

147  
2 ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE PLASMIDOS EN ALGUNOS  
SEROTIPOS DE Salmonella enteritidis AISLADOS EN  
EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
LUIS ENRIQUE PALAFOX GARCIA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

## INDICE .

RESUMEN .....	1
I- INTRODUCCION	
1.1- Clasificación y características del género <u>Salmonella</u> .....	2
1.2- Aislamiento y medios de cultivo empleados en el género <u>Salmonella</u> .....	3
1.3- Características bioquímicas y serológicas del género <u>Salmonella</u> .....	4
1.4- Serotipos de <u>Salmonella</u> identificados en México .....	6
1.5- Plásmidos en Enterobacterias y el género <u>Salmonella</u> .....	7
1.6- Patogenicidad y resistencia a antimicrobianos del género <u>Salmonella</u> .....	9
1.7- La Salmonelosis un problema de Salud Pública en México ....	12
JUSTIFICACION .....	15
OBJETIVOS .....	16
II- MATERIAL Y METODO.	
2.1- Aislamiento y obtención de cepas del género <u>Salmonella</u> ....	17
2.2- Pruebas bioquímicas y serológicas para <u>Salmonella</u> .....	19
2.3- Obtención y análisis de plásmidos del género <u>Salmonella</u> ...	22
2.4- Obtención de transconjugantes para el género <u>Salmonella</u> ...	25
2.5- Análisis de plásmidos en transconjugantes del género <u>Salmonella</u> .....	27
III- RESULTADOS .....	29
IV- DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	36
CUADROS Y FIGURAS .....	45
APENDICE .....	64
V- BIBLIOGRAFIA .....	67

## R E S U M E N .

Se aislaron e identificaron bioquímica y serológicamente 61 cepas de Salmonella enteritidis y 11 cepas de S. typhi a partir de muestras de catéteres, heces fecales, líquido cefalorraquídeo y sangre de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP), durante el período de enero a abril de 1989.

Se seleccionó un grupo de 16 cepas resistentes a la ampicilina y se determinó los plásmidos que confieren dicha resistencia por el método de electroforesis en geles de agarosa y por conjugación de estas cepas con E. coli K12.

Fue identificado un plásmido conjugativo de peso molecular de  $20.5 \times 10^6$  daltones, que confiere resistencia a la ampicilina en las cepas de los serotipos S. derby, S. heidelberg y S. typhimurium.

La característica de resistencia a antimicrobianos en las bacterias, en este caso a la ampicilina, puede ser el resultado del amplio uso de antimicrobianos en el tratamiento de leves infecciones y su prescripción constante, en especial en niños en los que frecuentemente se presentan. Así mismo por la característica que presentan estos plásmidos de ser transferidos a otra bacteria por conjugación, contribuye a la diseminación de estas características de resistencia a antimicrobianos entre las poblaciones bacterianas.

## I- INTRODUCCION .

### 1.1- Clasificación y Características del género Salmonella.

El género Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae y Kauffmann en 1963, 1966 lo subdivide en cuatro subgéneros: I, II, III y IV. El subgenero I incluye cepas de Salmonella aisladas del hombre y vertebrados de sangre caliente, los subgéneros II y IV, se conocen también como Arizona y son aislados generalmente de reptiles y sus comensales (29). Le Minor et. al. en 1970, proponen una subdivisión del género en cuatro especies: Salmonella kauffmannii (subgénero I de Kauffman), Salmonella galanae (subgénero II de Kauffmann), Salmonella arizonae (subgénero III de Kauffmann) y Salmonella houtenae (subgénero IV de Kauffmann) (29, 52).

En el sistema taxonómico propuesto por Edwards y Edwin en 1972, el género incluye tres especies, usadas en los Estados Unidos de América Salmonella cholerae-suis, Salmonella typhi y Salmonella enteritidis. Todas las salmonelas son consideradas serotipos de S. enteritidis (más de 2000 serotipos), excepto S. cholerae-suis y S. typhi (29, 52).

Cowan et. al. en 1974, designaron un sistema de cuatro subgéneros usados fuera de los Estados Unidos de América, correspondientes a los cuatro subgéneros de Kauffmann: los subgéneros I, II y IV incluyen las diferentes salmonelas y el subgénero III incluye todas las Arizona designadas como S. arizonae. Un quinto subgénero es designado por Le Minor en 1982 (28, 29, 52).

El Presente trabajo se basa en la clasificación propuesta por Edwards y Edwin para la designación de especies, y el esquema de

Kauffmann-White para designar los serotipos (28, 29).

La nomenclatura usada para Salmonella no sigue las reglas del Código de Nomenclatura de Bacterias; los primeros serotipos que se aislaron fueron designados específicamente por el papel que cumplen: S. typhi (agente de tifoidea), S. typhimurium (agente de enfermedad en el ratón), etc. Los siguientes serotipos de Salmonella del subgénero I que se aislaron, se designaron de la misma forma. Los nuevos serotipos de los subgéneros II-IV fueron designados de acuerdo a sus fórmulas antigénicas (29).

Las bacterias de este género, son bacilos gram negativos, móviles y miden de 0.7-1.5 X 2.0-5.0  $\mu\text{m}$ ; son anaerobios facultativos, crecen en medios de agar en colonias de forma lisa de 2-4 mm. de diámetro, con el centro negro (28).

Tienen una distribución mundial. El principal hábitat de Salmonella es el tracto intestinal de animales y el hombre. Se encuentran también en ambiente natural, fuera del huésped, (agua, suelo, alimentos), puesto que pueden ser eliminados en excreciones animales y humanas después de una infección. No se pueden reproducir en ambiente natural, pero pueden sobrevivir por semanas o hasta años en condiciones favorables de humedad, temperatura y pH (28, 29).

#### 1.2- Aislamiento y medios de cultivo empleados en el género Salmonella.

Los organismos de este género pueden ser aislados a partir de sangre, de acuerdo al método clásico para hemocultivos, propuesto por Castañeda y Hall (28). Se aíslan también a partir de muestras fecales, alimento y muestras ambientales, como agua contaminada,

etc; a partir de muestras con escaso contenido de organismos de Salmonella o muestras de una mezcla de diferentes tipos de bacterias, se utilizan medios de enriquecimiento, para su aislamiento: Medio de tetracionato de Muller, Medio de caldo selenito de Leifson y el medio de Muller modificado por Kauffmann. Tales medios contienen inhibidores para coliformes y permiten el desarrollo de Salmonella (24, 28, 29).

Los medios de agar usados para su aislamiento, son moderadamente y altamente selectivos, los primeros son: a) agar MacConkey, donde las colonias lactosa positivas son rojas y las lactosa negativas son incoloras; b) agar desoxicolato-citrato donde las colonias positivas son rojas y las lactosa negativas incoloras, con el interior negro las productoras de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) (24, 28, 29).

Son medios altamente selectivos: a) agar Salmonella-Shigella (SS), donde el aspecto de las colonias es el mismo al mencionado anteriormente; b) agar verde brillante, donde las colonias lactosa positivas son verdes y las colonias lactosa negativas son rosas; c) Medio Hektoen, donde las colonias que no fermentan ninguno de los azúcares que contiene el medio, son azul verdosas con el centro negro, como Salmonella; d) agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), donde las colonias de Salmonella son rojas con el centro negro, por el H<sub>2</sub>S producido (24, 28, 29).

1.3- Características bioquímicas y serológicas del género Salmonella.

Salmonella se caracteriza por producir gas a partir de glucosa;

todas las salmonelas son móviles, excepto S. gallinarum y S. pollorum, la mayoría producen ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), pero algunas como S. cholerae-suis y S. paratyphi A no lo producen, los nitratos se reducen a nitritos, utilizan el citrato como fuente de carbono, con excepción de S. typhi y S. paratyphi que no son capaces de utilizarlo. Todas las especies son capaces de descarboxilar la ornitina, con excepción de S. typhi, al igual que la descarboxilación de lisina es positiva con excepción del serotipo S. paratyphi, la reacción de ureasa es negativa, los aminoácidos fenilalanina y triptofano no son oxidados. La sacarosa, salicina e inositol no son fermentados, ni tampoco la lactosa a excepción de S. arizonae que si la fermenta, la D-xilosa es fermentada por todas las salmonelas y la gelatina no es hidrolizada por ninguna de ellas (28).

Serológicamente Salmonella se caracteriza por presentar tres tipos de antígenos, mismos que son utilizados para su tipificación: somáticos (O), flagelares (H) y de superficie (Vi).

Los antígenos somáticos se caracterizan por ser estables al calor y resistentes al alcohol, están compuestos por una proteína asociada a un polisacárido, considerado como una endotoxina. Se conocen 67 antígenos somáticos, los cuales se dividen en antígenos mayores y menores, con mayor valor taxonómico los antígenos somáticos mayores (29). Los antígenos flagelares H son proteínas termolábiles. Existen serotipos de Salmonella que sólo producen un antígeno flagelar, llamado monofásico. Muchos otros serotipos producen antígenos flagelares, llamados difásicos. Por ejemplo S. enteritidis y S. typhi producen antígenos flagelares monofásicos y

S. typhimurium produce antígenos flagelares difásicos. Los antígenos de superficie se presentan sólo en algunos serotipos de Salmonella. Únicamente se conoce un antígeno específico de superficie, el antígeno Vi, que se presenta en S. typhi, S. paratyphi C y S. dublin, pudiendo estar o no en sus respectivas cepas (29).

La tipificación de Salmonella en base a sus antígenos, permite dividirlos en serovariedades o serotipos, y con base a su fórmula antígenica, estos son agrupados en el esquema de Kauffmann-White (28, 29).

Desde el punto de vista epidemiológico, se subdividen en: biotipos, fagotipos, bacteriocina-tipos y antibiotipos. Los biotipos se determinan con base a los diferentes patrones de fermentación de un azúcar, por las cepas de un mismo serotipo. Los fagotipos están determinados por la sensibilidad a una serie de bacteriofagos, como el fago de Felix y Callow o el Vi de Craige y Yen. Los bacteriocinas-tipos se determinan por la producción o sensibilidad a bacteriocinas, puesto que aproximadamente el 5% de las cepas de Salmonella las producen. Los antibiotipos se determinan en base a la resistencia a ciertos antibióticos (28, 29).

#### 1.4- Serotipos de Salmonella identificados en México.

En México han sido aisladas cepas de 110 diferentes serotipos de S. enteritidis, que corresponden al 5% de todos los serotipos que se conocen en el mundo de esta especie. Los serotipos más frecuentemente identificados en México entre 1940 y 1962 son: S. typhimurium, S. derby, S. newport, S. ecoma, S. panama y S. infantis. Entre 1974-1981 fueron identificados 54 serotipos más de

S. enteritidis, siendo los más frecuentes: S. agona, S. anatum, S. derby, S. enteritidis serotipo enteritidis, S. heidelberg, S. infantis, S. london, S. newport, S. oranienburg, S. pollorum, S. poona y S. typhimurium. Se han identificado también las especies S. choleraesuis y S. typhi. Salmonelas que se han aislado a partir de muestras de origen: humano, alimento, animales y aguas de drenaje (16, 37, 44, 59).

#### 1.5- Plásmidos en Enterobacterias y el género Salmonella.

Los plásmidos son elementos extracromosómicos presentes en todas las Enterobacterias (E. coli, Salmonella, Serratia, etc.), son moléculas circulares de ácido desoxiribonucleico (ADN) covalentemente cerradas y superenrolladas, autónomos en su replicación, ya que poseen genes que les permiten replicarse sin requerir del ADN cromosomal. Su peso molecular varía de  $1 \times 10^6$  a  $200 \times 10^6$  aproximadamente. Portan genes que confieren ciertas funciones biológicas a las bacterias que lo poseen como: resistencia a antimicrobianos, a metales pesados (Ag y Hg) y fermentación de ciertos azúcares (lactosa, xilosa, etc.) (5, 21, 42).

Se conocen diferentes tipos de plásmidos en función de las características fenotípicas que confieren a las bacterias. Los plásmidos F (de factor sexual) descubiertos inicialmente en E. coli K12, pueden ser transferidos de una bacteria a otra por conjugación, un importante mecanismo de recombinación genética en bacterias, transformando la bacteria receptora en  $F^+$ . La conjugación se realiza gracias a genes que porta este plásmido que codifican formación de una proteína, que forma el llamado pili en

bacterias, el cual permite el intercambio de material genético. Tienen la capacidad de interaccionar con los genes cromosomales movilizándolos e integrándolos al cromosoma de otra bacteria, teniendo como resultado una cepa HFr (alta frecuencia) (5, 21).

Los plásmidos R, confieren resistencia a una o más drogas antimicrobianas, son muy comunes en E. coli y Salmonella. Los plásmidos Col, codifican proteínas llamadas colicinas, con propiedades antimicrobianas. Los plásmidos que confieren patogenicidad, codifican para enzimas catabólicas, incrementando la patogenicidad en bacterias. Pertenecen al grupo los plásmidos Ent, determinando la síntesis de enterotoxinas, cuya producción daña al organismo en que habita la bacteria, al igual que los plásmidos Hly y K característicos de E. coli (5, 21).

Otro tipo son los plásmidos que median virulencia, y aumentan la patogenicidad de las bacterias que los presentan, un ejemplo de ellos son los que se encuentran en el género Salmonella (8, 39, 40).

Algunos plásmidos les confieren resistencia a metales pesados, como níquel, cobalto, mercurio y arsenato a E. coli, Salmonella y a Pseudomona (5, 21).

En la bacteria se presentan uno o más plásmidos que pueden coexistir llamados compatibles e incompatibles aquellos que no pueden coexistir.

Se conocen dos clases de plásmidos: los conjugativos que se pueden transferir de una bacteria a otra, de peso molecular mayor de  $40 \times 10^6$ , mantenidos en una o dos copias por cromosoma bacteriano y plásmidos no conjugativos, de peso molecular menor de  $10 \times 10^6$ , que

no tienen la capacidad de ser transferidos y se encuentran aproximadamente 15 copias por cromosoma bacteriano.

La replicación vegetativa de un plásmido depende de su tamaño y ocurre durante el ciclo celular normal. Los plásmidos de peso molecular mayor de  $30 \times 10^6$ , se presentan de una a tres copias por célula y los plásmidos menores de  $30 \times 10^6$  se presentan más de 10 por célula (5, 21).

Los plásmidos presentan secuencias de inserción y transposones, también presentes en cromosomas bacterianos y fagos. Las secuencias de inserción son elementos genéticos de 768 a 5,700 pares de bases, responsables de la interacción que hay entre plásmidos y cromosomas bacterianos (5, 21, 42). Los transposones también elementos genéticos tienen un tamaño que va de 1,000 a 20,000 pares de bases tienen la característica de replicarse por sí mismos e insertarse en moléculas de ADN que tengan o no secuencias de homología. Codifican para muchas de las características determinadas por plásmidos (resistencia a antimicrobianos, metales pesados, etc.). Tienen en sus extremos secuencias repetidas invertidas cuyo tamaño varía 38 a 1,500 pares de bases (5, 21, 42).

#### 1.6- Patogenicidad y resistencia a antimicrobianos del género *Salmonella*.

Estos organismos son patógenos para el hombre; causando fiebres entéricas, gastroenteritis y bacteremias-septicemias (28). *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi C* y *S. sendai* son serotipos adaptados al hombre (27, 28, 29). Las salmonelas adaptadas a animales comprenden *S. cholerae-suis* en el cerdo, *S. gallinarum-pollorum* en aves, *S. abortus-egui* en caballos provocan cuadros

clínicos de tipo septicémicos y en humanos pueden producir infecciones, especialmente en niños causando la muerte (27). Otras salmonelas son capaces de provocar infecciones tóxicas via los alimentos.

La patogenicidad de los diferentes serotipos no se conoce (28), depende del serotipo que cause la infección, la dosis que se ingiera (# de bacterias) y la zona donde llegue a hospedarse (29). S. typhi es especifica del hombre causando principalmente fiebre tifoidea. La infección por S. cholerae-suis y S. enteritidis en el hombre se conoce como salmonelosis (6, 27, 55) y son transmitidas de hombre a hombre sin hospedero intermediario, por agua contaminada, por heces fecales o por alimentos contaminados (27, 28, 29). Es necesario ingerir un número de bacterias suficientemente alto, de  $10^8$  a  $10^9$ , para presentar síntomas clínicos(28). El cuadro clínico que se presenta por esta enfermedad, va desde el portador asintomático y las formas subclínicas hasta la septicemia fulminante; predominan las manifestaciones gastrointestinales, como diarrea, fiebre, vómito, dolor abdominal, inconciencia, etc. (6, 27, 55).

La resistencia a antimicrobianos en Salmonella a una o más drogas antimicrobianas, está determinada por plásmidos (5, 12, 21). Este fenómeno está relacionado con los patrones de uso que se ha tenido en el tratamiento de infecciones en el hombre y animales (10). La alta incidencia de resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas de animales puede ser atribuida a una presión selectiva, dada por la administración de antimicrobianos a niveles subterapeúticos (14).

Holmberg et. al (1984) publicaron recientemente evidencias de que las bacterias de origen animal resistentes a antimicrobianos pueden ser responsables de serias infecciones intestinales en el hombre (14).

El amplio e indiscriminado uso de antimicrobianos, para la prevención de infecciones, su adición a alimentos, etc. ha creado graves problemas seleccionando a aquellos organismos resistentes, que son potencialmente productores de enfermedades graves en el hombre (43, 47, 51).

Hadfield (1985), aisló en un brote epidémico en niños de Liberia, cepas de S. enteritidis resistentes a varios antimicrobianos como: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina entre otros (20).

Nakamura et. al. (1985) detectaron cepas de S. enteritidis, S. dublin y S. typhimurium en animales enfermos (ratón, gato, etc.) resistentes a ampicilina, kanamicina y tetraciclina (39).

Taylor et. al. (1985) encontraron cepas de S. typhi resistentes a cloranfenicol, estreptomina, sulfametaxazol, trimetropin y tetraciclina (54).

Platt et. al. (1986) encontraron cepas de S. typhimurium, S. enteritidis, S. dublin, S. heidelberg, S. infantis y S. derby resistentes a antimicrobianos, aisladas en un brote epidémico en Gran Bretaña (45).

Goldstein et. al han dado a conocer cepas de S. typhi resistentes a múltiples antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, sulfametaxazol y trimetropin (15).

También han sido detectadas cepas de S. newport y otros tipos de

Salmonella resistentes a cloranfenicol, causando epidemias en los Estados Unidos de América, por alimentos contaminados por estos organismos (51).

Ling y Chau (1987), aislaron cepas de S. enteritidis resistentes a múltiples antimicrobianos. Siendo las más frecuentes: S. typhimurium, S. johannesburg, S. wandswoth, S. derby, S. newport y S. london resistentes a: ampicilina, cloranfenicol, sulfametaxazol, tetraciclina y trimetropin, provocando importantes gastroenteritis (31, 32).

Nastas: (1987) aisló cepas de S. dublin resistentes a cloranfenicol y estreptomocina de epidemias de gastroenteritis en niños (41).

Ha sido demostrado que se puede presentar la transferencia *in vitro* de plásmidos que determinan resistencia a antimicrobianos en cepas de S. enteritidis a otras cepas usadas como receptores, com es el caso de E. coli (1, 31, 32, 35, 41, 43, 54, 58).

1.7- La Salmonelosis: Un problema de Salud pública en México.

Diferentes cepas de S. enteritidis y S. typhi resistentes a antimicrobianos, causantes de epidemias o gastroenteritis entre la población mexicana han sido aisladas.

Kupersztoch (1981) encontró en México cepas de Salmonella resistentes a sulfametaxazol, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol, estreptomocina y tetraciclina. Siendo S. typhimurium el serotipo más frecuentemente aislado, en cepas aisladas de hospitales (52.2%) y en cepas aisladas de laboratorios privados (26.8%) (25, 26).

Pérez y Hernández detectaron (1985) detectaron que entre la población infantil las cepas aisladas de S. enteritidis eran

frecuentemente resistentes a: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina y observando además un incremento en la resistencia de 84.2%, 79.7%, 58.6% y 48.7% para cada uno de los antimicrobianos mencionados con respecto a su resistencia reportada en 1953-1965, que era de 7, 1 y 0% respectivamente (46).

Solorzano et. al. (1987) aislaron cepas de S. enteritidis resistentes a ampicilina, cloranfenicol, trimetropin y sulfametaxazol (50).

Martínez et. al. (1986) aislaron cepas de S. typhimurium, S. enteritidis, S. london y S. poona en hospitales pediátricos en México, Distrito Federal, resistentes a tetraciclina (35).

El Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales encontró tres brotes de gastroenteritis en México causados por Salmonella.

El primero ocurrió en noviembre de 1973, ocasionado principalmente por S. infantis aislada de alimentos. El segundo brote se observó en diciembre de 1975, detectando a S. heidelberg como principal causante y el tercer brote en noviembre de 1978, encontrándose a S. typhimurium como principal serotipo (37).

La salmonelosis es un problema de salud que se ha venido incrementando no sólo en nuestro país (8, 16), sino también en otros como: Estados Unidos de América, Francia, Gran Bretaña, Perú, Chile, etc. causando graves infecciones, pérdidas económicas y altos porcentajes de muertes en el hombre (2, 10, 15).

Los organismos de Salmonella enteritidis son causa frecuente de bacteremias, gastroenteritis y complicaciones múltiples en niños (27, 36, 56, 59). En nuestro país la salmonelosis provoca serios problemas en los lactantes y en menor proporción entre la población

infantil preescolar y escolar, con porcentajes de 55%, 38% y 5% respectivamente. Esta enfermedad ocurre en forma endémica con máximos en la parte final de la primavera y en época de verano. Las temperaturas superiores a los 22°C y la humedad favorecen las condiciones para la infección salmonelósica (27).

Un importante porcentaje de transmisión de salmonelosis es a través de alimentos contaminados por Salmonella; constituyen un importante ejemplo, la infección salmonelósica por aves y sus productos contaminados o en mal estado, siendo causa de brotes epidémicos entre la población que los consume. Los animales domésticos que sirven como fuente de carnes comestibles son también causa de infección, así como algunos embutidos, entre ellos la longaniza y el chorizo, en los que se ha aislado Salmonella (27, 44, 48).

## J U S T I F I C A C I O N

La conjugación en bacterias y la capacidad de los transposones de insertarse en moléculas de ADN, contribuyen a una diseminación rápida de la resistencia a antimicrobianos en nuevos vectores que pueden ser transferidos y replicados establemente en diversos hospederos. De igual forma, el amplio e indiscriminado uso de antimicrobianos en la prevención y tratamiento de infecciones, así como su adición a alimentos para animales ha propiciado la selección de organismos resistentes y potencialmente productores de enfermedades en el hombre, como es el caso de S. enteritidis resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, tetraciclina, etc. organismo que causa frecuentemente epidemias, gastroenteritis y complicaciones múltiples, entre la población mexicana en particular en la población infantil, provocando graves problemas de salud y pérdidas económicas.

En virtud de que este organismo es la especie más frecuentemente aislada; del género Salmonella en hospitales pediátricos, se planteó la necesidad de realizar el presente trabajo con el fin de identificar bioquímica y serológicamente cepas de S. enteritidis resistentes a antimicrobianos en un hospital pediátrico, aislar los plásmidos que confieren estas características de resistencia a antimicrobianos y determinar si esta característica de resistencia a antimicrobianos puede ser compartida por los diferentes serotipos de Salmonella enteritidis que sea posible aislar.

## O B J E T I V O S .

El objetivo general de este trabajo es caracterizar plásmidos que confieren resistencia a ampicilina en cepas de Salmonella enteritidis aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría y los objetivos particulares son:

1.- Aislar e identificar cepas de diferentes serotipos de Salmonella enteritidis a partir de muestras de catéteres, materia fecal, líquido cefaloraquídeo (LCR) y sangre de 72 pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

2.- Seleccionar las cepas de aquellos serotipos de Salmonella enteritidis resistentes a ampicilina.

3.- Determinar la presencia de material genético extracromosómico (plásmidos) en las cepas de Salmonella enteritidis resistentes a ampicilina, por el método de electroforesis en geles de agarosa.

4.- Determinar la presencia de plásmidos en transconjugantes de Salmonella enteritidis, por el método de electroforesis en geles de agarosa. Transconjugantes a obtener por conjugación, utilizando como cepa donadora, cepas de S. enteritidis resistentes a ampicilina y como cepa receptora E. coli.

## II- MATERIAL Y METODO.

### 2.1- Aislamiento y obtención de cepas del género Salmonella.

Las cepas del género Salmonella fueron aisladas de 72 pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) que presentaron probable infección salmonelósica, con síntomas de gastroenteritis: diarrea, fiebre, vómito, dolor abdominal, cefalea (dolor de cabeza) etc. Los pacientes seleccionados fueron de consulta externa y del área de hospitalización del mismo Instituto. Su edad vario desde pacientes neonatos (recien nacidos) hasta los 12 años, de ambos sexos.

Se tomaron muestras de materia fecal, sangre, catéteres y líquido cefaloraquídeo. En los pacientes de consulta externa se realizó toma de muestras de materia fecal y sangre, la cual fue realizada por el personal del laboratorio de bacteriología del Instituto. En los pacientes internos se realizó esta misma toma 'de muestras, además de tomar muestras de catéteres y líquido cefaloraquídeo, en este caso la toma fue realizada por el personal médico de dicho Instituto.

Las muestras de materia fecal, se colectaron de dos formas: a) en pacientes neonatos se tomó la muestra de la zona rectal de este, con un hisopo estéril y se colocó en un frasco pequeño también estéril, b) En pacientes mayores de 2 años, se entregó un recipiente estéril para que este se encargara de colectar la muestra directamente en el mismo.

Las muestras de materia fecal que se colectaron con el hisopo rectal, se sembraron directamente en medios selectivos de agar MacConkey, agar Shigella-Salmonella (S-S), agar verde brillante y

agar xilosa-lisina (XLD), colocando una muestra de ésta con el hisopo en cada una de las cajas y extendiendo la muestra mediante el estriado característico para aislamiento (24), las cajas fueron incubadas a una temperatura de 37°C de 18-24 horas. A la muestra restante se adicionó en el mismo frasco de 3-5 ml. de caldo de enriquecimiento: selenito o caldo tetrionato, incubando a 37°C de 12-16 horas, para permitir el desarrollo de organismos del género Salmonella e inhibir el desarrollo de coliformes (24, 28). Los organismos que crecieron en este caldo de enriquecimiento, fueron aislados por siembra indirecta en cajas de petri con agar de medios selectivos para el aislamiento de Salmonella.

En el caso de las muestras de materia fecal que fueron colectadas directamente por el paciente, se realizó también siembra directa y además se tomó aproximadamente un gramo de esta y adicionó caldo de enriquecimiento como a las anteriores muestras.

Se realizó siembra directa de líquido cefalorraquídeo (LCR) en medios enriquecidos de agar chocolate y agar sangre, por estria para aislamiento, incubando a 37°C de 12-24 horas.

También se aisló Salmonella a partir de catéteres colocando la muestra en tubos de ensaye estériles que contenían de 3-5 ml. de caldo tioglicolato; los tubos fueron incubados a 37°C de 12-24 horas y posteriormente se hizo una resiembra en cajas de petri que contenían agar de medios selectivos para aislamiento de Salmonella, inoculándose estas por el método de estria e incubando a 37°C de 18-24 horas.

Para las muestras de sangre se realizó hemocultivo de acuerdo al método descrito por Castañeda (24, 28): se adicionaron 5 ml. de

sangre en una botella difásica, conteniendo agar casoy en una de las paredes laterales y caldo casoy en el fondo (medio doble de Ruiz-Castañeda), y se incubó a 37°C por un periodo de 30 días; las botellas fueron revisadas diariamente, realizando resiembras de aquellos hemocultivos donde se observó desarrollo de organismos, así como las resiembras de rutina a los 7 y 14 días después de haber sido inoculada la sangre. Estas resiembras fueron realizadas en cajas de petri con agar sangre y agar chocolate incubando a 37°C de 18-24 horas.

## 2.2- Pruebas bioquímicas y serológicas para Salmonella

Las cepas aisladas en medios selectivos, fueron identificadas mediante las siguientes pruebas bioquímicas: a) Prueba de agar-hierro Kligler (KIA), para detectar fermentación de dos azúcares: lactosa y glucosa. Se utilizaron tubos de ensaye con agar Kligler, preparado de acuerdo a indicaciones del fabricante (Merck) esterilizando en autoclave a 15 libras (lbs) por 15 minutos y enfriando el tubo en posición inclinada, para obtener el agar en Pico o inclinado. Se inoculó una sola colonia por estria y se incubó a 37°C de 18-24 horas.

b) Prueba para detectar producción de indol, H<sub>2</sub>S y movilidad En tubos de ensaye con medio de sulfato-indol-movilidad (SIM), esterilizado en autoclave a 15 lbs. por 15 min. se inoculó por picadura la cepa a probar y se incubó a 37°C de 18-24 horas. Para detectar la producción de indol, se agregó a cada tubo 3 gotas de reactivo de Kovac, al término de la incubación (alcohol etílico o isoamílico, p-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) que vira al color rojo en organismos productores de

indol (via metabólica que indica la degradación del aminoácido triptofano). La producción de H<sub>2</sub>S y la movilidad se detectan a simple vista.

2

c) Agar de citrato Simmons, para detectar la utilización de citrato como fuente de carbono, se emplearon tubos de ensaye con agar citrato de Simmons, preparado de acuerdo a indicaciones del fabricante (Merck) y esterilizando en autoclave a 15 lbs. por 15 min.; los tubos se enfriaron en posición inclinada para obtener el agar en forma de pico. Se inoculó una colonia por estria e incubó a 37°C de 24-48 horas.

d) Prueba de fermentación para los carbohidratos ramnosa y trealosa, utilizando tubos de ensaye con medio base-rojo de fenol para fermentación de carbohidratos, preparado de acuerdo a instrucciones del fabricante (Merck) y esterilizando en autoclave a 15 lbs. por 15 min.; una vez esterilizado el medio se añadió el carbohidrato esterilizado por filtración en membrana millipore de 0.45µm. para evitar la degradación hidrolítica del mismo. Se inoculó una colonia del microorganismo en el medio con una asa bacteriológica e incubó a 37°C de 18-24 horas.

e) Prueba de descarboxilación para los aminoácidos ornitina y lisina, se utilizaron tubos de ensaye con caldo descarboxilasa de Moeller, esterilizados en autoclave a 15 lbs. por 15 min. y se les adicionó posteriormente el aminoácido esterilizado por filtración en membrana millipore de 0.45µm., para evitar su desnaturalización. Se inoculó una colonia del microorganismo a probar con asa bacteriológica e incubó en anaerobiosis a 37°C de 18-24 horas. La anaerobiosis se obtuvo agregando a cada tubo, después de la

inoculación 1 ml. de aceite mineral.

f) Prueba rojo de metilo/Voges-Proskauer (RM/VP), para detectar la fermentación ácida mixta de glucosa o producción de acetoina y butilenglicol. Se utilizaron tubos de ensaye con medio RM/VP, esterilizados en autoclave a 15 lbs. por 15 min., se inoculó el organismo con asa bacteriológica y se incubó a 37°C por 72 horas.

El aislamiento e identificación bioquímica de las cepas se realizó en el laboratorio de Bacteriología del INP conjuntamente con la P.B. González V. Y., mismas que fueron utilizadas para su trabajo de tesis.

Las pruebas serológicas para identificación de Salmonella, fueron realizadas por el laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, por la técnica de aglutinación en tubo. Para lo cual se utilizaron sueros polivalentes y monovalentes. Identificando el serotipo de las salmonelas a través de la aglutinación positiva que se obtiene con el suero monovalente, determinandolo posteriormente con ayuda del esquema de Kaufmann-White, que agrupa a todos los serotipos de Salmonella en base a su fórmula antigénica.

La metodología posterior de éste trabajo se realizó en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Una vez aisladas e identificadas las cepas, se almacenaron en tubos de ensaye con medio de conservación a una temperatura de 4°C.

- Selección de cepas de Salmonella resistentes a ampicilina.

De las cepas aisladas se seleccionó solo un grupo de 14 cepas de la especie Salmonella enteritidis y 2 cepas de Salmonella typhi

resistentes a la ampicilina. La selección se hizo en base a los serotipos aislados con mayor frecuencia en este estudio y durante los años de 1987 y 1988, en el laboratorio de Bacteriología del INP y a las pruebas de susceptibilidad y resistencia a la ampicilina de las cepas aisladas. La determinación de resistencia a ampicilina, fue realizada por González V Y (17) determinando como cepas resistentes a aquellas que presentaron una concentración mínima inhibitoria (MIC, concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de una bacteria) igual o mayor al valor de corte que se reporta, en la literatura para los diferentes antimicrobianos que se usan en la actualidad para el tratamiento de las infecciones que causan estos microorganismos. El valor de corte se define como la concentración máxima de antimicrobiano que se alcanza en sangre.

### 2.3- Obtención y análisis de plásmidos del género Salmonella.

La obtención de plásmidos, se realizó en 16 cepas de Salmonella: 5 cepas del serotipo S. typhimurium, 4 cepas de S. heidelberg, 2 cepas de S. derby, 1 cepa de S. agona, 1 cepa de S. muenchen, 1 cepa de S. braenderup y 2 cepas de la especie S. typhi, mediante el método de lisis alcalina descrito por Maniatis (34). Para lo cual se utilizaron tubos de polipropileno de una capacidad de 1.5 ml., con tapón, puntas estériles de polipropileno para micropipeta, micropipeta y centrifuga eppendorf.

La técnica de obtención de plásmidos consistió en:

- 1) Inocular en 2 ml. de caldo infusión cerebro-corazón, conteniendo ampicilina, una colonia bacteriana e incubando a 37°C durante 12 horas con agitación constante.

- 2) Se tomó 1 ml. del cultivo y se transfirió a un tubo eppendorf, centrifugando a 15,000 r.p.m. 4°C durante 3 minutos.
- 3) Se removió el sobrenadante por decantación y resuspendió el paquete en 100 µl de solución I (recien preparada), para romper la pared celular (22, 53), manteniendo 30 minutos a 0°C.
- 4) Se agregaron 200 µl de solución II, para lisar la célula, precipitar lípidos de membrana y proteínas, separar ADN cromosomal, desnaturalizarle y separar el ADN de plásmido sin dañarlo (22, 53), mezclando el contenido por inversión del tubo de dos a tres veces, manteniendolo a 0°C durante 5 minutos.
- 5) Se adicionaron 150 µl de solución III, neutralizando con ello los lisados (22, 53). Posteriormente se resuspendió y mantuvo a 0°C durante 40 minutos.
- 6) Enseguida las muestras se centrifugaron a una velocidad de 15,000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos, inmediatamente después se transfirieron a otro tubo eppendorf 400 µl del sobrenadante, se adicionó 1 ml. de etanol absoluto frío (-70°C) se mezcló por inversión del tubo de 3-5 veces y se mantuvo a -70°C durante 5 minutos o hasta observar que la mezcla estuviera viscosa, obteniendo así la precipitación de ADN de plásmido (22, 53).
- 7) Se centrifugó la muestra a 15,000 r.p.m., 4°C durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante por decantación.
- 8) Se adicionaron 100 µl de solución III y 200 µl de etanol frío (-70°C) mezclando el contenido por inversión del tubo y se mantuvo a -70°C durante 5 minutos hasta obtener nuevamente una mezcla viscosa.
- 9) La mezcla fue centrifugada a 15,000 r.p.m., 4°C durante 5

minutos, se desechó el sobrenadante y se lavo adicionando 1 ml. de etanol a  $-70^{\circ}\text{C}$  resuspendiendo.

10) Se centrifugó nuevamente a 15,000 r.p.m.,  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante por decantación.

11) Se eliminó el resto de etanol de la muestra, con una bomba de vacío durante 30 minutos o a temperatura ambiente durante 3 horas hasta observar la formación de cristales en el fondo del tubo.

12) El paquete se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de buffer tris-Etilendinitrilotetracetato a pH 8 y 12  $\mu\text{l}$  de púrpura de bromofenol. El análisis de plásmidos se realizó por electroforesis en geles de agarosa, según método descrito por Maniatis (34).

Los geles se prepararon con agarosa al 0.7% con buffer tris-boratos (TBE), disolviendo en autoclave a  $115^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Posteriormente se vació la agarosa en una placa de acrílico de 12.5 X 8.0 cm. donde se colocó un peine, para lograr la formación de pocillos para colocar la muestra en el gel (Fig. 1). Una vez solidificada la agarosa, se retiró el peine y colocó la placa en una cámara para electroforesis (Fig. 2), agregando el buffer TBE en la cámara de tal forma que el gel quedara cubierto por éste (aproximadamente 200 ml.). Antes de someter la muestra a electroforesis se centrifugó a 15,000 r.p.m. a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, colocando 25  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en cada uno de los pocillos del gel. El corrimiento de la muestra se realizó a 80 voltios durante 2 horas, realizando dos cambios de buffer en la cámara, 30 y 60 minutos después de iniciada la electroforesis. Finalmente el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . durante 1 hora a temperatura

ambiente.

Los geles teñidos fueron observados y fotografiados bajo un transiluminador de luz UV utilizando un filtro rojo y película fotográfica blanco y negro Tri-X-Pan (ASA 400). Una vez fotografiados se almacenaron en la misma solución de bromuro de etidio a 4°C.

Se utilizaron cepas control de E. coli K12 con plásmidos de peso molecular conocido, que presentaban las siguientes características:

Características fenotípicas de resistencia a antimicrobianos y peso molecular de los plásmidos de las cepas control.

---

Plásmido	Característica de resistencia. (1)	Peso molecular (daltones).
P654/PR6D1	Tc	35X10 <sup>6</sup>
GM30/pBR322	Tc Ap	2.6X10 <sup>6</sup>
J54/RP4	Tc Ap Km Nm	40X10 <sup>6</sup>
K37/RI-19	Ap Km Sm Sp Su Cm	63X10 <sup>6</sup>

---

(1) Tc- Tetraciclina, Ap- Ampicilina, Km- Kanamicina, Nm- Neomicina, Sm- Estreptomicina, Sp- Espectomicina Su- Sulfametaxazol y Cm- Cloranfenicol.

#### 2.4- Obtención de transconjugantes para el género Salmonella.

La conjugación se realizó de acuerdo al método descrito por Alcaide y Garay (1).

La cepa receptora utilizada en la conjugación fue E. coli K12 C600, ácido nalidixico resistente (sin plásmido) y las donadoras,

las cepas aisladas de Salmonella enteritidis y Salmonella typhi. Los donadores y receptores se cultivaron en tubos de ensaye con 3 ml. de caldo Luria, en un baño a 37°C con agitación constante durante 4 horas. Posteriormente se tomó 1 ml. de la cepa donadora y 2 ml. de la cepa receptora, se mezclaron en otro tubo de ensaye con 3 ml. de caldo Luria y la mezcla se incubó a 37°C, sin agitación durante 18 horas.

La selección de transconjugantes se realizó en placas de agar Luria conteniendo ácido nalidixico y ampicilina.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones de las cepas conjugadas de 1:100 y de 1:10,000 en una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85%. Finalmente se inocularon en las placas de agar Luria 25 µl de la dilución de cada cepa conjugada, con una micropipeta y puntas estériles, estriando con una asa bacteriológica para el aislamiento y selección de los posibles transconjugantes. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas.

Se utilizó una segunda técnica para conjugación, en placas de agar Luria con las siguientes modificaciones (38).

Se preparon cajas de petri con agar Luria sin antimicrobianos, en las cuales se inoculó una asada de la cepa a conjugar para reactivarla y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Una vez que desarrollaron las cepas donadoras y receptoras, se tomó con una asa bacteriológica una colonia de cada cepa y se sembraron en tubos de ensaye con 1 ml. de caldo Luria estéril. Posteriormente de cada uno de estos tubos sin ser sometidos a incubación, se inoculó en las placas de agar Luria sin antimicrobianos, una gota

de 10 µl de la cepa donadora y una gota de 30 µl de la cepa receptora; se mezclaron con una asa bacteriológica y las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación para conjugación de las cepas, se sembró en una placa de agar Luria que contenía los antimicrobianos selectivos: ácido nalidixico y ampicilina, una asada de la colonia desarrollada, se estiró la placa para aislamiento de los posibles transconjugantes y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### 2.5- Análisis de plásmidos en transconjugantes del género Salmonella.

Una colonia de cada uno de los transconjugantes obtenidos tanto para S. enteritidis como para S. typhi, se inoculó en un tubo de ensayo con 2 ml. de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) con ampicilina, incubando a 37°C con agitación constante durante 12 horas. Posteriormente se realizó la obtención de plásmidos en estos transconjugantes por la técnica ya descrita, y se realizó electroforesis en geles de agarosa a los plásmidos aislados, utilizando en este caso la técnica descrita anteriormente para Salmonella. Analizando así los plásmidos que se transfirieron por conjugación a la cepa receptora de E. coli. Los geles de agarosa donde se observó la presencia de plásmidos de los transconjugantes se fotografiaron bajo un transiluminador de luz UV con un filtro rojo y película Kodak Tri-X-Pan.

En este caso se utilizó un control de E. coli K12 C600 sin conugar, del cual se inoculó una colonia en una placa de agar Luria con los antimicrobianos selectivos: ácido nalidixico y

ampicilina, incubando en las mismas condiciones en que se incubaron las placas de agar Luria donde se seleccionó los transconjugantes.

### III- RESULTADOS .

#### Aislamiento e identificación de cepas.

Se aislaron 61 cepas de la especie Salmonella enteritidis durante el periodo de Enero a Abril de 1989, de niños cuyas edades variaron desde recién nacidos hasta 12 años. El 72% de las cepas fueron aisladas a partir de coprocultivos, el 15% se aisló a partir de sangre, el 8% de líquido cefaloraquídeo y el 5% de catéteres.

Se identificaron 10 serotipos de Salmonella enteritidis y los más frecuentes fueron: S. typhimurium con 24 cepas (39.35%), S. heidelberg con 14 cepas (19.4%), S. agona con 8 cepas (11.1%) y S. derby con 4 cepas (5.6%). También se aislaron e identificaron 11 cepas de la especie S. typhi la cual presentó una frecuencia de aislamiento de 15.3% del total de cepas aisladas (cuadro 3).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas aisladas de las especies S. enteritidis y S. typhi, se presentan en el cuadro 2.

#### Obtención de plásmidos.

Se detectó la presencia de material genético extracromosómico (plásmidos) en 6 serotipos de la especie Salmonella enteritidis: 5 cepas de S. typhimurium, 4 cepas de S. heidelberg, 2 cepas de S. derby, 1 cepa de S. muenchen, 1 cepa de S. agona y 1 cepa de S. braenderup, al igual que en 2 cepas de la especie S. typhi. Se determinó su peso molecular, comparando su movilidad electroforética relativa (distancia que hay entre el origen y la banda formada por un plásmido en un corrimiento electroforético en geles de agarosa) con una curva de log. de movilidad electroforética relativa vs. peso molecular (Fig. 3) construida con

los datos obtenidos de la electroforesis realizada para plásmidos de peso molecular conocido (cuadro 4).

El análisis en geles de agarosa permitió identificar cepas de S. enteritidis y S. typhi portadoras de un plásmido que confiere resistencia a la ampicilina.

#### Salmonella typhimurium.

En el cuadro 5 se enlistan los plásmidos de las cepas de S. typhimurium aislados e identificados. En las cepas 1, 2 y 3 se identificó un plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones (d) (Fig. 5), el cual les proporciona la característica de resistencia a la ampicilina. En la cepa 2 fue identificado además, un plásmido de  $48.8 \times 10^6$  daltones (Fig. 5) en el que no fue posible determinar las características que confiere.

La cepa 4 de S. typhimurium (cuadro 5) presentó un patrón de resistencia a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, ceftazidina y kanamicina y se identificó un plásmido de  $27.2 \times 10^6$  (Fig. 5) en el cual no fue posible determinar las características fenotípicas que confiere por las limitaciones del método, dado que solo se utilizó un antimicrobiano como marcador.

En la cepa 5 de S. typhimurium (Fig. 5), se observó también la presencia del plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones y un patrón de resistencia a la gentamicina, ceftriazona, cefalotina y tetraciclina, probablemente éste codifique para esta característica de multiresistencia pues no se observó la presencia de algún otro plásmido que pueda conferir dicha resistencia.

Fueron aislados también en las cepas 1, 2, 3, 4 y 5 de S. typhimurium plásmidos de bajo peso molecular de  $0.39 \times 10^6 - 17 \times 10^6$

daltones (cuadro 5, fig. 5), los cuales pueden proporcionar diferentes características de las codificadas por plásmidos R o quizás simplemente se trate de plásmidos crípticos: los cuales no confieren ninguna característica fenotípica y tienen un peso molecular menor de  $10 \times 10^6$ . Detectando que en estas cepas dichos plásmidos presentan un bajo peso molecular.

#### Salmonella heidelberg.

En el cuadro 6 se presentan los plásmidos que se aislaron e identificaron en las 4 cepas de S. heidelberg con que se trabajaron. En las cepas 6 y 7 de S. heidelberg (fig. 6), se identificó el plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones y un plásmido de alto peso molecular  $48.8 \times 10^6$ , el cual probablemente proporcione una característica de virulencia a la bacteria, puesto que sólo se presentó un patrón de resistencia a ampicilina y cefalotina, la resistencia a la ampicilina se atribuye al plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones y dicho plásmido de  $48.8 \times 10^6$  daltones no puede codificar una resistencia a antimicrobiano, además que se sabe que Salmonella tiene plásmidos de un peso molecular muy similar que confiere características de virulencia.

La cepa 9 (fig. 6) presentó también el plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones con un fenotipo de resistencia a ampicilina y tetraciclina y dos plásmidos: uno de  $10.4 \times 10^6$  y otro de  $4.4 \times 10^6$ , los cuales al parecer por su peso molecular se trata de plásmidos crípticos. En la única cepa donde no se observó la presencia del plásmido de  $20.5 \times 10^6$  fue en la cepa 8, donde quizás se perdió el plásmido durante la extracción, puesto que son muy susceptibles de perderse durante la misma. Solo se identificaron dos plásmidos de  $4.9 \times 10^6$  y

6  
de  $4.0 \times 10^6$  daltones.

Otros serotipos de Salmonella enteritidis.

En las cepas 10 y 13 de S. derby (cuadro 7, fig.7) con fenotipo de resistencia a la ampicilina la primera y a la ampicilina y tetraciclina la segunda, se encontró un plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones que confiere dicha característica de resistencia a cada una de estas cepas.

También se detectaron otros plásmidos de diferentes pesos moleculares; en la cepa 13, uno de  $28.7 \times 10^6$  daltones y uno de  $25.7 \times 10^6$  daltones no determinando las características fenotípicas que confieren por limitaciones del método utilizado. En esta misma cepa y la cepa 10 se encontraron otros plásmidos cuyos pesos moleculares varían de  $0.39 \times 10^6$  a  $18 \times 10^6$  daltones, no identificando las características fenotípicas que confieren.

La cepa 11 de S. agona (cuadro 7, fig.7) presentó dos plásmidos, uno de  $24.3 \times 10^6$  daltones y otro de  $48.3 \times 10^6$  daltones. El primero parece conferir resistencia a la ampicilina y tetraciclina a la bacteria, mientras que el segundo, probablemente medie virulencia.

En la cepa 12 de S. muenchen (fig. 7), no fue posible detectar la presencia del plásmido característico de resistencia a ampicilina, pues hubo limitaciones del método de extracción, como el perderlo durante la manipulación o es posible que el número de copias en la bacteria haya sido escaso. En cambio se encontraron plásmidos de bajo peso molecular que varía de  $4.3 \times 10^6$  a  $13 \times 10^6$  daltones.

En el análisis electroferético de la cepa 14 de S. braenderup, sensible a la ampicilina se observó un plásmido de  $43 \times 10^6$  daltones el cual quizás medie alguna característica de virulencia o

resistencia a metales pesados y un plásmido de  $13.6 \times 10^6$  daltones el cual quizás no confiere ninguna característica fenotípica.

#### Salmonella typhi.

En la cepa 15 de la especie S. typhi (cuadro 8, fig. 8) con fenotipo de resistencia a ampicilina se aislaron plásmidos de  $43 \times 10^6$  daltones y  $13 \times 10^6$  daltones. El primero al parecer confiere resistencia a la ampicilina, ya que no hay otro fenotipo de resistencia a antimicrobianos y en el segundo no se conoce que fenotipo confiera, aunque probablemente se trate de un plásmido críptico por el bajo peso molecular que presenta. En la cepa 16 de la misma especie, multiresistente a antimicrobianos (cuadro 8, fig. 8) se encontraron cinco plásmidos, el de mayor peso molecular fue de  $48.8 \times 10^6$  y el de menor de  $16 \times 10^6$  daltones, donde no fue posible determinar el fenotipo que confieren.

#### Conjugación bacteriana.

Las dos técnicas utilizadas para conjugación permitieron obtener los siguientes transconjugantes de S. enteritidis y S. typhi. La técnica de conjugación en tubo descrita por Alcaide y Garay permitió obtener transconjugantes para la cepa 5 de S. typhimurium y la cepa 10 de S. derby; mientras que la conjugación realizada en placas de agar Luria, permitió obtener transconjugantes de las cepas 3, 4 y 5 de S. typhimurium, la cepa 6 de S. heidelberg y la cepa 10 y 13 de S. derby, así como el transconjugante de la cepa 15 de S. typhi.

Se realizaron pruebas bioquímicas a todos los transconjugantes, aplicando las pruebas que se utilizan para la identificación de E. coli: agar Kligler, medio sulfuro-indol-movilidad (SIM), citrato de

Simmons, fermentación de malonato y prueba de rojo de metilo-Voges-Proskauer (RM/VP) obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 1.- Características bioquímicas de los transconjugantes.

Prueba	Característica	<i>E. coli</i>
agar Kligler	Fermentación de lactosa.	+
	Producción de gas	+
	Producción de ácido sulfhídrico.	-
agar SIM*	Producción de indol	+
	Movilidad	+
citrato de Simmons	Utilización de citrato como fuente de carbono.	-
fermentación de carbohidratos	Malonato.	-
Rojo de metilo	Producción de ácidos	+
Voges-Proskauer	mixtos.	-

\*agar SIM- Sulfhídrico-indol-movilidad.

+ 100% de las cepas positivas.

- 100% de las cepas negativas.

El análisis electroforético de transconjugantes, permitió detectar la transferencia del plásmido de  $20.5 \times 10^6$  daltones de las cepas 3 y 5 de *S. typhimurium* y de la cepa 6 de *S. heidelberg* a la cepa receptora de *E. coli* (cuadro 9 fig.9). Hecho que también ocurrió en

la cepa 10 de S. derby (cuadro 9 fig. 10). Este plásmido codifica para resistencia a la ampicilina, dado que los respectivos transconjugantes obtenidos A, B, C y E presentaron el fenotipo de resistencia a la ampicilina, característica que no presentaban antes de la conjugación.

En los transconjugantes D y F de la cepa 4 de S. typhimurium y de la cepa 13 de S. derby respectivamente, no se observó la presencia de dicho plásmido (cuadro 9, fig. 10) sin embargo sus transconjugantes presentaron el fenotipo de resistencia a ampicilina puesto que fueron capaces de desarrollar en las placas de agar con antimicrobianos selectivos y fueron identificados como bacterias de E. coli. Es probable que este plásmido lo haya perdido la bacteria, ya que no es estable en ésta o quizás se perdió durante la extracción.

En el transconjugante G de la cepa 15 de S. typhi (cuadro 10, fig. 10), se observó la transferencia de los plásmidos de  $43 \times 10^6$  y de  $13 \times 10^6$  daltones. El primero en esta especie probablemente codifica para resistencia a la ampicilina, puesto que el respectivo transconjugante presentó también dicho fenotipo y el segundo plásmido probablemente sea críptico por su bajo peso molecular.

#### IV- DISCUSION Y CONCLUSIONES .

En base al aislamiento total de cepas de Salmonella enteritidis que se obtuvo de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP), S. typhimurium y S. heidelberg continúan siendo los serotipos más frecuentemente aislados en el INP, ya que dicho fenómeno se ha observado también durante los dos últimos años, 1987 y 1988, en dicho Instituto. A estos mismos serotipos pertenecen las cepas que se aislaron durante dos brotes epidémicos de salmonelosis detectados por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales en diciembre de 1975 y noviembre de 1978 (37). Resultados similares encontró Kupersztuch al aislar con mayor frecuencia el serotipo S. typhimurium a partir de pacientes afectados por salmonelosis tanto en muestras procesadas por laboratorios del sector salud, como aquellas procesadas por laboratorios del sector privado (25, 26). Este serotipo S. typhimurium, ha sido causa frecuente de epidemias de gastroenteritis en nuestro país (27) y ha provocado también algunas infecciones entre pacientes internos de hospitales pediátricos como el INP, Hospital Infantil de México y Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (46, 50).

Un porcentaje significativo de las cepas aisladas pertenece a la especie S. typhi (16.9%) causante de tifoidea (6, 55) la cual representa un problema de salud especialmente en niños, no solo entre pacientes de este Instituto, sino también para otros a partir de los cuales se han aislado cepas de dicha especie, como en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, presentando resistencia a antimicrobianos como la ampicilina y trimetropim-sulfametaxazol (50). Es importante señalar que esta especie provocó

una epidemia entre la población mexicana durante 1972 (3).

A partir de muestras de heces fecales y sangre de pacientes afectados por dichas enfermedades, es muy probable aislar organismos del género Salmonella; dado que precisamente es en estas muestras donde se haya el mayor número de organismos del género, además que en ellas se puede detectar con mayor probabilidad en caso de que el paciente este en la etapa de eliminación de los mismos o se encuentre justo en el periodo de incubación, lo cual es fácilmente detectable en heces fecales y sangre.

Se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de cepas del género y para diferenciar entre si las dos especies. Se trató usar el mayor número de pruebas para que esta diferenciación de especies no fuese errónea detectando precisamente patrones de fermentación para diferentes carbohidratos como ramnosa y trealosa, producción de ácidos mixtos como lisina y ornitina y la oxidación de otros como el triptofano, etc. todas ellas vías metabólicas determinadas en cada especie de Salmonella por sus características genéticas.

Se detectó la presencia de plásmidos en todas las cepas estudiadas, los cuales variaron en número para cada cepa, peso molecular y características fenotípicas que confieren a cada una de éstas.

Se encontró que los serotipos S. typhimurium, S. heidelberg y S. derby comparten la característica de resistencia a ampicilina y un plásmido con peso molecular de  $20.5 \times 10^6$  daltones. Estudios similares en niños como el realizado por Hadfield y otros estudios en animales y humanos han determinado la presencia de plásmidos que confieren resistencia a antimicrobianos en S. typhimurium (7, 20,

40, 43).

Se encontró una cepa de S. typhimurium con un plásmido de  $27.2 \times 10^6$  daltones el cual difiere en peso molecular respecto del plásmido de resistencia a la ampicilina identificado en las otras cepas ( $20.5 \times 10^6$  daltones), quizás ello se debe a que dicho plásmido determina esta multiresistencia y de ahí la diferencia de peso molecular.

En la cepa 2 de S. typhimurium, las cepas 6 y 7 de S. heidelberg y en la cepa 11 de S. agona se detectó un plásmido de  $48.8 \times 10^6$  daltones, encontrando nuevamente cepas de diferentes serotipos que comparten un plásmido. Este plásmido quizás codifique alguna característica de virulencia como lo son factores de adherencia en ciertas zonas del huésped que esta parasitando o algún otro factor como invasividad del aparato digestivo, características que recientemente se han encontrado en los organismos de S. typhimurium, S. dublin y S. enteritidis (4, 9, 39, 57).

Se aislaron e identificaron otros plásmidos en los serotipos S. typhimurium, S. heidelberg y S. derby, los cuales presentaron bajo peso molecular que varía de  $0.39 \times 10^6$  a  $18 \times 10^6$  daltones, cuyo peso molecular sugiere que en este caso se trata de plásmidos crípticos, los cuales no determinan ninguna característica fenotípica, dado que Salmonella se caracteriza también por presentar este tipo de plásmidos, los cuales son de bajo peso molecular  $10 \times 10^6$  y se presentan en número de copias alto en la bacteria (5, 21).

El plásmido de  $24.3 \times 10^6$  daltones de S. agona, quizás confiere resistencia a ampicilina y tetraciclina, cabe resaltar el hecho de que éste difiere en peso molecular con el plásmido que confiere

resistencia a ampicilina en los otros serotipos, por el hecho que precisamente en este caso hay una característica fenotípica más o quizás solo se trate de una secuencia de bases adicional que tenga este plásmido y no se haya detectado por el método utilizado, ya que éste no permite detectar variaciones tan pequeñas.

Es importante señalar que se han encontrado plásmidos que confieren resistencia para varios antimicrobianos a la vez, conocidos como  $\beta$ -lactamasas (ampicilina, tetraciclina, penicilina, etc.), fenómeno que se observa en este caso, con un plásmido que probablemente confiera resistencia para dos antimicrobianos del grupo de las  $\beta$ -lactamasas (7).

Una característica que resalta en S. braenderup es su sensibilidad a la ampicilina y ausencia de algún plásmido que determine resistencia a dicho antimicrobiano. Sin embargo se detectó un plásmido de  $43 \times 10^6$  daltones, mismo que quizás determine virulencia en ésta, puesto que la cepa no presentó ningún otro fenotipo, además que hay que recordar que todas estas cepas fueron aisladas de pacientes afectados por salmonelosis y ya se ha mencionado la relación que hay entre plásmidos de este tipo y la virulencia de los serotipos.

En la cepa 15 de S. typhi un plásmido de  $43 \times 10^6$  daltones parece determinar la resistencia a la ampicilina, aunque dicho plásmido es similar al plásmido de S. braenderup no es posible correlacionar los resultados, ya que en el primer caso se trata de una especie de Salmonella y en el segundo de un serotipo de S. enteritidis. La especie presentó también un plásmido de  $13 \times 10^6$  daltones, el cual como se ha mencionado puede ser un plásmido críptico por su bajo

peso molecular.

La cepa 16 de S. typhi multiresistente presento varios plásmidos encontrando un plásmido de  $48.8 \times 10^6$  daltones igual a los aislados e identificados en S. typhimurium, S. heidelberg y S. agona el cual probablemente determine virulencia en las cepas para con su huesped. El resto de plásmidos probablemente confieran las características de multiresistencia, siendo imposible caracterizarlos ya que solo se utilizó la ampicilina como antimicrobiano selectivo.

El empleo de endonucleasas de restricción y un análisis electroforético posterior, permitiría determinar si hay alguna similitud entre los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina y aquellos que confieren resistencia a ampicilina y cefalotina o ampicilina y tetraciclina, dado que presentaron pequeñas variaciones de peso molecular.

Los transconjugantes obtenidos permitieron determinar los plásmidos que confieren resistencia a la ampicilina, en los serotipos que se trabajaron, dado que las cepas receptoras de E. coli adquirieron el fenotipo que tenían las cepas donadoras de S. enteritidis. Observando la presencia de dicho plásmido en el análisis electroforético realizado a los transconjugantes, además de que se realizaron pruebas bioquímicas a éstos, comprobando con ello que eran organismos de E. coli. El bajo número de transconjugantes obtenidos se debe a que algunos de los plásmidos que presentan estas cepas, no tienen el sistema característico F, el cual permite el intercambio de material genético durante la conjugación, por lo cual son plásmidos no conjugativos o quizás este sistema no

sea eficiente bajo las condiciones que se realizó el experimento. La técnica de conjugación en placa de agar, pareció ser la más eficiente para la transferencia de plásmidos, quizás porque mediante esta técnica la pared celular de las bacterias está en estrecho contacto, lo cual es determinante para la formación del pili por el que se da la transferencia de material genético a diferencia de la técnica de conjugación en tubo, donde es posible que la conjugación sea interrumpida por rompimiento del pili a través de algún proceso mecánico.

El estudio realizado en este grupo de cepas de S. enteritidis permitió determinar la presencia de plásmidos que confieren resistencia a la ampicilina en la mayoría de ellas, detectando que algunos de estos plásmidos son susceptibles de ser transferidos a otra bacteria mediante el proceso de conjugación, en particular el plásmido que determina resistencia a la ampicilina en los serotipos S. typhimurium, S. heidelberg y S. derby, además de que dichos serotipos comparten características de resistencia a ampicilina y por consiguiente presentan el mismo plásmido. Es importante señalar el hecho que estos serotipos son los más frecuentemente aislados en el INP y un porcentaje significativo de las cepas que se aíslan presentan patrones de resistencia al menos a un antimicrobiano y son por consiguiente los serotipos de S. enteritidis que más problemas de salud causan.

Esta característica de resistencia a antimicrobianos en las bacterias es el resultado de un proceso selectivo que se ha dado por el amplio uso de antimicrobianos en el tratamiento de este tipo de enfermedades en el hombre, tanto por la prescripción de altas

y constantes dosis de antimicrobianos, como por la administración en ocasiones a niveles subterapeúticos. Así mismo existen ciertos plásmidos con la capacidad de ser transferidos por conjugación de una bacteria a otra, gracias al sistema de transferencia F<sup>+</sup>, el cual determina la formación del pili en las bacterias, mismo que permite el intercambio de material genético en éstas.

Estos plásmidos llamados conjugativos son susceptibles de ser transferidos con mayor probabilidad entre bacterias de la misma especie y más aún del mismo serotipo por la compatibilidad que tienen entre sí. Este potencial de diseminación epidémica entre las poblaciones bacterianas, dado por plásmidos ya sea determinando características de resistencia a antimicrobianos o características de virulencia de la bacteria para con su huésped y su capacidad de ser transferidos eleva la patogenicidad de estas bacterias, siendo también un factor determinante para que aumente el número de bacterias resistentes o multiresistentes a antimicrobianos.

Cabe resaltar que el presente trabajo ha permitido ampliar el conocimiento que se tiene de la biología molecular de plásmidos que determinan características de resistencia a antimicrobianos y tener mayor conocimiento del comportamiento epidemiológico de algunas de las cepas que se aíslan con mayor frecuencia en el INP, determinar que tipo de plásmidos confieren esta resistencia a antimicrobianos en los diferentes serotipos de Salmonella enteritidis que ahí se aíslan, además que dicho estudio ha permitido observar la posible diseminación de estas características de resistencia a antimicrobianos entre un grupo de bacterias; puesto que todo ello representa un problema de salud de mayor magnitud para los

pacientes y específicamente en los del INP, quienes en su mayoría son niños menores de 12 años.

Todo ello marca la pauta para que se tome en consideración el efecto que causa el uso de antimicrobianos, en ocasiones en forma desmedida en el tratamiento de infecciones, con especial referencia en niños, ya que esto puede ser un factor determinante en la selección de aquellas bacterias precisamente resistentes a antimicrobianos, provocando graves problemas a corto plazo. Así mismo se considera que todo esto determina los factores que deben de considerarse en un estudio epidemiológico de determinadas enfermedades causadas por bacterias, ya que en la medida que se amplie el conocimiento biológico de estas, será posible solucionar los problemas de salud que causan, en especial en niños.

## CONCLUSIONES :

Los datos obtenidos en el presente trabajo, permiten afirmar que:

1) Se demostró la presencia de material genético extracromosómico (plásmidos) en cepas de *S. derby*, *S. heidelberg* y *S. typhimurium* y en la especie *S. typhi*, así como su relación entre plásmidos y patrones de resistencia, con la obtención de transconjugantes.

2) Se identificó un plásmido conjugativo, con peso molecular de  $20.5 \times 10^6$  daltones característico de los serotipos *S. derby*, *S. heidelberg* y *S. typhimurium* que determina el fenotipo de resistencia a la ampicilina, y un plásmido conjugativo con peso molecular de  $43 \times 10^6$  daltones en *S. typhi* el cual probablemente determine la característica de resistencia a la ampicilina en esta especie.

3) Se observó la presencia de un plásmido de  $48.8 \times 10^6$  daltones en cepas de *S. agona*, *S. heidelberg* y *S. typhimurium*, el cual probablemente medie características de virulencia en la bacteria, así como plásmidos crípticos en los serotipos *S. agona*, *S. derby*, *S. heidelberg*, *S. muenchen* y *S. typhimurium* con pesos moleculares que varían de  $0.4 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  daltones.

4) Se considera que este trabajo refleja el problema que en la actualidad causa el mal uso de antimicrobianos en el tratamiento de infecciones bacterianas, específicamente salmonelosis en niños, pues se seleccionan bacterias resistentes a estos medicamentos aumentando más aún su patogenicidad.

5) Es necesario conocer más acerca de la biología de estas bacterias para evitar este tipo de problemas de salud.

CUADRO 2		PRUEBAS BIOQUIMICAS EN LAS CEPAS AISLADAS		
PRUEBA	CARACTERISTICA	S. enteritidis	S. typhi	
Agar Kligler	Fermentación de lactosa	-	-	
	Producción de gas	+	-	
	Producción de ácido sulfhídrico	+	+	
Agar SIM *	Producción de indol	-	-	
	Movilidad	+	+	
Citrato de Simmons	Utilización de citrato como fuente de carbono	+	-	
Fermentación de carbohidratos	ramnosa	+	-	
	trealosa	+	+	
Descarboxilación de aminoácidos	lisina	+	+	
	ornitina	-	+	
R rojo de metilo	Producción de ácidos mixtos	+	+	
Voges Proskauer		-	-	

- \* sulfhídrico-indol-movilidad
- + Positividad en el 100% de las cepas
- Negatividad en el 100% de las cepas

Cuadro 3.- Cepas de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* aisladas en el INP durante el periodo de enero a abril de 1989.

Cepa	Aislamientos.	
	No. de Cepas	%
<i>Salmonella typhimurium</i>	24	33.3
<i>Salmonella heidelberg</i>	14	19.4
<i>Salmonella agona</i>	8	11.1
<i>Salmonella derby</i>	4	5.6
<i>Salmonella shubra</i>	2	2.8
<i>Salmonella infantis</i>	2	2.8
<i>Salmonella muenchen</i>	2	2.8
<i>Salmonella braenderup</i>	2	2.8
<i>Salmonella kiambu</i>	2	2.8
<i>Salmonella indiana</i>	1	1.4
<i>Salmonella typhi</i>	11	15.3
Total	72	100.0

Cuadro 4.- Resultados de movilidad relativa electroforética de plásmidos de peso molecular conocido en cepas de *E. coli*.

Plásmido	Peso molecular (daltones)	Movilidad relativa <sup>1</sup> (mm)	Desviación estandar
GM30/pBR322	2.6X10 <sup>6</sup>	45	0.81
P654/PRSD1	35X10 <sup>6</sup>	16	0
J53/RP4	40X10 <sup>6</sup>	9	0
K37/RI-19	62X10 <sup>6</sup>	7	0.81

1.- Promedio de la migración relativa de 5 electroforesis realizadas para cada plásmido.

Cuadro 5- Presencia de plásmidos en cepas resistentes a ampicilina de *Salmonella typhimurium*.

Cepa	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
1	Ap	24, 48, 56	20.5, 0.39, 0.39
2	Ap	9, 24, 32, 36, 42	48.8, 20.5, 12, 8.7, 4.2
3	Ap Ce	21, 24, 27, 32, 36, 43, 46	24.3, 20.5, 17, 12.1, 8.7, 7.2, 3.5, 1.6
4	Ap Cf Cm Cp Gm Km Tc	19, 35, 44	27.2, 9.5, 2.9
5	Ce Cf Gm Tc	24, 40, 44, 50	20.5, 5.7, 2.3, 0.39

1.- Ap- Ampicilina, Ce- Cefalotina, Cf- Ceftriazona, Cp- Cefoperazona, Gm- Gentamicina, Km- Kanamicina, Cm- Cloranfenicol y Tc- Tetraciclina.

2.- Cada número representa una banda en el gel (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

Cuadro 6.- Presencia de plásmidos en cepas resistentes a ampicilina de *Salmonella heidelberg*.

Cepa	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
6	Ap Ce	9, 24	48.9, 20.5
7	Ap Ce	9	48.9
8	Ap Tc	41, 52	4.9, 4.0
9	Ap Tc	24, 34, 63	20.5, 10.4, 4

1.- Ap- Ampicilina, Ce- Cefalotina, y Tc- Tetraciclina.

2.- Cada número representa una banda de plásmido en el gel (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

Cuadro 7.- Presencia de plásmidos en cepas resistentes a ampicilina de *Salmonella enteritidis*.

Serotipo	Cepa	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
<i>S. derby</i>	10	Ap	24, 26, 31, 35, 37, 42, 48	20.5, 18, 13, 9.5 7.9, 4.3, 0.39
<i>S. agona</i>	11	Ap Tc	21, 9	24.3, 48.3
<i>S. muenchen</i>	12	Ap Ce	31, 37, 42	13, 7.9, 4.3
<i>S. derby</i>	13	Ap Tc	18, 20, 24, 26 30, 35, 40, 45	28.7, 25.7, 20.5, 18, 14, 9.5, 2.6
<i>S. braenderup</i>	14	sensible	11, 31	45, 13

1.- Ap- Ampicilina, Ce- Cefalotina, Tc- Tetraciclina.

2.- Cada número representa una banda de plásmido en el gel (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

**Cuadro 8.- Presencia de plásmidos en cepas resistentes a ampicilina de *Salmonella typhi*.**

Cepa	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
15	Ap	11, 31	43, 13
16	Ap Cm Gm Tc	9, 13, 19, 21 28	48.8, 38.2, 27, 24, 16

1.- Ap Ampicilina, Cm- Cloranfenicol, Gm- Gentamicina, Tc- Tetraciclina.

2.- Cada número representa una banda de plásmido (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

Cuadro 9.- Presencia de plásmidos en transconjugantes de *Salmonella enteritidis*.

Transconjugante	Cepas	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
A	3	Ap Ce	21, 24, 27, 32 36, 39, 43, 46	24.3, 20.5, 17 12, 8.7, 6.0, 3.5, 1.6
B	5	Gm Ce Cf Tc	24, 40, 45, 50	20.5, 5.7, 2.3, 0.4
C	6	Ap Ce	24	20.5
D	4	Ap Cf Cm Cp Gm Km Tc	41, 51	4.9, 0.4
E	10	Ap	22, 24, 30, 32 35, 40, 45	22.9, 20.5, 14.9 12, 9.5, 5.7, 2.3
F	13	Ap Tc	32, 35, 40, 45	12, 9.5, 7.0, 2.3

1.- Ap- Ampicilina, Ce- Cefalotina, Cf- Ceftriaxona, Cp- Cefaperazona, Cm- Cloranfenicol, Gm- Gentamicina, Km- Kanamicina, Tc- Tetraciclina.

2.- Cada número representa una banda de plásmido en el gel (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

Cuadro 10.- Presencia de plásmidos en transconjugantes de *Salmonella typhi*.

Transconjugante	Cepa	Patrón de resistencia <sup>1</sup>	Movilidad relativa <sup>2</sup>	Peso molecular <sup>3</sup>
G	15	Ap	11, 31	43, 13

1.- Ap- Ampicilina.

2.- Cada número representa una banda de plásmido en el gel (mm).

3.-  $1 \times 10^6$  daltones, cada número es el peso molecular de un plásmido.

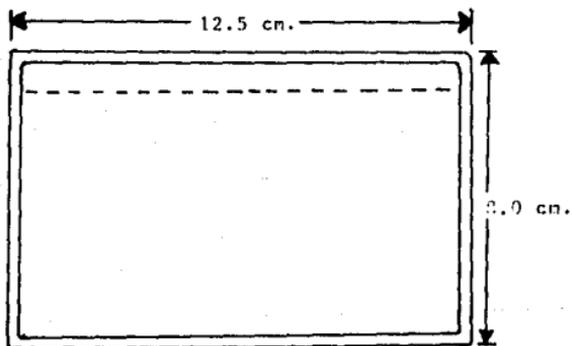
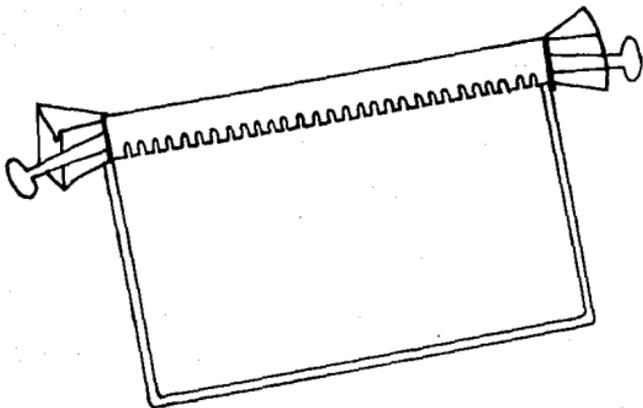


Fig. 1.- Preparación de geles de agarosa.

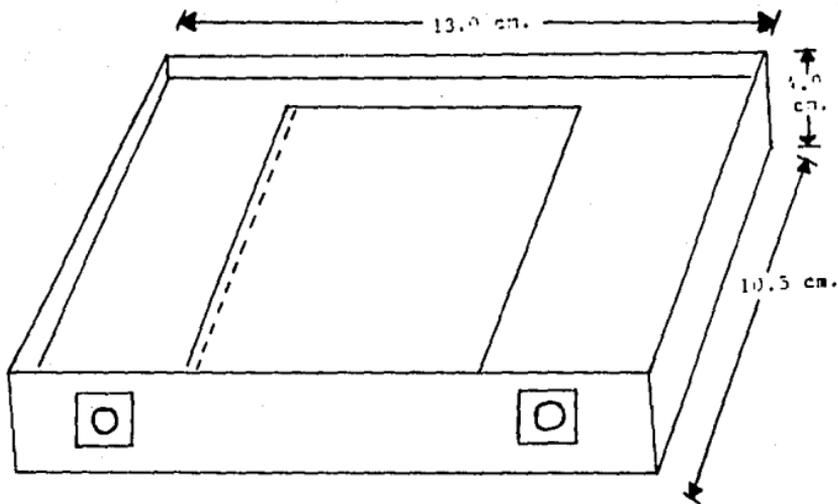
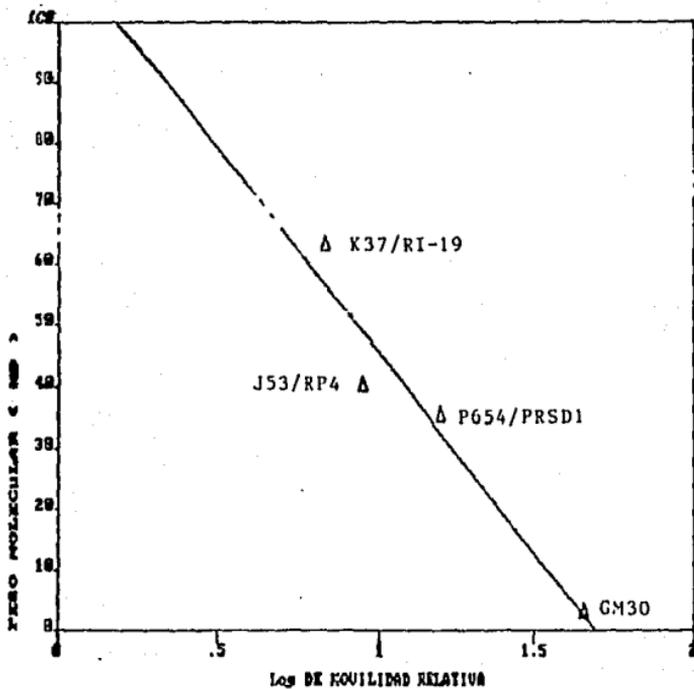


Fig. 2.- Câmara para electroforesis en geles de agarosa.



REGRESION LINEAL

VARIANZA -33.1

$$Y = \log X (-6.668 \times 10^1) + (1.125 \times 10^2)$$

Fig.3- Gráfica de peso molecular de plásmidos en E. coli.

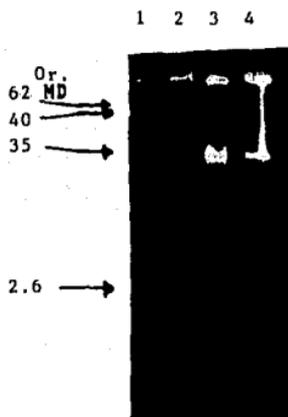


Fig. 4.- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos con peso molecular conocido de cepas de E. coli. Or-Origen 1-GM30/pBR322, 2-P654/PRSD1, 3-J53/RP4, 4-K37/RI-19.

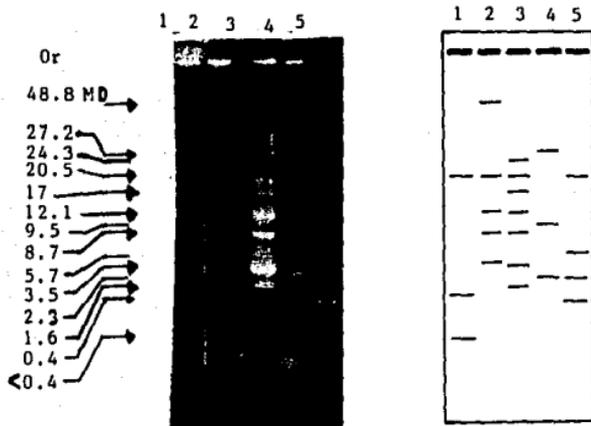


Fig.5.- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en cepas de S. typhimurium. Or-Origen, 1- Cepa 1, 2-Cepa 2, 3- Cepa 3, 4- Cepa 4, 5- Cepa 5.

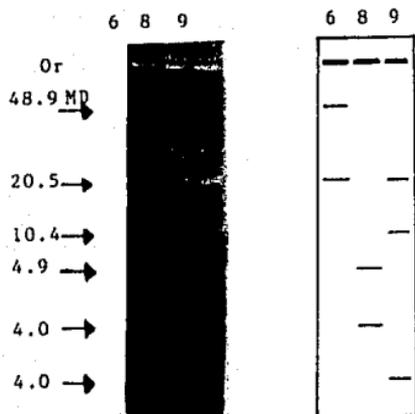


Fig. 6- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en cepas de S. heidelberg. Or-Origen, 6-Cepa 6, 8-Cepa 8 9-Cepa 9.

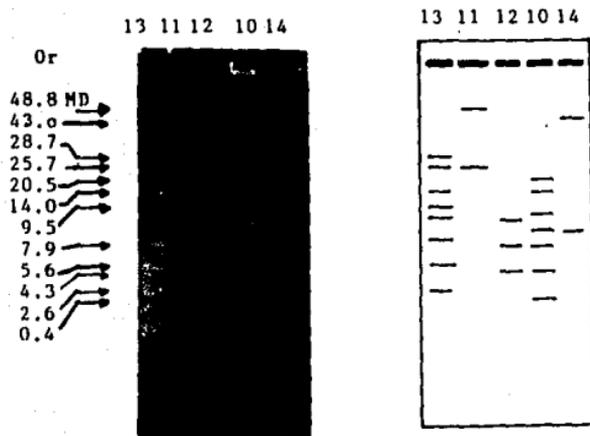


Fig. 7- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en cepas de distintos serotipos de S. enteritidis. Or-Origen, 13- S. derby, 11-S. agona, 12-S. muenchen, 10-S. derby, 14-S. braenderup

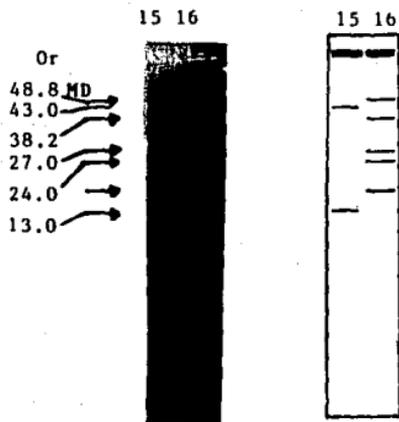


Fig. 8- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en cepas de S. typhi. Or-Origen, 15-Cepa 15, 16-Cepa 16.

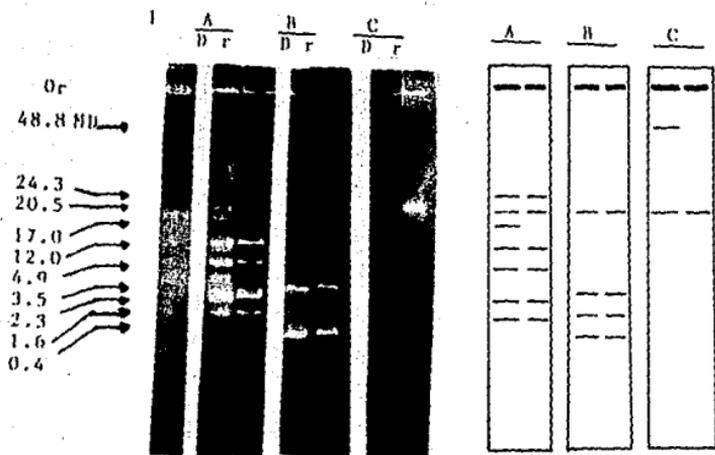


Fig.9- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en Transconjugantes de S. enteritidis. Or-Origen, --- 1-E. coli K12 C600 (receptora), D-Cepa donadora, r-Cepa receptora (Transconjugante), A-Cepa 3 de S. typhimurium, B-Cepa 5 de S. typhimurium, C-Cepa 6 de S. heidelberg.

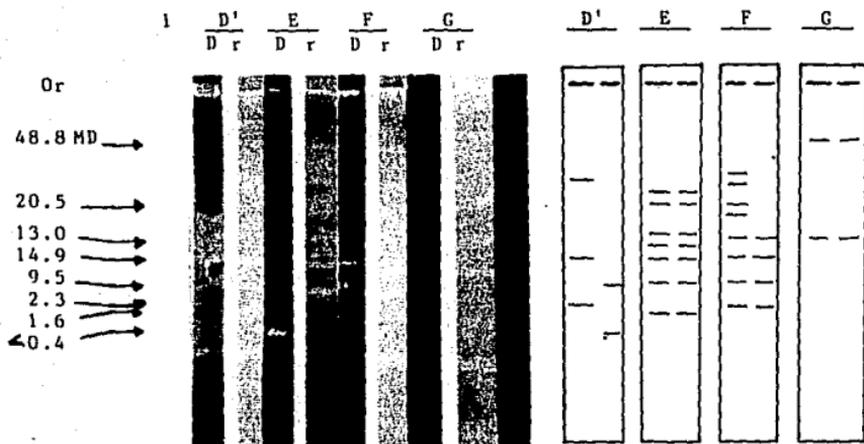


Fig. 10- Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos en Transconjugantes de S. enteritidis y S. typhi. Or-Origen 1-E E coli K12 C600 (receptora), D-Cepa donadora, r-Cepa receptora (Transconjugante), D'-Cepa 4 de S. typhimurium, E-Cepa 10 de S. derby, F-Cepa 13 de S. derby, G-Cepa 15 de S. typhi.

## A P E N D I C E .

### I- Soluciones y Buffers.

#### a) Aislamiento de plásmidos.

##### Solución I.

- Lisozima 2 mg/ml.
- Etilendinitrilotetracetato (EDTA) 10 mM (\*) a pH 8.0
- Tris-aminometano hidroximetil (tris-base) 25 mM a pH 8.0
- Glucosa 50 mM.

Esta solución se preparó en un baño de hielo a 0°C. Las soluciones de EDTA, tris-base y glucosa se esterilizaron en autoclave a 10 libras/115°C por 10 min. y almacenaron a 4°C.

##### Solución II.

- Hidroxido de sodio (NaOH) 0.2 N (\*\*)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%.

##### Solución III.

- Acetato de sodio 3 M a pH 4.8

Se ajustó el pH de la solución con ácido acético glacial y esterilizó en autoclave a 10 lbs/115°C por 10 min. y almacenó a temperatura ambiente.

#### Buffers.

- Buffer tris-etilendinitrilotetracetato (TE).

Tris-base 10 mM a pH 8.0

EDTA 1 mM a pH 8.0

\* mM- milimolar, unidades de concentración de una solución.

\*\* N- Normal, unidades de concentración de una solución.

-Buffer para electroforesis: Tris-boratos.

Tris-base 89 mM a pH 8.0

Acido bórico 89 mM

Se preparó el buffer a una concentración de 5X y esterilizó en autoclave a 10 lbs./115°C por 10 min. y se almacenó a temperatura ambiente. Al utilizarlo se diluyó a 1X con agua desionizada estéril.

- Colorante indicador para electroforesis:

Púrpura de bromofenol al 0.1% con glicerol al 50% en agua.

## II- Medios de cultivo.

- Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), el cual contenía 33 µg./ml de ampicilina para amplificar plásmidos que confieren la resistencia a dicho antimicrobiano, mismo que se adicionó al medio estéril por filtración con membrana millipore de 0.45 µm.

- Caldo Luria.

Bacto triptona	10 gr.
Extracto de levadura	5 gr.
Cloruro de sodio (NaCl)	10 gr.
Agua destilada	1000 ml.
Timina	20 µg/ml.

Se ajustó a pH 7 con NaOH 2.5 N

-Agar Luria.

Se preparó a partir de caldo Luria más 20 gr. de Bacto agar, ajustando a pH 7.0 con NaOH 2.5 N, este medio contenía 1000 µg/ml de ácido nalidíxico y 25 µg/ml de ampicilina como antimicrobianos para seleccionar los transconjugantes de S. enteritidis, mismos que se añadieron al medio por filtración con membrana millipore de 0.45 µm. La cantidad de antimicrobiano que

se pesó para la preparación del medio cultivo, se calculó en base a la fórmula establecida en el Manual de microbiología clínica de Lennette (26).

$$\text{peso de antimicrobiano (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{potencia } (\mu\text{g/ml})}$$

Donde se considera la potencia del antimicrobiano para la preparación de una solución, puesto que en ello radica su efectividad contra un microorganismo y esto debe ser considerado para cualquier estudio in vitro a diferencia del antimicrobiano que se requiere para amplificar plásmido, donde no es necesario considerar la potencia (10, 30).

- Medio de conservación.

Peptona proteasa 10 gr.

Extracto de carne 10 gr.

Bacto agar 9 gr.

En 1000 ml. de agua destilada, ajustando a pH 7.4 y esterilizando en autoclave a 15 lbs por 15 min.

#### V- BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Alcaide E, Garay E. R-Plasmid transfer in Salmonella spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters. *Appl Environ Microbiol* 1984; 44 (2): 435-438.
- 2.- Anónimo. Increasing rate of Salmonella enteritidis infections in the northeastern United States. *JAMA* 1987; 257 (5): 600-601.
- 3.- Bessudo D, Olarte J, Mendoza P y col. Aislamiento de S. typhi resistentes a altas concentraciones de cloranfenicol. *Bol Of San Panm* 1973; 64 (1): 1-4.
- 4.- Beninger P, Chikamani, Tenabe K y col. Physical and genetic mapping of the Salmonella dublin virulence plasmid psDL2. *J Clin Invest* 1988; 81: 1341-1347.
- 5.- Broda P. Plasmids. U.S.A. W. H. Freeman and Co., 1979: 1-124.
- 6.- Cecil. Tratado de Medicina Interna. 11a. ed. México: Interamericana, 1985: Vol. 1: 1572-1577.
- 7.- Chaslus-Dancla E, Martel J L, Carlier C, Lafont J P, Courvalin P. Emergence of aminoglycoside 3-n-Acetyltransferase IV in Escherichia coli and Salmonella typhimurium isolated from animals in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29 (2): 239-243.
- 8.- Cherubin C, Eng H K, Smith S M, Goldstein J C. Cephalosporin of efficacy and cross resistance with ampicillin. *Arch Intern Med* 1986; 146: 2149-2152.
- 9.- Chikamani G, Frierer J, Guiney D. Plasmid-mediated virulence in Salmonella dublin demonstrated by use of a Tn5-oriT construct. *Infect Immun* 1985; 50 (2): 420-423.
- 10.- Cohen M, Tauxe R. Drug resistant Salmonella in the United States; an epidemiologic perspective. *Science* 1986; 214: 964-969.

- 11.- Cordano A M, Virgilio R. Tifoidea en Chile. Susceptibilidad de Salmonella typhi a cloranfenicol y otras drogas. Rev Latmer Microbiol 1986; 28:15-22.
- 12.- Foster T. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiological 1983; 47 (3): 361-409.
- 13.- Frenkel L, Bremer H. Increased amplification of plasmids pBR 322 and pBR 327 by low concentrations of chloranphenicol. DNA Plasmid and amplification 1986; 5 (6): 539-544.
- 14.- Gast R, Stephens J. In vivo transfer of antibiotic resistance to strain of Salmonella arizonae. Poultry Science 1985; 65: 270-279.
- 15.- Golstein F, Chumpitaz J, Guevara J y col. Plasmid-mediated resistance to infections diseases 1986; 153 (2): 261-266.
- 16.- González C, Becerril P, Mendoza P, Bessudo D. Serotipos de Salmonelas identificados en México entre 1974-1981. Bol Of San Panm 1985; 99 (1): 34-39.
- 17.- González V Y. Determinación de sensibilidad y resistencia de Salmonella enteritidis a agentes antimicrobianos. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, México, 1989. (en elaboración).
- 18.- Gotuzzo E, Morris G, Benavente L y col. Association between specific plasmids and relapse in typhoid fever. J Clin Microbiol 1987; 25 (9): 1779-1781.
- 19.- Gulig R, Curtiss III R. Plasmid associated virulence of Salmonella typhimurium. Infect Immun 1987; 55 (12): 2891-2901.
- 20.- Hadfield T, Moson M, Wachsmuth I. An outbreak of antibiotic resistant Salmonella enteritidis in Liberia, west Africa. J Infect

Dis 1985; 151 (5): 790-795.

21.- Hardy K. Bacterial plasmids. Switzerland: Series Editors, 1981: 1-79.

22.- Kado C I, Lui S T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; (3):1365-1373.

23.- Krieg N, Holt J. Bergey's manual of sistematic bacteriology. U.S.A.: Williams and Wilking, 1984: Vol. 1: 414-416.

24.- Koneman E. Diagnóstico microbiológico. México: Medica Panamericana, 1985: 152-185.

25.- Kupersztoch Y. Antibiotic resistance of gram negative bacteria in México; relationship to drug consumption. Molecular Biology Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids; Edited by Stuart B, et. al. Plenum Publishing Corporation 1981; 529-537.

26.- Kupersztoch Y. Resistencia a antibioticos en cepas de Salmonella y Shigella. México: Publicación Interna. Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del I.P.N. 1978: 1-4.

27.- Kumate J. Salmonelosis. En: Torregosa F L, Olarte J. Enfermedades diarreicas en el niño. 9a. Edición. México: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 1988: 171-182.

28.- Le Minor L. Salmonella. En: Krieg N, Holt G J. Bergey's manual of sistematic bacteriology. U.S.A.: Williams and Wilkings 1984: Vol. 1: 427-458.

29.- Le Minor L. The genus Salmonella. En: Starr M. P. The prokaryotes: a handbook, isolation and identification of bacteria. U.S.A.: Springer Verlag Berlin, 1981: vol. 2: 1148-1158.

30.- Lennette E. H. Manual of clinical microbiology. 3a. ed.

- Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1980: 495-496.
- 31.- Ling J, Chau P. Incidence of plasmids in multiply-resistant Salmonella isolates from diarrhoeal patients in Hong Kong from 1973-1982. Epidem Inf 1987;99: 307-321.
- 32.- Ling J, Chau . Salmonella serotypes and incidence of multiply-resistant Salmonella isolated from patients in Hong Kong from 1973-1982. Epidem Inf 1987;99: 295-306.
- 33.- MacFadin J F. Biochemical test for identification of medical bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976.
- 34.- Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 86-93; 150-164.
- 35.- Martínez-Salazar J, Alvarez G, Gómez-Eichelman C. frequency of four classes of tetracycline resistance determinants in Salmonella and Shigella clinical isolated. Antimicrob Agents and Chemother 1986; 30 (4): 630-631.
- 36.- Meadow W, Schneider H, Been M. Salmonella enteritidis bacteremia in childhood. J Infect Dis 1985; 152 (1): 185-189.
- 37.- Mendoza H P. Estado actual de la salmonelosis en México. Publicación Interna del Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la S.S.A. México 1978; 83-90.
- 38.- Miller J. H. Experiments in molecular genetics. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972: 224-226.
- 39.- Nakamura M. Possible relationship of a 36-megadalton Salmonella enteritidis plasmid to virulance in mice. Infect Immun 1985; 47 (3): 831-833.

- 40.- Nakamura M, Soto S, Ohya T, Suzuki S, Ikeda S. Plasmid profile analysis in epidemiological studies of animal Salmonella typhimurium infection in Japan. J Clin Microbiol 1986; 23: 360-365.
- 41.- Nastasi M R, Villafuerte C, Mammina F y col. Molecular relationship among Salmonella dublin isolates identified at the center for Enterobacteriaceae of Palermo during the years 1971-1985. Epidem Inf 1987; 22: 283-290.
- 42.- Novick R. Plasmids. Scientific American 1980; 243 (6): 47-59.
- 43.- Olsvik O, Sorum H, Birkness K y col. Plasmid characterization of Salmonella typhimurium transmitted from animals to humans. J Clin Microbiol 1985; 22 (3): 336-338.
- 44.- Parrilla C, Saldade O, Nicoli M. Incidencia de Salmonella en productos cárneos. Salud Pública de México 1978; 20 (5): 569-574.
- 45.- Platt J, Brown J, Munro D. The distribution of plasmids among a representative collection of Scottish strains of Salmonella. J Hyg Camb 1986; 27: 199-204.
- 46.- Pérez I, Hernández A. Susceptibilidad de Salmonella y Shigella a los antimicrobianos en el Hospital Infantil de México 1979-1980. Bol Med Hosp Infant Mex 1985; 42 (8): 448-493.
- 47.- Que U J, Hentges J D. Effect of streptomycin administration on colonization resistance to Salmonella typhimurium in mice. Infect Immun 1985; 48 (1): 169-174.
- 48.- Sanchez L R. Prevalencia de portadores de Salmonella y Shigella en manipuladores de alimentos. Salud Pública de México 1981; 23 (4): 353-364.
- 49.- Shlaes D M, Medeiros A, Kron M y col. Novel plasmid-mediated B-lactamase in members of the family Enterobacteriaceae from Ohio.

Antimicrob Agents Chemother 1986; 30 (2): 220-224.

50.- Solorzano F, Leaños B, Guiscafre H. Resistencia antimicrobiana actual de Salmonella typhi, Salmonella enteritidis y Shigella sp. Bol Med Hosp Infant Mex 1987; 44 (8): 448-455.

51.- Spika S. J. Choramphenicol-resistant Salmonella newport traced through hamburger to diary farms. N Engl J Med 1987; 316 (10): 565-569.

52.- Starr M. P. The prokaryotes: a handbook on habitats isolation and identification of bacteria. U. S. A: Spring Verlag, 1981: vol. 2: 1114-1115.

53.- Takahashi S, Nagan Y. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J Clin Microbiol 1984; 20 (4): 608-613.

54.- Taylor D, Chumpitaz J, Goldstein F. Variability of Ins II plasmids from Salmonella typhi with special reference to peruvian plasmids encoding resistance to trimethoprim and other antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1985; 25 (3): 452-455.

55.- Thron G. Medicina interna de Harrison. Prensa Medica Mexicana, 1979; vol. 1: 983-992.

56.- Torrey S, Fleisher G, Jaffe D. Incidence of Salmonella bacteremia in infantis with Salmonella gastroenteritis. J Pediatr 1986; 108 (5): 718-721.

57.- Vandenbosch J, Rabert D, Jones G. Plasmid asociated resistance of Salmonella typhimurium to complement activated by classical pathway. Infect Immun 1987; 55 (11): 2645-2652.

58.- Viscaya A, Rodriguez M. Investigación de los tipos de Salmonella encontrados en las aguas negras de la zona metropolitana

de la ciudad de Monterrey, N. L. Salud Pública de México 1979; 21  
(5): 527-532.

59.- Yamamoto L, Asthon M. Salmonella infection in infants in  
Hawaii. Pediatr Infect Dis J 1988; 7 (1): 48-54.