulas se colocó un recipiente el cual tiene un chupón para cada una de las becerras, estos recipientes contienen la leche antibiótica acidificada (Anexo 1) que van a consumir las becerras a libertad durante el día. Al nacimiento y por tres días a las becerras se les proporcionó el calostro, al cuarto día se les alimentó con la leche acidificada, aproximadamente 6 litros al día. La leche permaneció en el recipiente intermedio y se les ofreció *ad libitum* (Figura 3). A todas las becerras se les ofreció diariamente agua *ad libitum* y a partir del día cinco se les proporcionó concentrado iniciador comercial, en cubetas.



**Figura 3- Alojamiento de las becerras en el área de crianza de la unidad de producción No. 1 (Foto: Magdalena Espinosa)**

Cuando las becerras presentaron algún signo de enfermedad (fiebre, diarrea, tos, descarga nasal, decaimiento) fueron evaluadas y tratadas, y se llevó una bitácora diaria de los tratamientos.

El tratamiento pudo ser sólo sintomático usando analgésicos, antiinflamatorios, mucolíticos y cuando fuera necesario el uso de antibióticos se utilizaron: gentamicina, penicilina procaínica-dihidro estreptomicina, sulfas-trimetoprim, emicina.

Unidad de producción 2.- Las veinte becerras en el área de crianza fueron colocadas en casetas con corral individual (Figura 4), se alimentaron en cubeta con leche no antibiótica, sometida a un proceso de purificación por rayos ultravioleta durante 70 min. Al nacer y por tres días se les suministró el calostro a las becerras,

al cuarto día en adelante se les alimentó con tomas de 3 litros cada una, de leche sin antibiótico y purificada con rayos ultravioleta, 2 veces al día. A todas las becerras se les ofreció diariamente agua *ad libitum* y concentrado comercial iniciador en cubetas.

Cuando las becerras presentaron algún signo de enfermedad (fiebre, diarrea, tos, descarga nasal, decaimiento) fueron evaluadas y tratadas.

El tratamiento pudo ser sólo sintomático usando analgésicos, antiinflamatorios, mucolíticos, antihistamínico y cuando fuera necesario se usaron antibióticos tales como estreptomina, sulfas-trimetoprim, enrofloxacina, tilosina ó florfenicol. Los tratamientos aplicados fueron registrados.



**Figura 4- Alojamiento de las becerras en el área de crianza de la unidad de producción No. 2. (Foto, Magdalena Espinosa)**

### **6.3 Muestreo.**

En cada una de las unidades de producción se tomó la muestra de  $n= 20$  becerras, de las cuales se obtuvieron muestras de heces. Solamente se hicieron 4 muestreos a diferentes edades, el primer muestreo se realizó entre los 0 y 7 días de edad, el segundo muestreo entre los 8 y 15 días de edad, el tercer muestreo entre los 21 y 30 días de edad y el cuarto muestreo a los 45 y 60 días de edad en cada unidad de producción de acuerdo con la metodología reportada por Brunton *et al.* (2014).

#### **6.3.1 Toma de muestras**

Cada animal se inmovilizó de tal forma que quedase expuesta la porción caudal a la persona encargada de tomar la muestra, después se colocó un guante de palpación y se lubricó el dedo índice con agua limpia para introducir el dedo lubricado en el ano del animal, y dando masaje se extrajeron las heces depositadas en el recto. Las heces se depositaron en una bolsa transparente limpia, rotulando en la misma la fecha de muestreo y el número de identificación del animal.

Después de ser obtenidas, las muestras, se mantuvieron en congelación a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **6.4 Técnicas moleculares**

#### **6.4.1 Extracción de DNA**

La extracción de DNA de las muestras de heces se llevó a cabo utilizando un kit comercial de extracción (MoBio, PowerSoil Isolation Kit) con columnas de



sílica y microperlas, siguiendo las condiciones del fabricante, con algunas modificaciones que a continuación se mencionan. Para iniciar se pesaban 0.25 g de la muestra en el tubo con microperlas (Glass Bead tube). La destrucción de las células mediante acción química se hizo con la solución Bead Solution, homogeneizando con pistilo ya que las muestras eran muy sólidas y posteriormente la solución C1 del Kit, un ciclo de homogenización (Powerlizer 24, MoBio, USA) por un tiempo de 45 s a 2500 rpm. Enseguida se llevaban a cabo dos lavados por medio de la solución C2 y C3 del kit, entre ellas se dejaba un período de incubación de 5 min a una temperatura de 4°C y centrifugación a 11000 rpm/1min.

Después de los lavados se colocaba la solución C4 que contiene sal y que es afín al DNA y con la cual la muestra era colocada en las columnas de sílica por tres ocasiones, esperando que todo el DNA de la muestra quede en la columna. A continuación, se colocaba la solución C5 que contiene etanol, con la cual se espera purificar el DNA de cualquier proteína o compuesto fenólico que pueda quedar junto al DNA al final de este paso se llevaba a cabo una doble centrifugación para quitar todo etanol de la columna, ya que, al mismo tiempo, residuos de etanol pueden inhibir posteriormente la PCR. Finalmente se colocó la solución de elución (C6), dejando un periodo de incubación a temperatura ambiente de 1 min, para después centrifugar y que el DNA pase a través de la columna, quedando en un tubo eppendorf listo para usarse.

#### **6.4.2 Amplificación por PCR en punto final de resistencia bacteriana.**

La reacción en cadena a la polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) se utilizaron para la identificación de resistencia bacteriana, según el protocolo y oligonucleótidos mencionados por Ahmed *et al.*, en 2007, en los resultados que obtuvieron aparecen como portadores de resistencia el Integrón 1 (tetraciclina, estreptomicina, ampicilina y sulfametoxazol-trimetoprim) y el CTX-M (ampicilina, AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; cefalotina, FOX, cefoxitina; CTT, cefotetan;

CFP, cefoperazona; cefotaxima; CAZ, ceftazidima; cefpodoxima; ceftriazona; ATM, aztreonam; ácido nalidíxico, CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; CHL, cloranfenicol; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; estreptomina; TET, tetraciclina; sulfametoxazol-trimetoprim.

**Cuadro 10- Primers usados en este estudio.**

Primer	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Longitud del producto (pb)	Referencia
Integrón clase 1 5'- CS 3'- CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	VARIABLE	Lèvesque <i>et al</i> (1995)
<sup>bla</sup> CTX-M CTX-M-F CTX-M-R	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	550	Bonnet <i>et al</i> (2000)

(Ahmed, 2007)

La reacción de la PCR se hizo a un volumen final de 15 µl, de los cuales 1.8 µl fueron agua libre de DNAasas, mezcla para PCR 7.5 µl conteniendo el Buffer 10x + dNTPs (dinucleótidos trifosfato) + la enzima Taq (TAKARA), 0.2µl de cada oligonucleótido (Integrón y CTX-M), 1.8 µl de BSA (Albúmina de suero de bovino como estabilizador enzimático) y 2 µl de DNA previamente extraído de cada una de las muestras de heces, cuadro 11. El ciclo de la PCR se llevó a cabo en un termociclador punto final (Bio Rad C1000, Singapore) con el siguiente protocolo de amplificación, cuadro 12 y 13:

**Cuadro 11- Mezcla de reactivos para amplificación de PCR en punto final.**

REACTIVO	CANTIDAD μl		REACTIVO	CANTIDAD μl
PCR MIX	7.5		PCR MIX	7.5
INTEGRÓN F	0.2		CTX-M F	0.2
INTEGRÓN R	0.2		CTX-M R	0.2
H <sub>2</sub> O	1.8		H <sub>2</sub> O	1.8
BSA	1.8		BSA	1.8
DNA	2.0		DNA	2.0
<b>TOTAL</b>	<b>15.0</b>		<b>TOTAL</b>	<b>15.0</b>

**Cuadro 12- Ciclo de amplificación de PCR punto final para la secuencia de Integrón 1**

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	4 min
Desnaturalización	95 °C	30 seg
Alineación	55°C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	7 min

**Cuadro 13- Ciclo de amplificación de PCR punto final para la secuencia bla-CTX-M-2**

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	4 min
Desnaturalización	95 °C	30 seg
Alineación	52°C	30 seg 35 ciclos
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	7 min

#### **6.4.3.- Visualización de DNA de los productos de PCR en geles de agarosa.**

La observación del DNA y productos de PCR se llevaron a cabo en geles de agarosa al 2% (mezclando 50 ml de TAE 1x Buffer con base de tris, ácido acético y EDTA, BioRad, USA, con un 1 g de agarosa). En el gel se colocaron 5 µl de cada muestra con 2µl del búfer de carga (Red Gel, marca Biotium), con una escalera Thermo 3000 pb, se corrió en una cámara de electroforesis horizontal a un voltaje constante de 60 V durante 60 min. La apreciación del gel se llevó a cabo con luz UV mediante un fotodocumentador (Gel Doc XR System, BioRad, Singapore).

El análisis de bandas se realizó por medio del software Quantity One. El cual es un programa de análisis de geles 1D, de uso sencillo pero capaz de analizar geles procedentes de electroforesis de una dimensión y determinar de forma práctica y automatizada la intensidad, así como el peso molecular de las distintas bandas presentes en la muestra, junto con el sistema de documentación de geles Gel Doc XR. La medida de comparación que se usó para obtener el peso molecular de las bandas fue la escalera 3000 pb (Thermo Fisher Scientific, USA) usada en los geles.

#### 6.4.5 Análisis estadístico.

Un estudio transversal descriptivo fue llevado a cabo para determinar la prevalencia de la resistencia bacteriana en los dos grupos de becerras alimentadas con leche con y sin residuos de antibióticos, por medio del análisis de ADN en las muestras de heces, usando la fórmula:

Prevalencia = n° de casos / población en estudio en un momento dado

Razón de la prevalencia = prevalencia en los expuestos / prevalencia en los no expuestos

Factor de riesgo, OR (odds ratio), es el grado de asociación que existe entre una enfermedad o condición de interés y cierta exposición.

$\chi^2$  = valorar la independencia entre las variables nominales

Posteriormente para comparar el peso al nacimiento, ganancia diaria de peso y el peso al destete de las becerras se utilizó la Prueba t de student, con significancia del 5%

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{S^2_{p1}/n_1 + S^2_{p2}/n_2}}$$

En el análisis de los datos se usaron los programas EPIDAT para análisis epidemiológico de datos, versión 3.1 y SPSS para el análisis estadístico de datos.

#### 6.4.6. Residuos biológicos

Los residuos biológicos se desecharon en bolsas rojas para su posterior incineración de acuerdo con lo descrito por la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

## VII.- RESULTADOS

Los pesos al destete y la ganancia diaria de peso de las becerras de ambos ranchos se muestran en el Cuadro 14. Los animales alimentados con leche sin antibiótico tuvieron una ganancia diaria de peso ( $P=0.001$ ) y peso al destete ( $P=0.003$ ) significativamente mayores en comparación con los animales que consumieron leche con antibiótico.

**Cuadro 14- Peso al nacimiento, peso al destete y ganancia diaria de peso de las becerras alimentadas con leche con antibiótico y sin antibiótico en el período de crianza.**

Variable	Becerras alimentadas con leche con antibiótico		Becerras alimentadas con leche sin antibiótico		P
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	
Peso al destete	70.9 kg	11.3	92.0 kg	21.0	0.003
Ganancia diaria de peso	0.5 kg	0.17	0.7 kg	0.1	0.001

Con un 95% de certidumbre, estos datos nos indican que al ser destetadas las becerras tuvieron una diferencia significativa entre las ganancias de peso diarias y el peso obtenido al destete esto nos indica un mejor desempeño de la alimentación con leche sin antibiótico en esta investigación.

Por otro lado, las becerras fueron medicadas en una o más ocasiones durante el período de la crianza de acuerdo con los protocolos establecidos de cada una de las granjas y fue en promedio de 2.3 veces tratadas las becerras LCA contra 1 vez promedio en las becerras LSA. En el Cuadro 15 se muestra que el número de becerras tratadas con antibiótico en el grupo LCA fue de 19 de las 20 becerras (95%)

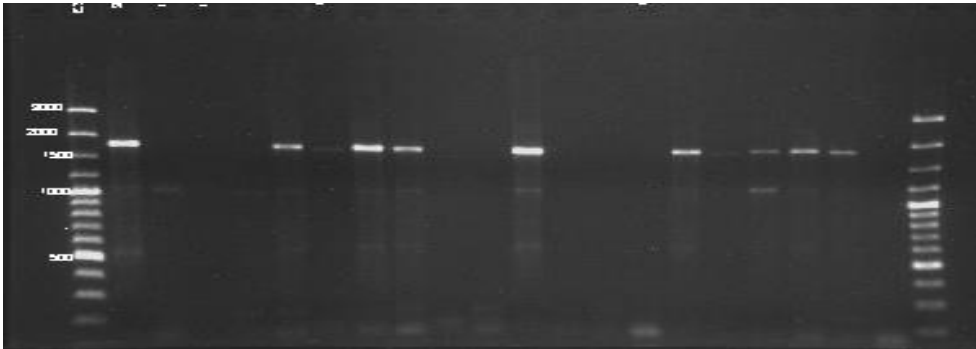
y en el grupo LSA fueron 12 de las 20 becerras (60%). Adicionalmente, 10 de 20 becerras tuvieron tratamiento no antibiótico (sueros, vitaminas y/o probióticos) en el grupo LSA. La mortalidad en el lote que se alimentó con leche con antibiótico no tuvo bajas 0%, en el grupo alimentado con leche sin antibiótico una de las becerras enfermo de neumonía y murió a las 6 semanas de vida, la mortalidad fue de 5% (Cuadro 15).

**Cuadro 15- Tratamientos y mortalidad de las becerras alimentadas con leche con antibiótico y sin antibiótico durante el período de crianza**

	<b>Becerras alimentadas con leche con antibiótico (LCA)</b>		<b>Becerras alimentadas con leche sin antibiótico (LSA)</b>	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<b>Becerras tratadas con antibiótico</b>	19/20	95	12/20	60
<b>Becerras tratadas sin antibiótico</b>	0/20	0	10/20	50
<b>Becerras sin tratamientos</b>	1/20	5	3/20	15
<b>Mortalidad</b>	0/20	0	1/20	5

La Figura 5 nos muestra un gel representativo de las amplificaciones de integrón 1, sin embargo, en el anexo 2 se encuentran el resto de los gels, así como los valores de las amplificaciones y las imágenes obtenidas de los gels.

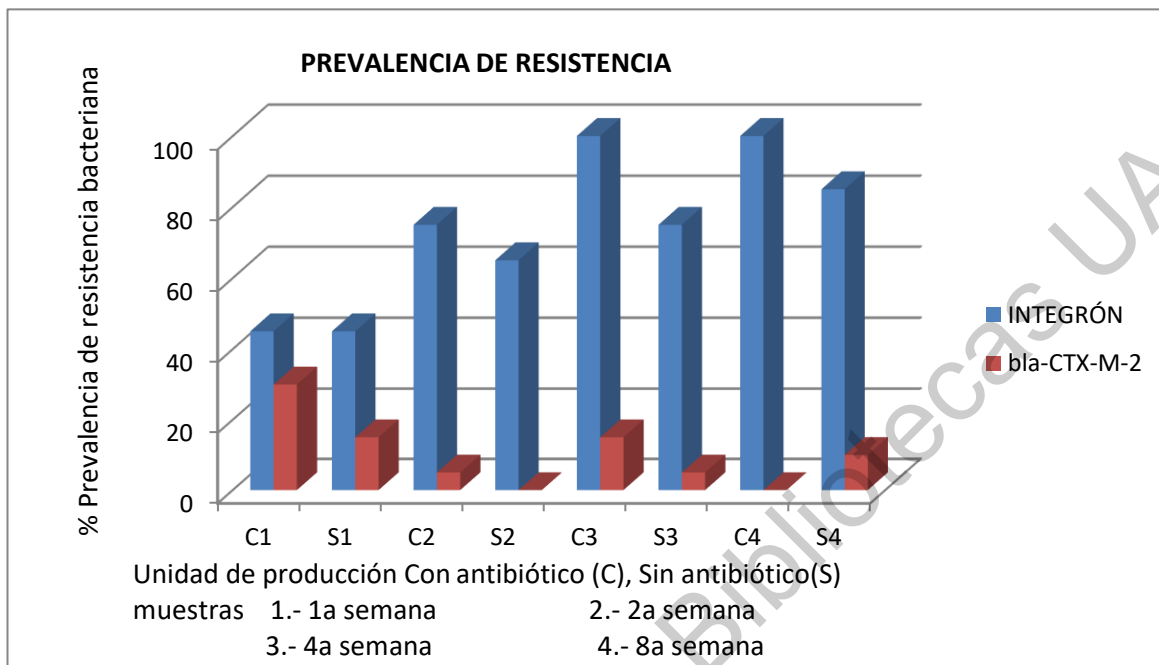
**FIGURA 5- Impresión representativa de las amplificaciones en gel del Integrón 1**



Desde el nacimiento, en la primera muestra de heces de las becerras se observó la presencia del Integrón 1 y del bla-CTX-M-2 en ambas unidades de producción. No obstante, hubo una mayor prevalencia tanto de Integrón 1 (100%) como del bla-CTX-M-2 (30%) en becerras alimentadas con LCA en comparación con becerras alimentadas con LSA del 85% de resistencia bacteriana por Integrón 1 (Figura 5 y Figura 6). Aunado a esto se encontró que la resistencia bacteriana con Integrón 1 y bla-CTX-M-2 no existe relación con el alimento; lo que sugiere que otros factores podrían estar relacionados.



**Figura 6- Prevalencia de los animales con resistencia bacteriana durante el período de crianza, alimentadas con leche con antibiótico (C) y leche sin antibiótico (S)**



Dirección General de Bibliotecas UAQ

**Cuadro 16 - Prevalencia de la resistencia bacteriana, positivas a Integrón 1, bla-CTX-M de las becerras Holstein a las diferentes edades durante la crianza.**

INTEGRÓN 1	Becerras alimentadas con leche con antibiótico (LCA)				Becerras alimentadas con leche sin antibiótico (LSA)			
	(+)	Prevalencia %	(-)	Total	(+)	Prevalencia %	(-)	Total
7 días	9	45	11	20	9	45	11	20
15 días	15	75	5	20	13	65	7	20
30 días	20	100	0	20	15	75	5	20
45 días	20	100	0	20	17	85	2	19
Totales	64	80.62	16	80	54	65.82	25	79
<b>Bla-CTX-M</b>								
7 días	6	30	14	20	4	20	16	20
15 días	1	5	19	20	0	0	20	20
30 días	4	20	17	20	1	5	19	20
45 días	0	0	20	20	2	10	17	19
Totales	11	13.75	69	80	7	8.8	72	79

(+) Positivos a resistencia, (-) Negativos a resistencia.

Nº de becerras positivas a la resistencia bacteriana/ Nº total de animales

Del total de las 159 muestras obtenidas del grupo alimentado con LCA y LSA, 118 de ellas fueron positivas a la presencia de resistencia bacteriana a antibióticos detectada por medio del Integrón 1 y 41 muestras negativas, esto nos da un factor de riesgo OR= 1.85 nos indica la probabilidad de que las becerras alimentadas con LCA presenten resistencia bacteriana a antibióticos por Integrón 1 es 1,85 veces mayor que las alimentadas con LSA. Del total de las 159 muestras

obtenidas del grupo alimentado con LCA y LSA, 16 de ellas fueron positivas a la presencia de resistencia bacteriana a antibióticos detectada por medio del bla-CTX-M-2 y 145 muestras negativas, esto nos da un factor de riesgo OR= 1.64 indicando la probabilidad de que las becerras alimentadas con LCA presenten resistencia bacteriana por bla-CTX-M-2 de 1.64 veces mayor que las alimentadas con LSA (Cuadro 17).

**Cuadro 17- El riesgo de presentar resistencia bacteriana a antibióticos, de acuerdo con la presencia de Integrón 1 y bla-CTX-M-2**

Factor de riesgo	Total, Integrón 1 y bla-CTX-M-2		Integrón 1		Bla-CTX-M-2	
	Con resistencia	Sin resistencia	Con resistencia	Sin resistencia	Con resistencia	Sin resistencia
Leche con antibiótico	75	85	64	16	11	69
Leche sin antibiótico	61	97	54	25	7	72
<b>Total</b>	136	182	118	41	18	141
<b>OR</b>	1.40		1.85		1.64	
<b>Ji<sup>2</sup> (p)</b>	0.14		0.09		0.33	

En el Cuadro 17 se observa también el resultado de Ji<sup>2</sup> para evaluar la relación del tipo de alimentación en cuanto a la presencia de resistencia bacteriana causada por Integrón 1 y bla-CTX-M, inferimos que estadísticamente no hay una diferencia significativa.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## VIII.- DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la resistencia bacteriana se manifiesta desde el nacimiento de las becerras en ambas producciones. No obstante, las becerras alimentadas con leche con residuos de antibiótico tuvieron una mayor prevalencia de resistencia bacteriana, que los animales alimentados con leche sin antibiótico; sin embargo, estadísticamente son similares. Diferentes autores han reportado que animales jóvenes suelen albergar mayor resistencia en su microbiota que los animales adultos (Wierup *et al.*, 1975, Howe and Linton, 1976; Hinton *et al.*, 1985), posiblemente como resultado de la transmisión fecal-oral y las mutaciones de las cepas bacterianas en su tracto gastrointestinal, o a los altos niveles de antimicrobianos que pueden llegar a usarse en la etapa de crianza (Edrington *et al.*, 2012). Además, dicha resistencia puede no estar relacionada con el uso reciente de los antimicrobianos; ya que existen otros factores relacionados como la dieta, manejo y medio ambiente (Wierup *et al.*, 1975; Gilliver *et al.*, 1999; Kanenne *et al.*, 2008). Los hallazgos en los mecanismos de resistencia han mostrado la presencia de elementos genéticos móviles, entre ellos los plásmidos, transposones e integrones (Lanz, 2003; Khachatryan, 2004), por lo que habilitan su transferencia a una gran variedad de especies bacterianas (Lèvesque *et al.*, 1997). La presencia de Integrón 1 y de la familia de las betalactamasas bla-CTX-M han jugado un papel muy importante en la diseminación de la resistencia bacteriana sobre todo en las bacterias Gram negativas, la intensa actividad del metabolismo bacteriano propio del sistema gastrointestinal determina el incremento del intercambio del material genético siendo este, por consiguiente, el lugar de elección para la transferencia a gran escala de los genes de resistencia (Puig, 2011).

La resistencia bacteriana en ambas unidades productivas fue observada tanto con Integrón 1 y bla-CTX-M-2, existiendo mayor prevalencia de Integrón 1 en ambas unidades productivas que de bla-CTX-M-2. El Integrón 1 tienen una alta

capacidad para traer consigo varios de los casetes genéticos de resistencia bacteriana y facilidad para transmitirse ya sea solo en el cromosoma bacteriano o formando parte de transposones o plásmidos (Levèsque *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2007). Ashraf *et al.*, (2009) hicieron aislamientos bacterianos de heces de becerras con diarrea de los cuales aislaron e identificaron a la *E coli*. Posteriormente, con discos de difusión y mediante la detección de genes de resistencia por PCR se revisó la resistencia bacteriana, dando como resultado el 10.4% a multi-resistencia, de los cuales el 36% de becerras positivas a resistencia por Integrón 1. Liming *et al.* (2010) realizaron estudios en heces de diferentes especies haciendo aislamientos de *E. coli* y buscando resistencia bacteriana mediante la presencia de Integrón 1; obteniendo como resultado 41.94% en aves, cerdos 20% y ganado lechero 5% con resistencia bacteriana. Sin embargo, en este estudio la prevalencia encontrada a Integrón 1 durante la crianza de las becerras desde el nacimiento fue de 45% y llegó hasta un 100% en el caso de becerras alimentadas con leche con antibiótico, y hasta un 85% en becerras alimentadas con leche sin antibiótico. Lo cual es menor a lo observado por Edrington *et al.* (2012), quienes mostraron que becerros alimentados con leche pasteurizada con antibióticos o sin antibióticos tienen una alta prevalencia de resistencia bacteriana de hasta 41% llegando a un 100% con ambos tipos de alimentación, pero la resistencia disminuye con la edad. Por lo que, los autores consideran que la resistencia está asociada con la inmadurez del sistema digestivo y la limitada diversidad bacteriana. No obstante, Khachatryan *et al.* (2004) mostraron que las bacterias resistentes parecen sobrevivir mejor en tracto digestivo de animales jóvenes. Sin embargo, en nuestro estudio no podemos dilucidar esa diferencia debido a que la investigación sólo se llevó a cabo en la etapa de crianza y no abarcó el destete.

Por otro lado, la amplificación del Integrón 1 dio diferentes tamaños de pares de bases en las muestras positivas, coincidiendo con otros estudios (Levèsque *et al.*, 1997 y Srinivasan *et al.*, 2007), en donde dependiendo del casete ó casetes de resistencia incorporados entre el segmento conservado del Integrón 1

fue la medida del amplicón resultante. Kannene *et al.*, (2008) reportaron que reemplazar la alimentación con leche medicada con antibiótico en lugar de la leche sin antibiótico en becerros incrementó la susceptibilidad a tetraciclinas en *E. coli* y *Salmonella* durante los primeros tres meses que la leche sin antibiótico fue ofrecida a los becerros, pero la resistencia a las tetraciclinas apareció con el tiempo. Además, Edrington *et al.* (2012) reportaron mayor la diversidad bacteriana en becerros alimentados con leche pasteurizada con antibióticos que en becerros alimentados con leche no pasteurizada. En cambio, Srinivasan *et al.* (2007) reportaron presencia de Integrón 1 en diferentes tamaños con resultados de 89.3% en suelo de granjas lecheras y 45.8% en lugares sin granjas lecheras. Por lo que la presencia de diferentes tipos de casetes de resistencia presentes en las muestras de este estudio nos muestra una multi-resistencia bacteriana, la cual puede estar mediada por diferentes bacterias y antibióticos.

Respecto a la resistencia a ceftiofur identificada mediante la detección de bla-CTX-M-2 fue mayor (30%) en becerras alimentadas con leche con antibiótico y disminuyó totalmente (0%) al término de la crianza. No obstante, la resistencia de las becerras alimentadas con leche sin antibiótico fue menor (20%) disminuyendo solamente el 10% al término de la crianza. El plásmido que contiene los genes CTX-M, los cuales codifican las enzimas lactamasas, han sido encontradas en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp. de alimento, humanos, animales de producción, silvestres y de compañía (Fernández *et al.*, 2007; Zarazaga *et al.*, 2006; Liebana *et al.*, 2006; Meunier *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2005).

Diferentes estudios han demostrado que la prevalencia de resistencia bacteriana es variable. Costa (2006) realizó un estudio en heces de diversos animales de vida salvaje e hizo aislamiento de *Escherichia coli* y observaron que es una bacteria multiresistente, obteniendo 12.5% positivas a CTX-Levine, de las cuales a una de estas se analizó mediante PCR con diferentes primers para CTX resultando positiva. Liebana *et al.*, (2006) en un estudio longitudinal en una granja

de ganado lechero del Reino Unido reportaron aislados de *E. coli* resistente a un amplio rango de  $\beta$  lactamasas, mostrando mayor prevalencia en becerros (62-100%) que en adultos (15-50%). Además, aislados de *E. coli* productoras de CTM-X fueron encontrados en las becerreras, en el patio y entre otros lugares de la granja. Por lo que, los autores mencionan que el uso de antibióticos para tratamientos de las enfermedades de los animales, no juegan un papel importante en el mantenimiento de la resistencia a antibióticos betalactámicos (ampicilina, ceftiofur, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona y cefpodoxima y a la estreptomicina), sino que existen otros factores que pueden mantener la transmisión del plásmido (Teale *et al.*, 2005). Aunado a esto, Hartman *et al.* (2012) aislaron *E. coli* e identificaron la resistencia mediante PCR a los diferentes grupos de CTX en heces de bovinos y suelo de los ranchos lecheros en diferentes regiones de Francia y el hallazgo fue la presencia para los grupos de CTX y su permanencia en el medio ambiente con una prevalencia del 20%. No obstante, en este estudio la prevalencia es parecida a Hartman *et al.* (2012), en las primeras semanas de vida de las becerras, sin embargo, va disminuyendo la prevalencia con la edad, esto tal vez pueda estar relacionado con el cambio en la diversidad microbiana que presenta el becerro con el tiempo (Edrington *et al.*, 2012) o con otros factores que pueden influir en la transmisión de plásmidos (Teale *et al.*, 2005) y no estar relacionado con la alimentación de leche con residuos de antibióticos.

Por otro lado, se observó mortalidad del 5% en los animales alimentados LSA y en los animales LCA no hubo mortalidad. Algunos autores mencionan que durante esta etapa de lactación es donde hay una alta morbilidad y mortalidad por enfermedades digestivas y respiratorias (Radostis, *et al.*, 2000). Adicionalmente se ha reportado que animales jóvenes tienen mayor susceptibilidad a la resistencia bacteriana por los tratamientos a los cuales son sometidos (Edrington *et al.*, 2012).



Respecto a los parámetros productivos, las becerras alimentadas con LCA tuvieron una menor ganancia diaria de peso de peso en comparación con becerras alimentadas con LSA. Brunton *et al.* (2004) mencionan que los animales no presentan diferencias en el peso al destete cuando son alimentadas con leche con residuos de antibiótico; no obstante, en este trabajo hubo una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) tanto en GDP como en peso al destete, el manejo juega un papel importante por el bajo peso de los animales al destete.

Por último, es importante hacer mayor investigación para dilucidar si la resistencia bacteriana se mantiene después del destete, principalmente con el Integrón 1; ya que se presenta con una mayor prevalencia que con bla-CTX-M-2. Además, hay que considerar la revisión de otros genes de CTX-M (Randall *et al.*, 2014) que tal vez puedan estar asociados con la administración de leche, pero que no fueron estudiados en este proyecto.

## **IX.- CONCLUSIONES**

La resistencia bacteriana mediante la identificación del Integrón 1 y bla-CTX-M-2 fue observada en becerras tanto alimentadas con leche con y sin antibióticos. No obstante, animales alimentados con leche sin antibiótico tuvieron mayor ganancia diaria de peso y mejores pesos al destete en comparación con becerras alimentadas con leche con antibiótico.

## X.- LITERATURA CITADA.

Agudelo G. D. A. y Bedoya M. O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Rev. Lasallista Investig., 2(1):38-42

Ahmed, A. M., Yusuke, M., Maiko, S., Akito, M., Hitoshi, W., Yukio, F., and Tadashi, S. (2007). Zoo Animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. Appl. Environ. Microb. 73, (20): 6686–6690.

Alais, Ch. (2003). Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. Ed. Reverte, S. A. p. 3-21

Araujo F. O. y Vergara-López J. (2007) Propiedades físicas y químicas del rumen. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15 (1); 133-140.

Ashraf, M. A., Emad, E. A. Y., Salama, A. O., Yojiro, I., Sabry A. E. and Tadashi, S. (2009). Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. Vet. Microb. 136: 397–402.

Alós, J. I. (2015), Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2015, 33(10):692–699.

Anderson, N. G. (2008). Experiences with free-access acidified-milk feeding in Ontario. Proceedings of the 41st Annual Meeting of the AABP, Charlotte (NC). Stillwater (OK): Frontier Printers Inc, 41:12–24.

Bennet, P. M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J. of Antimicrob. Chemoth. 43: 1-4.

Blanco, O. M. A. (2012). Alimentación en becerras lactantes. Departamento de rumiantes. FMVZ: UNAM.

<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgZooG001.pdf>.

Betancor, L., Gadea, M.P. y Flores, K. (2008) –Temas de Bacteriología y Virología Médica. Instituto de Higiene. p. 59-80

Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E. and Stokes, H. W. (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 15(7): 301- 309.

Brunton, L. A., Reeves, H. B., Snow, L. C. and Jones, J. R. (2014). A longitudinal field trial assessing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL- producing E. coli in calves. Prev. Vet. Med., 117(2): 403 – 412.

Clayton, K., Bush, D. y Keener, K. (2014) Métodos para la conservación de alimentos. Purdue University. Department food Science.FS-15-S-W. [www.foodsci.purdue.edu](http://www.foodsci.purdue.edu) consultado nov-2014

Coll, P., Coque, M. T., Domínguez, M. A., Vázquez, J. y Vila, J. (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. p. 1-68

Constable, P. D. (2004). Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. J. Vet. Intern. Med. 18(1): 8 – 17.

Correa, A. F. (2006) Estudio del desarrollo de los estómagos de los rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Granma, Unidad docente Santiago de Cuba. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Costa D., Poeta P., Sáenz Y., Vinué L., Rojo-Bezares B., Jouini A., Zarazaga M., Rodrigues J. and Torres C. (2006). Detection of Escherichia coli harbouring extended-spectrum *b*-lactamases of the CTX-M,TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. J. Antimicrob. Chemoth. 5 October 2006

Crook, J. A., Cullor, J. S., Collar, C., Rossitto, P. V., and Parko, J. (2013). Pathogen reduction by uv light of waste milk for improved animal health of neonatal calves. NMC Annual Meeting Proceedings 2013, 129- 130

Cunningham, J. G. (2003) Fisiología Veterinaria. ELSEVIER 3ª ed.

De Verdier, K., Nyman, A., Greko, C. and Bengtsson, B. (2012) Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from swedish dairy calves. Acta Vet. Scand. 54:2, 1 -10

Edrington, T. S., Farrow, R. L., Carter, B. H., Islas, A., Hagevoort, G. R., Callaway, T. R., Anderson, R. C. and Nisbet, D. J. (2012). Age and diet effects on fecal populations and antibiotic resistance of a multi-drug resistant *Escherichia coli* in dairy calves. Agric. Food Anal. Bacteriol. 2 (3): 162 - 174

Elizondo-Salazar, J.A., Heinrichs, A. J. and Gelsinger, S. L. (2013). Pasteurization of Non-Saleable Milk, DSE 13,187. extension.psu.edu.

EPIDAT Programa para análisis epidemiológico y estadístico de datos. Versión 3.1

Errecalde, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO Sanidad y Producción Animal (162, ISSN1014-1200).

Fernández R. F.; Hernández, L. J.; Martínez, P. L. M. y Machado B. C. (2003). Resistencia bacteriana. Rev. Cubana Med. Milit. 2003; 32(1):44-8

Fuchs, L. Y., Chiu, L., Conde, C., González, V. M., Noguez, A. H., Calderón, E., Avonce, N. y Ovando, C. (1994) Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública Mex. 36:428-438.

García , L. J. M., (1999) Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos. Actualidad SEM 28:18.

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., y Martínez-Romero, E. (2009). Genética genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Salud Pública Mex. 51(3):S439-S446.

Garzón, Q. B. (2007) Sustitutos lecheros en la alimentación de terneros. REDVET Rev. electrón. vet. Vol. VIII, Nº 5, Mayo/2007. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.

Garzón Q. B. (2008) Sustitutos lecheros en la alimentación de terneros. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Gasque, G. R. (2008). Enciclopedia bovina cría de becerras lecheras. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (1a ed.).

Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M. and Stokes, H. W. (2008). The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance J. Bacteriol., 190(14):5095–5100.

Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, S.M. Hazel, and Hart, C. A. (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. Nature. 401:233-234.

González-Púmariega, M., Lyvernhes, T. M, y Sánchez-Lamar, A. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. Theoria, Vol. 18 (2):69-80.

González R. G., Mella M. S., Zemelman Z. R., Bello T. H. y Domínguez Y. M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Rev. Méd. Chile, 132:619-626.

Goodman, L. S. and Gilman, A. (1975). The pharmacological basis of therapeutics. 5<sup>th</sup> Ed. Macmillan Publishing Co., Inc.

Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Nutr Hosp.; 22(2):14-9.

Hartmann A., Locatelli A., Amoureux L., Depret G., Jolivet C., Gueneau E. and Neuwirth C. (2012). Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). Original research article published: 09 march 2012 doi: 10.3389/fmicb.2012.00083

Hegland, R. B., M. R. Lambert, N. L. Jacobson y L. C. Payne. 1957. Efecto de los factores dietéticos y de manejo en el reflejo de cierre del surco del esófago en animales lecheros. J. Dairy Sci. 40:1107-1113.

Heinrichs, J. (2005) Rumen development in the dairy calf. Advances in Dairy Technology. 17, 179–187. Dairy and Animal Science Department, the Pennsylvania State University, University Park, PA.

Heinrichs, J. and Zanton, G. (2007) Understanding Dietary Fiber: The role of forage fiber in rumen development and heifer growth. 22nd Annual Southwest Nutrition & Management Conference February 22-23, 2007 Tempe, AZ - 2

Hinton, M., Rixson, P. D., Allen, V., and Linton, A. H. (1984). The persistence of drug resistant *Escherichia coli* strains in the majority faecal flora of calves. J. Appl. Bacteriol. 58:131-138.

Hopkins, K.L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E. J., and Carattoli, A. (2006) Replicon Typing of Plasmids Carrying CTX-M or CMY - Lactamases Circulating among Salmonella and Escherichia coli Isolates. Antimicrob. Agents Chemoter 50:9, 3203-3206

Howe, K., and A.H. Linton. (1976). A longitudinal study of *Escherichia coli* in cows and calves with special reference to the distribution of O-antigen types and antibiotic resistance. J. Appl. Bacteriol. 40:331-340.

Jasper, J. and Weary, D. M. (2002). Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. J. Dairy Sci. 85(11), 3054–3058.

Jawetz, E., Melnick J. L. and Adelberg, E. A. (2011). Mc Graw Hill 25<sup>a</sup> Ed. [www.freebooks.com](http://www.freebooks.com)

Jensen, M. B. and Budde, M. (2006). The effects of milk feeding method and group size on feeding behavior and cross-sucking in group-housed dairy Calves. *J. Dairy Sci.*, 89(12), 4778–4783.

Kaneene, J.B., L.D. Warnick, C.A. Bolin, R.J. Erskine, K. May, and R.A. Miller. (2008). Changes in tetra- cycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves. *J. Clin. Microbiol.* 46:1968-1977.

Khachatryan, A.R., D.D. Hancock, T.E. Besser, and D.R. Call. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:752-757.

Krause, K. M. and Oetzel, G. R. (2006). -Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 126 (2006):215-236.

Labarca, J., (2002). Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev. Chil Infect*; 19 (Supl. 2): S 157-160.

Langford, F. M., Weary, D. M., and Fisher, L. (2003). Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *J. Dairy Sci.* 86(12), 3963–3966.

Lanz R., Kuhnert P. and Boerlin P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91: 73–84.

La Rosa, H. D., Gómez, C. E. J. y Sánchez C. N. (2014) La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Rev. Cubana Pediatr.* 86 (4): 502-513.

Le Jeune, J. T. and Rajala-Schultz, P. J. (2009) Unpasteurized milk: A continued public health threat. *Clin. Infect. Dis.* 48:93–100.

Lukášova J. and Sustáckova A., (2003). *Enterococci* and Antibiotic Resistance. Acta Vet. Brno. 72: 315-323.

Malmuthuge, N., Griebel. P. J., and Guan, L. L (2015). The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. Front Vet Sci. 2015, Vol. 2, Art. 361. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

Martínez, J. A. y Sánchez, F. (2007). Mecanismos de acción de los antibióticos. Jano 2006, No. 1 [www.doyma.es/janoonline](http://www.doyma.es/janoonline)

Martínez, M. L. (2007) Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007;25 Supl. 2:38-47.

Moreno, M. C., González, E. R. y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cab. Cuello 2009. 69:185-192.

Morrow, D. A. (1980) Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. W. B. Saunders Company

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Ortega, P. D. y Zurita, J. (2013). Integrones plataformas bacterianas de recombinación genética y su influencia en la resistencia bacteriana. Rev. ecuat. med. y cien. biol. 2013, 167-185.

Park, Y. W., Juárez, M. Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Res. 68, 88-113.



Pérez, D. M. (1978) Fisiología de la lactación. Manual sobre ganado lechero. Patronato para el apoyo de la investigación pecuaria.

Pochón, D. O. (2001). Surco reticular de los rumiantes. Revisión bibliográfica. Rev. Vet., 12/13(1 y 2), 34–44.

Puig, P. Y., Espino, H. M. y Leyva, C. V. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panorama Cuba y Salud 6(1):30-38.

Quigley, J. (2005). Acidosis ruminal e ingestión ruminal de leche en becerros. Calf Notes 113. www.calfnotes.com

Radostis, O. M., Gay C. C., Blood D. C. and Hinchcliff K. W., (2000). Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. W. B. Saunders Company Ltd. 9<sup>th</sup> ed.

Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., Mc Laren, I., Coldhan, N., Teale, C. and Jones, J. (2014) Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Walles in 2011. Res. Vet. Sci. 96 (1):15-24.

Relling, A. E., y Mattioli, G. A. (2003.). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Ed. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP: EDULP.

Requena, L. (2001). Vamos a Estudiar Química Orgánica. Ediciones ENEVA.

Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O. and V. Monteils, V. (2013). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. J. Appl. Microbiol. 116:245--257.

Rosmini, M. R., Sequeira, G. J, Guerrero-Legarreta, I., Martí, L. E., Dalla-Santina, Frizzo, R. L. y Bonazza, J. C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Rev. Mex. Ing. Quím. 3:181-191.

Ruckebusch, Y., Phaneuf, L. P. y Dunlop, R. (1994). Fisiología de pequeñas y grandes especies. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. v. 1ª ed.

SAGARPA, Panorama de la lechería en México, boletín junio 2015.

Samaniego, G. J. A., y Pedroza-Sandoval, A. (2013). Usos potenciales de los ácidos grasos volátiles en suelo, agua y aire. Terra Latinoamericana 2013, 31: 2.

Sánchez, P., Muñoz, R.; y Gutiérrez, N. P. (2012) Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. Rev. Spei. Domus 8(17): 31-37.

Secretaría de Economía. Dirección General de industrias básicas. Análisis del sector lácteo en México. Marzo 2012

Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Temas de Bacteriología y Virología Médica. [www.higiene.edu.uy](http://www.higiene.edu.uy)

Schenck, F. J. and Callery, P. S. (1998) Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. J. Chromatogr. A 812; 99 -109.

Schneider, R, Rosmini, M., Ehrmann, M. y Vagel, R. (2004) Identificación de bacterias lácticas, componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. Revista FAVE Ciencias Veterinarias. 3 (1 -2)

Sørum, H. and Sunde, M. (2001) Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet. Res. 32; 227–241.

SPSS. Producto de Estadística y Solución de Servicio.

Srikanth, C. V. and McCormick, B. A. (2008) Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: A three-way crosstalk.

Hindawi publishing corporation interdisciplinary perspectives on infectious diseases  
Vol. 2008, 1 - 15

Srinivasan V., Nam H., Sawant A., Headrick S. I., Nguyen L. T. and Oliver S. P. (2008) Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microb. Ecol.* 55:184–193.

Stabel, J. R., Hurd, S., Calvente, L. and Rosenbuch, R. F. (2004). Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a comercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *J. Dairy Sci.* 87:2177-2183.

Stern, M. S., Calsamiglia, S. y Endres, M. I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. X Curso de Especialización Fedna. Madrid, 10 y 11 de Noviembre de 1994.

Stokes, H: W., and Gilling, M: R. (2011) Geneflow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (2011) 790–819.

Svensson, C., Linder, A. and Olsson, S. O. (2006) Mortality in Swedish Dairy Calves and Replacement Heifers. *J. Dairy Sci.* 89:4769-4777.

Teale, C.J., Berker, L., Foster, A.P., Liebana, E., Batchelor, M., Livermore, D: M., and Thelfall, E.J. (2005). Extended-spectrum beta-lactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales. *Vet. Rec.* feb. 5;156(6):186-7.

Toro, F. A. (2011) Uso de antibióticos en la nutrición animal. *Rev. Sist. Prod. Agroecol.* 2(2):51.

Van Horn, H. H. and Wilcox, C. J. (1999) Large Dairy Herd Management. American Dairy Science Association.

Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press 2<sup>nd</sup> Ed.

Weirup, M., K. Larsson, P. Holtenius, S.O. Jacobsson, and I. Meansson. (1975). The effect of antibiotic supplementation on antibiotic resistance, transferable antibiotic resistance, morbidity, and growth in calves. Nord. Vet. Med. 27:253-265.

Yáñez, R. D., Macías, B., Pinloche, E., and Newbold, C. J. (2010). The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. FEMS Microbiol. Ecol. 72:272–2.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **XI.- Anexos**

### **Anexo 1. Acidificación de la leche.**

#### ***Instrucciones para el preparado de 100 litros de leche acidificada:***

En un contenedor lo suficientemente grande para poder revolver la leche sin derramarla, se vierten los 100 litros de leche que deberá de estar a menos de 15°C.

Posteriormente, se vierte 1 litro de ácido fórmico diluido al 9.5% en los 100 litros de leche agitando vigorosamente mientras lo hace.

Revisar el pH con el potenciómetro – debe estar entre 4.0 a 4.5 si la leche ha sido preparada correctamente.

La leche se agita cada 6 horas mientras se deja reposar por 48 horas a temperatura ambiente antes de poder usarla para asegurar la limpieza microbiológica de la misma.

La leche podrá conservarse hasta por 7 días de ser necesario a temperatura ambiente. De preferencia en un lugar cerrado y fresco.

#### ***Instrucciones para administrar la leche a los becerros***

La leche debe estar entre 15°C y 24°C.

Por becerro se deben servir 5 litros a las 9:00 am.

Agitar la leche cada 6 horas: a las 3:00pm, 9:00pm, 3:00am.

A las 8:00 am del día siguiente se revisa el consumo de los becerros y se lava el equipo los días que se indique.

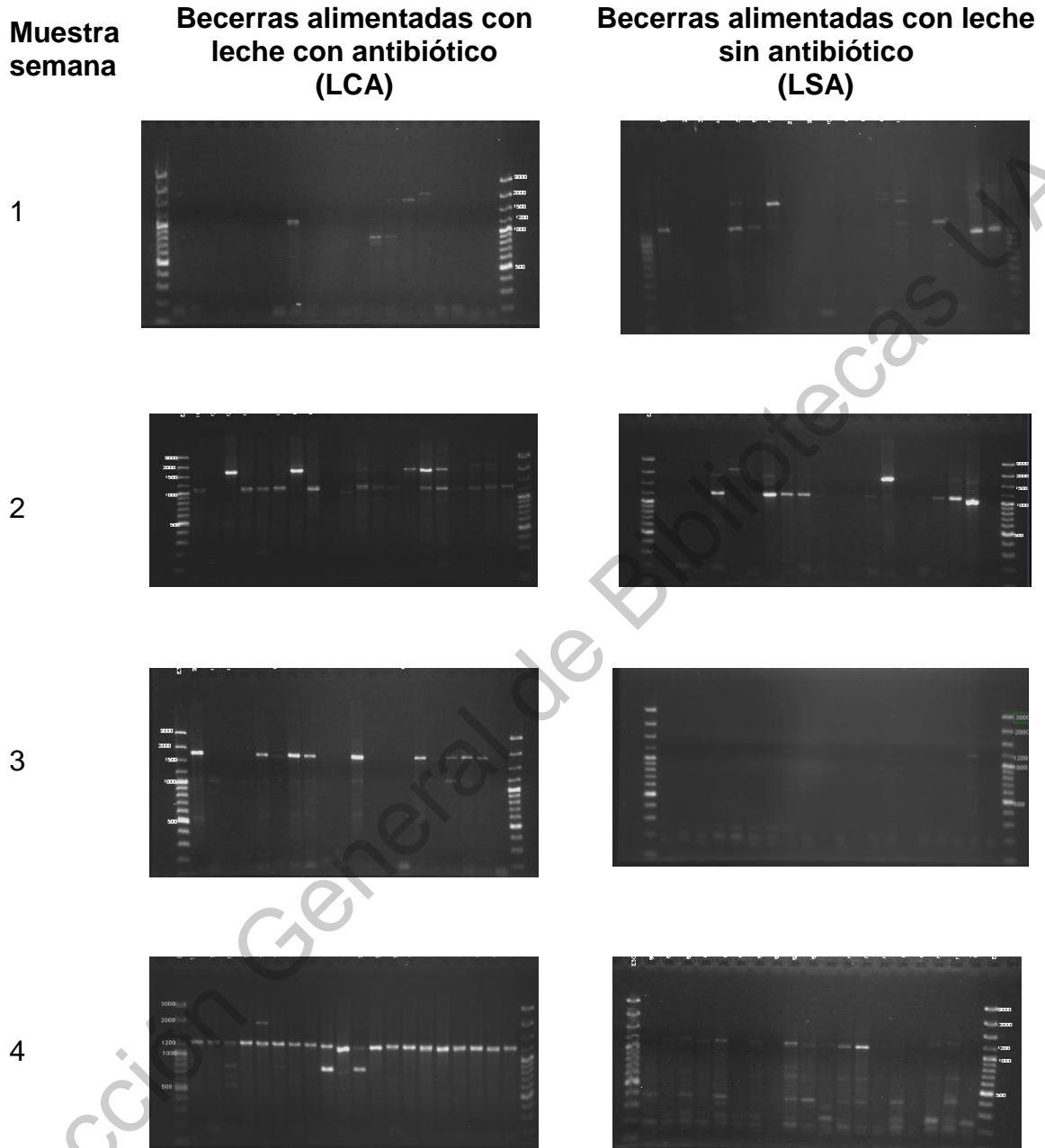
Se sirven otros 5 litros de leche nuevamente a cada becerro.

## **Anexo 2. Amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En este anexo se encuentran las imágenes de las ampliaciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los productos del Integrón 1 y bla-CTX-M-2, y los cuadros del resumen de estos resultados de acuerdo con los pesos encontrados en el programa Quantity One.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# Integrón 1





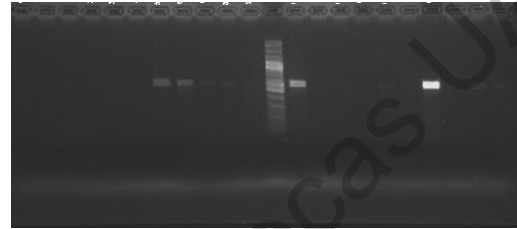
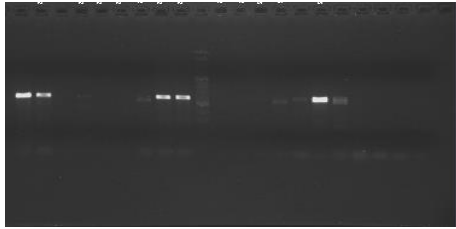
INTEGRÓN 1								
Becerras alimentadas con leche con antibiótico (LCA)					Becerras alimentadas con leche sin antibiótico (LSA)			
Muestra	1	2	3	4	1	2	3	4
Becerra	pb	pb	pb	pb	pb	pb	pb	pb
1	170	1793; 563	1036	1256	130	1855	0	391; 203
2	0	1065	142	1262	0	0	182	1167; 206
3	0	0	1872	1300; 800 700; 600	0	0	180	1178; 398 261; 211
4	0	1040	1170	1255	0	1926 1219	182	1143; 607 209
5	0	1769	1189; 219	1243; 1928	1651 1125; 147	2290 1206	239	1172; 395 247; 205
6	0	1720	1201	1243; 784	1140	1213	240	248; 201
7	173	1764; 1056; 563	2208; 1893;	1243; 668	1617; 1140	1903; 1200	241	1156; 600 248; 202
8	1107; 170	1744;1058; 567 180	1193	1236	0	1914; 1226	1161	0
9	0	0	1901	1243; 772	0	1219	182	1169; 743 615; 388 245; 203
10	0	180	2208; 1872; 1193; 1036	1235	0	0	0	Muerte becerra
11	0	1713 1063; 581	1908; 1198	2000; 1300; 800	0	0	186	1145; 614 386;
12	0	0	2208; 1904; 1187	1250	0	0	0	1175; 336 249
13	844; 766	0	1193	1273	1827; 1672 1154; 166	1200	0	1169; 618 390; 244 201
14	1757; 856 774;170	180	1872	1254	0	1832	1759	1146; 617 388; 199
15	1757	1716	1872;1197	1254	1819;1610 1149	0	0	1165; 201
16	2024; 1775	1689	1929; 1175	1221	0	1188	189	1158; 387 247; 200
17	170	1764; 1056	2178; 1900 1156	1239	1164; 164	1181	188	0
18	170	1777	2178; 1895; 1150	1237	0	1832; 1175	184	1169; 632; 242; 197
19	0	1764	2179; 1878;1178	1224	1665; 1443	1087	1098; 353;182	1169; 627; 388; 245; 197
20	0	0	1193	1241	1665	0	181	236
<b>Positivos</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>17</b>

**Bla-CTX-M-2**

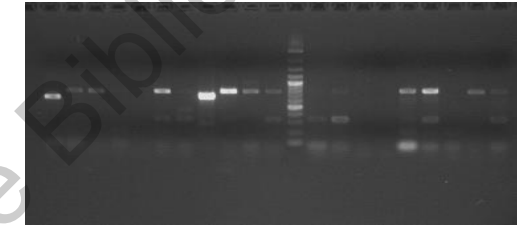
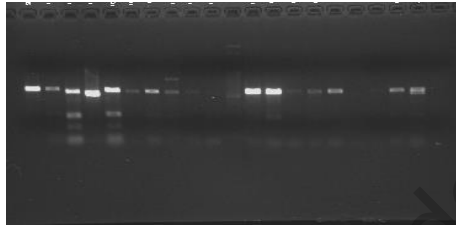
**Becerras alimentadas con  
leche con antibiótico  
(LCA)**

**Becerras alimentadas con leche  
sin antibiótico  
(LSA)**

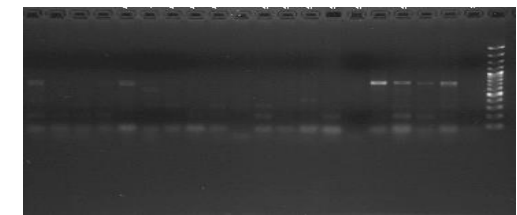
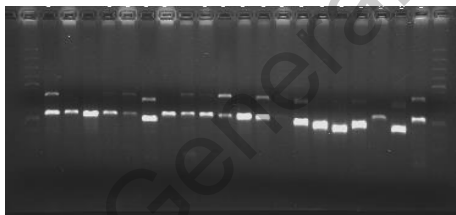
1



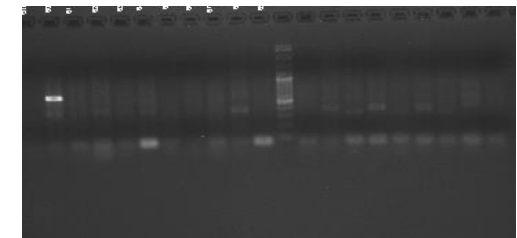
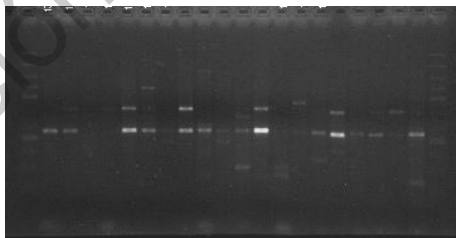
2



3



4



<b>bla-CTX-M</b>								
	<b>Becerras alimentadas con leche con antibiótico (LCA)</b>				<b>Becerras alimentadas con leche sin antibiótico (LSA)</b>			
<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Becerra</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>	<b>pb</b>
<b>1</b>	637	853	847; 758	875	0	682; 650	834; 309	676; 401
<b>2</b>	648	867	752	876	0	800; 765	0	0
<b>3</b>	0	837; 751; 492; 394	726	0	0	794; 755	0	408
<b>4</b>	632	810	853; 747	0	0	0	0	0
<b>5</b>	0	867; 500	855; 739	963; 885	705; 643	0	807;	740; 535; 385
<b>6</b>	0	869	832; 697	1198; 884	643	783; 356	674	0
<b>7</b>	626; 571	871; 753	744	886	644	782; 464; 352	426	408; 333
<b>8</b>	610	1039; 734; 492	871; 752; 438	964; 886	643	693	0	0
<b>9</b>	616; 590	885; 763	866; 736	894	643	800; 764	426	676; 387
<b>10</b>	0	810; 708	858; 720	895	643; 573	922; 800	0	Muerta
<b>11</b>	0	859	704	901	0	795; 339	418; 297	0
<b>12</b>	0	836; 492	842; 698	970	0	800; 348	0	676
<b>13</b>	534	848	698	0	0	808; 359; 327	500	400
<b>14</b>	571	710	803; 638	991; 901	0	0	294	337
<b>15</b>	566	854	596	897	578	0	0	400
<b>16</b>	725; 552	0	564	962; 884	0	818; 650	827	338
<b>17</b>	0	859	795; 598	884	643	818; 352	834; 300	384
<b>18</b>	0	867	686	870	0	0	820; 294	337
<b>19</b>	0	835	762; 561	960	580	806	820; 418	740; 408; 556
<b>20</b>	0	0	800; 661	861	814; 580	347	0	0
<b>Positivos</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>