

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



FRECUENCIA DE FACTORES DE RESISTENCIA
A ANTIBIOTICOS EN LA CIUDAD DE MEXICO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

THELMA CASTELLANOS CERVANTES

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1978

NO. M 85 82
ECHA _____
PDC _____
E _____



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: PROFR. OSCAR AMOR DODERO.
VOCAL: PROFRA. LEONOR MARTINEZ SOTO.
SECRETARIO: PROFR. GERARDO KONO YAIKO.
1er. SUPLENTE: PROFRA. LILLIA VIerna GARCIA.
2o. SUPLENTE: PROFRA. ELDA PENICHE QUINTANA.

SITIO DONDE SE DESARROLIO EL TEMA:

Departamento de Biotecnología del Instituto de
Investigaciones Biomédicas, UNAM.

SUSTENTANTE:

THELMA CASTELLANOS CERVANTES

ASESOR DEL TEMA:

PROFR. GERARDO KONO YAIKO

SUPERVISOR TECNICO:

DR. JAIME MARTUSCELLI

A MI MADRE POR SU APOYO

A LA MEMORIA DE MI PADRE

Mi agradecimiento al Dr. Gerardo Kono por su asesoría y colaboración en el desarrollo del presente estudio.

Agradezco al Dr. Jaime Martuscelli la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio así como su colaboración.

Mi sincero reconocimiento al QBP Jose Luis Ramirez por su cooperación.

C O N T E N I D O

	Pag.
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
CAPITULO II: GENERALIDADES	4
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	19
CAPITULO IV: RESULTADOS	31
CAPITULO V: CONCLUSIONES	48
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFIA	52

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N .

Desde la epidemia de fiebre tifoidea que se presentó en nuestro país en 1972-1973 y el hecho de la cada vez más frecuente dificultad que se tiene en el tratamiento de las enfermedades causadas por enterobacterias, se ha hecho evidente la importancia que tienen los factores de resistencia a los antibióticos.

La cepa que ocasionó la epidemia presentó resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y sulfas, comprobándose posteriormente que el responsable de esta multiresistencia era un plásmido.

Los antibióticos y otros agentes terapéuticos, que en gran número han sido introducidos al mercado durante las tres últimas décadas han presentado numerosos efectos los cuales son directamente responsables de la actual situación epidemiológica(17).

Esto indica que el uso inadecuado de los antibioticos puede conducir a graves consecuencias debido a que cepas con plasmidos que les confieran resistencia a los antibioticos pueden causar un número alarmante de infecciones serias dentro y fuera de hospitales, lo que lo convierte en un problema de salud pública y subraya por tanto la importancia de realizar más estudios al respecto en México.

Algunos trabajos que se han realizado con respecto a epidemias anteriores a la de 1972 tanto en nuestro país como en varios países centroamericanos, muestran que la cepa responsable de la epidemia es resistente a antibioticos por medio de un plasmido (14,15,32,41,43,45) y que es cada vez más difícil controlar los brotes de epidemias.

Este problema no es solo de nuestro país ni exclusivo de hospitales como lo demuestra la literatura con numerosos reportes de trabajos realizados en aguas de albañal tanto en drenaje domestico como de hospitales, encontrandose mayor porcentaje de bacterias resistentes en hospitales, aunque el porcentaje en aguas domesticas es bastante significativas (20,29). Así como estudios de Escherichia coli con factores de resistencia, en aguas de rios y aguas de costas britanicas en donde se encontraron gran cantidad de bacterias resistentes (57,58). También se ha examinado la flora de coliformes intestinales en adultos y niños de comunidades urbanas y rurales para observar la resistencia a antibioticos y su trasmisibilidad, observandose mayor cantidad de bacterias resistentes en muestras de niños y en comunidades rurales (28). Además en comunidades animales también se ha estudiado la frecuencia de bacterias resistentes y

nos muestra que por su alta incidencia, se tiene un problema grave también con los animales (30,49). Se ha comparado también la cantidad de bacterias resistentes en países desarrollados y subdesarrollados, siendo más baja la incidencia de resistencia en el país subdesarrollado (7).

En todos estos trabajos se ha encontrado gran cantidad de bacterias resistentes a antibióticos y en realidad son diferentes los factores que influyen para el aumento y disminución de los resultados mencionados.

Por tanto interesados en conocer la frecuencia de estos plásmidos así como el tipo de enterobacterias que lo portan y que porcentaje de estas bacterias portadoras de plásmidos transfieren a E.coli su resistencia por conjugación, se realizó el presente estudio en aguas de albañal de la ciudad de México - provenientes tanto de hospitales como de diferentes zonas urbanas.

CAPITULO II

GENERALIDADES.

Dentro de la Genética bacteriana y a partir de la descripción de las primeras bacterias resistentes a antibióticos encontradas por Watanabe, se han hecho numerosos estudios para determinar la causa de esas resistencias y se ha llegado a la conclusión de que la mayor parte de estas resistencias es debido a un tipo particular de información genética determinada por moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) no codificado por el cromosoma bacteriano. A este tipo de elementos genéticos extracromosomales se les ha denominado " plasmidos " (26). Algunos plasmidos que son capaces de integrarse al cromosoma bacteriano recibieron el nombre de "epi somas" (24,6). Actualmente a estos elementos genéticos extracromosomales se les ha denominado con el nombre genérico de " plasmidos " (37).

Las más importantes características de los plasmidos son las siguientes:

- a) Un plasmido es un elemento extracromosomal.
- b) No es necesario para la célula.
- c) Puede ser adquirido por conjugación celular.
- d) Puede reproducirse autonomamente.
- e) Puede reproducirse integrado al cromosoma de la bacteria (6,37).

PLASMIDOS.

Entre los plasmidos más conocidos tenemos los siguientes:

FACTORES SEXUALES; se consideran los mediadores de la transferencia cromosómica por medio del mecanismo de conjugación, los más ampliamente estudiados los constituyen el factor F, el cual se encuentra en E.coli K12 y el factor I.

La presencia del factor F, es reconocida por dos efectos. Primero; la célula se convierte en un donador genético y segundo, produce un filamento especial que por él mismo no es importante en motilidad y ha sido clasificado dentro de los apéndices con el nombre de " fimbrias " o pelos (pili) que tiene sitios receptores para ciertos fagos. Actualmente parece que este pilus F es detectable por la aparición de un nuevo antígeno (35). Tanto en células F como en células Hfr.

El factor I es un plasmido que también codifica para la síntesis de un pilus pero en este caso de pili I, que tiene también sitios receptores para fagos específicos.

Existen dos diferencias fundamentales entre estos dos factores; la frecuencia de transferencia y el pilus sexual.

FACTORES Col; existe gran cantidad de estos factores que transportan genes que llevan información a sus huéspedes para producir colicinas, toxinas letales para las bacterias coliformes (37).

Los factores col también son transmisibles y contienen factores sexuales, entre otros tenemos Col V-K30; ColV-K94 (existen también factores Col productores de colicinas I como ColV,I-K94); ColV,B-K260; ColB-K77; ColB-K98; ColIb p9 (así como 20 factores similares extraídos de S.typhimurium). ColIa-CA53; ColEla; ColEl-K30, transmisible en S.typhimurium pero no en E.coli; y una gran variedad extraídos de enterobacterias que producen colicinas B, E, I, K y V. Los factores ColV K30, ColV-K94 y ColV, B-K260 tienen características de factor F eso podría resultar de una asociación entre factor F y determinantes de colicinas, apareados solo superficialmente y así parecer factores sexuales de una clase diferente (35).

Los tres tipos de plásmidos antes mencionados (factor F factor I y algunos factores Col) son conjugativos, es decir que son plásmidos que pueden transferir ADN por conjugación como ejemplos tenemos; plásmido F de E.coli; el ColIb, V, plásmido B y muchos de los plásmidos R de bacterias gram-negativas (37).

También existen plásmidos no conjugativos es decir que no promueven la conjugación, en realidad el término es usado cuando la conjugación no ocurre naturalmente.

FACTORES DE RESISTENCIA (R); estos factores transportan genes que le confieren a la célula huésped resistencia a diferentes agentes antibacterianos (37). Las bacterias que transportan estos factores se denominan bacterias R⁺.

Un solo plasmido puede transferir genes para la resistencia a la estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina y las sulfonamidas. En algunos casos ha sido posible disociar el factor R en diferentes partículas más pequeñas; a) un elemento denominado factor de transferencia de resistencia (RTF), que transporta a los genes que gobiernan los procesos de transferencia celular. b) elementos separados, llamados determinantes r, los cuales transportan los genes de resistencia.

PLASMIDOS DE LOS Staphylococcus; estos plasmidos transportan un gen que origina que la célula bacteriana produzca una penicilinasasa potente, haciéndola por lo tanto resistente a la penicilina. Difiere del factor R en que no son capaces de transferirse por conjugación, sin embargo puede ser transportado de célula a célula por transducción mediada por fagos (47).

En la figura I se muestra una clasificación de plasmidos de S.aureus.

En la figura II se observa la clasificación de plasmidos aislados de enterobacterias.

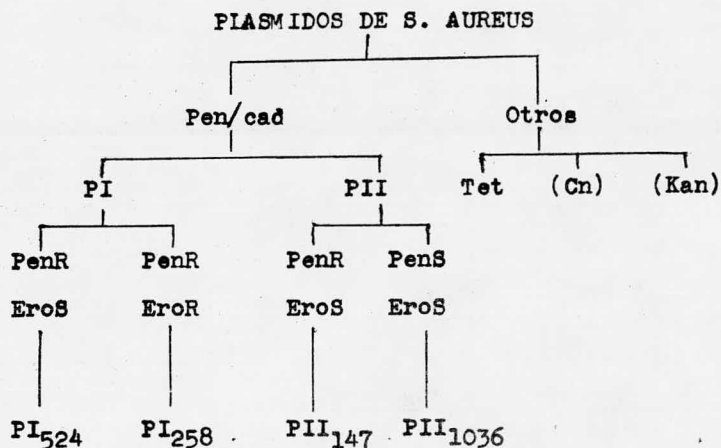


FIGURA I. Clasificación de plásmidos aislados de S.aureus. Pen/cad pertenecientes a la serie de plásmidos de peso homogéneo denominados penicilinasas, porque la producción de penicilinasas es una característica de estos plásmidos, otra característica de estos plásmidos es la resistencia al cadmio. PI y PII representan las dos incompatibilidades fijadas, lo cual es una subdivisión más, hecha sobre la resistencia a penicilina y eritromicina (Ero). Otros plásmidos acarrean resistencia a otros antibióticos como tetraciclina (Tet), cloranfenicol (Cn) y kanamicina (Kan). La nomenclatura es de acuerdo a Peyru 1969.

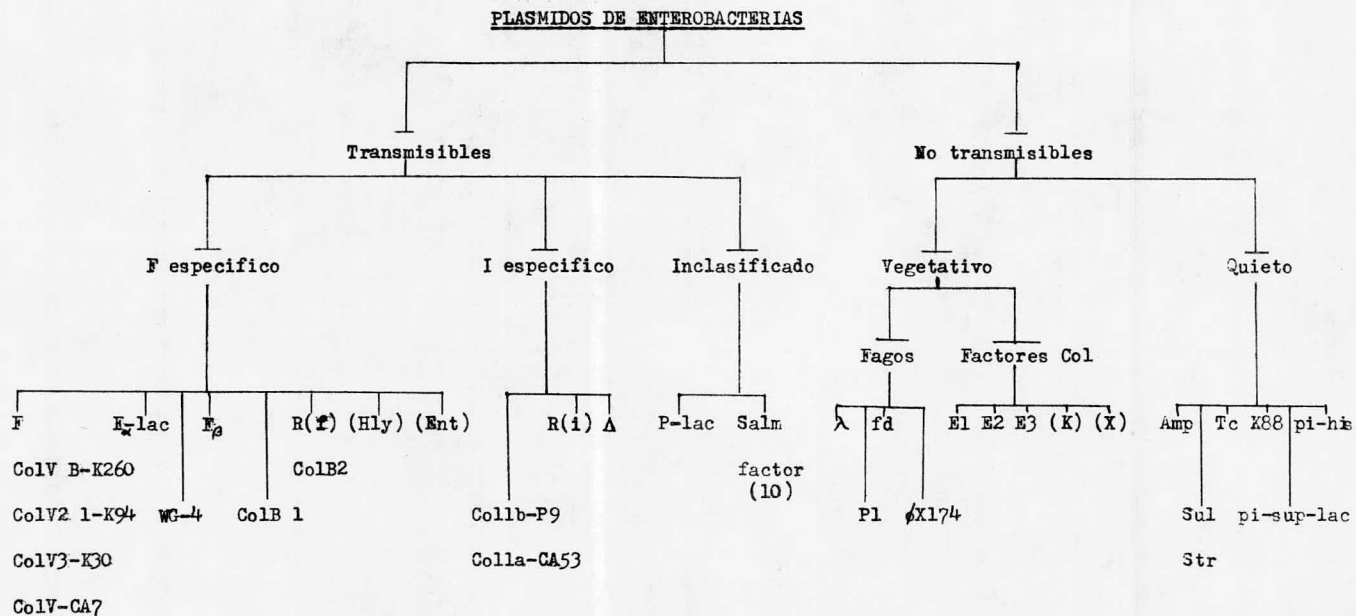


FIGURA II. Clasificación de plasmidos aislados de enterobacterias. Este esquema es una ampliación de el de Meynell.

ESTRUCTURA MOLECULAR.

Numerosos estudios se han realizado para detectar y aislar el ADN de los plásmidos para demostrar así su carácter autónomo con respecto al ADN del cromosoma bacterial. Reportes recientes han demostrado que la estructura de estas moléculas de ADN son circulares, unas cerradas covalentemente en sus dos cadenas y con una estructura o configuración superenrollada, y otras con una cadena sellada covalentemente y otra abierta (9,21). Esto se muestra en la figura III. Freifelder y colaboradores muestran grandes evidencias de que los plásmidos se cierran covalentemente (18).

Identificación; La molécula de ADN superenrollada del plásmido se puede identificar como un "satélite" en una centrifugación por su coeficiente de sedimentación debido esto a que por sus características de superenrollada es compacta y por lo tanto sedimenta más rápidamente (9,38,47). Para separarlo del ADN cromosomal se lleva a cabo una intercalación que hace disminuir su densidad de flotación o también por medio de una desnaturalización alcalina reversible (9,38).

Esto se puede observar en la figura III donde se esquematiza la estructura de las moléculas de ADN en condiciones neutras y alcalinas observándose también los diferentes coeficientes de sedimentación.

La determinación del peso molecular se puede hacer por análisis de sedimentación o por microscopía electrónica. En la técnica de sedimentación se utilizan gradientes neutros de sacarosa y se mide la proporción del coeficiente de sedimentación.

FIGURA III

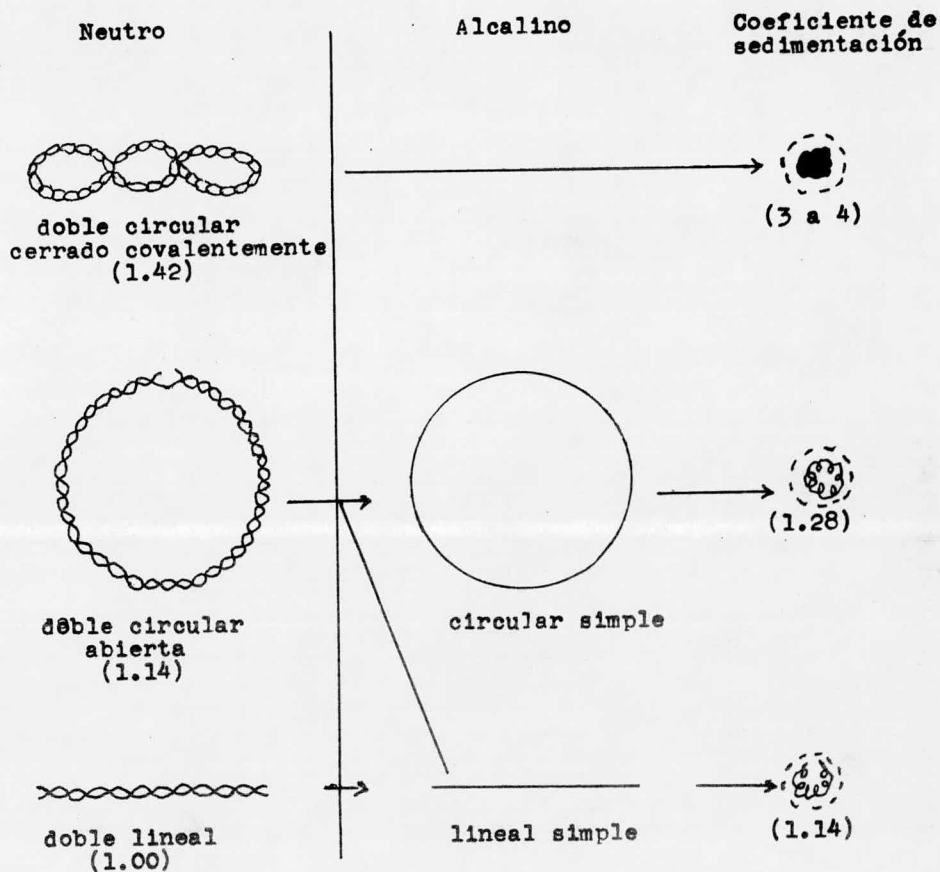


Diagrama representativo de las diferentes configuraciones de moléculas de ADN. Mostrando el coeficiente de sedimentación relativo de las diferentes moléculas de ADN en un gradiente de sacarosa neutro y alcalino.

Se ha observado que la estructura superenrollada se pier de por radiaciones X (9).

INCOMPATIBILIDAD.

Se entiende por incompatibilidad a la incapacidad de dos plasmidos diferentes a coexistir en una misma célula huésped (37). Se cree que este fenómeno refleja una competencia por un sitio específico en la membrana celular. Esto se basa en la hipótesis del replicón (23) la que propone que un plasmido requiere unirse a un sitio específico en la membrana para su duplicación. Por ejemplo E.coli K12 se infiere que transporta un sitio de inserción para F; otros dos sitios uno para cada uno de los dos grupos de factores R y varios sitios adicionales para diferentes factores Col.

AUTODUPLICACION.

Los plasmidos son autoduplicantes; su autoduplicación parece que ocurre por el mismo mecanismo que el cromosoma bacteriano según el modelo de Jacob y Brenner como se observa en la figura IV. El ADN se inserta en un sitio de la membrana específico y las dos replicas son segregadas en células hijas diferentes en el momento de la división celular. En la mayoría de los casos, la autoduplicación de los plasmidos está regulada en forma tal, que solo ocurre una sola vez durante cada ciclo de autoduplicación cromosómica. La autoduplicación de los plasmidos por lo general no es sensible a ser inhibida por agentes tales como los colorantes de acridina y luz ultravioleta.

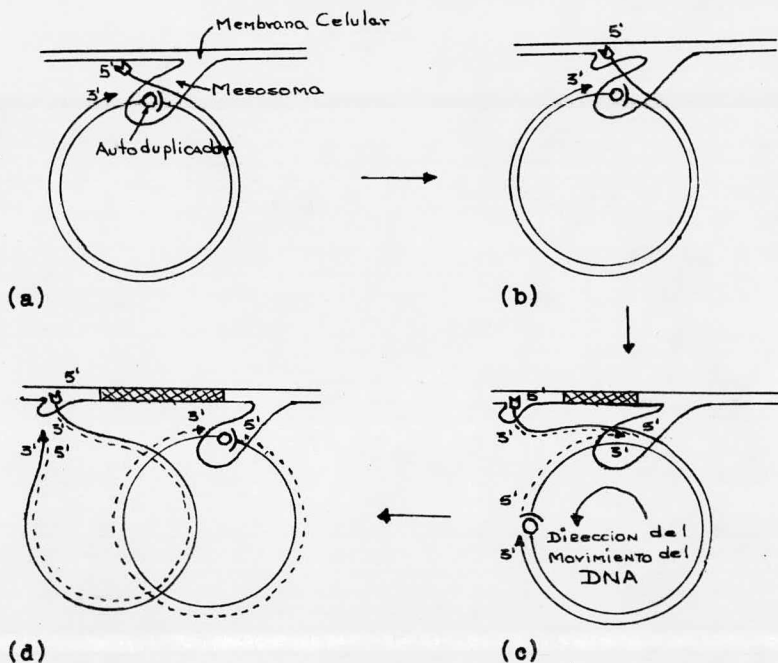


FIGURA IV. Autoduplicación del cromosoma bacteriano según el modelo de Jacob y Brenner. A; el cromosoma está insertado a un mesosoma en el sitio del autoduplicador, el cual sirve como pivote. Uno de los filamentos se encuentra roto. B; la terminal 5' del filamento roto se inserta en un nuevo sitio en la membrana. C; El cromosoma gira en sentido opuesto a las manecillas del reloj pasando el sitio de inserción del mesosoma, en el cual se ha fijado el sistema autoduplicador enzimático. Los filamentos nuevos - recién sintetizados se muestran con líneas interrumpidas. Los sitios de inserción están separados por una síntesis localizada de la membrana (indicada por el área sombreada). D; El ciclo de autoduplicación se ha completado. La fase final consistirá en la unión de las terminales libres de un filamento del cromosoma nuevo (línea continua).

leta. Por medio del empleo de estos agentes a dosis umbral las células pueden " curarse " de sus plásmidos. Parece haber una estrecha relación entre permeabilidad y curación, pero en realidad el fenómeno de curación no ha sido elucidado. Dentro de las sustancias que se ha comprobado curan de plásmidos a las bacterias se encuentran; azul de metileno, acridinas, rifampicinas, novocaina, bromuro de etilo y anaranjado de acridina.

Es necesario aclarar que por el fenómeno de curación el plásmido no se destruye sino que solo está inhibida su replicación, es decir que se hereda solo una cadena y se diluye con el tiempo de la población bacteriana.

Autotransferencia.

Algunos pero no todos los plásmidos que se encuentran en las bacterias gram-negativas pueden llevar a cabo su propia transferencia por el proceso de conjugación (como ya se mencionó al hablar de plásmidos no conjugativos). Por otra parte las bacterias gram-positivas nunca se ha observado que se conjugen.

La transferencia de algunos plásmidos ocurre de la siguiente manera; la conjugación requiere la presencia en una de las bacterias del factor de fecundidad o factor F, la célula que contiene este factor se llama F^+ y se considera como bacteria masculina. Las cepas femeninas no contienen factor F y se designan como F^- . La verdadera conjugación de las dos cepas probablemente se produce por la formación de un puente

entre el pilus codificado por el factor F^+ y los puntos receptores en la cepa F^- . Durante la conjugación el material genético solo pasa de la bacteria F^+ a la F^- , mediante la recombinación del material genético proveniente de ambas cepas. El cromosoma bacteriano circular se abre y se hace lineal para su transferencia a través del puente de conjugación. Como el puente puede romperse en cualquier momento durante la conjugación se pueden transferir pocas o muchas características genéticas según el tiempo que estén unidas las dos bacterias.

El factor de fecundidad de las cepas machos de las bacterias es un agente infeccioso semejante al virus. Durante la conjugación con machos F^+ , muchas de las bacterias hembras se infectan con el factor y se convierten en machos. Sin embargo el agente F , no es un bacteriofago verdadero, debido a que solo se transfiere por contacto entre células, nunca mata a su huésped y nunca se libera en el medio. Ulteriores investigaciones demostraron que las bacterias machos son de dos tipos, según sea la posición del agente F dentro de la célula. En los machos F^+ , el factor se encuentra en el citoplasma y durante la conjugación puede infectar a la hembra o bacteria F^- . El sexo en este caso es realmente un proceso de infección. El otro tipo de bacterias macho se llama "Hfr" (alta frecuencia de recombinación); en este caso el agente F está integrado en el material genético bacteriano. Cuando se integra en el cromosoma, el factor no es infeccioso y aunque se produce la transferencia del material cromosómico más frecuentemente que con los machos F^+ , pocos receptores se convierten en F^+ . La razón de estas diferencias está en que el cromosoma bacteriano

circular se separa, para convertirse en lineal para la transferencia en el punto donde está colocado el factor F, y este es el último lugar genético, que se pasa a través del puente de conjugación. La conjugación raramente dura lo suficiente para que se transfiera todo el cromosoma bacteriano; por esta razón el fragmento que contiene el factor F integrado permanece en el macho Hfr.

Generalidades sobre Enterobacterias.

La familia Enterobacteriaceae se caracteriza porque sus miembros son bacilos cortos gram-negativos, no esporulados, algunos de estos bacilos son móviles por flagelos peritricos. Fermentan a la glucosa con producción de ácido o de ácido y gas. Algunas especies de esta familia atacan a los alginatos o pectinas y con excepción de Erwinieae todos reducen los nitratos a nitritos(12).

Tienen gran importancia porque producen enfermedades gastrointestinales que cada vez revisten mayor importancia por la gran incidencia de estas enfermedades sobre todo en niños. Otros bacilos también son importantes porque sirven de índice de contaminación en análisis de agua, leche etc.

Entre las enfermedades que pueden producir estos bacilos se encuentran; enteritis, peritonitis, cistitis, neumonia, tifoidea, paratifoidea, disenteria bacilar, fiebres entericas y algunas otras molestias.

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

TRIBU I.- Escherichiese

Genero I.- Escherichia

- 1.- Escherichia coli.

Genero II.- Shigella

- 1.- Shigella dysenteriae
- 2.- Shigella flexneri
- 3.- Shigella boydii
- 4.- Shigella sonnei

TRIBU II.- Edwardsielleae

Genero I.- Edwardsiella

- 1.- Edwardsiella turda.

TRIBU III.- Salmonelleae

Genero I.- Salmonella lignieres

- 1.- Salmonella cholerae-suis
- 2.- Salmonella typhi
- 3.- Salmonella enteritidis

Genero II.- Arizona

- 1.- Arizona hinshawi ("y")

Genero III.- Citrobacter

- 1.- Citrobacter freundii

TRIBU IV.- Klebsielleae

Genero I.- Klebsiella

- 1.- Klebsiella pneumoniae
- 2.- Klebsiella ozaenae
- 3.- Klebsiella rhinoschleromatis.

Genero II.- Enterobacter

- 1.- *Enterobacter cloacae*
- 2.- *Enterobacter aerogenes*
- 3.- *Enterobacter hafniae*
- 4.- *Enterobacter liquefaciens*

Genero III.-Pectobacterium

- 1.- *Pectobacterium carotovorum*

Genero IV.- Serratia

- 1.- *Serratia marcescens.*

TRIBU V.- Proteae**Genero I.- Proteus**

- 1.- *Proteus vulgaris*
- 2.- *Proteus mirabilis*
- 3.- *Proteus morganii*
- 4.- *Proteus retgeri*

Genero II.- Providencia

- 1.- *Providencia alcalifaciens*
- 2.- *Providencia stuartii.*

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS.

Las muestras para el presente estudio fueron recolectadas a partir de enero de 1976 a marzo de 1977 en diferentes zonas de la ciudad de México como se muestra en la tabla III.

MUESTREO DE AGUAS DE ALBAÑAL.

Para el muestreo se utilizaron toallas sanitarias que se colocaban en la sisterna principal del drenaje, durante 24hr. La toalla previamente esterilizada y sujeta a un cordón de una longitud apropiada a la profundidad de la sisterna, el objeto de mantenerla durante 24hr. es que reportes anteriores demuestran que es el tiempo adecuado para este tipo de muestreo, ya que la cuenta de bacilos coliformes es constante y el grado de letalidad es bajo (29).

Después de estas 24hr. la muestra es recolectada en reci-

pientes esteriles y llevados inmediatamente al laboratorio para ser procesada.

OBTENCION DE CUENTAS VIABLES.

De las aguas de albañal recolectadas en las toallas sanitarias, se hacen diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} en solución salina al 0.85 %. Un volumen estandar de 0.1 ml. de cada dilución fué inoculado sobre placas de agar Mac Conkey (DIFCO) utilizando como soporte agar Mac conkey blando al 0.6 %.

La investigación fué limitada a bacilos gram negativos fermentadores de lactosa.

Cada una de las diluciones se siembra por duplicado en placas de:

agar Mac conkey sin antibiotico.

agar Mac Conkey	adicionadas con Cloranfenicol	25 Ugr/ml.
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"
"	"	"

Los antibioticos fueron esterilizados por filtro milipor de 0.22 μ m y adicionados al Mac Conkey previamente esterilizado en autoclave a 15 lb. durante 15 minutos y enfriado hasta una temperatura de 48°C.

Una vez sembradas las cajas con cada uno de los antibioticos por duplicado se incuban a 37°C. durante 24hrs. despues de lo cual se procede a contar las colonias de cada placa eliminando aquellas que tengan más de 300 colonias o menos de 30 colonias, obteniendose así las cuentas en los diferentes medios.

T A B L A I

LUGARES DE RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

Lugar	Abreviatura	Fecha
Ciudad Universitaria	CU	26-I-76
Constitución de 1917	VIO	21-III-76
Villa Olímpica	VO	29-III-76
Copilco	CO	7-IV-76
Multi. Miguel Aleman	FMA	4-V-76
Villa Coapa	VCO	2-VI-76
Xochimilco	XOCH	2-VI-76
Polanco	POL	23-VI-76
San Juan de Aragon	SJA	26-VII-76
Multi. Benito Juarez	MBJ	19-VIII-77
Agricola Oriental	AGO	21-VII-76
San Jeronimo	SJ	17-VII-76
Mixcoac	MIX	21-VII-76
Multi. J.F. Kenedy	JFK	21-VII-76
Rastro de Ferreria sección cerdos	RC	8-III-77
Rastro de Ferreria sección pollos	RP	8-III-77
Zoologico de Chapultepec	ZOL	23-VI-76
Zoologico de San Juan de Aragon	ZSJA	26-VII-76

Lugar	Abreviatura	Fecha
Hospital 20 de Noviembre.	20 NOV	25-I-77
Pediatría del Centro Médico.	PED	17-I-77
Hospital General del centro médico la Raza.	GRAL	1-VII-76 9-VII-76
Hospital de Infectología del centro médico la Raza.	INF	29-VI-76
Hospital general e infectología del centro médico la Raza.	INF GRAL	29-VI-76 9-VII-76
Ginecología No 1 (IMSS).	GIN 1	7-II-77
Hospital Floresta.	HF	13-I-77 19-I-77
Hospital General. (SSA)	HG	21-II-77
Infectología del hospital General de S.S.A.	IHG	14-II-77
Hospital Adolfo Lopez Mateos.	HIM	31-VII-76 31-VII-76 30-IX-76
Instituto Nacional de Neurología.	INN	8-IV-76

SELECCION DE COLONIAS BACTERIANAS.

Se seleccionaron 50 colonias de cada lote de cajas y se siembran por la técnica de parche en el mismo medio, para lo cual se utilizan palillos esteriles, luego se incuban a 37°C. durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo las colonias se replican por la técnica del terciopelo en cajas de agar Mac Conkey sin antibiotico y en cajas con cada uno de los antibioticos, se incuban a 37°C. durante 24 hrs.

De el crecimiento obtenido procedemos a separar las colonias resistentes a 1, 2, 3, ó 4 antibioticos así como las multisensibles.

PURIFICACION DE CEPAS.

Esto se hace con el fin de comprobar que una sola cepa es la portadora de la resistencia ya sea a 1, 2, 3 ó 4 antibioticos y no se trata de dos cepas juntas, por lo que se procede a reaislar o purificar segun el siguiente protocolo:

En placas de acrilico con oradaciones de 2.5 cm. de profundidad se agregan dos gotas de caldo luria y se suspenden ahí las bacterias durante 2 hrs. después de las cuales se reaislan en placas de agar Mac Conkey sin antibiotico y se incuban a 37°C. durante 24 hrs. Del crecimiento obtenido se seleccionan de cada muestra dos colonias y se siembran por parche en una placa del mismo medio sin antibiotico y se incuba a 37°C. durante 24 hrs.

Ya desarrollados los parches se replican por la técnica del terciopelo en cajas de agar Mac Conkey adicionadas de cada uno de los antibioticos, incubar a 37°C. durante 24 hrs. y comparar con el patron de resistencia que presentaban en las replicas anteriores, comprobando de esta manera que la resistencia a uno o varios antibioticos pertenece a una sola cepa bacteriana.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS.

La identificación de las bacterias se llevó a cabo con pruebas bioquímicas y la tipificación se hizo por pruebas serologicas es decir por reacciones de aglutinación con los sueros específicos.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Producción de Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citratos de Simmons, sulfuro de hidrogeno, ureasa, movilidad, licuefacción de la gelatina, descarboxilación de la lisina, desaminación de fenil-alanina, malonato, glucosa, lactosa, sacarosa, manitol (12,13).

En la tabla II se observa la diferenciación por pruebas bioquímicas de las Enterobacterias.

Para las pruebas serologicas que se hicieron para la tipificación se utilizaron antisueros polivalentes para identificar E. coli patogena.

DIFERENCIACION DE ENTEROBACTERIACEAS POR PRUEBAS BIOQUIMICAS¹

PRUEBA o SUBSTRATO	Escherichiae		Edward-siellae		Salmonellae				Klebsiellae					Proteus					Providencia						
	Eche- richia	Shig- ella	Edward- siella	Salmo- nella	Arizona	Citro- bacter	Kleb- siella	Klebsi- ella	cloacae	aero- genes	Enterobacter		liquifaciens		Seri- ratia	Pectobac- terium 25C	vul- garis	mira- bilis	mor- ganii	retzi- geri	alkali- faciens	stuartii			
											hafniae	37C	22C	37C									22C		
Indol	+	o+	+	-	-	-	-	o+	-	-	-	-	-	-	-	o+	+	-	-	-	+	+	+	+	
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato de Simmons	-	-	-	d	-	-	+	+	+	+	(+)o	n	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Sulfuro de hidrógeno (TSI)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	g ²	+	+	+	+	-	d	d	d ²	d ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KCN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina (22C)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)o	o(+)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxilasa de Lisina	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dihidrolasa de arginina	d	-o(+)	-	(+)o+	+	(+)d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decarboxilasa de ornitina	d	d(1)	+	+	+	d	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diaminasa de fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas de glucosa	+	-(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	(1)	-	-	d	d	+	+	+	+	o(+)	o(+)	d	(+)	o(+)	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	d	-(1)	-	-	d	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d
Manitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	d	d	-	d(2)	-	d	-o+	-o+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	d	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	d	-	+(2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	d	d	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1) Ciertos biotipos de *S. flexneri* producen gas; los cultivos de *S. sonnei* fermentan lentamente lactosa y sucrosa, y decarboxilan ornitina.
 2) *S. typhi*, *S. cholerae-suis*, *S. enteritidis* biotipo Paratyphi A y Pullorum, y otros pocos no fermentan rápidamente el dulcitol. *S. cholerae-suis*, no fermentan la arabinosa.
 3) El volumen de gas producido por cultivos de *Serratia*, *Proteus* y *Providencia* es pequeño.
 +, 90 por ciento o más, positivos en 1 o 2 días. -, 90 por ciento o más, negativos. d, tipos bioquímicos diferentes, (+, +), -. (+), positivo demorado.
 Nota: Ver "Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Methods" (NCDC Publication, 1968) para datos adicionales, pruebas y bibliografía.
 Ewing, Biochemical Reactions Given by Enterobacteriaceae in Commonly Used Test. Enteric Bacteriology Laboratories, DHEW-HSMHA-NCDC, Atlanta, Ga. 30333, Octubre 1969. Reproducido con autorización del autor.

MEDIOS DE CULTIVO.

Para llevar a cabo las pruebas bioquímicas se utilizó el siguiente material:

Agar base Mac Conkey (DIFCO)
 Agar citrato de Simmons (MERCK)
 Agar Kligler y fierro (DIFCO)
 Bacto MR-VP (DIFCO)
 Base de caldo rojo de fenol (DIFCO)
 Caldo sacarosa rojo de fenol (DIFCO)
 Extracto de carne (DIFCO)
 Gelatina nutritiva (EBL)
 Malonato fenil-alanina (MERCK)
 Medio manitol (MERCK)
 Medio SIM (DIFCO)

Medio Mac Conkey:

Peptona Gelysate	17. gr.
Peptona Polypeptone	3. gr.
Lactosa	10. gr.
Sales viliares	5. gr.
Cloruro de sodio	5. gr.
Agar	12. gr.
Rojo neutro pH final 7.4	0.04gr.

Caldo Luria:

Bacto triptona (DIFCO)	10. gr.
Extracto de levadura (DIFCO)	5. gr.
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	10. gr
Agua destilada	1000. ml.
Ajustar con NaOH 2.5N a pH 7.0	

Medio Manitol:

Extracto de carne	1.00 gr.
peptona	10.00 gr.
cloruro de sodio	75.00 gr.
D-manitol	10.00 gr.
Agar	15.00 gr.
Rojo de fenol	0.025gr.

Medio SIM:

Extracto de carne	3.00 gr.
peptona	30.00 gr.
Tiosulfato de sodio	0.025gr.
agar	3.00 gr.

PRUEBAS BIOQUIMICAS.**Producción de Indol. Método de Kovacs.**

Para-dimetilaminobenzaldehido	5.00 gr.
Alcohol amílico o butílico	75.00 ml.
Acido clorhídrico conc.	25.00 ml.

Añadir aproximadamente 1 ml. del reactivo a un cultivo de 24 a 48 hrs. en peptona acuosa, agitar suavemente. El reactivo sube a la superficie y un color rojo cereza indica una prueba positiva para Indol.

Para confirmar la producción de Indol se recomienda también el reactivo de Ehrlich. Agregando 0.5 ml. sobre el medio de SIM, antes de 5 minutos debe aparecer una coloración rosa

en la superficie del medio cuando la reacción es positiva.

PRUEBA DE ROJO DE METILO

Solución de rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.1 gr.
Alcohol etílico (al 95%)	300 ml.
Agua destilada c.b.p.	500 ml.

Añadir 3 gotas de la solución indicadora a 3 ml. de un cultivo de 4 ó 5 días en el medio MR-VP (MR rojo de metilo, VP caldo de Voges-Proskauer). Un color netamente rojo es positivo, un color amarillo es negativo.

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER.

A 3 ml. de cultivo añadir 3 ml. de una solución alcalina de sulfato de cobre. La aparición de un color rojo de eosina después de 30 minutos indica la presencia de acetil metil carbinol.

PRUEBA DE UREASA.

Caldo sacarosa, rojo de fenol	21.0 gr.
Urea	10.0 gr.
Indicador azul de timol	1.0 ml.
Agua destilada	1000 ml.

Disolver por ebullición. Esterilizar en autoclave a 7lb/112°C. durante 10 minutos.

La coloración cambia de rojo a azul si es positiva.

PRUEBA DE DESAMINACION DE FENIL-ALANINA.

Extracto de levadura	3 gr.
l-fenil-alanina (calboichem)	1 gr.
Fosfato disodico (J.T. Backer)	1 gr.
Cloruro de sodio (J.T. Backer)	5 gr.
Agar (DIFCO)	12 gr.
Agua destilada	1000 ml.

Esterilizar en autoclave a 7 lb. durante 10 minutos.

Al cultivo inclinado de agar fenil-alanina se le agrega de 4 a 5 gotas (0.2 ml.) de una solución de Cl_2Fe (cloruro ferrico) al 10 % la presencia de un color verde indica una reacción positiva es decir la presencia de ácido fenil piruvico.

CONJUGACION.

Para las conjugaciones se utilizaron cepas con resistencia a los 4 antibioticos utilizados (Cm, Tc, Sm, y Amp), otra como receptora JM 1456 y como donadora JM 104, con las siguientes características:

E.coli JM 1456 F^- $trip^-$ thy^- lac^- Sm^S Nal^R

E.coli JM 104 Rfi^+ thr^- leu^- Rfi^+ (Sm, Su, Tc, Cm) lac^-

La técnica para llevar a cabo estas conjugaciones fué la siguiente:

En tubos de 13 X 100 mm. se mide 1 ml. de caldo luria en donde se ponen a crecer las cepas problema durante 10 hrs. aproximadamente a $37^\circ C$.

De la cepa JM 1456 se prepara un volumen adecuado (dependiendo de el número de conjugaciones que se vayan a hacer).

En placas oradadas de acrilico de 100 X 25 mm. esteriles se agrega :

0.8 ml. de caldo luria

0.1 ml. de la cepa JM 1456

0.1 ml. de la cepa problema (resistente a Cm,
Tc, Sm, Am).

Testigo No 1._ 0.8 ml. de caldo luria

0.2 ml. de la cepa JM 1456

Testigo No 2._ 0.8 ml. de caldo luria

0.2 ml. de la cepa J.M. 104

Testigo No 3._ 0.8 ml. de caldo luria

0.1 ml. de la cepa JM 1456

0.1 ml. de la cepa JM 104

Incubar a 37°C. durante 14 a 24hrs.

Posteriormente pasar a cajas con agar luria Nalidixico preparadas de la siguiente manera:

500 ml. de caldo luria

10 gr. de agar

Esterilizar en autoclave a 15 lb. durante 20 minutos y posteriormente agregar por cada 500 ml. de medio 10 ml. de una solución al 0.50% de ácido nalidixico, agregado al medio por medio de filtro milipor.

ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS.

Las cepas ya clasificadas y con su patron de resistencia se guardan por picadura en tubos de 13 X 100 mm. en el medio de cultivo NB (medio nutritivo) preparado de la siguiente manera:

Caldo nutritivo 20.0gr.

Cloruro de sodio 8.5gr.

Agua desionizada 1000.0ml.

Para solidificar añadir 600 mg. de agar por litro, esterilizar en autoclave a 15 lb. durante 20 minutos.

A los tubos se les pone tapones de corcho que se sellan con una combinación de parafina y vacelina (50 % de cada una).

CAPITULO IV

RESULTADOS.

Los datos obtenidos son indicativos del problema que los factores R causan en la terapeutica médica y representa un problema relacionado con la salud pública como lo demuestran numerosos reportes tanto de evidencias experimentales como de datos epidemiológicos que sugieren una estrecha relación entre la flora bacteriana portadora de plasmidos R y la diseminación de estos factores en las poblaciones humanas.

Uno de los objetivos de este trabajo fué comparar la cantidad de enterobacterias con plasmido R provenientes tanto de hospitales como de colonias urbanas. Los resultados obtenidos de las cuentas porcentuales de hospitales tabla III comparados con las cuentas porcentuales de colonias urbanas tabla IV se puede observar que el mayor porcentaje de bacterias resistentes corresponde a los hospitales con el 60.2 % de bacterias

resistentes por lo menos a un antibiotico y 39.5 % de bacterias sensibles a los 4 antibioticos probados, en comparación con 43.6 % de bacterias resistentes y 56.4 % de bacterias sensibles a los 4 antibioticos usados, correspondientes a las muestras de colonias urbanas.

También el porcentaje de bacterias resistentes a los 4 antibioticos probados es mayor en hospitales y menor en las colonias como se puede observar en las últimas columnas de las dos tablas.

De la tabla V que representa las cuentas porcentuales del total de las 34 muestras analizadas se puede concluir que un porcentaje del 58.8% es resistente por lo menos a un antibiotico y el 41.2% es sensible a los 4 antibioticos probados; como se puede observar casi el 60 % es resistente a antibioticos, por lo menos a uno y poco más del 40 % es sensible a los antibioticos usados que aunque es poco comparado con el porcentaje de resistencia es una cantidad importante que nos demuestra que los marcadores de resistencia a antibioticos no es una característica obligada de las enterobacterias.

Una observación interesante fué que la resistencia a Cm unicamente, es muy baja, generalmente va asociada con resistencia a otros antibioticos, esto se observa en las tablas III IV y V. Y nos da un indicio de que la resistencia a Cm unida a otras resistencias es debido a un plasmido, a diferencia de lo que ocurre con la resistencia unicamente a Amp que es bastante alta lo cual podría sugerir que esta resistencia es cromosomal y no debida a un plasmido.

T A B L A I I I

CUENTAS PORCENTUALES DE 15 MUESTRAS DE HOSPITALES.

	sin	1	2	3	4
	antibiotico	antibiotico	antibioticos	antibioticos	antibioticos
-	79.5	22.9	12.9	10.8	13.9
Gm	-	0.5	4.9	17.3	77.3
Tc	-	5.9	12.5	33.2	48.4
Sm	-	5.8	33.2	31	30
Amp	-	31.5	17.6	21.7	29.6

T A B L A I V

CUENTAS PORCENTUALES DE 16 MUESTRAS DE COCINAS.

	sin	1	2	3	4
	antibiotico	antibiotico	antibioticos	antibioticos	antibioticos
-	56.4	26.6	8.3	6.1	2.6
Cm	-	0.7	8.2	26.7	64.4
Tc	-	14.2	27.2	31.7	26.9
Sm	-	21.5	33.8	23.6	21.1
Amp	-	40.1	11.9	24.2	23.8

T A B I A V

CUENTAS PORCENTUALES TOTALES DE LAS 34 MUESTRAS.

	sin	1	2	3	4
	antibiotico	antibiotico	antibioticos	antibioticos	antibioticos
-	41.2	23.5	18.6	12.6	4.1
Cm	-	0.6	6.6	36.8	56
Tc	-	8.5	28	35.9	27.6
Sm	-	9.1	41.4	28.1	21.4
Amp	-	26.7	12.3	34.3	26.7

CUENTAS PORCENTUALES DEL RASTRO DE FERRERIA.

Las bacterias de origen animal de este estudio fueron aisladas del rastro de ferrería de la sección de pollos y de la sección de cerdos. En las tablas VI y VII se describen los resultados obtenidos y como se puede observar en la tabla VI que corresponde a la sección de pollos solo el 18 % es sensible a los antibioticos probados y el 82 % es resistente por lo menos a un antibiotico lo que resulta bastante alarmante. En la tabla VII el porcentaje de multisensibles es más alto (44 %) y el porcentaje de bacterias resistentes por lo menos a un antibiotico es de 56 % que es más bajo que en la sección de pollos pero sigue siendo una cifra alta.

Los resultados obtenidos sugieren que existe una gran diseminación de bacterias resistentes debido al uso indiscriminado que existe en este medio con respecto al uso de antibioticos en animales con fines preventivos, de tratamiento así como nutricionales y de engorda.

Desafortunadamente no existen reportes sobre la incidencia de plasmidos de resistencia en animales en México, aunque de acuerdo a estudios realizados en humanos como ya hemos mencionado antes, hay una amplia diseminación de dichos factores , y si el uso de los antibioticos es indiscriminado como habiamos mencionado tanto en unos como en otros, es logico encontrar estos resultados.

T A B L A VI

CUENTAS PORCENTUALES DEL RASTRO DE FERRERIASECCION POLLOS.

	sin	1	2	3	4
	antibiotico	antibiotico	antibioticos	antibioticos	antibioticos
-	18	16	32	34	0
Cm	-	2	6	70	22
To	-	8	42	36	14
Sm	-	4	52	32	12
Amp	-	2	4	64	30

T A B L A VII

CUENTAS PORCENTUALES DEL RASTRO DE FEBRERIASECCION CERDOS.

	sin antibiotico	1 antibiotico	2 antibioticos	3 antibioticos	4 antibioticos
-	44	12	30	10	4
Cm	-	0	6	26	68
Tc	-	6	40	38	16
Sm	-	6	64	20	10
Amp	-	8	10	46	36

Cuentas porcentuales de los zoológicos.

Los resultados de el zoológico de San Juan de Aragón no se presentan porque fueron tan escasas las bacterias que se aislaron en diferentes muestras y no llegaron al 1 % por lo que no se pudieron obtener resultados representativos.

En la tabla VIII se presentan los resultados obtenidos en el zoológico de Chapultepec en donde se muestra que el 48% de bacterias es sensible a 4 antibióticos utilizados en este trabajo y un 52 % es resistente por lo menos a un antibiótico, lo que indica una gran diferencia entre los dos zoológicos.

La diferencia entre los dos zoológicos probablemente sea que en el de Chapultepec asisten muchas personas y al tomar la muestra en el drenaje central, no se podía excluir a las bacterias provenientes de los sanitarios, que no deja de ser alarmante ya que se supone todas esas personas pertenecen a una población sana.

Podría ser probable que esto indicara que en realidad es una insignificante cantidad de bacterias resistentes las que corresponden a los animales del zoológico, ya que además a estos animales no se les da antibióticos con fines de engorda porque no son para consumo humano y por lo tanto no existe selección y en consecuencia aumento de bacterias resistentes, en este tipo de animales.

Lo anterior resulta poco probable pero sin embargo no deja de ser posible.

T A B I A VII

CUENTAS PORCENTUALES DEL SOCIOLOGICO DE CHAPULTEPEC.

	sin antibiotico	1 antibiotico	2 antibioticos	3 antibioticos	4 antibioticos
-	48	40	10	2	0
Cm	-	0	8	44	48
Tc	-	8.2	18.4	40.8	32.6
Sm	-	8	24	34	34
Amp	-	52	18	16	14

PORCENTAJES DE BACTERIAS RESISTENTES.

En la comparación de la tabla IX que corresponde a las muestras de las colonias y la tabla X correspondiente a las muestras de hospitales, se observa nuevamente que existe mayor cantidad de bacterias resistentes en hospitales que en colonias sin dejar estos de ser altos. Otra observación es que al antibiotico que presentan mayor porcentaje de resistencia es a Sm y Amp, y el más bajo corresponde a Cm como ya se había observado anteriormente, así como también que el más alto porcentaje total corresponde a bacterias con resistencia a Amp. Esto se vuelve a observar en la tabla XI en donde se muestra que las bacterias resistentes solo a Amp son las más abundantes. Esta elevada incidencia de enterobacterias Amp^R probablemente se deba al gran uso actual que tiene este antibiotico ya que para las enfermedades diarreicas es el antibiotico de elección a partir de la epidemia de fiebre tifoidea de 1972 en donde se encontró que la cepa responsable era Cm^R y que era el antibiotico de elección en esa época.

En la tabla XI se muestran las posibles combinaciones de resistencias y nos muestra que en la de dos resistencias el más alto porcentaje corresponde a las bacterias con la combinación Tc Sm. De la combinación de tres resistencias las de más alto porcentaje corresponde a las bacterias con la combinación Tc Sm Amp con un total de 1087 cepas y un número mayor 2290 cepas tienen resistencia a los cuatro antibioticos probados, es decir que hay mayor cantidad de cepas resistentes a cuatro o tres antibioticos que a dos ó a un antibiotico.

T A B L A IX

PORCENTAJE DE BACTERIAS RESISTENTES DE 17 MUESTRAS
DE COLONIAS URBANAS.

LUGAR	Cm	Tc	Sm	Amp
CU	9.0%	12.3%	15.3%	21.3%
VIO	5.6	9.6	11.6	12.7
VO	1.5	2.3	12.5	10.7
CO	6.5	16.9	23.9	18.7
PMA	3.6	22.4	22.4	38
VGO	11.2	13	16.1	22.6
XOCH	6.1	14.6	17.3	20.4
POL	2.35	2.55	2.75	21.1
ZOL	2.5	3.7	6.7	15
SJ	4.2	14.5	24.6	12.7
JFK	9.3	15.45	13.18	9.5
BJA	3	8.6	9	11.3
MBJ	4.1	19.1	20.2	28
RP	24.3	54.3	59	11.1
RC	5	8.3	27.9	11.7
AGO	11.5	18.7	10.4	13.3
MIX	12.9	17	22.9	29.4
Promedio subtotal	6.99%	14.9%	18.67%	18.09%

T A B L A X

PORCENTAJE DE BACTERIAS RESISTENTES DE 16 MUESTRAS
DE HOSPITALES.

HOSPITAL	Gm	Tc	Sm	Amp
INN	23.4%	29.7%	57.2%	46.4%
INF	38.4	40	27.2	48.4
INF GRAL	5	18	25.5	45.5
GRAL	7.44	15.3	20.5	37.2
GRAL	10.7	24.2	35.4	52
INF GRAL	9.8	14.9	18.9	47.4
HLM	9	17.9	14.8	19.7
HLM	1.8	13.4	8.7	15.8
HLM	29	49	31	58
HF	20.7	25.9	7.1	11.25
PED	0.87	2.1	2.3	97
HF	5.2	11.3	18.3	7.7
20 NOV	7.5	19.5	15.5	33.9
GIN 1	36.9	43.5	78.8	78
IHG	8.8	17.8	11.6	21
HG	9	16	45	8
Promedio subtotal	13.96%	22.44%	26.1%	39.2%
PROMEDIO TOTAL.	10.47%	18.67%	22.3%	28.6%

T A B L A X I

CUENTAS PORCENTUALES DE LAS COMBINACIONES DE RESISTENCIA.

1 antibiotico	número de bacterias	Porcentaje
Cm	9	0.8 %
Tc	196	16.5 %
Sm	304	25.7 %
Amp	675	57.0 %
2 antibioticos		
Cm Tc	125	10.2 %
Cm Sm	21	1.7 %
Cm Amp	58	4.7 %
Tc Sm	556	45.4 %
Tc Amp	85	7.0 %
Sm Amp	379	31.0 %
3 antibioticos		
Cm Tc Sm	202	12.1 %
Cm Tc Amp	297	17.8 %
Tc Sm Amp	1087	65.1 %
Cm Sm Amp	60	5.0 %
4 antibioticos		
Cm Tc Sm Amp	2290	100.0 %

FRECUENCIA DE GENEROS DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES.

En la tabla XII se indica que el genero de enterobacterias que con más frecuencia obtuvimos y que fue fueron resistentes a los cuatro antibioticos probados fué E.coli y le siguen en porcentaje descendente Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter y finalmente Providencia y Proteus.

CONJUGACIONES.

En la tabla XIII se muestra que la transferencia de la resistencia a Cm fué elevada ya que de un total de 485 cepas multirresistentes más del 50 % transfiere resistencia al Cm, lo cual puede explicar la alta incidencia de bacterias resistentes al Cm en una población bacteriana.

T A B L A X I I

FRECUENCIA DE LOS GENEROS DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES ACm Tc Sm y Amp.

	E, coli	Citrobacter	Enterobacter	Klebsiella	Providencia	Proteus
CU	20					
VIO	6					
VO	18					
CO	15					
VCO	13		2	2		
XOCH	19			1		
POL	12		2	1		
SJ	23					
AGO	1		19			
MIX	19					1
JFK	19					
SJA	22					
MBJ	20					
ZSJA	5					
ZOL	14					
RP	10					
RC	15			1		
INN	12		9	1	1	
GRAI	8		11			
HIM	18		2			
HLM	15	5				
PED	6		1	13		
HF	19			1		
2ONOV	13			7		
GIN 1	11			9		
INF	18		1			
INF-GRAL.	3		7	6		
HG	17			1		
ING	14					
TOTAL	405	5	54	43	1	1
%	79.88%	0.99%	10.65%	8.48%	0.20%	0.20%

T A B L A XIII

CEPAS Cm^r Tc^r Sm^r Amp^r QUE TRANSPIEREN RESISTENCIA A Cn.

Procedencia	número de cepas	si transfieren	no transfieren
CU	20	14	6
VIO	6	3	3
VO	18	8	10
CO	15	8	7
INN	22	8	14
VCO	16	14	2
XOCH	20	17	3
POL	15	12	3
ZOL	13	13	0
INF	19	5	14
INF GRAL	20	12	8
GRAL	18	11	7
SJ	22	4	18
AGO	18	1	17
MIX	18	18	0
JFK	12	12	0
SJA	20	18	2
ZSJA	5	5	0
MBJ	20	7	13
FLM	17	12	5
HLM	17	11	6
PED	20	16	4
HF	20	8	12
20 NOV	19	12	7
GIN I	14	12	2
IHG	14	3	11
HG	18	2	16
RP	13	7	6
RC	16	11	5
TOTAL	485	284	201
%	100 %	58.6 %	41.4 %

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

Durante el presente trabajo se encuentra que las cepas que llevan factores R con resistencia múltiple son más abundantes en las aguas de albañal provenientes de hospitales, además el mayor porcentaje de bacterias encontradas en este estudio corresponde al género E.coli así como también le corresponde el mayor porcentaje de multirresistencia, por lo que las enterobacterias pueden considerarse como un reservorio de multirresistencia. Resultados similares han sido reportados por Grabow y Prozesky (20), Linton (29) y otros investigadores.

Es verdad que la alta incidencia de enterobacterias resistentes en aguas de albañal provenientes de hospitales refleja el uso masivo de antibioticos en los hospitales, sin embargo la prevalencia de enterobacterias antibiotico resis-

tentes en las personas no hospitalizadas, demuestra que no escapan a los efectos selectivos de los antibioticos porque de cualquier manera estas personas no hospitalizadas estan en contacto con ellos, ya sea por tratamiento médico, automedicación (que es un grave problema en nuestro país), o por medio de los alimentos.

Otra observación es que el tratamiento con antibioticos no produce el surgimiento de bacterias R^+ sino solamente su selección. La transferencia de resistencia a Cm es elevada en este estudio, la habilidad de las enterobacterias para transferir resistencia al Cm a la cepa JM 1456 puede explicar la alta incidencia de cepas resistentes al Cm acompañado de otras resistencias. Esto muestra que la exposición a drogas no solo selecciona para transferir resistencia sino también para factores R con más de un determinante de resistencia (20).

Los determinantes de resistencia encontrados en este estudio fueron a los antibioticos de elección y más utilizados por el clínico para combatir infecciones entericas causadas por bacterias gram-negativas, este hecho hace peligrosa la diseminación de estos determinantes ya que traería como consecuencia la ineficiencia en el tratamiento de dichas infecciones y además, como se ha comprobado, la selección de cepas con plasmidos R.

El uso inadecuado de antibioticos incrementa notablemente la diseminación de plasmidos R debido al efecto de presión selectiva que ejerce sobre la población bacteriana. Dicha practica favorece la selección, colonización y mantenimiento de poblaciones de cepas portadoras de factores R. Este efecto se

ha comprobado tanto experimental (25,33) como epidemiológicamente (16,36,39,53).

Como se mencionó anteriormente, están involucrados los antibióticos más efectivos contra infecciones causadas por bacterias gram-negativas. Estos tipos de patrones de resistencia concuerdan significativamente con los reportados en otros países donde se han investigado y donde se han investigado plasmidos R en E.coli y otras enterobacterias del hombre y animales sanos y enfermos (1,31,36, 53,55). Así como los encontrados en México y centroamérica, causando graves problemas con infecciones por Salmonella y Shigella (5, 19,40,42).

Los resultados obtenidos de las muestras del rastro de Ferrería, están de acuerdo con trabajos en los que se ha encontrado que la flora normal de bacterias entericas en animales de granja, está compuesta de una gran cantidad de bacterias resistentes (94,49).

Un estudio en animales de ranchos y granjas pertenecientes a la facultad de medicina veterinaria, con respecto a factores R en E.coli, nos muestra una alta incidencia de estas bacterias con resistencia múltiple a agentes antibióticos. Este estudio nos describe también que la mayor incidencia de cepas multirresistentes se nota en porcinos (57%) y aves (47%) que son las especies que generalmente reciben en su alimentación más dosis de antibióticos como aditivo y además reciben con mayor frecuencia dosis de antibióticos con fines profilácticos (8).

Aunque se carece de datos que muestren la problemática

en el campo es de suponerse que la situación es grave pues como se sabe el uso indiscriminado de antibioticos es una practica común, también dentro de la medicina veterinaria. Esto es de gran importancia ya que se ha demostrado tanto in vivo como in vitro que los plasmidos R pueden ser transferidos de la flora bacteriana de animales a la del hombre (2,16,55).

No obstante los avances de la investigación en la producción de nuevos antibioticos, la introducción al mercado de una gran parte de ellos va seguida a menudo de reportes de una población progresivamente incrementada de bacterias resistentes a dichos medicamentos (10,22,44,48,42,52). Existen reportes de otros países donde se ha implantado un control en el uso de quimioterapeuticos, en los cuales segun estadísticas realizadas ha disminuido el índice de resistencia bacteriana de dichas agentes gracias al empleo más cuidadoso de estos (33, 34,51).

Debe tenerse en cuenta el riesgo adicional de que la posesión de factores R por ciertos patógenos intestinales parece estar relacionada con un incremento de la virulencia de dichas bacterias, esto debido a la asociación de estos plasmidos con otros de caracter ya estudiado como el plasmido Ent. de E. coli enteropatógeno, plasmido que controla la producción de enterotoxina de las cepas que lo poseen (50,56) o bien estar ligados a otros factores de caracter aún no definidos (27,42).

Por todo esto los factores de resistencia a antibioticos revisten una gran importancia y requieren de una mayor y constante investigación en este campo en nuestro país así como de un control en la administración de antibioticos.

B I B L I O G R A F I A.

1. Aden, D.P. 1969. Transferable drug resistance among Enterobacteriaceae isolated from cases of neonatal diarrhea in calves and piglets. App. Microb. 18; 961-964.
2. Aden, D.P. 1971. Transferable drug resistance: Chemical and biological effect on in vivo transfer. Proceedings of the Montana academy of Sciences. 31; 84-95.
3. Anderson, E.S. 1968. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. Ann. Rev. Microb. 22; 131-180.
4. Aranson, A.L. 1975. The use, misuse and abuse of antibacterial agents. Mod. Vet. Pract. 56; 383-389.
5. Calderon, E. 1974. Amoxicillin in the treatment of typhoid fever to chloramphenicol-resistant Salmonella typhi. J. Infect. Dis. 129; 219.
6. Campbell, A.M. Episomes. Ed. Modern Perspectives in Biology. 1969. U.S.A.
7. Chawewan, Koonkhamlert and William D. Sawyer. 1973. Drug-resistant Escherichia coli and Klebsiella-Enterobacter in Healthy adults in Thailand and the effect of antibiotic administration. Antimicrobial agents and Chemotherapy. Vol 4; (No 2) 198-200.
8. Chirino Trejo, J.M. (tesis) Incidencia de factores R en Escherichia coli de la flora intestinal normal de aves, bovinos, ovinos y porcinos sanos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1977.
9. Clowes, R.C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev. 36; 361-405.
10. Davey, R.B., Pittard, J. 1975. Potential for in vivo acquisition of R plasmids by one strain of vibrio cholerae biotype el tor. Antimicrob. Agents Chemother. 8; 111-116.
11. Davies, J.E. and Rownd, R. 1972. Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae. Science. 176; 758-768.
12. Edwards, W.H. Edwing. Identification of Enterobacteriaceae. Ed. Burgess Publishing Company. Third edition. 1972. USA.
13. Ewing, W.H. 1963. Enterobacteriaceae. Biochemical methods for group differentiation. Atlanta Communicable Disease Center.

14. Farrar, W.E. 1972. Interbacterial transfer of R factor in the human intestine: in vivo acquisition of R-factor-mediated kanamycin resistance a multiresistant - strain of Shigella sonnei. J. Infect. Dis. 126; 27-33.
15. Farrar, W.E., and Eidson, M. 1971. R factors in strains of Shigella dysenteriae type I isolated in the western hemisphere during 1969-1970. J. Infect. Dis. 124; 327-329.
16. Fein, D. 1974. Matching of antibiotic resistance patterns of Escherichia coli of form families and their animals. J. Infect. Dis. 130; 274-279.
17. Finland, M., Jones, W.F. and Barnes, M.W. 1959. Occurrence of serious bacterial infections since introduction of anti bacterial agents. J.A.M.A. 170; 2188.
18. Freifelder, D., Folkmanis, A. and Kirchner, I. 1971. Studies on Escherichia coli sex factors; evidence that covalent circles exist within cells and the general problem of isolation of covalent circles. J. Bacteriol. 105; 722-727.
19. Gangarosa, J.E., Bennett, J.V., Wyatt, C., Pierce, F.E., Clarte, J., Mendoza-Hernandez, P., Vazquez, V. and Bessudo, D. 1972. From the center for disease control. J. Infect. Dis. 126; 215-218.
20. Grabow, W. O. K. and Prozesky, O.W. 1973. Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. Antimicrobial agents Chemother. 3; 175-180.
21. Helinski, D.R. 1973. Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R-factors. Ann. Rev. Microbiol. 27; 437-470.
22. Horak, V.R. 1971. Factors of Escherichia coli strain causing urinary tract infections, their types of transfer-factors and differences in their transmissibility to Citrobacter and Salmonella typhimurium recipient strain. Folio Microbiol. 16; 317-322.
23. Jacob, F., Brenner, S., and Cuzin, F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28; 329-348.
24. Jacob, F., and Wollman, E.L. 1958. Les episomes elements genetiques ajoutes. C.R. Acad. Sci. Paris. 247; 154-156.
25. Joban Putra, R.S., Datta, N. 1974. Trimethoprim R-factors in enterobacteria from clinical specimens. J. Med. Microb. 7; 169-177.
26. Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol Rev. 32; 403-430.

27. Levine, M.M. 1972. An epidemic-associated episome. *J. Infect. Dis.* 126; 215-218.
28. Linton, K.B., Lee, P.A., Richmond, M.H., Gillespie, W.A. 1972. Antibiotic resistance and transmissible R-factor in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and rural community. *J. Hyg. Camb.* 70; 99-104.
29. Linton, K.B., Richmond, M.H., Bevan, R. and Gillespie, W.A. 1974. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. *J. Med. Microbiol.* 7; 91-103.
30. Maré, I.J. 1968. Incidence of R factor among gram negative bacteria in drug-free human and animal communities. *Nature* 220; 1046-1047.
31. Marsik, F.J., Parisi, J.T. 1975. Transmissible drug resistance of Escherichia coli and Salmonella from humans, animals and their rural environment. *J. Infect. Dis.* 132; 296-302.
32. Mata, L.J. Gangarosa, E.J., Caseres, H., Perera, D.R. 1970. Epidemic Shiga bacillus dysentery in central america. Etiologic investigations in Guatemala 1969. *J. Infect. Dis.* 122; 170-180.
33. Mc Gowan, J.E., Finland, M. 1974. Usage of antibiotics in a general hospital: Effect of requiring justification. *J. Infect. Dis.* 130; 165-168.
34. Mc Kay, N.M. 1975. The use of antibiotics in animal feeds in the united Kingdom. The impact and importance of legislative controls. *World's Poultry, Sci.* 31; 116-126.
35. Meynell, E., Meynell, G.G. and Datta, N. 1968. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 32; (1) 55-83.
36. Nau, H.C. 1975. Antimicrobial resistance and R factor transfer among isolates of Salmonella in the northeastern United States; a comparison of human and animal isolates. *J. Infect. Dis.* 132; 617-621.
37. Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss III, R., Datta, N. and Falkow, S. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40; 168-189.
38. Novick, R.P. 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33; 210-263.

39. Nov, J.H., Avlife, G.A. 1974. Antibiotic resistant-gram-negative bacilli in faeces of neonates. *J. Med. Microbiol.* 7; 509-520.
40. Olarte, J., Filloy, J., Galindo, E. 1976. Resistance of Shigella dysenteriae type I to ampicillin and other antimicrobial agents; strain isolated during a dysentery outbreak in a hospital in México city. *J. Infect. Dis.* 133; 572-575.
41. Olarte, J., Galindo, E. 1970. Factores de resistencia a los antibioticos encontrados en bacterias enteropatas aisladas en la ciudad de México. *Rev. Iat. Am. Microbiol.* 12; 173-179.
42. Olarte, J., Galindo, E. 1973. Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, ampicillin and other antimicrobial agents; strain isolated during an extensive typhoid fever epidemic in México. *Antimicrobiol. agents Chemother.* 4; 597-601.
43. Olarte, J., Varela, G. and Galindo, E. 1971. Infección por Shigella dysenteriae I (bacilo de Shiga) en México. *Bol. Med. Hosp. Infantil.* XXVIII No 6: 605-612.
44. Overturf, G.D., Wilkins, J., Ressler, R. 1974. Emergence of resistance of Providencia stuartii to multiple antibiotics: speciation and biochemical characterization of Providencia. *J. Infect. Dis.* 129; 357-357.
45. Reller, L.B., Rivas, E.N., Masferrer, R., Bloch, M., Gangarosa, E.J. 1971. Epidemic Shiga-bacillus dysentery in central America. Evolution of the outbreak in El Salvador 1969-1970. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20; 934-940.
46. Richmond, R.H. and Wiedeman, B. 1974. Plasmids and bacterial evolution. In evolution in the microbial world Soc. Gen. Microbial symp. 24; 59-85. Cambridge University.
47. Rownd, R., Ph.D., Kasamatsu, H. Ph.D. and Mickel, S. 1971. The molecular nature and replication of drug resistance factors of the enterobacteriaceae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 182; 188-206.
48. Schaberg, D.R. 1976. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant gram-negative bacilli; epidemiology and control. *J. Infect. Dis.* 133; 363-366.
49. Siegel, D., Huber, W.G. and Drysdale, S. 1975. Human therapeutic and agricultural uses of antibacterial drugs and resistance of the enteric flora of humans. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 8; 538-543.

50. So, M. 1975. Polynucleotide sequence relationships among ent plasmids and the relation ship between ent and other plasmids. *J. Bacteriol.* 121; 234-238.
51. Sogaard, H. 1974. Antibiotic - resistant gram-negative bacilli in a urological ward for male patients during a nine-year period; relationship to antibiotic consumption. *J. Infect. Dis.* 130; 646-650.
52. Van Hest, A.P., Hofmeyer, F.E. 1974. Infection multiple drug resistance an aver growing problem in modern practice. *S.A. Med. J.* 48; 1826-1828.
53. Watanabe, T. 1971. Infectious drug resistance in bacteria curr. *Top. Microb. Immunol.* 56; 43-98.
54. Willetts, N. 1972. The genetics of transmissible plasmids. *Ann. Rev. Gen.* 6; 257-268.
55. Williams, H. 1975. Antibiotic-resistant bacteria in animals: The dangers to human health. *World's Poultry, Sci. J.* 31; 104-115.
56. Williams, H. , Halls, S. 1968. The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that control enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.* 52; 319-334.
57. Williams Smith, H. 1971. Incidence of R Escherichia coli in coastal bathing waters of Britain. *Nature.* 234; 155-156.
58. Williams Smith, H. 1970. Incidence in river water of Escherichia coli containing R factors. *Nature.* 228; 1286-1288.