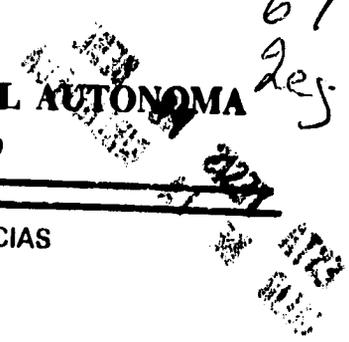




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

69
2ej



DETERMINACION DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA DE
Salmonella enteritidis AGENTES ANTIMICROBIANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A I
YOLANDA GONZALEZ VAZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
REGION ESCOLAR

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Determinación de sensibilidad y resistencia de Salmonella enteritidis a agentes antimicrobianos.

realizado por Yolanda González Vázquez

con número de cuenta 7110368-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. Rafael García González

Propietario

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente

Dra. Clara Esquivel Huesca

Suplente

Biol. Marcos Vázquez González Jiménez

Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

Dedicatoria

**A mis padres, Jesús González y Vicitación Vázquez
por el apoyo que siempre me han brindado.**

A mi hijo, Luis Enrique por los momentos de alegría.

**A mis hermanos, Gonzala, María, Paula, Guadalupe,
Estela, Virginia, Jesús y Rosario.**

A mis sobrinas, Laura, Beatriz y Adriana.

A mis compañeros Luis Enrique y Sabina.

Agradecimiento

**A la máxima casa de estudios U.N.A.M.
Facultad de Ciencias por la formación profesional recibida.**

Al M. en C. Rafael García González, por la dedicación que tuvo para que este trabajo se realizara

Al Jurado:

Dra. Patricia Ramos Morales

Dra. Clara Esquivel Huesca

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Bio. Marco Antonio González Jimenez.

**Mi agradecimiento por el apoyo
para la realización de este trabajo.**

Al Instituto Nacional de Pesca, especialmente a las Biólogas Ma. Elena Espinoza Vázquez, Irma López López. Ma. Esther, C. Horacio Mejía Ayala y C. Joaquín Díaz Mendoza por su paciencia y dedicación

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCION	
I.1 Infecciones causadas por <u>Salmonella</u> y resistencia a antimicrobianos	6
I.2 Identificación en México	12
I.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	13
I.4 Microdilución	14
Justificación	16
Objetivos	17
II MATERIAL Y METODO	
II.1 Aislamiento y obtención de cepas del género <u>Salmonella</u>	18
II.2 Pruebas metabólicas y serológicas para la identificación del género <u>Salmonella</u>	19
II.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en las cepas aisladas de <u>Salmonella enteritidis</u> .	21
III RESULTADOS.	23
IV DISCUSION	26
V CONCLUSIONES	31
VI CUADROS Y FIGURAS	32
VII BIBLIOGRAFIA	49

DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA DE
Salmonella enteritidis
A AGENTES ANTIMICROBIANOS

RESUMEN

De Enero a abril de 1989 se aislaron 55 cepas de *Salmonella enteritidis* y 11 de *Salmonella typhi* de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría, en muestras de coprocultivos, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo y catéteres. Para la identificación de las cepas se realizaron pruebas metabólicas y serológicas, encontrándose que las más frecuentes fueron: *S. typhimurium* (36.3%), *S. typhi* (16.6%), *S. heidelberg* (15.1%) y *S. agona* (9%). Por el método de doble microdilución seriada en placa se probó la sensibilidad a: ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cefoperazona, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, estreptomina, kanamicina y tetraciclina:

Se calcularon las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) requeridas para inhibir el 50% (CMI 50%) y 90% (CMI 90%) de las cepas. Asimismo se determinó el porcentaje de inhibición acumulativa para cada uno de los agentes antimicrobianos. Las cepas presentaron un porcentaje de resistencia bajo para cefoperazona, kanamicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, ceftriaxona y gentamicina, del 3 al 6%. Sin embargo, para la estreptomina, ampicilina, cefalotina y tetraciclina presentaron una resistencia del 18.1 al 29.2%.

I INTRODUCCION

La familia Enterobacteraceae agrupa 20 géneros, entre los cuales se encuentra el género *Salmonella* que incluye 3 especies. *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, según la clasificación de Edwards y Edwin, realizada en 1972 (Le Minor, 1984).

Se ha señalado que todos los serotipos de *Salmonella* que existen pertenecen a la especie *S. enteritidis*, con 2000 serotipos aproximadamente, siendo especies únicas *S. cholerae-suis* y *S. typhi* (Le Minor, 1981, Starr, 1981).

En otra clasificación se subdivide al género *Salmonella* en cuatro subgéneros (I, II, III y IV) en el subgénero I. *kauffmannii* se incluyen las cepas aisladas del hombre y los vertebrados de sangre caliente, subgénero II . *salamae*, subgénero III. *arizonae* y subgénero IV . *houtenae*, estos subgénero del II al IV son aislados de reptiles y sus comensales. Los subgéneros II y III tienen características semejantes entre ellos, no se desarrollan en presencia de cianuro de potasio (KCN), hidrolizan la gelatina, y una de las diferencias más notorias entre éstos es que el subgénero II es negativo para la (ONPG) ortonitrofenilgalactósido y el III es positivo (Le Minor, 1981, Starr, 1981).

Por lo que respecta a su nomenclatura, ésta es controvertida puesto que no sigue las reglas internacionales del código de nomenclatura bacteriológico. Los primeros serotipos aislados se denominaron de acuerdo al papel específico que cumple *S. typhi* como agente patológico causal de tifoidea, *S. paratyphi* agente de paratifoidea, *S. abortus-ovis* agente que ocasiona el aborto en ovejas, *S. typhimurium* causante de la enfermedad del ratón (Le Minor, 1981).

El mismo criterio de clasificación se ha aplicado a los serotipos de *Salmonella* que se incluyen en el subgénero I, mientras los subgéneros del II al IV se denominan con base a su fórmula antigénica (Le Minor, 1981 y Starr, 1981).

El principal hábitat de las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* es el tracto intestinal del hombre y de los animales, aunque existen serotipos estrictamente adaptados a un hospedero específico, al que le causan daño, por ejemplo *S. typhi*, que causa la tifoidea; *S. paratyphi A* y *S. sendai*, que provocan algunos trastornos gastrointestinales.

Por otra parte *S. gallinarum-pollorum*, *S. abortus-ovis* y *S. cholerae-suis* son serotipos que parasitan aves, ovejas y cerdos, respectivamente. Además, se ha observado que los serotipos de estas bacterias no pueden crecer en medios mínimos (Le Minor, 1981).

Las *Salmonellas* comunes como *S. typhimurium* causan diversos síntomas clínicos, que van desde una leve infección asintomática, como ocurre generalmente en los niños que son altamente susceptibles a las infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Asimismo entre los roedores, el ratón, presenta una gran susceptibilidad a estas infecciones.

Existen serotipos que pueden causar bacteremias, septicemias, o infecciones asintomáticas en el hombre, lo cual depende del serotipo, de la cepa, de la dosis y el lugar donde se hospede. Por otra parte, es necesario ingerir un número de bacterias suficientemente alto, de 10^8 a 10^9 para provocar una infección y presentar síntomas clínicos (Le Minor, 1981, 1984). Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son cosmopolitas, ya que se distribuyen en ambientes naturales como el agua, suelo, alimentos y otros.

Los organismos del género *Salmonella* no son capaces de reproducirse en un ambiente natural, pero pueden sobrevivir varias semanas en el agua y hasta años en el suelo bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y pH (Le Minor, 1981, 1984). Los organismos de este género se caracterizan por tener forma de bastoncillos lisos y tamaño aproximado de $0.7-1.5 \times 2.0-5.0 \mu\text{m}$. Según la definición general de la familia Enterobacteriaceae (Le Minor, 1984), son bacterias gram negativas, aerobias facultativas, producen gas a partir de glucosa y generalmente son móviles.

Estas bacterias crecen en medios de agar formando colonias con el centro negro, de superficie lisa, son microorganismos patógenos para diversos mamíferos, entre estos, el hombre y sus animales domésticos, asimismo, infectan a reptiles y aves silvestres.

Algunos serotipos como los de *S. abortus-ovis* y *S. typhi* crecen formando colonias pequeñas de 0.5 a 1.0 μm de diámetro. Muchas cepas no requieren de un factor de crecimiento (cepas prototróficas), otras consideradas como auxotróficas requieren de factores de crecimiento muy específicos, entre éstas aquellos serotipos estrictamente adaptados al hospedero como *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *S. sendai* que son exclusivamente organismos adaptados al humano (Krieg, 1984, Le Minor, 1984).

El género *Salmonella* presenta las siguientes características metabólicas: reducen los nitratos a nitritos, producen ácido sulfhídrico (H_2S), aunque algunas no lo hacen, como sucede con las cepas de *S. cholerae-suis* y *S. paratyphi A*, el citrato es utilizado como única fuente de carbono, aunque hay algunos tipos como *S. typhi* y *S. paratyphi A*, que no lo utilizan.

La mayoría de las bacterias de este género descarboxilan la ornitina y lisina, sin embargo, *S. typhi* y *S. paratyphi A* se caracterizan por ser negativas para esta prueba. Son negativas con respecto a la reacción de la ureasa, no oxidan a la fenilalanina ni al triptofano. No fermentan la sacarosa, salicina, inositol y amigdalina. La lactosa generalmente no es fermentada por las bacterias del género *Salmonella*, pero *S. arizonae* tiene una marcada actividad betagalactosidasa detectable a través de la prueba ortonitrofenilgalactósido (ONPG), y las cepas *S. arizonae* la fermentan rápidamente.

El malonato no es utilizado por la mayoría de las *Salmonellas* constituyendo la excepción *S. arizonae*. En el cuadro I se incluyen otras características metabólicas de las especies pertenecientes al género *Salmonella* (Koneman, 1985, Le Minor, 1981 y McFadin, 1980).

Serológicamente *Salmonella* se caracteriza por presentar 3 tipos de antígenos mismos que son usados para su tipificación: somáticos "O", flagelares "H" y de superficie "Vi".

El antígeno de pared celular o somático "O", se caracteriza por ser resistente al calor y al alcohol, contiene en su composición un complejo proteína lipopolisacárido que se considera una endotoxina.

Los estudios de absorción cruzada han permitido identificar un gran número de factores antigénicos, 67 de los cuales, pueden ser usados para su identificación serológica. El esquema de clasificación de Kauffamn-White se basa en pruebas de aglutinación con antisueros absorbidos permitiendo la identificación de diferentes antígenos "O". Estos factores "O" están estrechamente relacionados y pueden ser clasificados como sigue:

Antígenos mayores "O", permiten identificar el grupo antigénico, por ejemplo, el factor antigénico O:4 que caracteriza a todas las *Salmonellas* del grupo B (Le Minor, 1981).

Los antígenos flagelares "H" son inactivados por calentamiento a temperaturas superiores a 60°C. así como por el alcohol y ácidos. La aglutinación con antisueros sirve para su identificación. Los antígenos flagelares específicos de *Salmonella*, pueden producir solo un antígeno flagelar, llamado antígeno "H" monofásico.

Otros serotipos de *Salmonella* pueden expresar dos antígenos flagelares, por lo que se les llama difásicos, ejemplo de ello lo constituye *S. enteritidis* y *S. typhi* pertenecientes al primer grupo y *S. typhimurium* al segundo (Le Minor, 1981).

Ciertos antígenos de superficie "Vi" son comunes en otros géneros como *Echerichia* y *Klebsiella*, pero pueden presentarse en algunos serotipos de *Salmonella*. Solo se conoce un antígeno específico de superficie, el antígeno "Vi" se destruye a 100°C de temperatura, impide la aglutinación de las *Salmonellas* con el suero anti "O" y su pérdida permite la aglutinación. Los antígenos "Vi" se presentan sólo en tres serotipos: *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. dublin* (Le Minor, 1981).

1.1 Infecciones causadas por *Salmonella* y resistencia a antimicrobianos

Las enfermedades ocasionadas por estas bacterias pueden presentarse en tres diferentes entidades clínicas: gastroenteritis, septicemia con lesiones focales y fiebre entérica (Kumate, 1988 y Thron, 1979).

La gastroenteritis originada por *Salmonella* representa una infección real del intestino, se caracteriza por diarrea, fiebre y dolor abdominal que dura de 2 a 5 días. La deshidratación y el desequilibrio hidroelectrolítico constituye la mayor amenaza en los niños pequeños, llegando a causar la muerte. Cualquier especie de *Salmonella* puede producir la enfermedad, pero el agente más frecuente es *S. enteritidis*, (Takeuchi, 1975, Thron, 1979, Jolik, 1987). Las septicemias con lesiones focales prolongadas que se caracterizan por fiebre, escalofríos, anorexia y anemia. En pacientes con este tipo de enfermedades se aísla *S. cholerae-suis* (Cecil, 1987, Kumate, 1988, Takeuche, 1975).

La patogenicidad de los diferentes serotipos de *Salmonella* aun no se conoce, sin embargo depende principalmente de la dosis que se ingiera, del serotipo al que pertenece la bacteria y de la zona donde llega a hospedarse. Se considera como dosis infectante 10^8 a 10^9 bacterias (Cecil, 1987 y Kumate, 1988).

Por otra parte, existe una variedad de infecciones ocasionadas por *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis*, que afectan al humano llamadas comúnmente salmonelosis (Kumate, 1988).

La salmonelosis constituye uno de los principales padecimientos gastrointestinales que afectan a las poblaciones humanas, especialmente a la infantil; ocupa uno de los principales lugares entre las causas de morbilidad y mortalidad en México (Parrilla 1978). La salmonelosis es una enfermedad de los lactantes en tanto que la tifoidea predomina en la edad preescolar y escolar como se muestra en la figura 1 (Kumate, 1988).

La salmonelosis se presenta en forma endémica con máximos en el verano y al final de la primavera, esto se debe a que la humedad y temperatura

superiores a los 22°C favorecen las condiciones para el desarrollo de estos microorganismos (Kumate, 1988).

Las *Salmonella* adaptadas a los animales comprende a *S. cholera-suis* en el cerdo; *S. enteritidis*, serotipos *pollorum* y *gallinarum* en las aves; *S. dublin* en rumiantes; *S. abortus-ovis* en las cabras y ovejas, *S. abortus equi* en los caballos, pero en los niños produce cuadros clínicos de tipo septicémico con localizaciones extraintestinales a la cual se le atribuye una elevada mortalidad (Cecil, 1987, Kumate, 1988).

La transmisión de persona a persona tiene cierta importancia en la salmonelosis; el vehículo más importante es el alimento contaminado de origen animal, como la carne, huevos y productos elaborados con ellos. Las *Salmonellas* puede distribuirse en la carne y ser fuente de contaminación secundaria de utensilios, equipo y manipuladores, los que a su vez pueden convertirse en portadores.

La transmisión de persona a persona, sobre todo de *S. typhimurium*, *S. derby* y *S. heidelberg* puede ocurrir en los niños y personas de nivel socioeconómico bajo. Tal vez, un factor sobresaliente es el procesamiento en masa de los alimentos, particularmente los derivados de animales; entre los cuales estos microorganismos están ampliamente diseminados (Parrilla, 1978 y Mendoza, 1978).

Además existen diversidad de reservorios, entre los que se encuentran insectos y roedores que pueden intervenir en su transmisión (Sánchez, 1981).

S typhi ocasiona síntomas de tipo gastrointestinal como dolor abdominal febre, diarrea y en la etapa final de la enfermedad, después de una febre prolongada, bacteremia e invasión de las placas de Peyer del intestino delgado por este microorganismo (Mendoza, 1978) .

Otras *Salmonellas*, particularmente *S. paratyphi A* y *S. paratyphi B*, también pueden causar febre entérica, pero los síntomas son leves y la tasa de mortalidad es menor.

La transmisión se realiza a través de las heces y la orina de personas enfermas, o portadoras crónicas de estas bacteria, también puede ocurrir a través de alimentos y agua contaminada (Jolik y col., 1987, Mendoza, 1978).

La *Salmonella* ha sido la causa de varios brotes epidémicos; Bessudo y col (1973), señalan la ocurrida en México a principios de 1972, causada por *S. typhi*, habiéndose encontrado que 92% de las cepas fue resistente a cloranfenicol, tetraciclina y estreptomina. Kupersztoch en 1978, señala haber encontrado cultivos resistentes de *Salmonella* a cloranfenicol durante la epidemia de fiebre tifoidea que se registró en 1972.

En el laboratorio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México, se han estudiado 3 brotes de gastroenteritis causada por *Salmonella*. El primero ocurrió en noviembre de 1973, del cual se aisló, *S. infantis*; el segundo en diciembre de 1975, aislándose *S. heidelberg* y el tercero, en noviembre de 1978, en el cual se aisló *S. typhimurium* (Mendoza, 1978).

Los antimicrobianos empleados en el tratamiento de las infecciones causadas por *Salmonella*, tales como la ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidixico y otros utilizados, en la mayoría de las veces en forma injustificada, como ha sido referido por diferentes autores (Solórzano y col., 1987), ha provocado la selección de cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos, aumentando la posibilidad de transferencia de material genético codificador de esta resistencia a través de los plásmidos.

El fenómeno de resistencia a antimicrobianos está dado por plásmidos, los cuales se encuentran en todas las Enterobacterias y se definen como elementos extracromosómicos que están formados por moléculas circulares de ácido desoxirribonucleico (ADN); se caracterizan por ser autónomos en su replicación, y no requerir de los genes del cromosoma para poder replicarse. Los plásmidos tienen genes que permiten a las bacterias realizar ciertas funciones biológicas, como es la resistencia a antimicrobianos y a los metales pesados, así como a factores de patogenicidad y virulencia (Broda, 1979, Hardy, 1981 y Novik, 1980).

Hay dos tipos de plásmidos, los conjugativos que se pueden transferir de una bacteria a otra, con un peso molecular mayor de 40×10^6 D (Daltons) mantenidos

en una o dos copias por cromosoma bacteriano y los plásmidos no conjugativos los cuales no tienen la capacidad de ser transferidos con un peso molecular menor de 10×10^6 D y se contemplan en aproximadamente 15 copias por cromosoma bacteriano.

En una bacteria se pueden presentar uno o más plásmidos denominados compatibles, al coexistir en el mismo huésped y aquellos nombrados incompatibles por no presentar factores comunes de compatibilidad.

La replicación vegetativa de un plásmido va depender de su tamaño y se da durante el ciclo celular normal (Broda, 1979, Hardy, 1981)

Los plásmidos tienen transposones y secuencias de inserción, presentes también en fagos y cromosomas bacterianos. Los transposones son elementos del ADN capaces de ser transpuestos, es decir que pueden desplazarse de una molécula de ADN a otra, que contengan o no secuencias de homología, su tamaño varía de 1,000 a 20,000 pares de bases (p.b.) y son capaces de replicarse por sí mismos.

Los transposones tienen en sus extremos secuencias repetidas invertidas, cuya estructura es de 38 a 1,500 (p.b.) siendo estas secuencias las que le permiten a los transposones moverse de una molécula de ADN a otra.

Las secuencias de inserción son elementos de ADN cuyo tamaño va de 768 a 5.700 (p.b.) y son las responsables de la interacción dada entre plásmidos y cromosomas bacterianos (Fedoroff, 1976, Broda, 1979, Hardy, 1981 y Novik, 1980).

Para aquellos pacientes inmunocomprometidos con infecciones intestinales se recomienda como tratamiento de primera elección, al trimetoprim-sulfametoxazol: trimetoprim, que actúa interfiriendo la síntesis de bases púricas y pirimídicas; el sulfametoxazol es un metabolito que interfiere con el ácido fólico y repercute en la síntesis de bases púricas y pirimídicas, (Solórzano y col., 1987).

Como tratamiento alternativo para estos casos se sugiere la aplicación de antimicrobianos que actúen a nivel de síntesis de la pared celular como es la

ampicilina y cefotaxima y como inhibidores de la síntesis de proteínas el cloranfenicol (Klaus y col. 1987).

La resistencia de *Salmonella* a los diferentes antimicrobianos también se ha observado en otros países, como Liberia situado al este de Africa, donde se encontraron cepas de *S. enteritidis* serotipo *enteritidis*, con fuerte soporte a las concentraciones de tetraciclina, nitrofurantoína, kanamicina y estreptomina.

Hadfiel y col. (1985) identificaron un plásmido de 120 a 140 megadaltons (Md) como característica asociada a la resistencia en estas cepas.

Por su parte Riley y col. en 1984 aislaron cepas de *S. heidelberg* y *S. typhimurium* con resistencia a antibacterianos como son: estreptomina, ampicilina, sulfonamidas y tetraciclina .

Sidahmed en 1985 en Sudan, reportó cepas de *S. typhi* resistentes a ampicilina .

Cherubin y col. en 1986 reportaron cepas de *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. enteritidis*, *S. newport* y *S. alachua*, quienes presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina, pero sensibilidad a antimicrobianos, como son las cefalosporinas .

En Gran Bretaña Platt y col., aislaron en 1986 cepas de *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. derby*, en un brote epidémico, las cuales de acuerdo a los estudios realizados presentaron resistencia a varios antimicrobianos. .

Cohen en 1984 y 1987 aisló cepas de *Salmonella*, las cuales soportaron a las concentraciones de estreptomina, tetraciclina, ampicilina, sulfadiazina, cloranfenicol y trimetoprim suministradas, además se observó que los serotipos más frecuentes fueron *S. newport*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. saint-paul* y *S. typhi* .

En 1987 Spika en California, señala haber encontrado cepas de *S. newport*, resistentes a tetraciclina y kanamicina (Spika, 1987).

Ling y Chau en 1987 en Japón, detectaron cepas de *S. enteritidis*, mismas que fueron resistentes a cloranfenicol, estreptomina, espectinomicina, sulfonamidas y tetraciclina.

Yamamoto y Asthon en 1988 realizaron 114 aislamientos de bacterias del género *Salmonella*, a partir de 117 niños, con infecciones gastrointestinales, realizando pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en 75 de estos aislamientos, con porcentajes de resistencia del 28% para ampicilina, 12% para el trimetropim sulfametoxazol y 12% para cefalotina, donde se detectó al serotipo *S. typhimurium* como el más frecuente.

Courbot y col. en 1990, aislaron cepas de *S. enteritidis* con resistencia múltiple a antimicrobianos, como ampicilina, tetraciclina y sulfametoxazol .

En México desde hace 25 años se ha observado la aparición de cepas de *Salmonella*, resistentes a los antimicrobianos de uso común (Pérez y Hernández, 1985).

Bessudo y col. en 1973 reportaron cepas de *S. typhi* con un porcentaje de resistencia de 88% para cloranfenicol, tetraciclina y estreptomina .

Kupersztoch en 1981 reportó cepas de *S. typhimurium*, resistentes a sulfametoxazol, ampicilina, carbencilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina.

Pérez y Hernández en 1985 aislaron cepas de *Salmonella* del Hospital Infantil de México, observándose su resistencia a: cloranfenicol, ampicilina, estreptomina y tetraciclina; además el serotipo *S. newport* fue resistente a los 4 antimicrobianos mencionados y a la cefalotina, gentamicina y kanamicina; también fueron aisladas cepas de *S. typhimurium* y *S. newport*, resistentes a gentamicina , estreptomina, ampicilina y sisomicina .

Martínez y col. en 1986 reportaron cepas de *S. london* , *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. poona*, resistentes a tetraciclina.

Mendoza y col. en 1986 reportaron cepas de *Salmonella* resistentes a cloranfenicol 46%.

Solórzano y col. en 1987 aislaron cepas de *Salmonella typhi* y *S. enteritidis* en pacientes del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de México, encontrando resistencia a cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol.

Paralelamente se efectuaron a nivel mundial otras investigaciones que permitieron entre otros a Chicami en 1985 detectar un plásmido de 80 kb de *S. dublin* que porta características de virulencia.

Gotuzzo en 1987 reporto plásmidos que portan genes que median las propiedades de virulencia en varias Enterobacterias, incluyendo cepas invasivas de *E.coli* y bacterias del grupo de *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. cholerae-suis*.

Krause en 1991 de forma similar aisló un plásmido de 60 a 100 kb, identificando una región del plásmido de 80 kb responsable de la característica de virulencia en *S. dublin*. Algunos otros autores han reportado plásmidos los cuales están asociados a carácter de virulencia en *Salmonella* (Beninger, 1988, Vander Bosch, 1987, Gulig, 1987).

1.2 Identificación en México.

Entre 1974 y 1981 en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México se tipificaron 4,522 cepas de *Salmonella*, que se aislaron de diferentes fuentes, 2,803 procedían de origen humano, 1619 de los alimentos, 100 de agua de drenaje y animales (González y col. 1985).

Las *Salmonella* de origen humano aisladas con mayor frecuencia (62%) fueron: *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. newport*, y *S. poona*, *S. anatum*, *S. panama*, *S. woethigton*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. montevideo*, *S. seftenberg*.

Las *Salmonellas* que se aislaron con mayor frecuencia en los alimentos fueron con un porcentaje del 36%: *S. derby*, *S. typhimurium*, *S. anatum*, *S. london*, *S. agona*, *S. give*, *S. infantis*, *S. worthigton*, *S. bovis-morficans* y *S. muenchen*. Las aisladas con mayor frecuencia de agua de drenaje y animales con porcentaje del 2%: *S. gallinarum*, *S. anatum*, *S. pollorum*, *S. irumu*, *S. gaviana*, *S.*

typhimurium, *S. derby*, *S. infantis*, *S. london*, *S. oranienburg*, *S. montevideo* y *S. newington* (González y col. 1985).

Por otra parte, también se ha aislado *Salmonella* de aguas negras encontrándose que los serotipos más frecuentes fueron: *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. agona*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. javiana*, y *S. worthington* (Viscaya, 1979). Mendoza y col (1978), aislaron entre 1973 y 1977 bacterias del género *Salmonella* de algunos embutidos tales como: longaniza, chorizo, moronga, pathe, por mencionar algunos, encontrando que los serotipos más frecuentes fueron: *S. typhimurium*, *S. give*, *S. derby*, *S. london*, *S. anatum*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. bovis-morficans*.

Parrilla y col. (1978) aislaron *Salmonella* en productos cárneos encontrando una mayor incidencia de éstas en longaniza y chorizo. Los serotipos más frecuentes fueron: *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. london*, *S. give*, *S. agona* (Parrilla y col. Mendoza y col. 1978).

1.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos puede medirse *in vitro* utilizando los principios de difusión en agar.

Las técnicas de difusión pueden utilizarse como procedimientos cualitativos, cuantitativos y semicuantitativos.

Bauer y Kirby (1966) desarrollaron procedimientos cualitativos estándares para pruebas de susceptibilidad. Se seleccionan por lo menos cinco colonias bacterianas aisladas de la superficie de una placa de agar sangre con un hisopo de dacrón. Estas colonias se incuban en un tubo que contiene caldo triptelina soya, para su desarrollo 2 a 3 horas aproximadamente, estandarizando este inóculo con el tubo estandar No. 5 de Mac-Farland.

Posteriormente se inoculó con un hisopo la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (M-H), cubriendo uniformemente toda la superficie. Una vez seco el

concauidades. En cada cavidad o pocillo hay 50 μ l de caldo Mueller-Hinton, se puede seleccionar el número y los tipos de antimicrobianos así como la concentración exacta.

La caja se prepara colocando 50 μ l de las diferentes concentraciones de antimicrobiano en los pocillos apropiados. Se prepara una suspensión bacteriana inoculando con una asa bacteriológica a la colonia en estudio en 1 ml. de caldo nutritivo y se incuba a 35°C de 4 a 6 horas.

Posteriormente se añaden a 25 ml. de agua 50 μ g de esta suspensión obteniendo una concentración final de alrededor de 10 microorganismos por ml. En cada uno de los 96 pocillos se colocan 50 μ g de esta suspensión diluida. Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana se cubre con una bolsa de plástico u otro material adecuado para evitar el desecamiento durante la incubación a 35°C durante 15 horas.

La (CMI) se interpreta como el primer pocillo que no exhibe desarrollo del microorganismo (Koneman, 1985).

inóculo, la placa de Mueller-Hinton está lista para la colocación de los discos con antimicrobianos sobre la superficie del agar.

La referida preparación se incuba a 35° C durante 18 horas, observando posteriormente las zonas de inhibición de los diferentes discos, las cuales se miden con una regla (Koneman, 1985). figura. 2

Procedimientos cuantitativos. Se llevan a cabo por dilución en caldo utilizando tubos de ensayo que contienen caldo nutritivo. A cada uno se le añade una cantidad de antimicrobiano diluido seriadamente de 100 µg/ml a 0.4 µg/ml. Los tubos se inoculan con una suspensión calibrada del microorganismo en estudio y se incuban a 35°C durante 18 horas figura. 3; finalizando este período los tubos son examinados visualmente para comparar la presencia de turbidez, la cual indica que hay desarrollo de los microorganismos y por lo tanto, el antimicrobiano no inhibe el desarrollo de los mismos (Koneman, 1985).

El punto de ruptura es la inhibición del desarrollo, introduciéndose aquí el término de concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la menor concentración de antimicrobiano en µg/ml que inhibe el desarrollo *in vitro* de las bacterias.

Procedimientos semicuantitativos. Se llevan a cabo con dos discos, uno con alta y otro con baja concentración del antimicrobiano. Los microorganismos resistentes se desarrollan hasta los bordes de ambos discos. Los microorganismos sensibles exhiben zona de inhibición del desarrollo alrededor de ambos discos. Los organismos de sensibilidad intermedia son inhibidos sólo por el disco que contiene la mayor concentración de antimicrobiano (Koneman, 1985).

1.4 Microdilución

La susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de "microtubos" moldeados en una caja para microdilución (Terasaka Trays).

Esta caja puede contener 80, 96 o más pocillos según el número de hileras horizontales y verticales como se puede observar en la figura. 4, que contiene 96

Justificación

La selección de cepas resistentes a agentes antimicrobianos, está íntimamente ligada al uso de los mismos. Esto ha sido probado desde 1951 en Japón, con el empleo a nivel clínico de los primeros agentes antimicrobianos y en nuestro país durante la epidemia de 1972 a 1974, durante la cual se encontraron cepas de *S. typhi* resistentes a cloranfenicol y ampicilina. Otros brotes epidémicos se presentaron en 1974, 1975 y 1978, los cuales fueron causados por *S. enteritidis*, encontrándose que cepas aisladas de estos microorganismos, fueron resistentes a ampicilina y tetraciclina (Kupersztoch, 1981, 1978, Mendoza, 1978).

Por estos hechos y teniendo en cuenta el consumo de antimicrobianos en alimento para la engorda de animales, así como la prescripción indiscriminada de estos agentes, resulta evidente la importancia de desarrollar estudios del estado de sensibilidad a antimicrobianos, que exhiben actualmente las bacterias del género *Salmonella* (Kupersztoch, 1981, 1978, Mendoza, 1978).

Objetivos

Objetivo general: conocer el estado de sensibilidad hacia agentes antimicrobianos de organismos del género *Salmonella*, aislados de muestras clínicas del Instituto Nacional de Pediatría.

Objetivos particulares

- 1. Aislamiento e identificación metabólica y serológica de *Salmonella*.**
- 2. Determinación de la frecuencia por serotipos.**
- 3. Por medio de la doble microdilución seriada en placa determinar la resistencia y sensibilidad de las cepas aisladas.**
- 4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) 50 y 90% .**

II. MATERIAL Y METODO

II.1 Aislamiento y obtención de cepas del género *Salmonella*

De enero a abril de 1989 se obtuvieron 856 muestras de coprocultivos, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo y catéteres, se aislaron 72 cepas del género *Salmonella* de pacientes de consulta externa y hospitalización del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con edades comprendidas de neonatos a 12 años, de ambos sexos, que presentaron diarrea, vómito y síntomas gastrointestinales, con diagnóstico presumiblemente de infección salmonelósica.

Las muestras fueron materia fecal 72%, Hemocultivos 15%, líquido cefalorraquídeo 8% (LCR) y catéteres 5%.

En los pacientes de consulta externa, se realizó la toma de muestras de materia fecal y sangre, por el personal de servicio de toma de productos del INP, en tanto que, en los pacientes hospitalizados la toma de muestras de materia fecal, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo y catéteres, fueron realizados por el personal médico de cada servicio.

En pacientes neonatos, se tomó la muestra de la zona rectal, con hisopo estéril y se colocó en un tubo estéril con caldo nutritivo. Para los pacientes mayores de 2 años, se utilizó un frasco estéril para depositar las muestras que fueron colectadas con el hisopo estéril y caldo nutritivo, los cuales se sembraron directamente en medios selectivos: agar Mac-Conkey agar *Shigella-Salmonella* (S-S), agar verde brillante y agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). La muestra fue inoculada con el hisopo en cada una de las cajas de petri y se dispersó mediante estriado. Posteriormente fueron incubadas a 37°C entre 18 y 24 horas. A una parte de la muestra se le agregaron de 3 a 5 ml de caldo nutritivo (selenito o

caldo tetracionato) y se incubó a 37°C de 12 a 16 horas para permitir el desarrollo de las bacterias del género *Salmonella* e inhibir el desarrollo de coliformes figura 5 (Koneman, 1985, Le Minor, 1981).

N.2 Pruebas metabólicas y serológicas para la identificación del género *Salmonella*

Las cepas del género *Salmonella*, aisladas en medios selectivos, fueron sometidas a diversas pruebas metabólicas para su identificación utilizando medios diferenciales, manufacturados por Merck :

- a) Agar hierro 2 azucares según (Kligler) para detectar fermentación de lactosa o glucosa, producción de ácido sulfhídrico ($H_2 S$) y gas a partir de glucosa.

Se prepararon tubos de ensaye con agar Kligler de acuerdo a las instrucciones del fabricante, esterilizando en autoclave a 15 libras durante 15 minutos y enfriando los tubos en posición inclinada. Para todas las pruebas se inoculó solo una colonia, la cual se incubó a 37°C durante 18 horas.

- b) Agar citrato de Simmons: se empleó para detectar la utilización del citrato como fuente de carbono. Se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se esterilizó en autoclave a 15 libras durante 15 minutos, enfriando los tubos en posición inclinada. Se inoculó a partir de una sola colonia y se incubó a 37°C durante 24 horas.

- c) Rojo de metilo Voges-Proskauer; El rojo de metilo es un indicador de pH, con un intervalo entre 6 (amarillo) y 4.4 (rojo), que se utiliza para detectar la fermentación de ácido mixta de glucosa o producción de acetoinabutilenglicol, caracterizándose los microorganismos del género *Salmonella* por producir ácidos mixtos a partir de glucosa y no acetoina. A fin de provocar un cambio de color, al emplear los reveladores de la reacción, el organismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido a partir del sustrato hidrocarbonado que emplea. El medio que se utilizó fue caldo rojo de metilo Voges-Proskauer

(RMVP). Se prepararon los tubos de ensayo con 5 ml de caldo RMVP de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Merck), esterilizando en autoclave a 15 libras durante 15 minutos, se inoculó a 37°C durante 72 horas.

- d) Agar sulfato, indol, movilidad (SIM). El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptofano, además del ácido pirúvico y amoníaco (NH₃).

Se prepararon tubos de ensayo con agar sulfato-indol movilidad (SIM), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Merck), esterilizando en autoclave a 15 libras durante 15 minutos. La cepa fue inoculada con asa bacteriológica en forma vertical y se incubó a 37°C entre 18 y 24 horas. Para detectar la producción de indol, al finalizar este período, se añadieron 5 gotas del reactivo de Kovac (alcohol amílico p-dimetil aminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado).

- e) Descarboxilación de los aminoácidos lisina y ornitina . Algunos organismos son capaces de descarboxilar aminoácidos específicos del medio, con liberación de aminas de reacción alcalina y dióxido de carbono como productos. Para esta prueba se utilizaron tubos de ensayo con caldo descarboxilasa de Moeller, se esterilizaron en autoclave a 15 libras durante 15 minutos, agregando posteriormente el aminoácido por filtración con membrana millipore con poro de 0.45 µm para evitar su desnaturalización. Se inoculó una colonia e incubó en anaerobiosis a 37°C de 18 a 24 horas. La anaerobiosis se obtuvo agregando 1 ml de aceite mineral estéril a cada tubo.

- f) Fermentación de los carbohidratos trealosa y ramnosa, se prepararon tubos de ensayo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Merck) con medio base rojo de fenol para fermentación de carbohidratos y se esterilizó en autoclave a 15 libras durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se añadió el carbohidrato esterilizando por filtración con membrana millipore con poro de 0.45 µm para evitar la desnaturalización del mismo. Se inoculó una colonia en el medio con una asa bacteriológica e incubó a 37°C de 18 a 24 horas (Koneman, 1985, Le Minor, 1981, 1984) .

Pruebas serológicas para la identificación de *Salmonella*

Se llevaron a cabo en el Laboratorio de bacteriología del INP y en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales, utilizándose la técnica de aglutinación en tubo. Para lo cual, se emplearon sueros polivalentes en el laboratorio del INP y monovalentes en el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales, llegando a la identificación del serotipo de las *Salmonellas* a través de aglutinación positiva que se obtiene con el suero monovalente, determinándolo posteriormente con ayuda del esquema de Kaufmann-White, que agrupa a todos los serotipos de *Salmonella* en base a su fórmula antigénica (Le Minor, 1981, 1984).

II.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en las cepas aisladas de *S. enteritidis*

Preparación del inóculo.

Las cepas a probar fueron sembradas en 5 ml de caldo (M-H) e incubadas durante 18 horas a 37°C. A partir de este cultivo y por estandarización del inóculo, empleando la comparación turbidimétrica con un tubo de Mac-Farland de 0.5 % se ajustó a una densidad de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ ML) (Lorian, 1986) .

Posteriormente se preparó una dilución 1:20 de este inóculo, esta dilución se realizó con 5.7 ml de solución salina al 0.65 % más 0.3 ml del inóculo, siendo este utilizado en la técnica de microdilución figura 6

Determinación de susceptibilidad; ésta se realizó con el empleo de la técnica de doble microdilución seriada en placa (Lennette, 1982), en la preparación de estas soluciones a partir de las cuales se realizaron diluciones, se considero la potencia del antimicrobiano para matar o inhibir el desarrollo de los microorganismos.

Se utilizó para ello la fórmula recomendada por (Lennette, 1982), la cual permite calcular la cantidad de antimicrobiano que se desea obtener cuadro 2.

Se emplearon cajas estériles para la microdilución (Terasaka Trays) de 96 pocillos figura 7 conteniendo caldo (M-H), con cada una de las diluciones dobles seriadas de los diferentes agentes antimicrobianos. Las cuales fueron preparadas el día del estudio (García, 1986), agregando 50 µl de antimicrobiano recientemente preparado el cual se mezcló con 50 µl de caldo (M-H) .

Finalmente se agregaron 50 µl del inóculo diluido 1:20. Se utilizaron los pocillos 11 y 12 como controles, el pocillo 11 contenía 50 µl de (M-H) mas 50 µl del antimicrobiano (control negativo), el pocillo 12 contenía 50 µl de (M-H) mas 50 µl del inóculo (control positivo).

Las cajas de microdilución se agruparon de 5 en 5, con una vacía sobre las demás, para evitar la evaporación y contaminación, se colocaron dentro de una bolsa de plástico y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Después de este lapso se puede interpretar la (CMI), definida como la menor concentración de antimicrobiano que no presento desarrollo (Jones, 1986) .

Las concentraciones requeridas para inhibir 50% y 90% de las muestras (CMI 50% y CMI 90%) determinó el porcentaje de inhibición acumulativa a varias concentraciones, de cada uno de los agentes antimicrobianos cuadro 6 .

El valor de corte en µg/ml para considerar a una cepas sensible o resistente, se estableció con base a los datos publicados por otros autores (Lennette, 1982, Jones, 1986, Roberts, 1975) y se definió como el valor resultante del promedio de la concentración sérica de un antimicrobiano y de la concentración tisular de éste, haciendo pruebas *in vitro* con microorganismos en dilución en tubo.

III RESULTADOS

Se aislaron un total de 72 cepas, de este total 6 se contaminaron durante su almacenamiento por lo cual se trabajó únicamente con las 66 cepas restantes. De éstas 55 fueron cepas de *Salmonella enteritidis* y 11 de *Salmonella typhi*, de pacientes neonatos y hasta 12 años, de consulta externa y hospitalización del Instituto Nacional de Pediatría de enero a abril de 1989. Los diferentes serotipos que se aislaron se presentan en el cuadro 3 encontrando que *Salmonella typhimurium* fué el más frecuente con un 36.3 % del total de las cepas aisladas, *S. heidelberg* con un 15.1% y *S. agona* con un 9% . Por su parte *S. typhi* tuvo una frecuencia de 16.6%.

El mayor número de cepas se aisló a partir de coprocultivos con una frecuencia del 72 %, hemocultivos 15 %, líquido cefalorraquídeo 8 % y únicamente el 5 % a partir de cultivo de catéteres.

Pruebas metabólicas y serológicas.

Se realizaron un total de 6 pruebas metabólicas, para la identificación de la especie probable, las cuales se presentan en el cuadro 4. Las 2 especies identificadas se lograron diferenciar principalmente por la prueba de descarboxilación de los aminoácidos ornitina y lisina, y por la fermentación de los carbohidratos ramnosa y trealosa.

La identificación serológica de las cepas fué realizada por personal del INP y el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Salubridad y Enfermedades Tropicales, mediante la técnica de aglutinación en placa y en tubo, realizada con sueros polivalentes y monovalentes respectivamente.

Sensibilidad a agentes antimicrobianos

Los resultados de susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos y las CMI 50 % CMI 90% de las cepas aisladas se presentan en los cuadros 5 y 6.

La resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas al ácido nalidíxico fué de 4.5% con una (CMI) que inhibe el desarrollo de las bacterias en un 90 % de 12µg /ml.

La resistencia microbiana hacia la ampicilina fué de 26.2 % con una (CMI 90 %) de 96 µg/ml.

Cefalotina: la resistencia hacia éste antimicrobiano fué de 26.2 % con una (CMI 90%) 96 µg/ml.

Cefoperazona: la resistencia fué de 3 % con una (CMI 90 %) de 3 µg/ml.

Ceftriaxona: se encontró para este antimicrobiano una resistencia de 6% con una (CMI 90 %) de 16 µg/ml.

Cloranfenicol: la resistencia hacia este antimicrobiano fué de 4.5 % con una (CMI 90 %) de 6µg / ml.

Estreptomina: la resistencia hacia este antimicrobiano fué de 29.2 % con una (CMI 90%) de 24 µg/ml.

Gentamicina: la resistencia fué de 6 % con una (CMI 90%) de 3 µg /ml.

Kanamicina: la resistencia fué de 3 % con una (CMI 90 %) de 1.5 µg /ml.

Finalmente con la Tetraciclina se obtuvo una resistencia de 18.1 % con una (CMI 90%) de 24 µg/ml.

Es de hacer notar que las cepas presentaron un porcentaje de resistencia bajo para kanamicina y cefoperazona y se observa asimismo como estos antimicrobianos inhiben un mayor porcentaje de cepas con una (CMI) baja cuadros 5 y 6 .

En el cuadro 6 se puede observar la eficiencia de las cefalosporinas como agentes antimicrobianos para inhibir el desarrollo de *Salmonella enteritidis*, ya que a una concentración baja la ceftriaxona y cefoperazona inhiben a un alto porcentaje de cepas, sin embargo la cefalotina requiere una concentración más alta para inhibir un alto porcentaje de cepas; ésto se debe a que un porcentaje considerable de cepas fueron resistentes a esta cefalosporina.

En las figuras 8, 9, 10 y 11 se observa que la ampicilina, la estreptomycin, cloranfenicol, tetraciclina y el ácido nalidíxico tienen una capacidad similar.

IV DISCUSION

***S. typhimurium* fue el serotipo que se aislo con mayor frecuencia (36.3%) a este respecto Martínez y col. (1986), señalan también haber aislado en cuatro hospitales de la Ciudad de México (1978-1979) a *S. typhimurium* con mayor frecuencia que otras cepas, asimismo en un estudio González y col. (1985) realizado entre 1979 y 1981 en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México se encontró que *S. typhimurium* fue el serotipo aislado con mayor frecuencia (45.7%), por otra parte estudios realizados en otros países coinciden en señalar, que esta cepas se encuentra con mayor frecuencia en muestras tomadas de humanos.**

El hecho de que este serotipo se aise con mayor frecuencia de los hospitales de México, pone de manifiesto el grave problema de salud pública que existe en nuestro país, pues este serotipo a causado conjuntamente con otros serotipos brotes epidémicos como los ocurridos en 1974, 1975 y 1978.

La especie *S. typhi* ocupó el segundo lugar en frecuencia de aislamiento (16.6%). Este resultado es importante, si se tiene en cuenta que en 1972 fue el causante de una epidemia en nuestro país.

Como era de esperarse en coprocultivos se realizó el mayor porcentaje de aislamiento de los serotipos de este agente patógeno, pues infecta preferentemente el tracto digestivo y solamente cuando el grado de infección es grave invade tejido sanguíneo y líquido cefalorraquídeo.

Con relación a la resistencia se tiene que las cepas aisladas de *Salmonella* fueron considerablemente resistentes a la estreptomocina (29.2%), ampicilina (26.2%), cefalotina (26.2%) y tetraciclina (18.1%), como puede observarse en el cuadro 5.

Es importante señalar que es posible establecer una correlación entre los resultados de resistencia a ampicilina detectados en este trabajo y los resultados obtenidos en la caracterización de plásmidos de las mismas cepas hechas por Palafox, 1990, donde se aislaron plásmidos que confieren resistencia a la ampicilina y se hizo la transferencia de éstos a *E. coli* K12, por el proceso de conjugación, identificando un plásmido conjugativo con peso molecular de 20.5×10^6 D en las cepas de *S. derby*, *S. heidelberg* y *S. typhimurium*, que permiten la resistencia a la ampicilina.

En otros estudios se señalan porcentajes de resistencia a la estreptomocina mayores, Bessudo (1973) informa haber encontrado una resistencia a este antibiótico del 88%. Kupersztoch (1978, 1981) del 64% y 45% respectivamente. Sin embargo en otras regiones del mundo como en Hong Kong, se encontró un porcentaje de resistencia menor a este antimicrobiano Ling (1987).

En cuanto al porcentaje de resistencia hacia la ampicilina, Kupersztoch (1978) señala haber encontrado una resistencia del 61% en un estudio realizado en México, este porcentaje es considerablemente mayor al aquí registrado. Pérez, (1986), Mendoza y col. (1986) encontraron porcentajes de resistencia hacia este antibiótico del 33% y 27.63%, respectivamente de muestras tomadas en diferentes hospitales de México, entre el valor de estos porcentajes se encuentra el del presente trabajo (26.2%).

En Liberia Africa un estudio realizado por Hadfiel (1985), encontró un porcentaje de resistencia hacia la ampicilina del 92.3%, un valor de resistencia que sobrepasa el triple del resultado de este estudio.

Respecto al porcentaje de resistencia que presentaron los serotipos de *Salmonella* hacia la cefalotina (26.2), cabe mencionar que otros estudios realizados en el país señalan valores de resistencia, muy variables que van desde el 0% Bessudo, (1973), hasta el 56% Kupersztoch, (1978).

Por otra parte en Africa Hadfiel (1985) encontró un porcentaje de resistencia del 0%, mientras que en Japón Yamamoto (1985), señala una resistencia del 25%, resultado que es muy similar al obtenido en el INP.

Otro valor de resistencia que presentaron los serotipos de *Salmonella* fue hacia la tetraciclina (18.1%). Bessudo (1973) señala un porcentaje de resistencia del 88% hacia este antibiótico, en muestras tomadas de diferentes instituciones hospitalarias de México, y Kupersztuch (1978) en estudios posteriores realizados también en el país reportan una resistencia del 47%.

En Liberia Africa el porcentaje de resistencia hacia este antimicrobiano es del 94.1% (Hadfiel, 1985).

La resistencia observada en los serotipos de *Salmonella* hacia la ceftriaxona, gentamicina, ácido nalidixico, cloranfenicol, cefoperazona y kanamicina tuvo un rango del 3 al 6%, estos valores son bajos.

De acuerdo con esto Bessudo (1973), señala un porcentaje de resistencia del 0% para la gentamicina. Sin embargo Kupersztuch (1978) reporta un porcentaje del 39.9% para este antibiótico. La resistencia para el ácido nalidixico va del 0% Bessudo (1973) al 98.3% Kupersztuch (1978). Para el cloranfenicol los rangos de resistencia observados van del 4.6% (Solórzano, 1987) a 88% (Bassudo 1973).

El porcentaje de resistencia hacia la cefoperazona obtenido en este estudio fue de 3% es muy bajo, comparado con el encontrado (38.4%) en otro estudio realizado en México por Pérez (1986).

Finalmente para la kanamicina otros estudios señalan porcentajes de resistencia de 0% Bessudo (1973) al 44% (Kupersztuch 1978).

Como puede observarse los porcentajes de resistencia de *Salmonella* hacia los antimicrobianos tanto en estudios realizados en México, como en otros países del mundo presentan grandes variaciones.

Estas variaciones están dadas por el tiempo que lleva en uso el antimicrobiano, por ejemplo los antibióticos de tercera generación (cefalosporinas) cuyo uso se puede considerar reciente presenta resistencias menores, comparadas con los de estreptomina, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina, antimicrobianos que se empezaron a administrar en la década de los 40, Aquí la excepción la constituye la cefalotina (26.2%).

Otro de los factores que determino el valor de resistencia hacia los antimicrobianos es la forma en que se administran: en países subdesarrollados la automedicación es una práctica común que influye en los porcentajes de resistencia.

Por otra parte el consumo de carne proveniente de animales que son tratados con antimicrobianos, también influye sobre la resistencia hacia los antimicrobianos.

El hecho de que los países en subdesarrollo registren los porcentajes de resistencia más altos, pone de manifiesto que este problema rebasa los límites de un problema de salud pública, para situarlo en un plano social, es decir, son las condiciones de pobreza, que no permiten que la población viva en mejores condiciones sanitarias, y que determinan que sea blanco fácil no solo de infecciones ocasionadas por *Salmonella*, siendo también, de otros agentes infecciosos. Sin embargo, existe la posibilidad de que a través de campañas públicas, en las que se convenza a la población de hervir el agua para beber, de no consumir alimentos callejeros y el dar mayor saneamiento al medio en que habitan, podría detener este tipo de infecciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se recomendaría administrar a los pacientes del INP, con infecciones por *Salmonella*, los siguientes antibióticos: kanamicina, gentamicina y cefoperazona, debido a que estos antibióticos fueron los más eficaces para inhibir el desarrollo de los serotipos aislados, sin embargo en la actualidad el tratamiento se basa en administrar, ampicilina o cloranfenicol o trimetoprim sulfametoxazol o una cefalosporina a los que la bacteria resulte sensible, de ahí la importancia del antibiograma.

Finalmente se recomienda la creación de un comité técnico internacional que controle la eficacia de los diferentes antibióticos aplicados, es decir, que no permita su uso indiscriminado y que se descarte el uso de aquellos que presentaron un porcentaje de resistencia alto.

V CONCLUSIONES

En el INP se aislaron con mayor frecuencia los serotipos de *S. typhimurium*, *S. heidelberg* y la especie *S. typhi*.

Los serotipos de *Salmonella* estudiados en el INP presentaron porcentajes de resistencia considerables hacia la estreptomocina, ampicilina, cefalotina y tetraciclina.

Se recomienda administrar en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Salmonella* los siguientes antibióticos: kanamicina, cefoperazona y cloranfenicol.

Se recomienda la creación de un comité técnico interdisciplinario a nivel internacional que evalúe la resistencia de los antimicrobianos, quién sería el encargado de controlar la aplicación de estos.

Se sugiere realizar estudios periódicos que incluyan pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en especial dentro de instituciones públicas hospitalarias, a fin de llevar un control interno de la eficacia de estos fármacos.

Cuadro I Características metabólicas de *Salmonella*.

Características	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. cholerae-suis</i>
Fermentación de lactosa	-	-	-
Producción de gas	+	-	+
Producción de ácido sulfhídrico	+	+	+
Producción de indol	-	-	-
Movilidad	+	+	+
Utilización del citrato como fuente de carbono	+	-	-
Fermentación de ramnosa	+	-	+
Fermentación de trealosa	+	+	-
Descarboxilación de lisina	+	-	+
Descarboxilación de ornitina	-	-	+
Rojo de metilo	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-

+ Positivo en el 100 % de las cepas

- Negativo en el 100 % de las cepas

Cuadro 2 Solventes y diluyentes para preparar 10 ml de una solución stock de antimicrobianos a una concentración de 5120 µg/ml

Antimicrobiano	Potencia	Solvente	Diluyentes	µg/ml
Ampicilina	853.0	Hidróxido de sodio 1 N	Agua	60.02
Cloranfenicol	1000	Etanol	Agua	51.2
Ceftriaxona	1000	Agua	Agua	51.2
Cefoperazona	1000	Agua	Agua	51.2
Kanamicina	794.0	Agua	Agua	64.4
Ac. Nalidixico	990.0	Hidróxido de sodio 0.1 M	Agua	51.7
Gentamicina	619.0	Agua	Agua	82.7
Cefalotina	1000	Agua	Agua	51.2
Tetraciclina	114.5	Etanol	Agua	44.7
Estreptomina	1000	Agua	Agua	51.2

Cuadro 3 Serotipos de *Salmonella enteritidis*, aislados de enero a abril de 1989 en el Instituto Nacional de Pediatría

Serotipos	No. de cepas	%
<i>Salmonella typhimurium</i>	24	36.3
<i>Salmonella typhi</i> (1)	11	16.6
<i>Salmonella heidelberg</i>	10	15.1
<i>Salmonella agona</i>	6	9
<i>Salmonella derby</i>	4	6
<i>Salmonella shubra</i>	2	3
<i>Salmonella infantis</i>	2	3
<i>Salmonella muenchen</i>	2	3
<i>Salmonella braenderup</i>	2	3
<i>Salmonella kiambu</i>	2	3
<i>Salmonella indiana</i>	1	1.5
TOTAL	66	100%

(1) especie *Salmonella typhi*

Cuadro 4 Pruebas metabólicas de las cepas aisladas

Prueba	Característica	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi</i>
Agar Kilgler	Fermentación de lactosa	-	-
	Producción de gas	+	-
	Producción de ac. sulfhídrico	+	+
Agar sulfhídrico indol movilidad	Producción de indol	-	-
	Movilidad	+	+
Citrato de Simmons	Utilización de citrato como fuente de carbono	+	-
Fermentación de carbohidratos	Ramnosa	+	-
	Trealosa	+	+
Descarboxilación de aminoácidos	Lisina	+	-
	Omitina	-	-
Rojo de metilo Voges Proskauer	Producción de ácidos mixtos	+	+
		-	-

+ Positivo en el 100% de las cepas

- Negativo en el 100% de las cepas

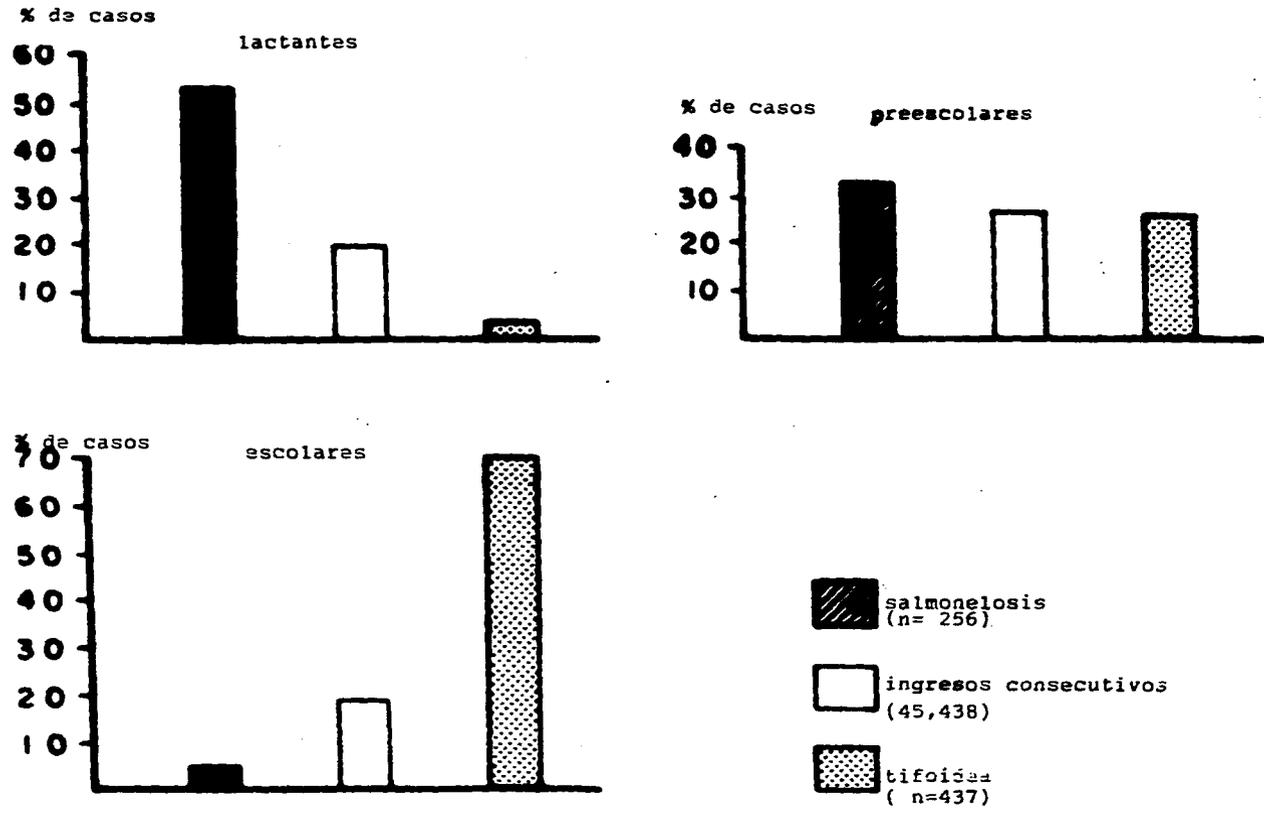
Cuadro 8 Porcentaje de la susceptibilidad y resistencia de Salmonella, aisladas de enero a abril de 1989 en el Instituto Nacional de Pediatría

Antimicrobiano	Porcentaje de resistencia	Porcentaje de susceptibilidad
Estreptomina	29.2	75.5
Ampicilina	26.2	71.2
Cefalotina	26.2	71.2
Tetraciclina	18.1	81.8
Ceftriaxona	6	93.9
Gentamicina	6	93.9
Acido Nalidixico	4.5	95.4
Cloranfenicol	4.5	95.4
Cefoperazona	3	96.9
Kanamicina	3	96.9

Cuadro 6 Concentración mínima inhibitoria (CMI) del 50 y 90% de las cepas de *Salmonella enteritidis*

Antimicrobiano	CMI 50%	CMI 90 %	Valor de corte
Acido Nalidíxico	1.5 µg/ml	12 µg/ml	32 µg/ml
Ampicilina	3 µg/ml	96 µg/ml	32 µg/ml
Cefalotina	3 µg/ml	96 µg/ml	32 µg/ml
Cefoperazona	0.25µg/ml	3 µg/ml	64 µg/ml
Ceftriaxona	0.5 µg/ml	16 µg/ml	64 µg/ml
Cloranfenicol	0.62 µg/ml	6 µg/ml	25 µg/ml
Estreptomicina	2.5 µg/ml	24 µg/ml	15 µg/ml
Gentamicina	0.25 µg/ml	3 µg/ml	8 µg/ml
Kanamicina	0.25 µg/ml	1.5 µg/ml	25 µg/ml
Tetraciclina	0.25 µg/ml	24 µg/ml	16 µg/ml

Fig. 1 Incidencia por edades, de salmonelosis y fiebre tifoidea en niños, registrada en el Hospital Infantil de México en un total de 45,438 ingresos consecutivos.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

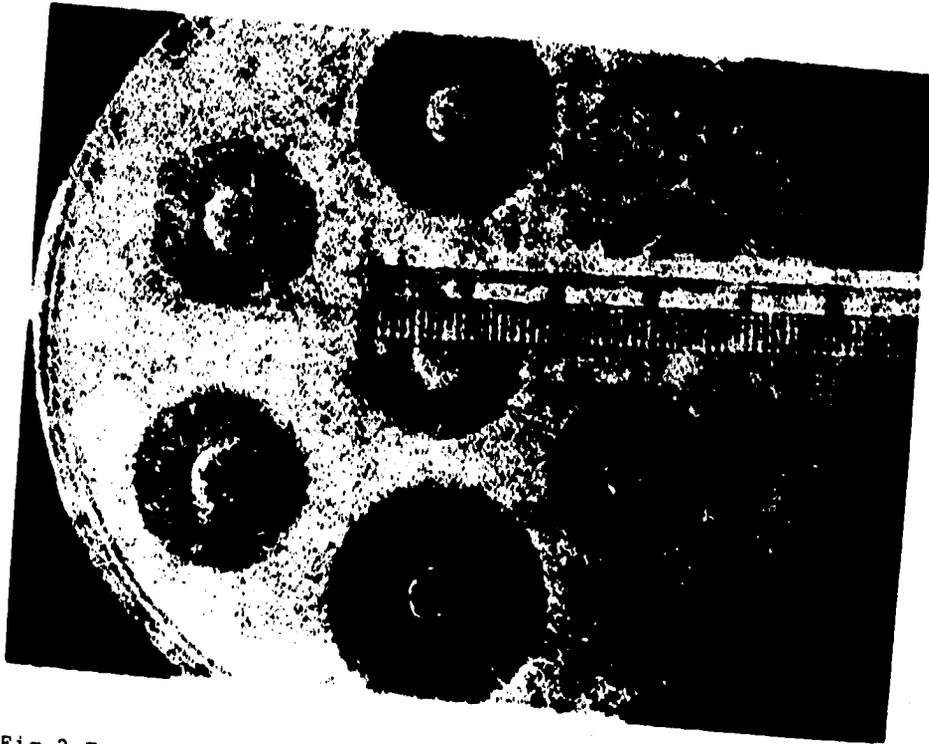


Fig 2 Zonas de inhibición de los diferentes discos
de antimicrobianos.

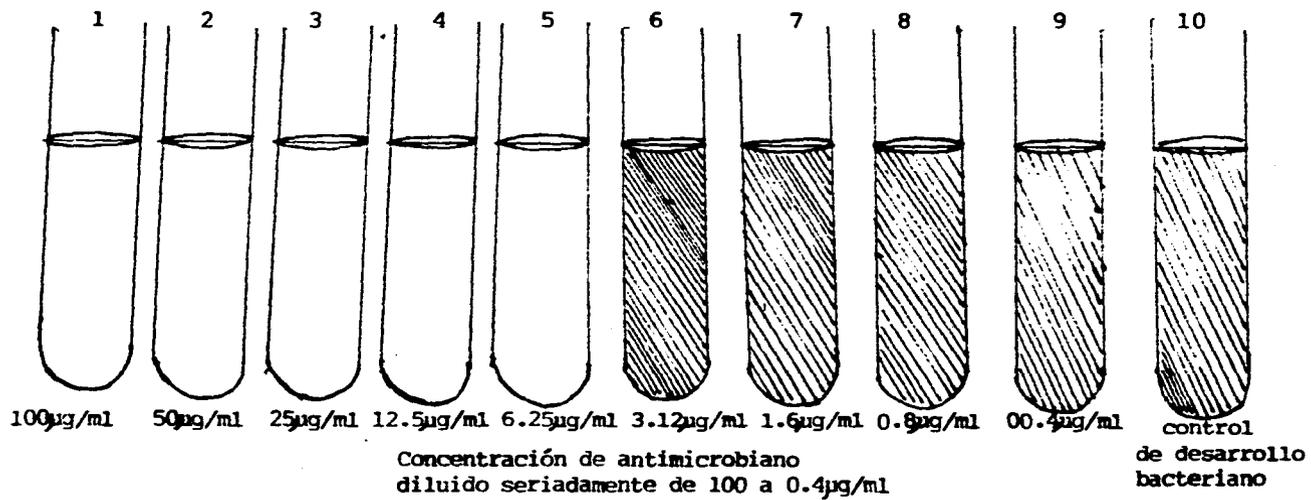


Fig. 3 Presencia de turbidez del tubo 6 al 10, lo cual indica que hay desarrollo de los microorganismos.

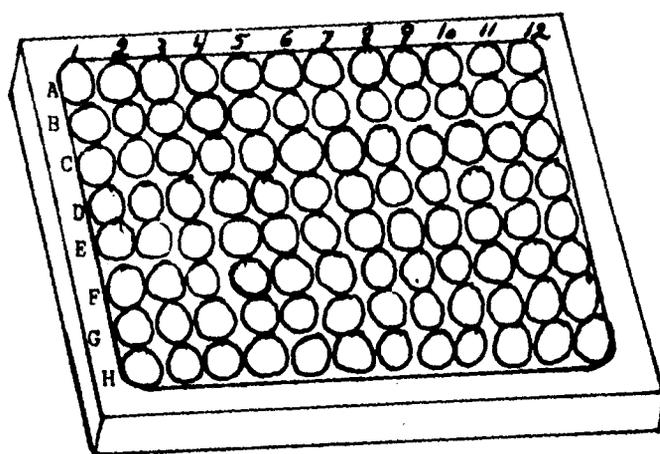


Fig. 4 Caja para microdilución (Terasaka Trays).

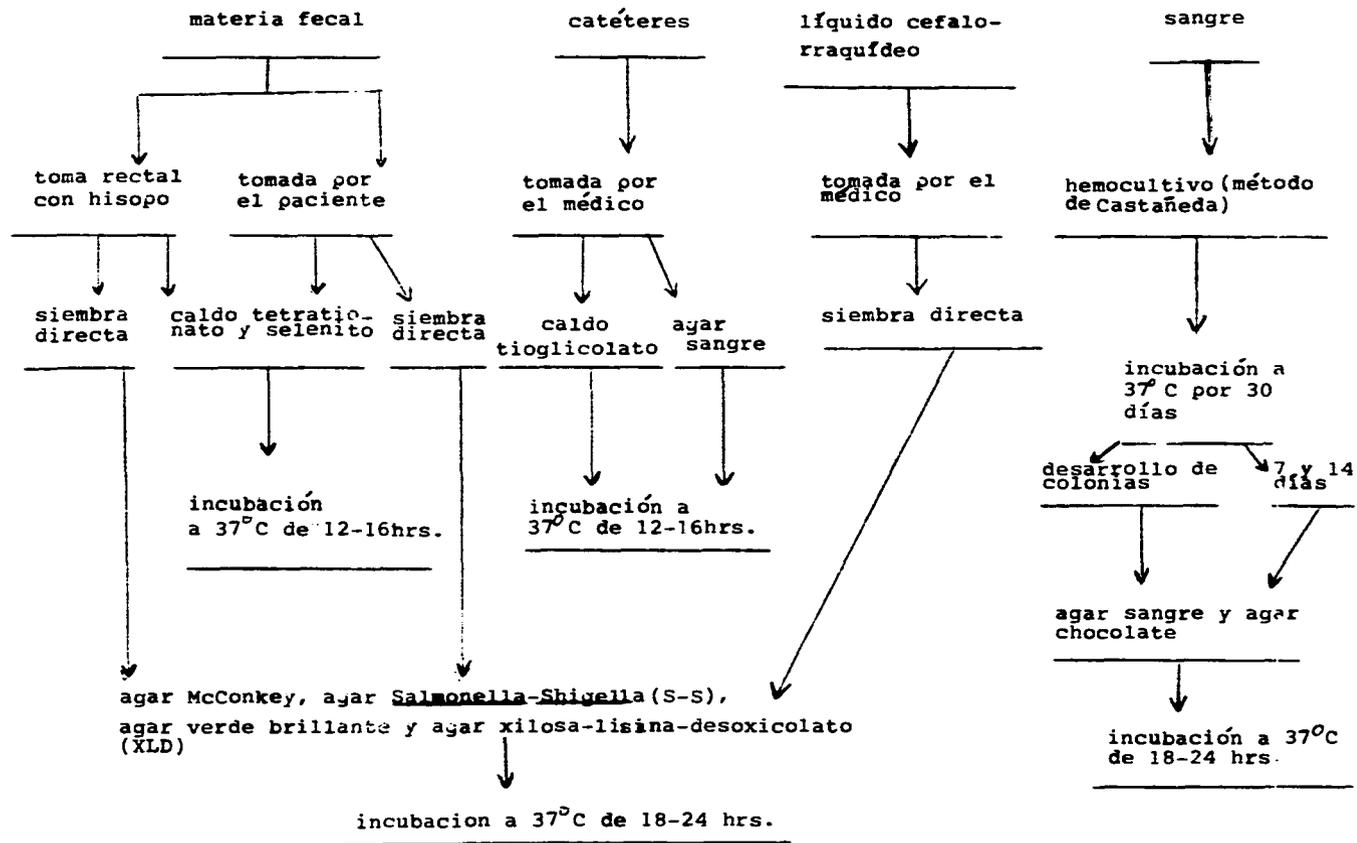


Fig. 5 Método para el aislamiento de cepas del género *Salmonella*

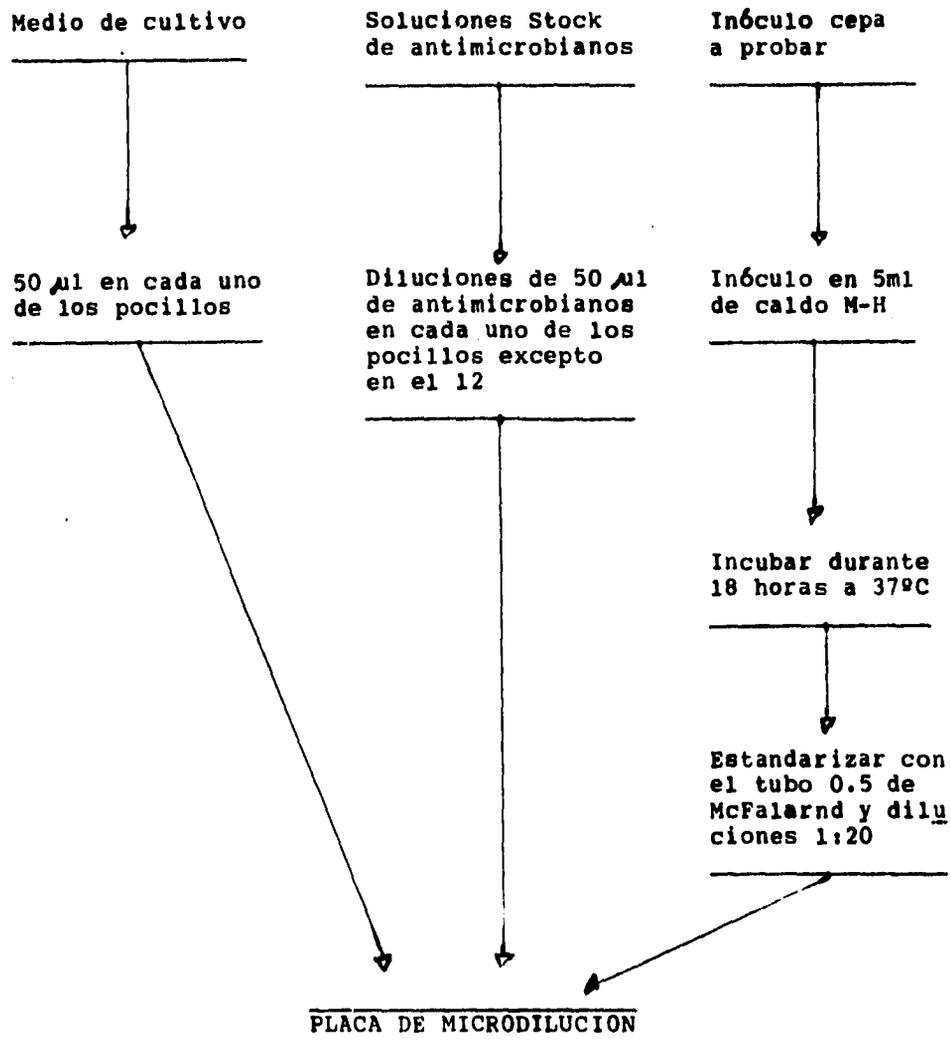


Fig. 6 Técnica de Microdilución

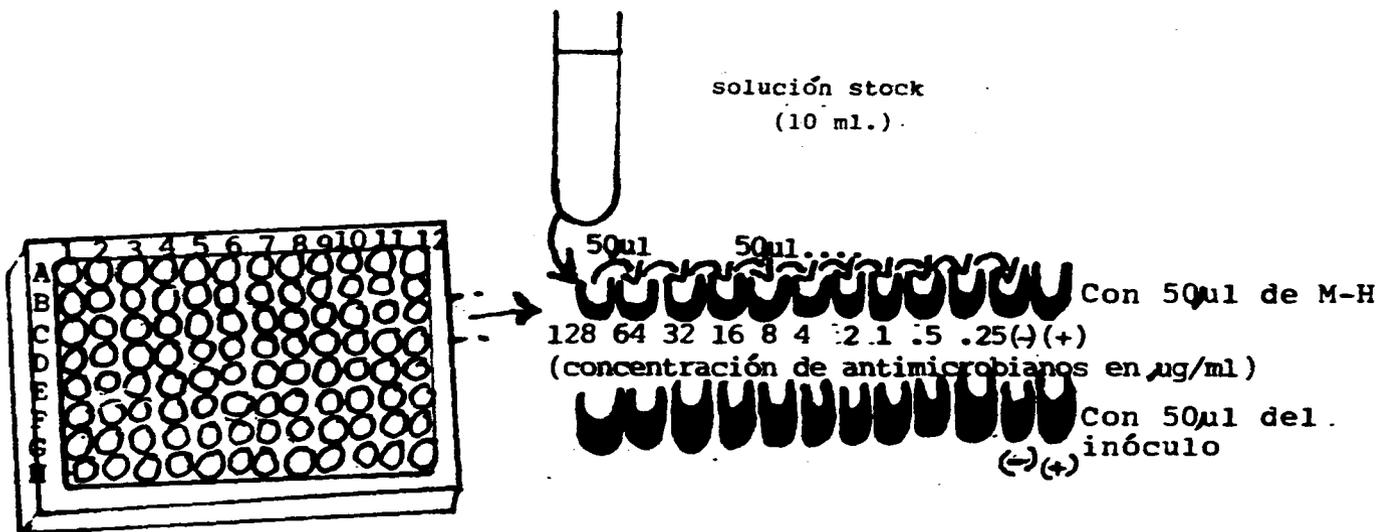


Fig. 7. Diluciones dobles seriadas de los diferentes antimicrobianos.

Fig. 8 Concentración de Antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) % acumulativo de cepas de *Salmonella enteritidis*

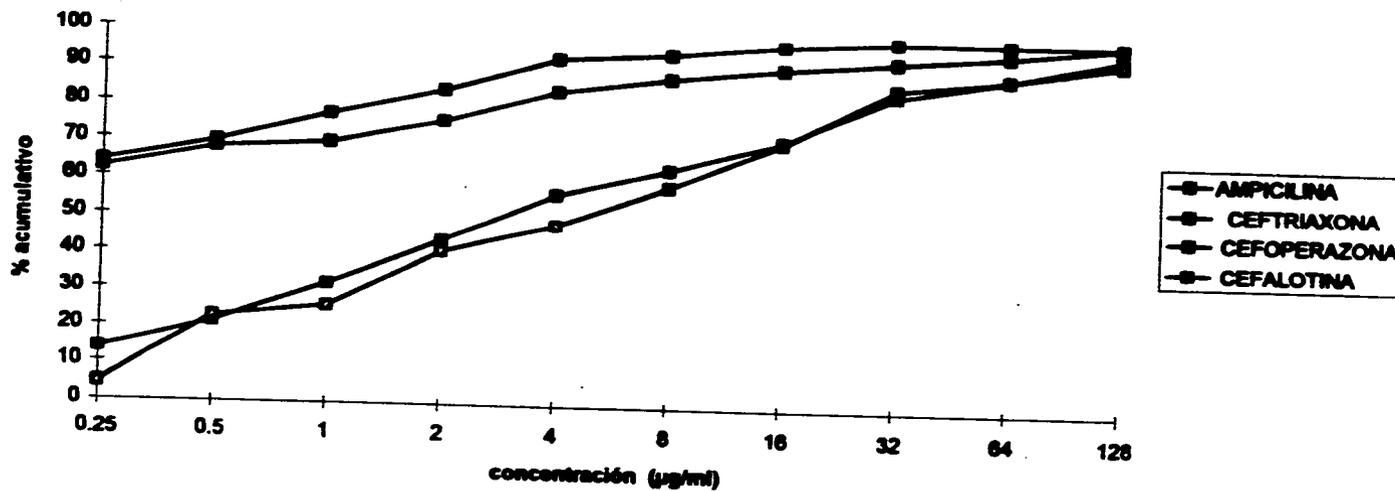


Fig. 9 Concentración de Antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) % acumulativo de cepas de *Salmonella enteritidis*

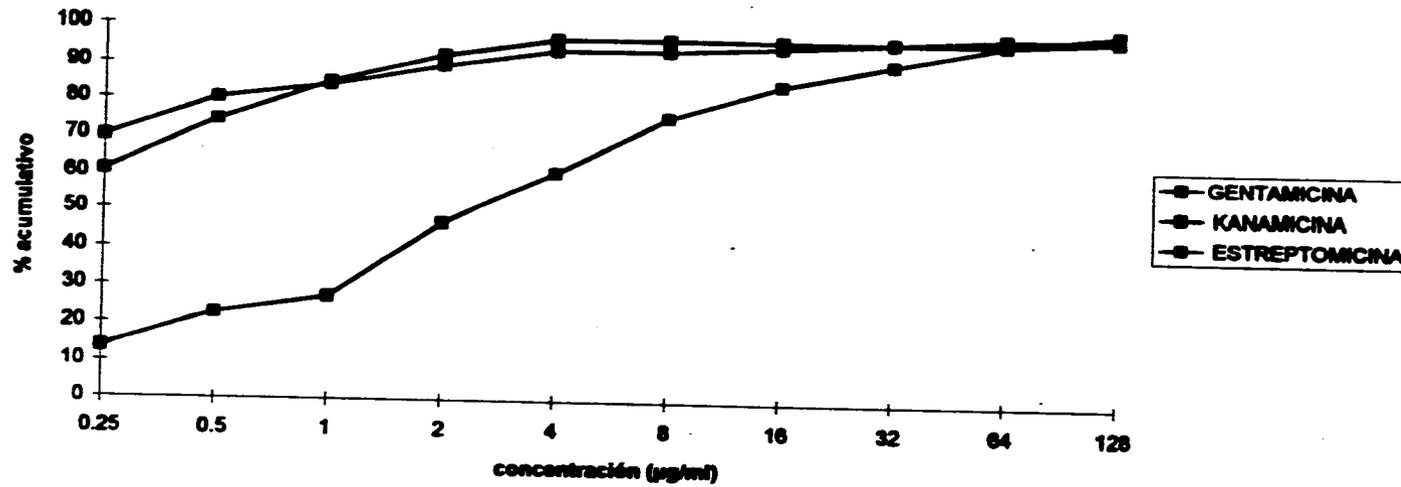


Fig. 10 Concentración de Antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) % acumulativo de cepas de *Salmonella enteritidis*

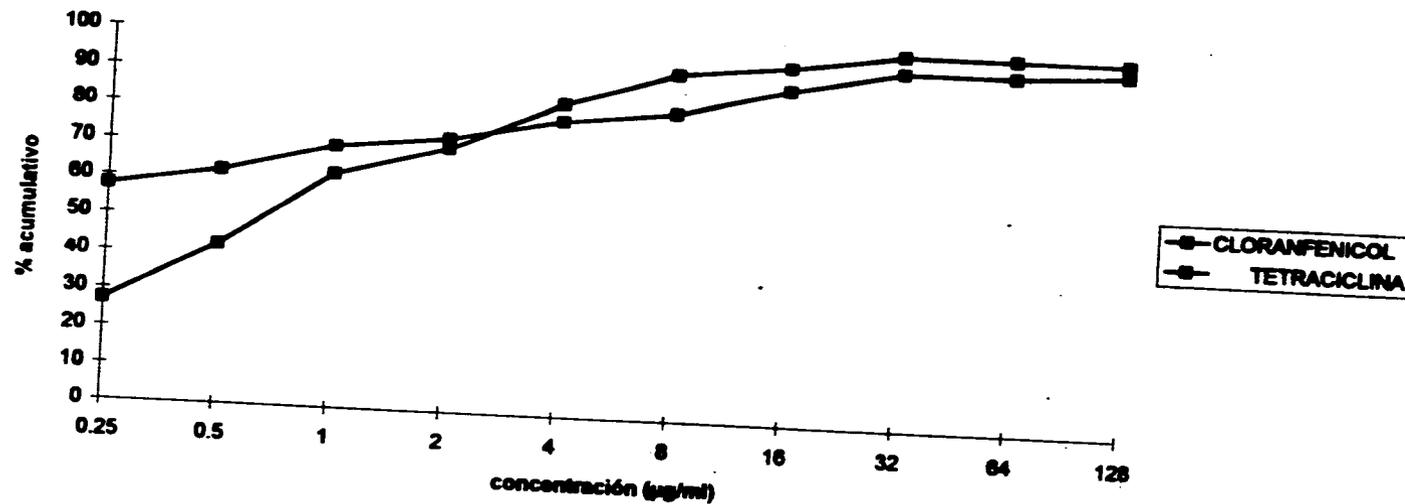
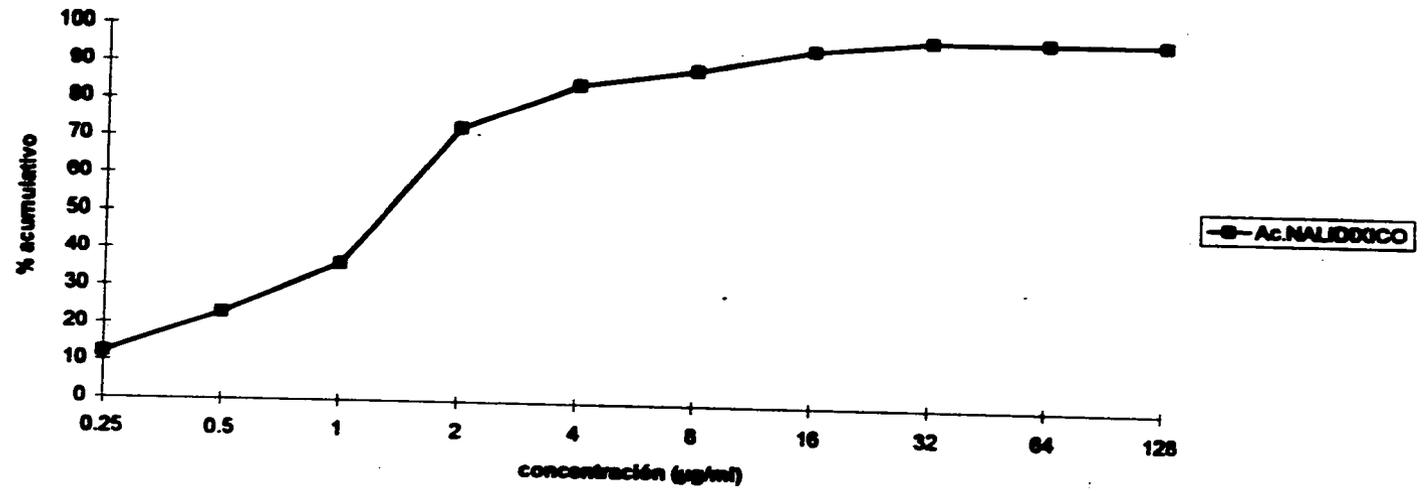


Fig. 11 Concentración de Antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) % acumulativo de cepas de *Salmonella enteritidis*



VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bessudo D, Olarte J, Mendoza H, Galindo E, Carrillo J, Gutiérrez T. y Kumate. (1973). Aislamiento de *S. typhi* resistentes a altas concentraciones de cloranfenicol. Bol of Sn Panm 64 8: 1-4
- 2.- Broda P. (1979). Plasmid USA Freeman and Co 1-124
- 3.- Cecil. (1985). Tratado de Medicina Interna. Ila. ed. México Ed. Interamericana. vol.1: 1572-1577.
- 4.- Claus S. (1987). Manual de terapéutica a antimicrobianos. Barcelona. Ed. Salvat 1-333, 413-419.
- 5.- Cohen M. y Tauxe R. (1986). Drug resistat *Salmonella* in the United States, and epidemiologic perspective. Scoemca 214: 964-969
- 6.- Cohen S, Willie B, Sooka A y Koornhof H. (1987). Bacteremia caused by lactose-fermenting, multiply resist *Salmonella typhi* in patient recovering form typhoid fever. J. Clin Microbiol 25 (8): 1516-1518.
- 7.- Cordano A M. y Virgilio R. (1986). Tifoidea en Chile susceptibilidad de *Salmonella typhi* a cloranfenicol y otras drogas Rev. Latmer Microbiol 28: 15-22.
- 8.- Courbot G, Wachsmuth Y, Bouquety J, Siophatis M, Cameron D and Georges A. (1990). Cluster of antibiotic-resistant *Salmonella enteritidis* infections in the Central Africa. J. Clin Microbiol 28 (4): 771-773.
- 9.- Cherubin C, H K, Smith D, Ellie and Goldstein. (1986). Cephalosporin therapy for Salmonellosis. Questions of efficacy and cross resistance with ampicillin. Arch Intern Med 146 (11):2149-2152
- 10.- Escamilla J, Kilpatrick M y Flores U. (1986). Spurious sulfamethoxazole trimethoprim resistance of *Salmonella typhi*. J. Clin Microbiol 23 (1): 205-206.
- 11.- Fedoroff N. (1976). Elementos genéticos transponibles del maíz. Scientific American 239 (1) 45-55.
- 12.- García G, Díaz O y Sanchez S. (1986). Sensibilidad *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*. Infectología 6: 94-100.
- 13.- González C, Becerril P, Mendoza P y Bessudo D. (1985). Serotipos de *Salmonella* identificados en México entre 1974-1981. Bol of San Panm 99 (1): 34-39.

- 14.- Gravan L, Barry A. (1976). Procedimiento para pruebas de microdilución. Manual de microbiología clínica. Washington D.C. 556-560.
- 15.- Hadfiel T, Moswon M y Wachsmuth I. (1985). An outbreak of antibiotic resistant *Salmonella enteritidis* in Liberia, west Africa. *J. Infect Dis* 151 (5): 790-795.
- 16.- Hardy K. (1981). Bacterial plasmid. Switzerland: Series Editors, 1-79.
- 17.- Jolik W, Willett H, Amos D and Zinsser. (1987). Microbiology. Panamericana. Buenos Aires 712-717.
- 18.- Jones R N. (1986). Standars and advisory activites antimicrob. Newsletter 3: 81-86.
- 19.- Koneman E. (1985). Diagnóstico microbiológico. México: Medica Panamericana, 152-185, 380-396
- 20.- Krieg N Holt J. (1984). Bergey's manual of sistematic bacteriology. U.S.A.; Williams and Wilking, vol.1: 414-416.
- 21.- Kumate J. (1988). Salmonelosis. En Torregrosa F.L. Olarte J. Enfermedades diarreicas en niños. 9a.- Edición México; Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 171-182.
- 22.- Kupersztoch. (1981). Antibiotic resistance of gram negative bacteria in Mexico; relation to drug Molecular Biology Pathogenicity and Ecology of bacterial Plasmids; Edited by Stuart B., et al. Plenum. Publishigf Corporation 529-537.
- 23.- Kupersztoch. (1978). Resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* y *Shigella*. México; Publicación interna. Departamento de Genética y Biología molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. 1-4.
- 24.- Le Minor L. (1981). The genus *Salmonella*. In Starr M P. The prokaryotes: a handbook, isonation and identification of bacteria. USA.: Springer Verlag Berlin, vol.2: 1148-1158.
- 25.- Le Minor L. (1984). *Salmonella* En: Krieg N Holt G.J. Bergey's manual of sistematic bacteriology U.S.A.: Williams and Wilkings. vol. 1 427-458.
- 26.- Lennette E.H. (1985). Manual of clinical microbiology. 143-153, 263-277, 350-372.
- 27.- Ling J. Chau. (1987). *Salmonella* serotypes and incidence of multiphy-resistant *Salmonella* isolated from patients, in Hong Kong from 1973-1982. *Epidem Infec* 99: 295-306.

- 28.- Ling J Chau P. (1987). Incidence of plasmids in multiply-resistant isolates from diarrhoeal patients in Hong Kong from 1973-1982. *Epidem Inf* 99:307-321.
- 29.- Lorian V. (1986). *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: the Williams and Wilkins Co. 1-23.
- 30.- McFadin J F. (1979). *Biochemical test for identification of medical bacteria*. Baltimore: Williams and Wilkins I-14
- 31.- Martínez S, Alvarez G y Gómez E. (1986). Frequency of four classes of tetracycline resistance determinants in *Salmonella* and *Shigella* spp. clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 630-631
- 32.- Meadow W, Shneider H and Been. (1985). *Salmonella enteritidis* bacteremia in Childhood. *J. Infect Dis.* 152 (1): 185-189
- 33.- Martínez H. (1978). 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 83-90.
- 34.- Mendoza M, Chacón L y Lara G. (1986). Aislamientos resistentes a antibióticos. *Infectología* 6 (12): 519-525
- 35.- Novik R. (1980). Plasmid. *Scientific American*. 243 (6): 47-59..
- 36.- Olarte J y Galindo E. (1973). Naturaleza e importancia de la resistencia a múltiples antibióticos (factores R) encontrados en cepas epidémicas de *Shigella* y *Salmonella typhi* aisladas en México. *Gac Med México* 105: 123-133.
- 37.- Olarte J. (1978). Quimioterapia de las infecciones y resistencia bacteriana. *Bol Med Hosp Infant Méx* 35: 295-309.
- 38.- Palafox G L. (1990). Caracterización de plásmidos en algunos serotipos de *Salmonella enteritidis*, aislados en el Instituto Nacional de Pediatría. Tesis profesional Facultad de Ciencias México 36-43.
- 39.- Parrilla C, Saldade O y Nicoli M. (1978). Incidencia de *Salmonella* en productos cárneos. *Salud Pública de México* 20 (5): 569-574
- 40.- Pérez I y Hernández A. (1985). Susceptibilidad de *Salmonella* y *Shigella* a los antimicrobianos en el Hospital de México 1979-1980 *Bol Med Hosp Infant Mex* 42 (8) 448-493.
- 41.- Platt J, Brown J and Munro D. (1986). The distribution of plasmids among a representative collection of scottish strains of *Salmonella*. *J Hyg Camb* 97: 199-205.

- 42.- Riley L, Mitchell, Cohen J, Seals M, Birkness K, Hargrett N, Stanley and Feldman. (1984). Importance of Host Factors in Human Salmonellosis caused by multiresistant strains of *Salmonella*. J. Infect Dis vol 149 (6): 878-883.
- 43.- Robert A y Viscont J. (1975). The rational and irrational used of sistematic antimicrobial drugs. Am J. Epidemical. 101: 495.
- 44.- Sanchez L. R. (1981). Prevalencia de portadores de *Salmonella* y *Shigella* en manipuladores de alimentos. Salud Pública de México 23 (4): 353-364.
- 45.- Solorzano F, Leafos B y Guiscafre H. (1987). Resistencia antimicrobiana actual de *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* y *Shigella* sp. Bol Med Hosp Infant Mex 44 (8): 448-455.
- 46.- Sidahmed H. (1985). Sensitive of *Salmonella* and *Shigella* to antibiotics and chemotherapeutic agents in Sudan. J. trop Med Hyg 88 (4): 243-247.
- 47.- Spika S.J. (1978). Choramphenicol resistant *Salmonella newport* traced throught hamburger to diary farms. N Eng J Med 316 (10): 565-569.
- 48.- Standars and advospny activites. (1988). Antimicrob. Newaletter, 5 (2) 2-3.
- 49.- Starr M.P. (1981). The prokaryotes: a hadbook on habitats isolation and identification of bacteria U.S.A. Spring Verlag vol. 2: 1114-1115.
- 50.- Takeuchi A. (1975). Electron Microscope Observations on Penetration of the Gut Epithelial Barrier by *Salmonella typhimurium*. En Schessinger D. In Microbiology 174-181.
- 51.- Thron G. (1979). Medicina Interna de Harrison. Prensa Medica Mexicana, vol. 1: 983-992.
- 52.- Viscaya A y Rodriguez M. (1979). 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 21 (5): 527-532.
- 53.- Yamamoto L y Asthon M. (1988). *Salmonella* infection in infantis in Hawaii. Pediatr Infect Dis J 7 (1): 48-54