

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DISTRIBUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA
INHIBITORIA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CEPAS
IDENTIFICADAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE *Chirotoma*
humboldtianum

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MAGDALENA PERCHES TREVIÑO

DIRECTORA DE TESIS: M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. CAMPUS



El verdadero propósito de la educación, no es que el hombre culto pueda ganar dinero o conseguir un puesto elevado, ni siquiera el propio engrandecimiento.

Su fin es ensanchar el espíritu, ampliar la mente, estimular la percepción y capacidad de asombro, dar una visión y comprensión nuevas del mundo, excitar el intelecto y despertar las facultades dormidas para satisfacción del que las posee.

Taylor Caldwell

*Dedico este trabajo a mis queridos
maestros*

*La M. en C. Gloria Luz Paniagua
Contreras*

El M. en C. Eric Monroy Pérez

*A quienes agradezco de todo corazón, la
oportunidad que me dieron, así como su
continuo apoyo académico y sobretodo su
maravillosa amistad.*

AGRADECIMIENTOS

A mi honorable y hermosa Escuela, La Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación profesional que me brindó, así como el apoyo académico, de materiales y de laboratorio para la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Vaca, por su amistad, su apoyo académico, sus buenas ideas y sus incansables comentarios constructivos.

Al M. en C. Rodolfo Cárdenas por su siempre amable disposición para ayudarme, su acertado consejo académico y por supuesto, por proporcionarme los peces para mi trabajo.

A la Biol. Susana González por su constante apoyo, amistad y cariño.

A la Sra. Paulina Alvarado por su amistad y su tan importante y necesaria colaboración en el laboratorio.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	32
MATERIAL Y METODOS	33
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	86
APÉNDICE	87
BIBLIOGRAFÍA	88

IZT.

RESUMEN

La alimentación en la actualidad constituye uno de los principales problemas al que se enfrenta el país, particularmente las zonas rurales son las más afectadas, entre ellas, la población ejidal que se encuentra establecida en las cercanías del embalse de San Felipe Tiacaque, en el municipio de Ixtlahuaca, Estado de México. Por lo que la utilización del "charal" *Chirostoma humboldtianum* como recurso alimenticio podría ser una alternativa, sin embargo, también podría ocasionar problemas de salud, toda vez, que se ha reportado que especies de *Aeromonas sp.* se encuentran de manera normal en el tracto digestivo de algunas especies de peces. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las bacterias comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum* y determinar la CMI a 7 antibióticos β -lactámicos por el método de dilución en placa. El 65.5% de las bacterias identificadas del tracto digestivo de *C. humboldtianum* correspondió a *Aeromonas hydrophila*, 17.2 % a *Hafnia alvei*, 6.8% a *Enterobacter cloacae*, 3.5% a *Enterobacter amnigenus*, 3.5% a *Citrobacter freundii* y 3.5% al género *Klebsiella sp.* El 100% de las cepas fue productora de β -lactamasas. Las cepas analizadas de *Aeromonas hydrophila* mostraron una alta resistencia a la penicilina, ampicilina, dicloxacilina y cefalotina, mientras que la cefuroxima y la combinación del inhibidor de β -lactamasas sulbactam más ampicilina fueron los antimicrobianos más eficaces. La combinación del inhibidor sulbactam más ampicilina fue el antibiótico más eficaz contra las cepas pertenecientes a la especie de *Hafnia alvei*, así como las pertenecientes al grupo de las Enterobacterias. A partir de los resultados encontrados en este estudio podemos concluir que está ocurriendo un incremento en la selección de bacterias resistentes a los nuevos antibióticos, debido principalmente a la producción de β -lactamasas, por lo que resulta importante analizar e identificar en estudios posteriores las diferentes clases de estas enzimas.

INTRODUCCIÓN

Contaminación de los mantos acuíferos en México

En un estudio realizado por la Semarnat (1999) sobre 393 estaciones superficiales (225 ríos, 81 lagos y presas, 13 sitios costeros ó santuarios y 15 sitios de descarga residual se encontró que el 93% de las aguas está contaminada (17.6% levemente contaminada”, 58.4% “contaminada”, 6.6% “fuertemente contaminada” y 10.3% “excesivamente contaminada”).

En este estudio la Comisión Nacional de Agua reportó que la mayoría de los cuerpos de agua superficial reciben descargas de tipo doméstico, industrial, agrícola ó pecuario, sin recibir algún tipo de tratamiento (SEMARNAT, 1999) .

La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (1999) describió en su programa "Cruzada por los Bosques y Agua" que el 78% de las aguas residuales municipales y que el 85 % de las industriales se vierten en el medio ambiente sin recibir tratamiento alguno.

Se ha reportado que el agua apta para el consumo humano es la que oscila entre las calidades de "contaminado" con previo tratamiento, y "excelente", que no requiere tratamiento, mientras que la industria y el riego pueden utilizar agua hasta "fuertemente contaminada" con previo tratamiento, e incluso la "excesivamente contaminada", aunque solo de forma muy restringida (SEMARNAT, 1999).

Se ha descrito que de las 13 cuencas hidrológicas en el país, el "Índice de Calidad del Agua" (ICA) de 12 es de "contaminada", y en una más, la del Valle de México, es "excesivamente contaminada" (SEMARNAT, 1999).

Además de la del Valle de México, las cuencas más contaminadas son las de Lerma, Alto Balsas, Pánuco y porciones del Bajo Bravo (SEMARNAT, 1999). De esta manera el agua "excesivamente contaminada" no sirve para el abastecimiento, para la pesca, ni para la recreación (SEMARNAT, 1999).

Se ha descrito que los principales contaminantes presentes en las aguas de los cuerpos receptores son en orden decreciente: coliformes fecales, grasas y aceites, ortofosfatos, sólidos disueltos y detergentes (SEMARNAT, 1999).

En un estudio realizado sobre mantos acuáticos se encontró que el 54 % de los cuerpos de agua monitoreados resultó contaminado, si bien, en caso de utilizarse como fuente de abastecimiento, requeriría un tratamiento

avanzado; en caso de uso recreativo, sería apta cuando no se tiene contacto directo, pero no es recomendable para contacto directo; para la Acuacultura es apta en general, pero ciertos organismos acuáticos sensibles, como algunas especies de trucha, bagre y charal, no tendrían un adecuado desarrollo; por último, se consideró apta para la mayoría de los usos industriales así como para riego de casi cualquier cultivo (excepto hortalizas) (SEMARNAT, 1999).

Se ha descrito que México cuenta con una superficie de 120,000 Km² de aguas interiores, de las cuales el 70% se encuentra en condiciones de ser explotadas desde el punto de vista alimenticio, más aún, si consideramos que nuestro país cuenta con un clima bondadoso para la práctica de la Acuacultura (Baca, 1986). De esta manera todo depósito natural, presa o lago, canal, acequia o corriente de agua resulta ser un desperdicio mientras no se encuentre poblado por peces comestibles, por lo que es inadmisibile que se desaproveche su potencial como centro productor de alimentos de gran valor proteínico para el hombre. Debido a esto las comunidades rurales cercanas a algún depósito de agua podrían incorporar a su dieta un producto altamente nutritivo como el pescado, sin representar ningún agobio al combinarlo a sus labores agrícolas y ganaderas (Rubin, 1985). Un claro ejemplo de esto lo constituye el embalse de San Felipe Tiacaque localizado en el Edo. de México

en el cual habitan peces como la carpa y el charal (*Chirostoma humboldtianum*) y que representa un excelente medio alimenticio para los lugareños de bajos recursos económicos.

Descripción el embalse San Felipe Tiacaque

El embalse San Felipe Tiacaque pertenece al municipio de Ixtlahuaca, ubicado geográficamente entre los 99° 42' 15" de longitud Oeste y a los 19° 41' 16" latitud Norte, a una altitud de 1534 metros sobre el nivel del mar (msnm). Pertenece a la región hidrológica Lerma-Chapala- Santiago, incluida en la provincia del eje Neovolcánico y a la subprovincia de lagos y volcanes de Anáhuac. El clima según Koppen, modificado por García (1964) corresponde al más seco de entre los templados (i (wi) (w) b (i) g), con lluvias en Verano.

De acuerdo a las temperaturas, los meses más cálidos se presentan durante la primera parte del año antes de los meses de lluvia que se inicia a mediados de año y se continúan hasta Octubre.

La temperatura media mensual máxima es 17.4 °C en los meses de Abril, Mayo y Junio. La temperatura media mensual es superior a 14.2 °C y la temperatura máxima promedio es de 28.7 °C (García, 1964).

La precipitación total anual es de 760 mm, presentándose el máximo en Julio con 175.8 mm. La parte correspondiente a la zona forestal en la región corresponde a la provincia templada, en la cual se encuentra encino, palo blanco, madroño entre otros (Cetenal, 1970).

Descripción de *Chirostoma humboldtianum*

La caracterización taxonómica de *Chirostoma* ha sido descrita por Barbour (1973) y Alvarez (1970; tabla 1).

Phylum	<i>Chordata</i>
Subphylum	<i>Vertebrata</i>
Superclase	<i>Gnatostomata</i>
Clase	<i>Osteichthyes</i>
Subclase	<i>Actinopterygii</i>
Orden	<i>Mugiliformes</i>
Suborden	<i>Atherinoidei</i>
Familia	<i>Atherinidae</i>
Especie	<i>Chirostoma humboldtianum</i>

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Chirostoma humboldtianum*

Se ha reportado que *Chirostoma humboldtianum* tiene una longitud aproximada de 200 a 250 mm, cuerpo moderadamente delgado con una ligera depresión; hocico romo o subtriangular, mandíbulas casi iguales; dientes pequeños, en bandas, ocasionalmente 2 a 3 en el vómer, escamas de la línea lateral acanalada y lanceoladas en el margen; escamas predorsales moderadamente sobrepuestas; aleta pectoral corta, ligeramente punteada. De 43 a 73 escamas medio laterales y de 24 a 50 escamas predorsales; de 19 a 50 espinas branquiales; la distancia desde el hocico hasta el origen de la aleta pélvica, 40.9 a 51.2 por ciento con respecto a la longitud corporal; longitud cefálica, 25.6 a 34.2 por ciento; longitud cefálica postorbital, 12.2 a 16.8 por ciento; longitud de los ojos, 4.6 a 7.8 por ciento; longitud del hocico, 8.4 a 13.4 por ciento (Barbour, 1966).

El género *Chirostoma* se encuentra constituido por 18 especies y 6 subespecies, en donde *Chirostoma compressum* está extinta (Barbour, 1966).

Se ha reportado que el género *Chirostoma* es característico de la ictiofauna Mexicana, cuya distribución está restringida a la región meridional de la meseta Mexicana (Hocutt & Wiley, 1985). Entre ellos se encuentran *Chirostoma estor* "pez blanco", *Chirostoma granducole* "charal blanco", *Chirostoma patzcuaro* "charal pinto", *Chirostoma attenatum* "charal prieto" y *Chirostoma humboldtianum* "charal" (SEMARNAT, 1998).

De entre los peces de aguas epicontinentales, la familia *Atherinidae* resulta ser de gran interés por constituir un importante renglón en las pesquerías, no sólo de México, sino de muchos otros lugares del mundo (Barbour, 1973). Los peces de la familia *Atherinidae*, entre los cuales encontramos a *Chirostoma humboldtianum*, cuenta con una amplia tradición en México, pues desde la época prehispánica han sido consumidos en forma de guisados con chile rojo seco, incorporados al tamal, secos, asados, fritos, en forma de boquerón y en torta (Sierra y Sierra 1977; Ocampo 1981).

Principales infecciones causadas por la alimentación de pescado dulceacuícola

Debido a que *Chirostoma humboldtianum* es un importante recurso alimenticio para la población de bajos recursos económicos del Municipio de Ixtlahuaca Edo. de México, en el cual se reportan 14,107 ejidatarios y comuneros distribuidos en 33 ejidos (INEGI, 1999), podría constituirse como un grave problema de salud, toda vez, que se ha reportado que bacterias patógenas para los humanos como: *Aeromonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Acinetobacter*, se encuentran de manera normal en el tracto digestivo de algunas especies de

peces (Trust, 1980; Linberg, *et al.*, 1988; Ringo *et al.*, 1999; Goodwin & Killian, H. S. 1998 ; Ascencio *et al.*, 1991).

Se ha reportado que animales que son portadores de especies de *Aeromonas* pueden actuar como reservorios para transferirlas a los humanos vía cadena alimenticia (Palumbo *et al* 1989).

Género *Aeromonas*

El género *Aeromonas* comprende bacilos Gramnegativos, anaerobios facultativos, autóctonos de ambientes acuáticos, que han sido ampliamente reconocidas como patógenos de una variedad de animales de sangre fría y caliente, así como de provocar enfermedades e infecciones en el hombre. Han sido aisladas de agua salobre, dulce, marina, clorinada, no clorinada y de aguas residuales. Su ubicuidad en ambientes acuáticos provee de una gran oportunidad a los animales, particularmente peces y anfibios de estar en contacto con ellas e ingerirlas. Su amplia distribución en aguas superficiales como ríos, lagos y presas ha creado una creciente preocupación por parte de Centros Epidemiológicos y Centros de Salud Pública en varios países del mundo, al ser recursos que se utilizan para abastecimiento de agua para beber, así como pesquerías y lugares para actividades recreativas y

deportivas. Pathak y cols (1988) reportaron la presencia del género *Aeromonas* en algunos ríos de la India, Havelaar y cols (1990) en el río Severn en Inglaterra y en dos ríos en los países bajos, Hazen y cols (1978) recuperaron *Aeromonas* de un gran número de cuerpos de agua dulce en USA, presentando los habitats lóticos, poblaciones más grandes que en los lénticos. Urriza y cols (2000) reportaron la presencia de este género en del río Arga en España, que recibe descarga de aguas de desecho de la ciudad de Pamplona. Se ha demostrado la presencia de *Aeromonas* en aguas de drenaje así como en aguas tratadas en cantidades equivalentes a coliformes fecales, mostrando una estacionalidad, aumentando las poblaciones en los meses de verano, al igual que en los ambientes de agua dulce ó marina. Tradicionalmente, el monitoreo bacteriológico de los abastecimientos de agua potable se ha enfocado a la detección de *Escherichia coli* y las bacterias coliformes relacionadas. Recientemente se ha puesto atención en la incidencia de aparición de biopelículas y organismos asociados que se presentan en los sistemas de distribución, incluyendo las especies mesófilas de *Aeromonas*. Las *Aeromonas* pueden crecer en los abastecimientos de agua potable como resultado de un insuficiente e incompleto tratamiento de agua. Las *Aeromonas* mesófilas son muy versátiles nutricionalmente, ya que son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos de bajo peso molecular

(aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos), péptidos y ácidos grasos de cadena larga cuando están en concentraciones tan bajas como 0.1mg de carbón por litro. Esta versatilidad, particularmente por biopolímeros, hacen a estas bacterias aptas para crecer como componentes de las biopelículas en los sistemas de distribución de agua potable, y así ser responsables del incremento en la incidencia de gastroenteritis asociadas a ellas. Ghanem y cols. (1993) consideraron que ya que el 90% de los abastecimientos de agua en el Cairo fueron positivos para *Aeromonas* y 56% de los aislamientos produjo enterotoxinas, el abastecimiento de agua fué la principal fuente de infecciones por *Aeromonas*. En estudios hechos en depósitos de agua municipal clorinada y no clorinada en el Oeste de Australia, Burke y cols. (1983) demostraron una relación entre la ocurrencia de *Aeromonas* y la incidencia estacional de las *Aeromonas* asociadas a gastroenteritis, donde los aislamientos fecales seguían cercanamente el patrón de distribución de las *Aeromonas spp.* en el agua para beber. Por muchos años, la taxonomía de *Aeromonas spp.* fue muy confusa, después de una exhaustiva revisión, Popoff y cols (1981) las colocaron en grupos de hibridación de ADN. Desde entonces, la taxonomía del género ha dependido de una mezcla compleja de datos fenotípicos y genotípicos. Las especies con comportamiento bioquímico distinto, son referidas como fenoespecies, mientras que distintos grupos de

hibridación de ADN son llamados geno-especies. Sobre la base de características fenotípicas, el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey reconoce los siguientes cuatro grupos para el género *Aeromonas*: las especies móviles mesófilas: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*, y una especie no móvil psicrófila: *A. salmonicida*. Dentro de las infecciones en peces se ha reportado que cepas de *Aeromonas hydrophila* han sido aisladas de septicemia hemorrágica y de putrefacción de cola y aletas de peces de agua dulce como: la lobina, la carpa, el bagre, la perca y el salmón (Hazen, *et al.*, 1978). La septicemia hemorrágica está caracterizada por la presencia de pequeñas lesiones superficiales, que con frecuencia ocasiona el desprendimiento de escamas, ano y branquias hemorrágicas, úlceras, abscesos, exoftalmia (ojos abultados), e inflamación abdominal. Internamente puede haber la presencia de fluido ascítico en la cavidad peritoneal, anemia, e inflamación del riñón e hígado (Hazen, *et al.*, 1978). Las infecciones por *Aeromonas hydrophila* en humanos se han agrupado en cuatro categorías: 1) Celulitis o infección de heridas por exposición a agua o suelo contaminados; 2) Diarrea aguda de corta duración, algunas veces sanguinolenta y coleriforme que ataca a cualquier grupo de edad, pero que prevalece principalmente en pacientes que presentan diarrea del viajero y en menores de 5 años; 3) Septicemia asociada a enfermedades hepatobiliares, pancreáticas o

malignas, en particular leucemia aguda; 4) Otras infecciones, por ejemplo: infecciones postoperatorias, casos raros de infecciones del tracto urinario, meningitis, peritonitis, endocarditis y otitis (Burke, *et al.*, 1983). Se ha descrito que entre los factores de virulencia de el género *Aeromonas*, son dos grupos los principalmente asociados con su patogenicidad: las aerolisinas y las enterotoxinas (Burke, *et al.*, 1983). En Bangladesh, Albert y cols. (2000) hicieron una caracterización de los genes que codifican para la producción de aerolisinas enterotóxicas, siendo estas: *alt*, citotóxica termolábil, *ast*, citotónica termolábil y *act*, citotóxica hemolítica. Estudiaron la distribución de estos genes de 115 *Aeromonas* aisladas de 1735 niños con diarrea, 27 *Aeromonas* aisladas de 830 niños control y de 120 *Aeromonas* seleccionadas al azar de diferentes cuerpos de agua superficial. Se encontró la presencia del gen *alt* en *Aeromonas* de las tres muestras. También se encontró que la presencia del gen *ast* fue mayor en las muestras ambientales que en las muestras de los niños con diarrea. Es importante mencionar que los aislamientos que fueron positivos para ambos genes *alt* y *ast* fueron significativamente mas frecuentes en los niños con diarrea que los encontrados en las muestras control y ambientales. Esto indica que los productos de ambos genes actúan sinérgicamente para inducir diarrea severa. Es interesante mencionar, que la presencia de un flagelo lateral en las especies

mesófilas de *Aeromonas* se ha considerado que tiene una relación con la presencia de propiedades toxigénicas, Gryllos y cols. (2000) concluyeron que el flagelo polar y posiblemente el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y adhesinas presentes en las *Aeromonas* mesófilas son estructuras de superficie que promueven la adherencia a las células epiteliales además de la participación de el pili en el proceso de adherencia y colonización. Se ha descrito que la diferencia medida en la frecuencia relativa de sepsis por *Aeromonas* señalada en varias regiones del mundo puede estar atribuida a un número de factores incluyendo etnias, exposición ambiental, condiciones climáticas, hábitos dietéticos (alimenticios) y el acceso a adecuados centros y programas de salud pública. Un ejemplo de esto es el citado por Geldreich (1978) en el que reporta que aproximadamente el 1% de adultos son portadores sanos de *Aeromonas* en el tracto gastrointestinal, mientras que esta figura se incrementa al 20% en el sudeste de Asia en donde se acostumbra el consumo de mariscos frescos contaminados aunado a una deficiente higiene.

Se ha descrito que existen otros géneros y especies de bacterias comensales del tracto digestivo de peces como; *Enterobacter sp.*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella sp.* y *Citrobacter freundii* que podrían causar infecciones en los humanos, ya sea por consumo de pescado o por el contacto con estos animales

(Trust, 1975; Linberg, *et al.*, 1988; Ringo *et al.*, 1999; Goodwin & Killian, H. 1999; Ascencio *et al.*, 1998).

Resistencia a antibióticos

El uso de los antibióticos tanto para uso humano como veterinario y agrícola, ha ocasionado la selección de bacterias resistentes a estos agentes (Kuperstoch-Portnoy, 1981). Un ejemplo de esto lo constituyó el estudio realizado en México sobre 697 cepas clínicas de *Salmonella* y 195 de *Shigella* (Kuperstoch-Portnoy, 1981), en donde se detectó que el 20.5% de las primeras fue resistente a ocho o más antibióticos, en tanto que el 17% de las segundas fue resistente a cuatro o más antibióticos (Kuperstoch-Portnoy, 1981).

De esta manera el uso indiscriminado de los antimicrobianos puede seleccionar cepas multirresistentes a estos agentes, las cuales pueden tener grandes efectos de salud sobre la población, por ejemplo en México en el año de 1972 y 1973 ocurrió una epidemia de fiebre tifoidea, en donde se encontró un mínimo de 10,000 casos, con una mortalidad de 10 a 12%. La cepa de *Salmonella typhi* causante de la infección era resistente al cloranfenicol, antibiótico de primera elección, así como a la sulfonamida, tetraciclina y estreptomina (Kumate, 1981).

La alta frecuencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos debido a que poseen plásmidos representa un serio problema para el tratamiento eficaz de los pacientes infectados y, a nivel poblacional, la presencia de plásmidos constituye una grave fuente de diseminación de la resistencia, toda vez, que muchos plásmidos que confieren resistencia a antibióticos son capaces de transferirse a otras bacterias de la misma especie, de especies distintas, e incluso, de géneros diferentes.

La resistencia a antibióticos mediada por plásmidos fue descrita por primera vez en Japón (Watanabe, 1963) y posteriormente confirmada en las epidemias de disentería bacilar causadas por *Shigella dysenteriae* en centro América y el Sur de México en 1969-1970 (Mata *et al.*, 1970). La cepa causante de la epidemia contenía un plásmido que le confería resistencia a varios antibióticos, entre ellos los de elección.

A menor escala, en los hospitales, también se han encontrado cepas multirresistentes portadoras de plásmidos. Así por ejemplo, en una unidad de quemados de un hospital de Seattle ocurrió un brote de infección por *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, ambas cepas poseían al mismo plásmido que les confería la resistencia (Elwell. *et al.*, 1978).

Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos

Se ha descrito que los mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos pueden agruparse en 4 categorías (Amábile Cuevas, C.F. 1988):

- A) Inactivación del antibiótico.
- B) Alteración del sitio blanco que actúa como receptor al antibiótico.
- C) Disminución del transporte del antimicrobiano al interior de la célula.
- D) Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco.

Los mecanismos de resistencia y los mecanismos de acción de los principales grupos de antibióticos se aprecian en la tabla 2.

ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	BLANCO DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA	BASE GENÉTICA
β-lactámicos • Penicilinas • Cefalosporinas	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas de unión de la penicilina (PBPs)	<ul style="list-style-type: none"> Hidrólisis del anillo β-lactámico (β-lactamasas) Alteración del blanco (PBPs) 	Plásmido y cromosoma
Macrólidos y lincosamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> Metilación del material ribosomal 23s (metilasa) Hidrólisis de la lactona de eritromicina (eritromicina-esterasa) 	Plásmido y cromosoma
Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando su unión al ribosoma (cloranfenicol-acetil-transferasa)	Plásmido
Aminoglucósidos • estreptomicina • neomicina • kanamicina • gentamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> Modificación del antibiótico impidiendo su transporte (acetil-transferasa, fosfatidil-transferasa, adenil-transferasa, metilasa) Modificación de la subunidad 50s del ribosoma Disminución de la captación por la célula 	Plásmido y cromosoma Plásmido Cromosoma
Quinolonas y ácido nalidixico	Inhibición de la Replicación, Transcripción, Recombinación y superenrollamiento del ADN	ADN girasa	<ul style="list-style-type: none"> Mutación sobre ADN girasa Disminución de la permeabilidad Eflujo 	Cromosoma Cromosoma Cromosoma
Tetraciclina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Proteína de la subunidad ribosómica 30s	Interferencia con el transporte de la droga (proteínas inducibles)	Plásmido
Sulfonamidas Trimetoprim	Inhibición de la síntesis del ácido fólico		Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco	Plásmido

Tabla 2. Mecanismos de Acción y de Resistencia a los antibióticos por las bacterias

Resistencia a antibióticos β-lactámicos

Se ha descrito que el mecanismo más importante de resistencia bacteriana a los antibióticos β-lactámicos es la producción de β-lactamasas (BL), estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo β-lactámico,

incapacidad de los antibióticos para difundir al interior de la célula microbiana, (Chopra, I & Ball, 1982) y, en parte, a niveles bajos de β -lactamasa codificados por el cromosoma (Ohmori, *et al.*, 1977; Curtiss, *et al.*, 1981).

Se ha descrito que existen varias clases de β -lactamasas: TEM-1 (clase A), KOXY (clase B), IMP-1 (clase B), AmpC (clase C), MOX-1 (clase C), OXA-5 (clase D) y PSE-2 (clase D). Con excepción de la clase D, cuya expresión es constitutiva (Rosdahl, 1993) todas son inducibles y la mayoría de su actividad es extracelular (Richmond, 1965).

Otro de los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias a los antibióticos β -lactámicos es debido a mutaciones cromosómicas que alteran la cantidad o afinidad de proteínas de membrana externa llamadas PBPs (por penicillin binding proteins). La introducción en 1960 de la meticilina, un compuesto derivado de la penicilina y resistente a β -lactamasa, fue seguida rápidamente por la aparición de cepas resistentes. La resistencia a meticilina se debe, probablemente, a la proteína PB2a que tiene baja afinidad por los compuestos β -lactámicos (Hartman & Tomasz, 1984; Fasola, *et al.*, 1995).

Para combatir a las cepas productoras de β -lactamasas se han desarrollado las cefalosporinas, cuyo grado de resistencia a β -lactamasas es variable; éstas incluyen a las cefalosporinas de segunda generación

(cefóxitina, cefamandol y cefuroxima) y a las de tercera generación (cefotaxima, moxalactam, cefoperazome y otras). También se han introducido antimicrobianos resistentes a la penicilinas, éstos incluyen a las penicilinas semisintéticas: meticilina, oxacilina, nafclicina y otras (Richmond, 1979).

Otra de las estrategias utilizadas contra cepas productoras de β -lactamasas es la combinación de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, de los que uno de ellos es un producto natural del *Streptomyces clavuligerus* (ácido clavulánico) y el otro es totalmente sintético (sulbactam) (Comber, *et al.*, 1980). Estos inhibidores de β -lactamasas poseen una estructura química similar a los antibióticos pero con actividad antimicrobiana deficiente, sin embargo, cuando se combinan con un antibiótico β -lactámico restauran su actividad sobre microorganismos resistentes a éste. El ácido clavulánico se ha combinado con amoxicilina o ticarcilina y el sulbactam con ampicilina o cefoperazone (Comber, *et al.*, 1980).

No obstante, que la utilización de un β -lactámico más el inhibidor de β -lactamasas constituye un factor de selección a favor de bacterias productoras de β -lactamasas resistentes al inhibidor, aparentemente no ha ocurrido aún un incremento en la producción de β -lactamasas resistentes a

inhibidores, toda vez que en una revisión de 1500 artículos publicados sobre este tópico entre 1978 y 1993 se encontró que si bien aumentó la frecuencia de cepas productoras de β -lactamasas resistentes a ampicilina y penicilina, no hay evidencia, publicada en este período de que se haya incrementado la resistencia a la combinación de amoxicilina + clavulánico (Rolinson, 1994).

ANTECEDENTES

Entre los estudios sobre aspectos biológicos de *Chirostoma humboldtianum* se encuentran el de Téllez (1983) y Flores (1985) en el embalse Huapango, Edo. de México, donde el primero estudió la edad y crecimiento de machos y el segundo lo hizo para las hembras. Por su parte De la Cruz (1985) lleva a cabo un análisis de variabilidad en la población y Garibay y cols. (1988) realizaron un estudio histológico gonadal. Así, Téllez (1979) en el Lago de Chapultepec y Gámez (1984) en el embalse Huapango abordan aspectos de la alimentación de *C. humboldtianum*, mientras que Navarrete y Cházaro (1992) lo hicieron en el embalse San Felipe Tiacaque, Edo. de México, en donde, Aguilar (1993) realizó un estudio de crecimiento, supervivencia y reproducción. Huicochea y cols. (1987) abordaron aspectos referentes a Ecología y producción de *C. humboldtianum* en el embalse San Felipe Tiacaque, Edo. de México, (citado por Aguilar, 1993).

Por otra parte en lo que se refiere a las especies bacterianas comensales del tracto digestivo de los peces, Trust en 1975 aisló la flora bacteriana del tracto digestivo del salmón (*Oncorhynchus keta*), las especies predominantes fueron identificadas como *Aeromonas*, siendo *Aeromonas hydrophila* la más frecuente. Otras especies comúnmente encontradas fueron *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Acinetobacter*.

Schubert (1975), Araujo y cols (1991) y Stecchini (1994) reportaron que la distribución de las especies bacterianas mesófilas en el medio acuático puede estar relacionado con los niveles de contaminación en el agua, encontrando que *Aeromona caviae* predomina en el agua de drenaje y en aguas con un alto grado de materia fecal. En aguas menos contaminadas, dulces o marinas, *A. caviae* y *A. hydrophila* presentaron una distribución casi igual.

Depaola & Peeler (1995) midieron el efecto del uso de alimento medicado con oxytetraciclina en la resistencia antibiótica de bacterias Gram-negativas del agua e intestinos del pez gato en estanques. *Plesiomonas sp.*, *Shigella sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Citrobacter freundii* fueron aisladas frecuentemente en Primavera y Otoño; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Edwardsiella tarda*, y *Enterobacter sp.* fueron aisladas principalmente en la Primavera. El tratamiento con oxytetraciclina no afectó

la distribución de las especies bacterianas en el Otoño pero pudo haber acelerado un cambio hacia una mayor prevalencia de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en la Primavera. El tratamiento con oxytetraciclina no pareció estar involucrado en la resistencia múltiple antibiótica.

En Saudi Arabia, Ramadan y cols. (1995) reportaron que 28 cepas de *Enterobacter cloacae* con susceptibilidad reducida a cefalosporinas de tercera generación (aztreonam y amikacina), fueron altamente sensibles a imipenem y sparfloroxacina, produciendo todas β - lactamasas.

En China, Li y cols. (1995) reportaron la resistencia antibiótica de 29 cepas de *Enterobacter cloacae* de 32 examinadas, a 9 antibióticos de 21 probados, demostrando la presencia del plásmido 80Kb en 24 cepas, mientras que tres cepas relativamente sensibles, no contenían plásmidos. La presencia del plásmido 80Kb se relacionó directamente con la alta resistencia de *E. cloacae*.

En Suiza, Gunthardt y cols. (1996) estudiaron la susceptibilidad antibiótica de 80 aislamientos de *Hafnia alvei* obtenidos de 61 pacientes, el 100% de las cepas fueron sensibles a la netilmicina, ciprofloxacina e imipenem, 92% a piperacilina, 90% a cotrimoxazole, 88% a ceftriaxona y ceftazidime.

En Japón, Kumamoto y cols. (1996) reportaron que la concentración mínima inhibitoria (CMI90) para *Enterobacter cloacae* de ciprofloxacina (CPFX) y tosufloxacina (TFLX) fué de 1 µg/ml, la CMI90 de amikacina (AMK) fué 2 µg/ml, la CMI90 de cefozopran (CZOP), gentamicina (GMC) y ofloxacina (OFLX) fué de 4 µg/ml.

En Estados Unidos, Thornsberry y cols. (1996) llevaron a cabo un estudio comparativo de la susceptibilidad a ocho antimicrobianos (cefepime, ceftazidime, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem y piperacilina) en 12,574 aislamientos obtenidos de 83 instituciones médicas, utilizando los métodos E-test (AB Biodisk) y de microdilución en caldo para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de las *Enterobacteriaceas* fue mas susceptible a cefepime, que a la actividad de ceftazidime, ceftriaxona y cefotaxime, principalmente por la gran actividad del cefepime contra las especies que producen β- lactamasas (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*).

Piddock y cols. (1997) midieron la prevalencia, los mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, y ocurrencia de producción de β-lactamasas en 3745 Enterobacterias aisladas de 96 hospitales en el Reino Unido. En este estudio el 10.9% (409 cepas) fue resistente a cefotaxime/

cefazidime, de los cuales 338 (9%) fueron *Enterobacteriaceae*, 29 *Escherichia coli*, 35 *Klebsiella spp* y 7 *Hafnia alvei*.

Pitout (1997) detectó la producción de β - lactamasas en 80 cepas bacterianas de *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. gergoviae* y *E. sakazakii* resistentes a antibióticos β -lactámicos. También midió la resistencia a 16 antibióticos β -lactámicos con pruebas de susceptibilidad por difusión en disco y microdilución en caldo.

Son y cols (1997) probaron la resistencia antibiótica de cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de 21 tilapias (*Tilapia mossambica*), resultando todas resistentes a ampicilina y sensibles a gentamicina. El 57% fue resistente a la estreptomycin, el 48% a la tetraciclina y el 43% a la eritromicina.

Chang y cols. (1997) han estudiado los factores de virulencia de *A. hydrophila*, incluyendo las fosfolipasas y/o proteasas, como posibles responsables de la patogénesis de la diseminación séptica, posterior al primer foco de infección en el tracto gastrointestinal de pacientes inmunocomprometidos.

En Bristol, Reino Unido, Walsh y cols. (1997) examinaron la distribución y la expresión de los genes que se expresan para la producción de β - lactamasas en 21 *Aeromonas hydrophila*, de las cuales el 100% produjo

β -lactamasas con una actividad significativamente alta contra ampicilina, oxacilina, cefaloradina e imipenem.

En Chennai, India, Komathi y cols. (1998) aislaron *Aeromonas sp* del 6.5% de pacientes menores de 10 años que sufrían de diarrea (200 muestras de evacuaciones), de las cuales el 4% fue *A. hydrophila*, el 2% *A. sobria* y el 0.5% *A. caviae*. Entre los aislamientos obtenidos 10 produjeron enterotoxinas y 11 produjeron citotoxinas. La mayoría exhibió resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados como trimetoprim, cloranfenicol y tetraciclina.

En Exeter, Reino Unido, Mattick y cols (1998) demostraron que las *Aeromonas sp* mesófilas son comúnmente aisladas de casos de infección gastrointestinal y tienen marcadores indicativos de enteropatogenicidad, incluyendo producción de citotoxinas y hemolisinas, adherencia a células epiteliales y resistencia a ciertos antibióticos.

En Karachi, Pakistán, Ahmed y cols. (1998) probaron los patrones de sensibilidad antibiótica por difusión en disco y concentración mínima inhibitoria de 43 *Aeromonas spp*, resultando el 80% sensible a las cefalosporinas y quinolonas, y el 94% resistente a la ampicilina, mismas que fueron productoras de β -lactamasas; el 40% mostró resistencia al cloranfenicol. La CMI para cefotaxima fue 0.06-1.0 $\mu\text{g/ml}$, la CMI90 para

cefotaxíme fue 0.50 µg/, para imipenem 0.25 µg/ml y para ciprofloxacina 2.0 µg/ ml.

Miranda y cols (1998) en Chile midieron la resistencia antibiótica de 172 *Aeromonas* móviles aisladas de 56 abastecimientos de agua natural para beber, de aguas de irrigación (60) y de aguas de paso que reciben drenaje (56), utilizando los métodos de dilución y difusión en agar. Una alta proporción de las bacterias aisladas mostró resistencia a la carbenicilina, eritromicina, estreptomicina y cefradina, y sensibilidad al cloranfenicol, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, ácido nalidixico y trimetropim-sulfametaxol. Estos resultados indican que las *Aeromonas* resistentes a antibióticos son fácilmente recuperadas de los recursos de agua en Chile, representando un alto riesgo para la Salud Pública.

Ascencio y cols (1998) demostraron que las *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*) se adhieren a las líneas celulares que poseen receptores mucosos, colonizan el tracto intestinal y están involucradas en enfermedades gatrointestinales humanas.

En España, Capdevila y cols. (1998) probaron la susceptibilidad antibiótica de *Enterobacter amnigenus*, la cual mostró un nivel de resistencia a ampicilina del 83%, 75% a cefazoline y 33% a ácido clavulánico. Todos los aislamientos fueron susceptibles a cefalosporinas de tercera generación.

aztreonam, ciprofloxacina y aminoglucósidos. *E. amnigenus* causó infecciones bien documentadas en el hombre, por lo que no debe considerarse el microorganismo aislado como un simple contaminante ó como un simple huésped del colon.

En Suecia, Lindberg y cols. (1998) aislaron *Enterobacteriaceas* del 31% de una muestra de 72 peces de agua dulce, siendo la más frecuente *Rahnella aquatilis*, una de cada tres fué *Citrobacter freundii*, y también se obtuvieron *Hafnia alvei*.

En España, Tejedor (1998) examinó la interacción de las β - lactamasas T1 de *Enterobacter cloacae* con compuestos β -lactámicos. La habilidad de la penicilina y cefoxitina para inducir la producción de β -lactamasas en la cepa fue cuantificada. *Enterobacter cloacae* mostró una susceptibilidad limitada a un número de antibióticos excepto al imipenem, que sería el antibiótico de elección como terapia contra la infección.

En Noruega, Ringo y cols. (1999) demostraron que el régimen dietético no influía en la flora bacteriana aeróbica y anaeróbica facultativa del tracto intestinal de la trucha ártica (*Salvenilus alpinus L.*). En este estudio fueron identificados *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sp.* y *Carnobacterium*.

Goodwin y cols. (1998) aislaron *Haflnia alvei* de lesiones presentes en los ojos y en el centro de la cabeza del pez gato de canal (*Ictalurus punctatus*), obteniendo una excelente identificación por el método API-20E, pues este microorganismo ya ha sido reportado como patógeno en humanos y peces.

Rice (1999) estudió los mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro de Enterobacterias. En este trabajo se contempló las mutaciones puntuales dentro de los genes plasmídicos que codifican enzimas que hidrolizan cefalosporinas, incluyendo penicilinas e inhibidores de β -lactamasas.

En Japón, Yamaguchi y cols. (1999) evaluaron la actividad de seis antimicrobianos β -lactámicos en 2000 aislamientos clínicos de 22 centros médicos, encontraron que *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* fueron resistentes a ceftazidime y piperacilina, y se mantuvieron sensibles al imipenem, al igual que *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*

Thompson y cols. (1999) en 141 cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*, indujeron la producción de β -lactamasas de amplio espectro, β -lactamasas AmpC, β -lactamasas K1 y otras utilizando como inductores antibióticos β -lactámicos solos ó en combinación con

inhibidores de β -lactamasas, para de esta manera establecer la frecuencia de producción de β -lactamasas.

OBJETIVOS

General

- Identificar las cepas bacterianas comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*.

Particulares

- Determinar la susceptibilidad y/o resistencia a 12 antibióticos por el Método de Kirby- Bauer.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina, cefuroxima y ceftriaxona por el método de dilución en placa.
- Detectar la producción de β -lactamasas en las cepas identificadas.
- Cuantificar el efecto del inhibidor de β - lactamasas sulbactam sobre la CMI de ampicilina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una muestra representativa de 52 peces que fue colectada en el embalse de San Felipe Tiacaque, Edo. de México. Para lo cual se utilizó un chinchorro playero de tipo charalero de 28 metros de longitud con una caída de 1.5 mts. y una abertura de malla de 0.8 cms. Una vez colectados, fueron colocados en bolsas de plástico estériles y se transportaron al laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala. El manejo de los animales fue totalmente aséptico. Para la extracción del tracto intestinal, se limpió la superficie ventral del cuerpo con una toalla de papel estéril para remover el exceso de moco, después se roció etanol al 70%, utilizando una botella con aerosol (rociador), y se secó con una toalla de papel estéril. Posteriormente utilizando tijeras y escalpelo estériles y/o flameados en alcohol y sosteniendo las aletas pectorales a los lados con pinzas, se hizo una incisión a través de la piel y el músculo en la línea media de la pared ventral del cuerpo extendiéndose de la parte posterior del istmo hasta el ano. La incisión tuvo que ser ligeramente lateral en el ano, para poder evitar cortar el intestino posterior y permitir que el contenido intestinal entre a la cavidad visceral (Thoesen, 1994). Se tomó con pinzas estériles el tracto digestivo y con tijeras se cortó para extraer su contenido y colocarlo en el medio de cultivo BHI (infusión cerebro-corazón). Posteriormente se

incubaron por 24 horas a temperatura ambiente (20-25° C por 24-48 hrs., Thoesen, 1994). Al término de esto se procedió a sembrar las muestras bajo la técnica de estriado y quema con asas estériles en los medios de cultivo enriquecidos y selectivos; Gelosa sangre, SS (salmonella- Shigella), VB (verde-brillante) y EMB (eosina azul de metileno) y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C por 24 horas). Obteniendo el crecimiento óptimo se realizaron varias resiembras de las colonias lactosa + y lactosa – con el propósito de purificar las colonias. Para posteriormente determinarlas por el sistema de identificación API- 20E, fabricado por el laboratorio francés bioMérieux SA. Una vez aisladas e identificadas las diferentes cepas se mantuvieron en Stocks para bacterias a temperaturas de 6-7° C.

Sistema de Identificación para Gramnegativos API- 20E.

Es un sistema que utilizó 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos.

Estos tests se inocularon con una suspensión bacteriana la cual hidrató el medio. Durante la incubación, se produjeron cambios de color espontáneos o revelados por adición de reactivos. La lectura de las reacciones se realizó de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante el API-20E index o el programa informático para identificación.

Preparación de la galería:

Se preparó una cámara de incubación con su tapa correspondiente y se repartieron 5 ml de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para proporcionar una atmósfera húmeda. Posteriormente se anotó la referencia de la cepa en la lengüeta lateral y se colocó la galería en la cámara de incubación. Al mismo tiempo se realizó la prueba de la oxidasa para lo cual se tomó una colonia de la cepa a identificar y se colocó sobre un trozo de papel filtro sobre un portaobjetos. Se humedeció el papel con una gota de agua estéril y se añadió una gota de reactivo OX. Si la reacción fue positiva apareció en uno o dos minutos una coloración púrpura.

El resultado de esta reacción se anotó, debido a que constituye el test número 21 de la identificación.

Preparación del inóculo:

Se destapó una ampollita de NaCl 0,85% (Medium 5ml), con la ayuda de una pipeta pasteur estéril se recogió una colonia de la placa de agar y se realizó una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente la ampollita. Posteriormente se llenaron los tubos y las cúpulas de los Tests con la suspensión bacteriana y se incubaron de 18-24 horas a temperatura ambiente (20-25°C).

Lectura de la galería

Después de la incubación se leyeron las galerías con la ayuda de la Tabla de Lectura. Se anotó en la hoja de resultados las reacciones espontáneas y si la glucosa fue positiva y/o 3 o más tests fueron positivos, se efectuó el revelado de los tests que necesitaban reactivos:

- Test TDA: se añadió una gota de reactivo TDA al test. Un color marrón oscuro indicó una reacción positiva.
- Test IND: se adicionó una gota de reactivo James: si la reacción fue positiva apareció una coloración rosa.

- Test VP: se añadió una gota de VP1 y VP2 y se esperó como mínimo 10 minutos. Un color rosa o rojo indicó una reacción positiva.
- Test NO₂: Se adicionó una gota de NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Se esperó de 2 a 3 minutos. Un color rojo indicó una reacción positiva.

Identificación

Las identificaciones se realizaron mediante el sistema computarizado API-20E, para lo cual en la hoja de resultados los tests estaban en grupos de tres y cada uno tenía asignado un valor 1, 2 ó 4. La galería API-20E constó de 20 tests, los números en el interior de cada grupo correspondieron a las reacciones positivas. El test de la oxidasa es el número 21 y si fue positivo se le asignó el valor 4. Sumando los valores de los tests positivos para cada grupo se obtuvo un código de 7 cifras. El programa informático para identificación se utilizó introduciendo manualmente en el teclado el perfil numérico de 7 cifras.

Resistencia a antibióticos

Una vez identificadas las bacterias por el sistema de identificación API-20E, se utilizó la técnica de Bauer- Kirby (Bauer, *et al.*, 1966) para probar la sensibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa crecida en MH) con un hisopo estéril y se procedió a inocular sobre la totalidad de la superficie del agar de Mueller-Hinton.

Por último se tomó un sensidisco con los doce antimicrobianos a determinar (Sanofi,diagnostics, Pasteur) con una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió ó permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a temperatura ambiente. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte.

Detección de β - lactamasas

Para la detección de β - lactamasas se utilizaron discos impregnados con una cefalosporina cromogénica, nitrocefín (BBL). Este compuesto cambió de color amarillo a rojo cuando el enlace amida del anillo β - lactámico fue hidrolizado por la β - lactamasa, para lo cual se tomó un disco impregnado

con nitrocefín y se humedeció con una gota de agua estéril y enseguida se colocó con una asa estéril una colonia aislada (crecida en Mueller- Hinton por 24 horas a temperatura ambiente) de la cepa bacteriana. Se observó la ocurrencia de cambio de color durante un periodo máximo de 1-2 minutos (O'Callaghan, C.H. et al., 1972).

IZT.



Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos β - lactámicos

La concentración mínima inhibitoria de penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona y sulbactam más ampicilina se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton (MH), utilizando un sembrador múltiple, conforme a lo reportado por Vaca y cols. (1995). Para lo cual se creció cada una de las cepas bacterianas en caldo nutritivo a temperatura ambiente por 24 horas. Cada cultivo se diluyó (1:3) con caldo nutritivo estéril en un pozo del sembrador, para posteriormente hacer las réplicas en cajas de MH más diluciones dobles seriadas del antibiótico en el rango de concentración de 3.9 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ (cuadro 1). La CMI fue la mínima concentración del antibiótico que inhibió el crecimiento visible después de incubar 24 horas a temperatura ambiente.

RESULTADOS

Identificación bacteriana en el tracto gastrointestinal de *Chirostoma humboldtianum*

Con el propósito de identificar las bacterias comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum* se utilizó una muestra poblacional de 52 peces. Se identificaron bacterias pertenecientes a 5 especies y a 1 género (tabla 3). El 65.5% de las bacterias del tracto digestivo de *C. humboldtianum* correspondió a *Aeromonas hydrophila*, 17.2 % a *Hafnia alvei*, 6.8% a *Enterobacter cloacae*, 3.5% a *Enterobacter amnigenus*, 3.5% a *Citrobacter freundii* y 3.5% al género *Klebsiella*.

Bacteria	Número de cepas	Porcentaje
<i>Aeromonas hydrophila</i>	19	65.5
<i>Hafnia alvei</i>	5	17.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	6.8
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	3.5
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3.5
<i>Klebsiella</i> .	1	3.5

Tabla 3. Frecuencia de bacterias comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*

Resistencia a los antibióticos

Aeromonas hydrophila

En la figura 2 se observa que el 100% de las cepas de *Aeromonas hydrophila* fue resistente al antibiótico ampicilina, 95% a carbenicilina y 40% a cefalotina.

Hafnia alvei

El 100% de las cepas de *Hafnia alvei* mostró resistencia para ampicilina, ceftriaxona y cefalotina, el 80% a cefotaxima y carbenicilina y el 20% a trimetoprim con sulfametoxazol (figura 3).

Enterobacter cloacae y *Enterobacter amnigenus*

El total de las cepas de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter amnigenus* fue resistente a los antibióticos ampicilina, carbenicilina, cefalotina, ceftriaxona y cefuroxima (figura 4).

Citrobacter freundii

En la figura 5 se aprecia que la cepa de *Citrobacter freundii* mostró resistencia frente a ampicilina y carbenicilina.

FIGURA 2
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*

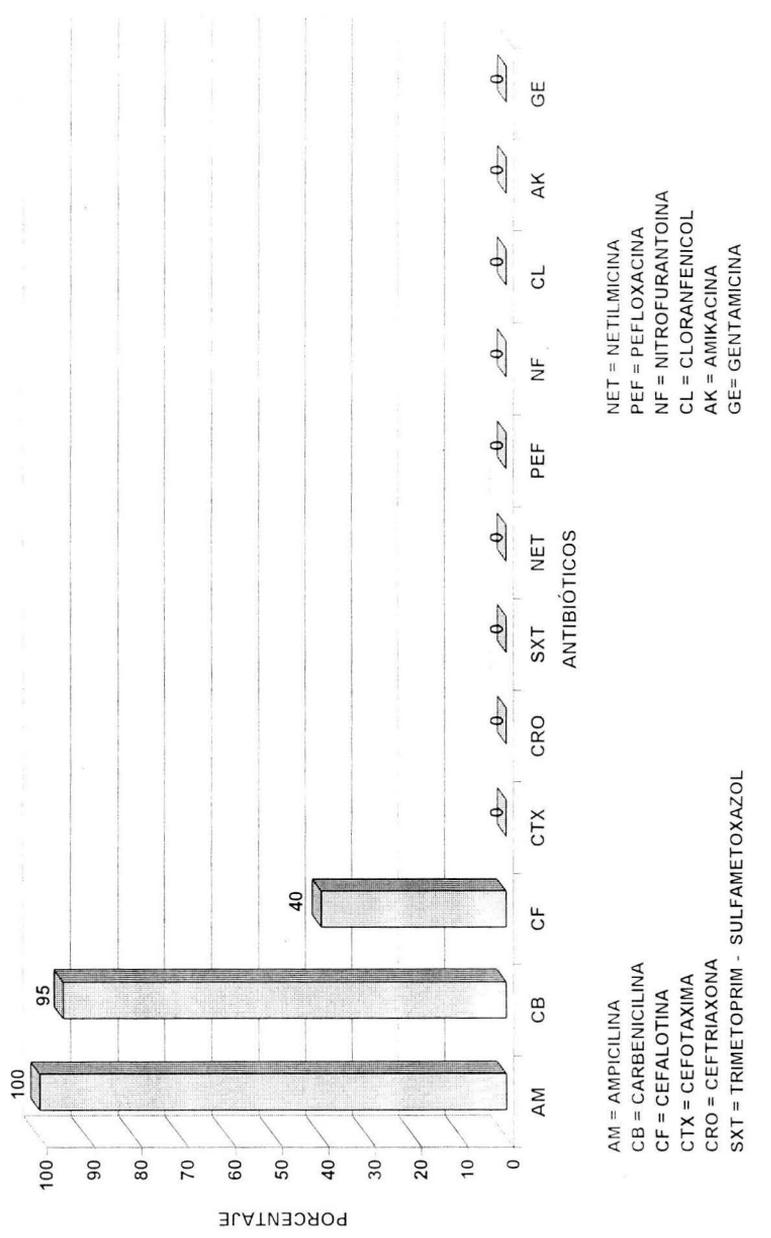


FIGURA 3.
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Hafnia alvei*

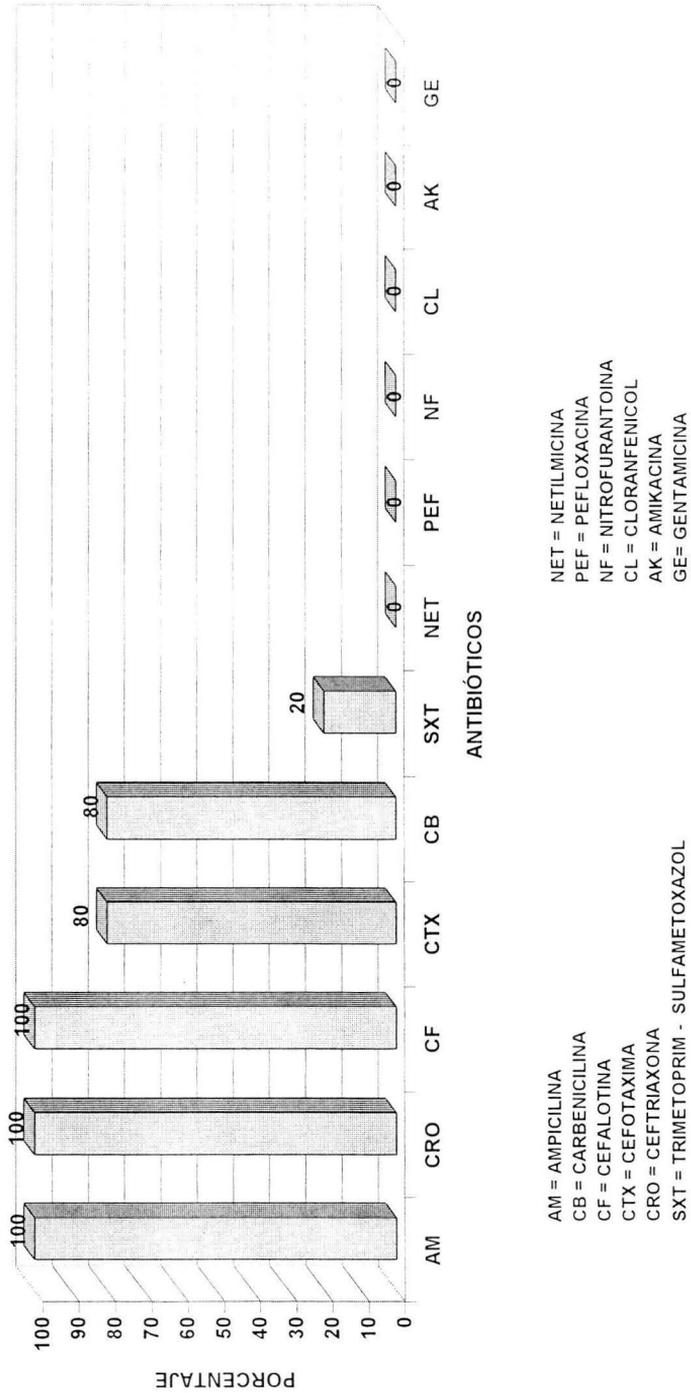


FIGURA 4
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Enterobacter cloacae* y *E. amnigenus*

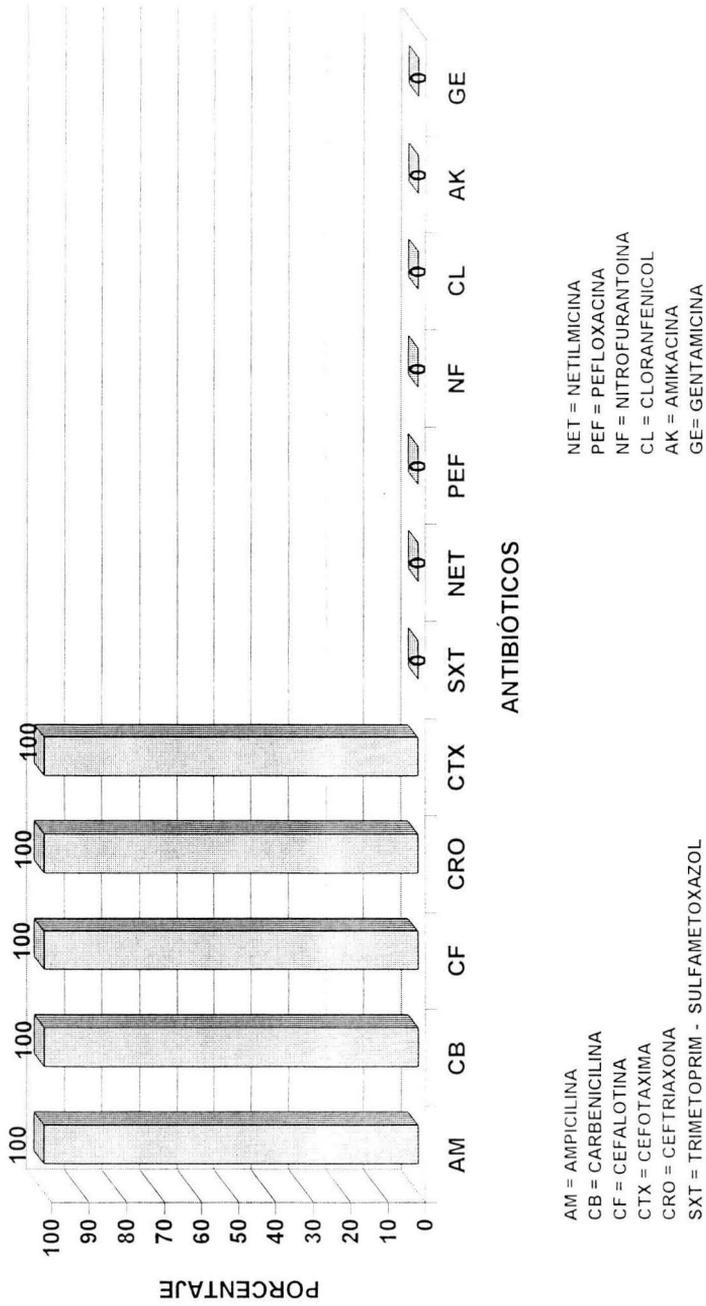
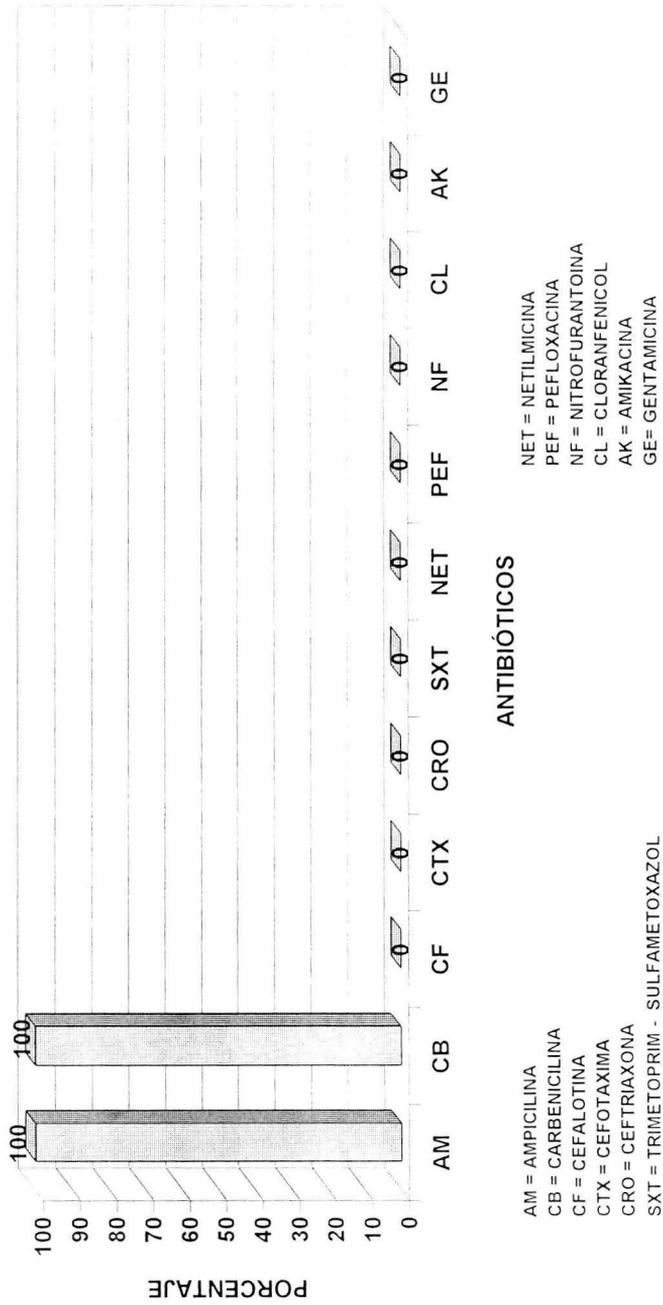


FIGURA 5
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Citrobacter freundii*



Klebsiella sp.

La cepa bacteriana del género *Klebsiella* fue resistente a los antibióticos ampicilina, carbenicilina, cefalotina y cefotaxima (figura 6).

Producción de β -lactamasas

Con el propósito de determinar la producción de β -lactamasas por las cepas encontradas, se determinó cualitativamente la capacidad de estas para hidrolizar a la cefalosporina cromogénica nitrocefín (BBL). Como se aprecia en la figura 7 el 100% de las cepas fue productora de β -lactamasas

Multirresistencia a los antibióticos en las cepas identificadas

La tabla 4 muestra los patrones de resistencia a los antibióticos y el número de especies representadas en cada patrón. Se observaron un total de 7 patrones distintos de multirresistencia, dentro de los cuales el patrón de resistencia; CF+CRO+AM+CTX+CB estuvo representado por 3 cepas de *Hafnia alvei*, 2 de *Enterobacter cloacae* y 1 de *Enterobacter amnigenus*. Los siguientes 3 patrones de resistencia (CF+CRO+AM+SXT+CB, CF+CRO+AM+CTX y CF+AM+CTX+CB) se caracterizaron por estar representados por 1 cepa en cada caso. A continuación aparece el patrón de resistencia CF+AM+CB, el cual estuvo representado por 6 cepas de *Aeromonas hydrophila*. Finalmente

FIGURA 6
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Klebsiella* sp.

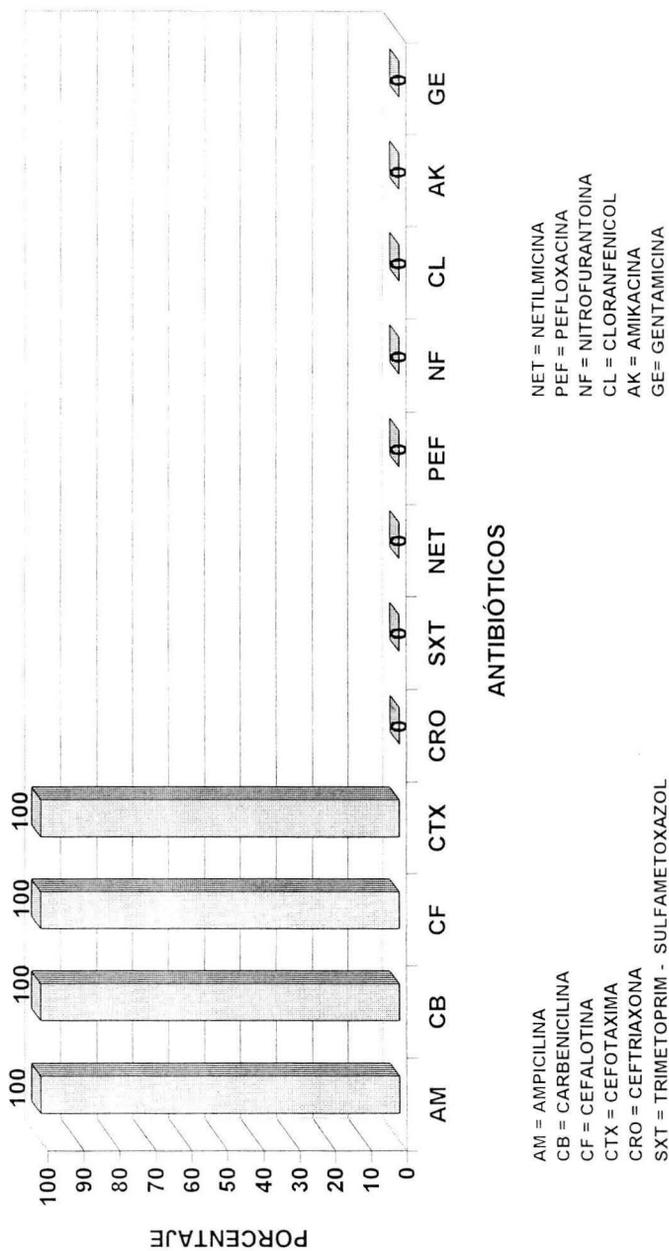
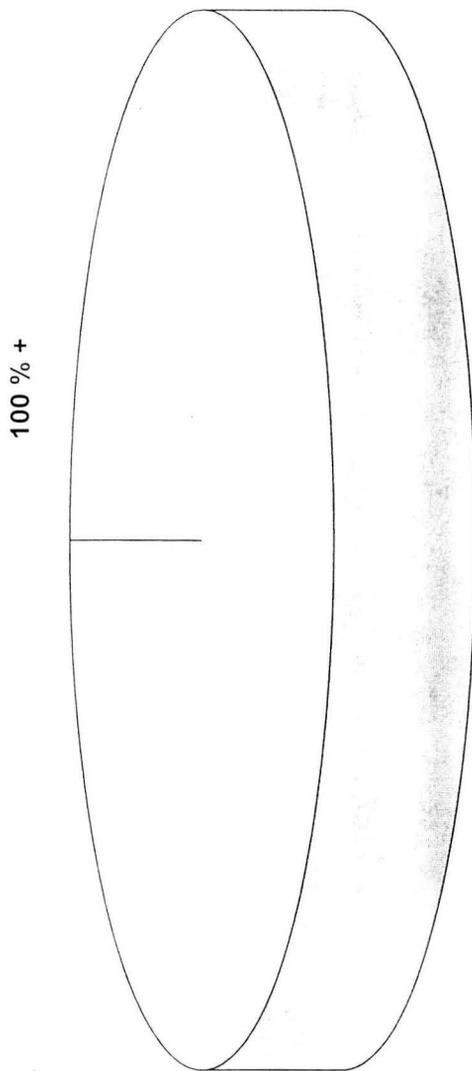


FIGURA 7
PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS EN EL TOTAL DE LAS CEPAS
IDENTIFICADAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE *Chirostoma*
humboldtianum



encontramos al patrón de resistencia AM + CB el cual estuvo representado por 12 cepas de *Aeromonas hydrophila*.

PATRONES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella spp</i>
CF+CRO+AM+CTX+CB	-	3	2	1	-	-
CF+CRO+AM+SXT+CB	-	1	-	-	-	-
CF+CRO+AM+CTX	-	1	-	-	-	-
CF+AM+CTX+CB	-	-	-	-	-	1
CF+AM+CB	6	-	-	-	-	-
CF+AM	1	-	-	-	-	-
AM+CB	12	-	-	-	1	-
TOTAL DE CEPAS	19	5	2	1	1	1

Tabla 4. Patrones de multiresistencia a los antibióticos en el total de las cepas identificadas

Resistencia a antibióticos β -lactámicos y al inhibidor de β -lactamasas en las cepas encontradas.

Aeromonas hydrophila

En la figura 8 se aprecia que la distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria para penicilina fue unimodal, con el 100% de las cepas resistentes en el intervalo de 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$. La distribución de la CMI para ampicilina fue bimodal, sensible (15% de las cepas) en el rango de 125-250 $\mu\text{g/ml}$ y resistente (85%) en el intervalo 1000-4000 $\mu\text{g/ml}$ (figura 9).

FIGURA 8
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A PENICILINA

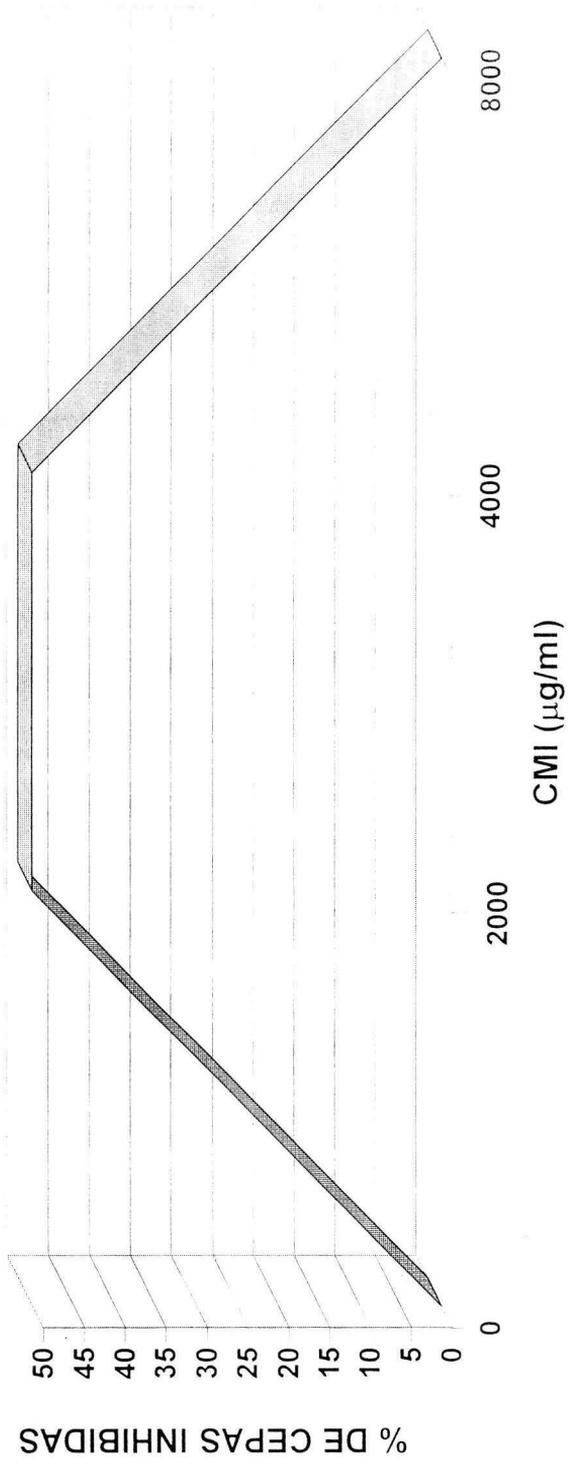
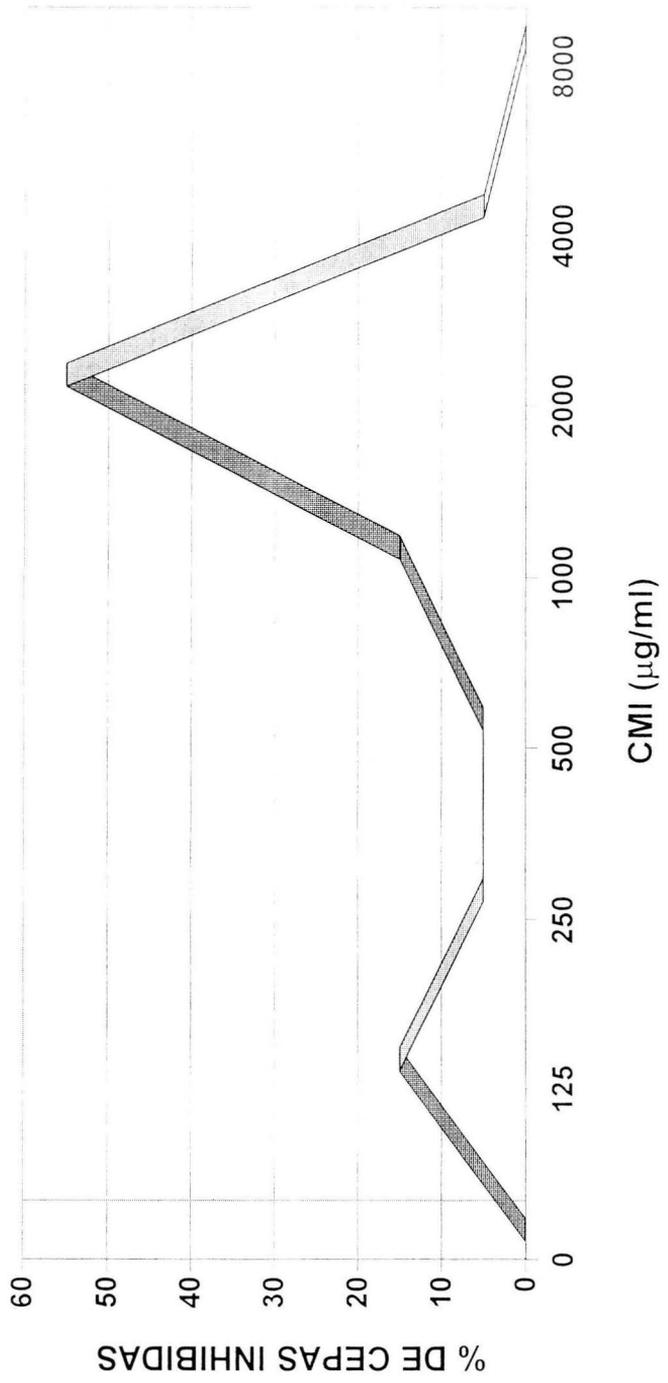


FIGURA 9
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A AMPICILINA



El 100% de las cepas fue resistente a dicloxacilina (CMI = 500-1000 $\mu\text{g/ml}$, figura 10) y el 100% sensible a ceftriaxona (CMI= 3.9-7.8 $\mu\text{g/ml}$, figura 11). En la figura 12 se observa que para el antimicrobiano cefalotina se obtuvieron 3 poblaciones; sensible (15% de las cepas) en el pico de 125 $\mu\text{g/ml}$, moderadamente sensibles (25%) en el pico de 500 $\mu\text{g/ml}$ y resistente (60%) en el pico de 2000 $\mu\text{g/ml}$. El 100% de las cepas fue sensible a cefuroxima (CMI = 3.9-62.5 $\mu\text{g/ml}$, figura 13) y la distribución de la CMI para el inhibidor de β -lactamasas ampicilina + sulbactam fue bimodal, sensible (70%) en el el pico de 31.3 $\mu\text{g/ml}$ y moderadamente susceptible (25%) en el pico de 250 $\mu\text{g/ml}$ (figura 14).

Hafnia alvei

El 100% de las cepas fue resistente a penicilina (CMI = 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$, figura 15), ampicilina (CMI = 125-1000 $\mu\text{g/ml}$, figura 16), dicloxacilina (CMI = 250-1000 $\mu\text{g/ml}$, figura 17), ceftriaxona (CMI = 125-1000 $\mu\text{g/ml}$, figura 18) y cefalotina (CMI = 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$, figura 19). La distribución de la CMI para cefuroxima fue bimodal, moderadamente resistente (80% de las cepas) en el rango de 250-1000 $\mu\text{g/ml}$ y resistente (20%) en el intervalo de 1001-2000 $\mu\text{g/ml}$ (figura 20). En la figura 21 podemos apreciar que el 100% de las cepas fue sensible a la ampicilina + sulbactam (CMI = 3.9-7.8 $\mu\text{g/ml}$).

FIGURA 10
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A DICLOXACILINA

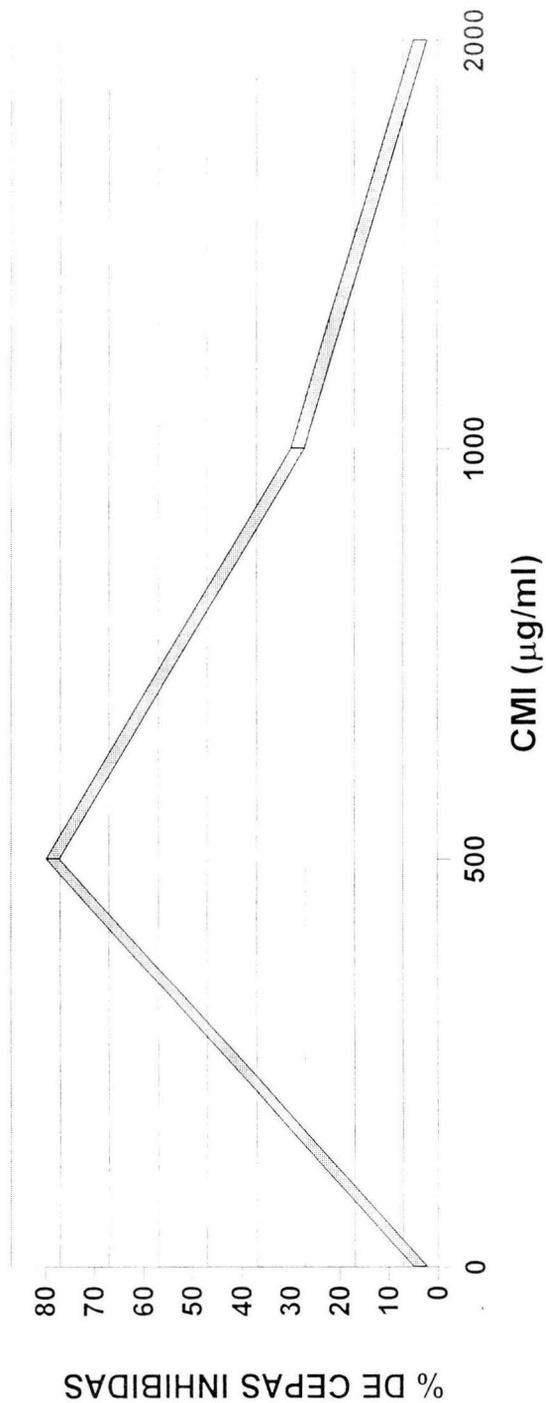


FIGURA 11
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A CEFTRIAXONA

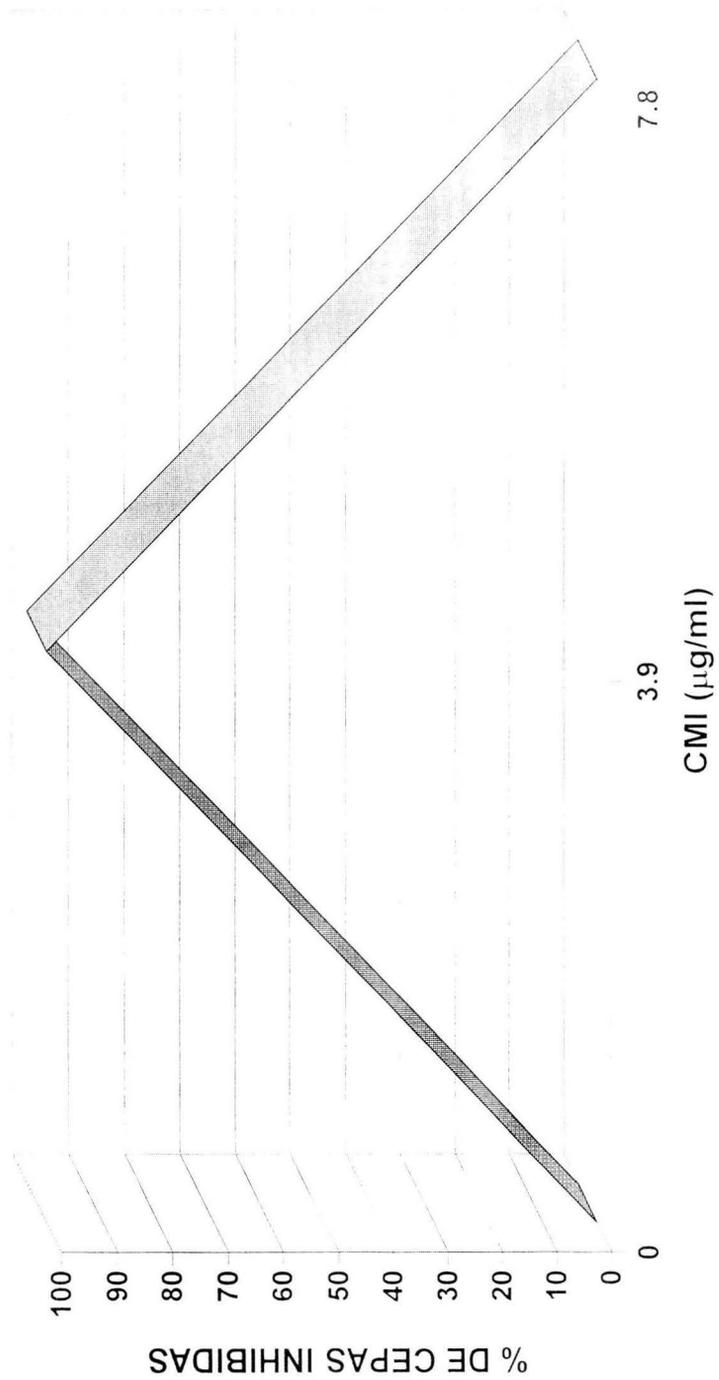


FIGURA 12
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A CEFALOTINA

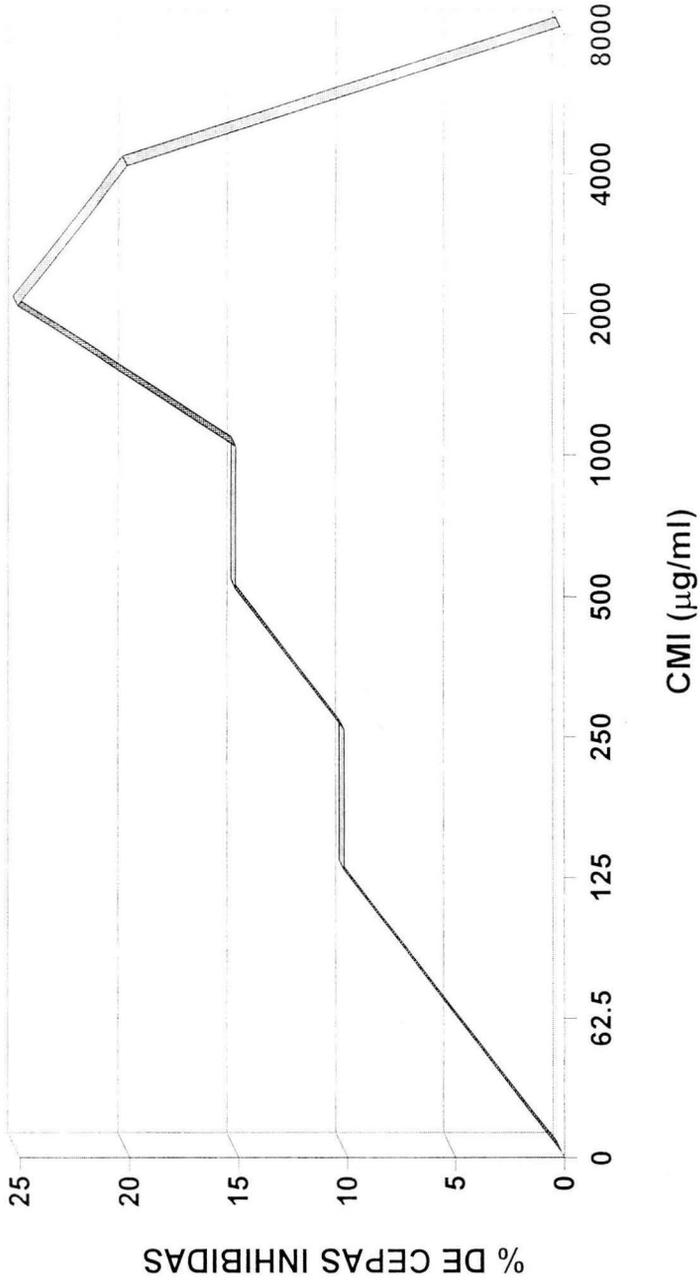


FIGURA 13
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A CEFUROXIMA

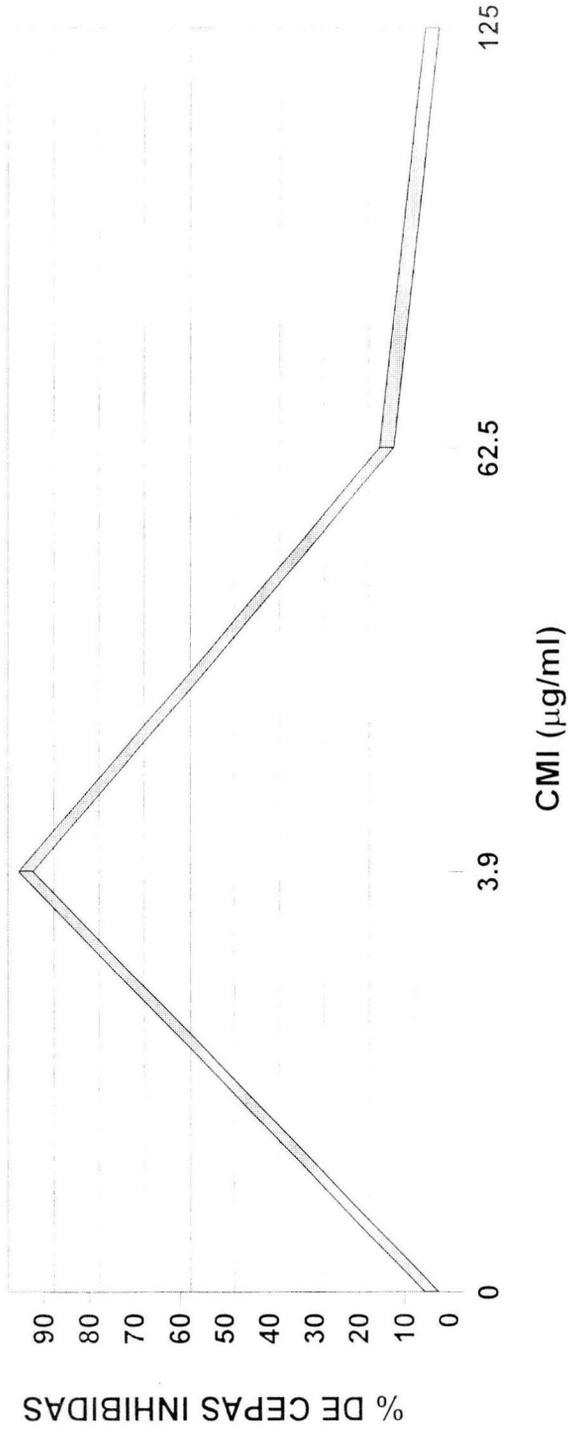


FIGURA 14
SUSCEPTIBILIDAD DE *Aeromonas hydrophila* A AMPICILINA + SULBACTAM

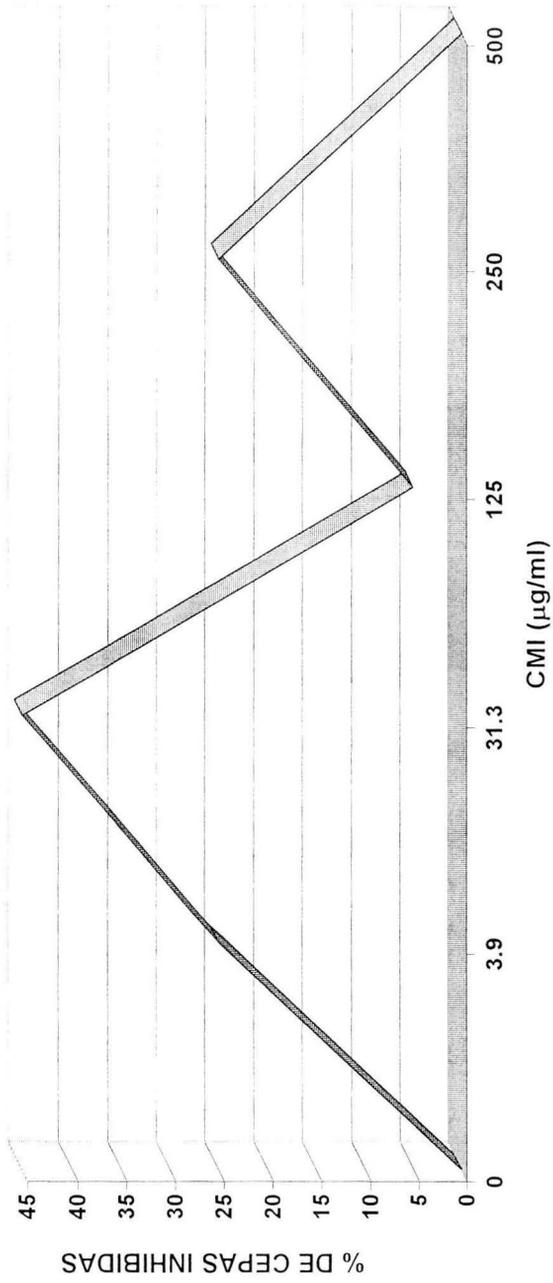


FIGURA 15
SUSCEPTIBILIDAD de *Hafnia alvei* A PENICILINA

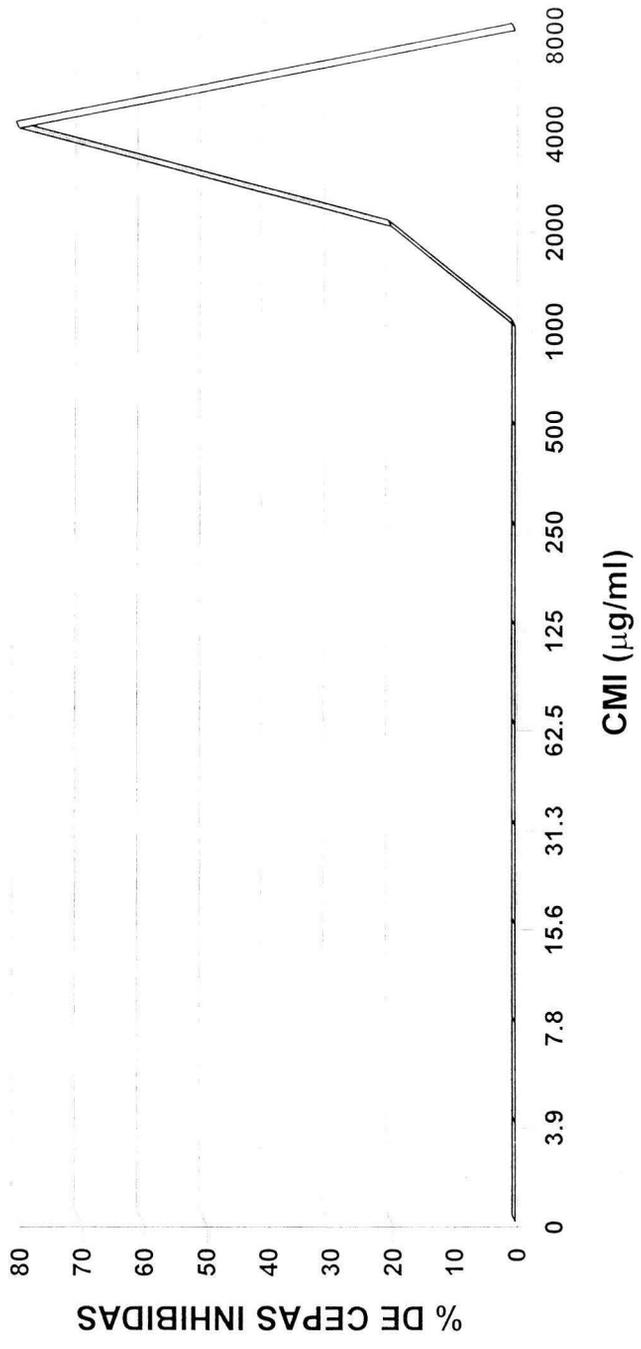


FIGURA 16
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A AMPICILINA

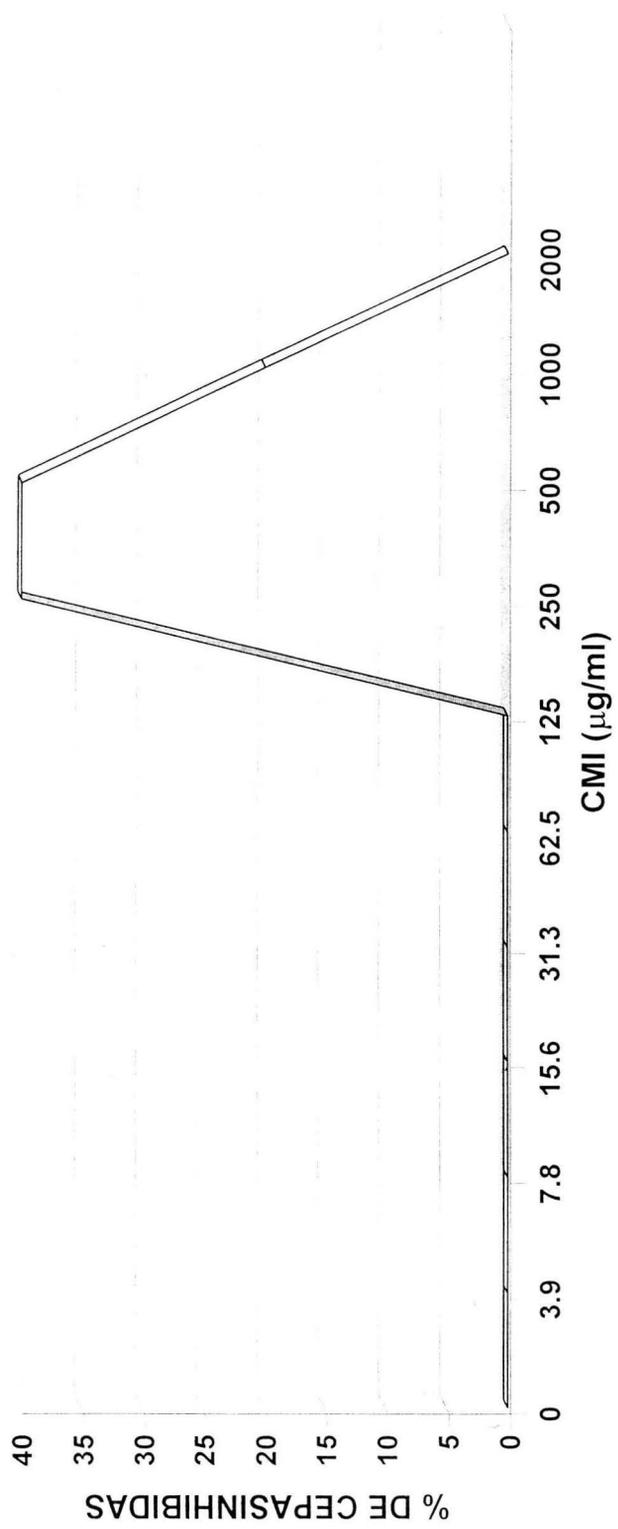


FIGURA 17
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A DICLOXACILINA

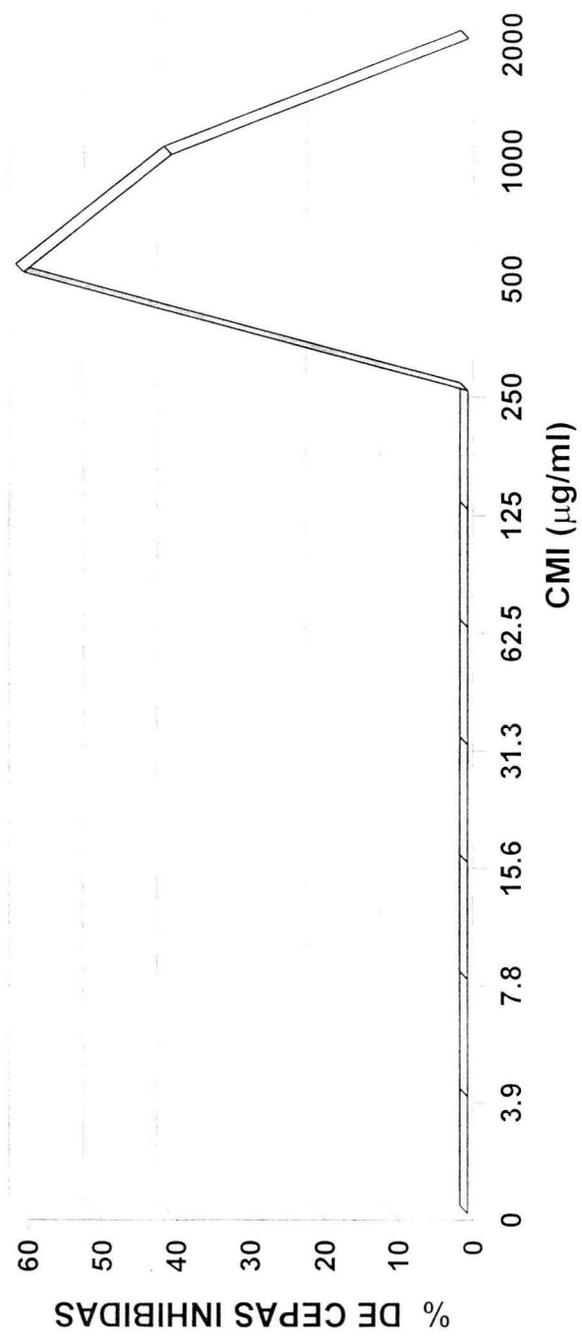


FIGURA 18
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A CEFTRIAXONA

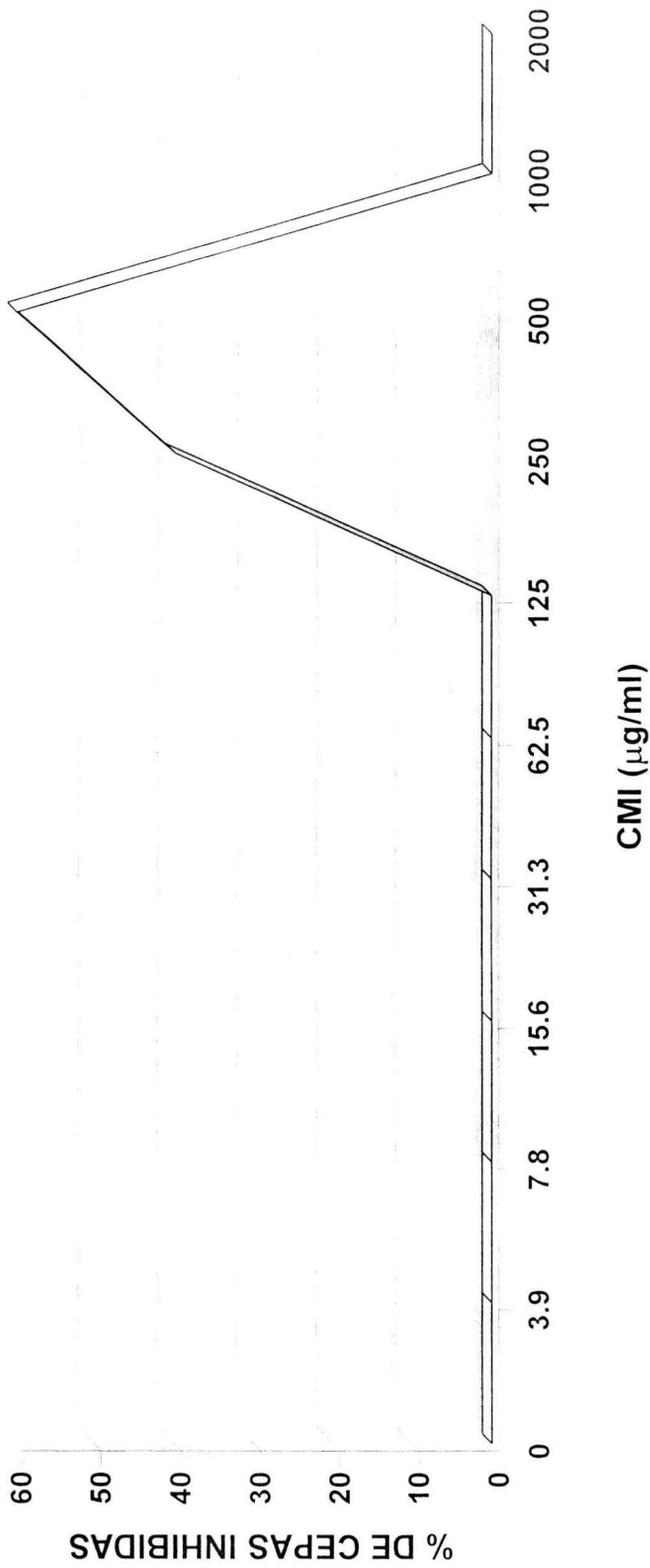


FIGURA 19
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A CEFALOTINA

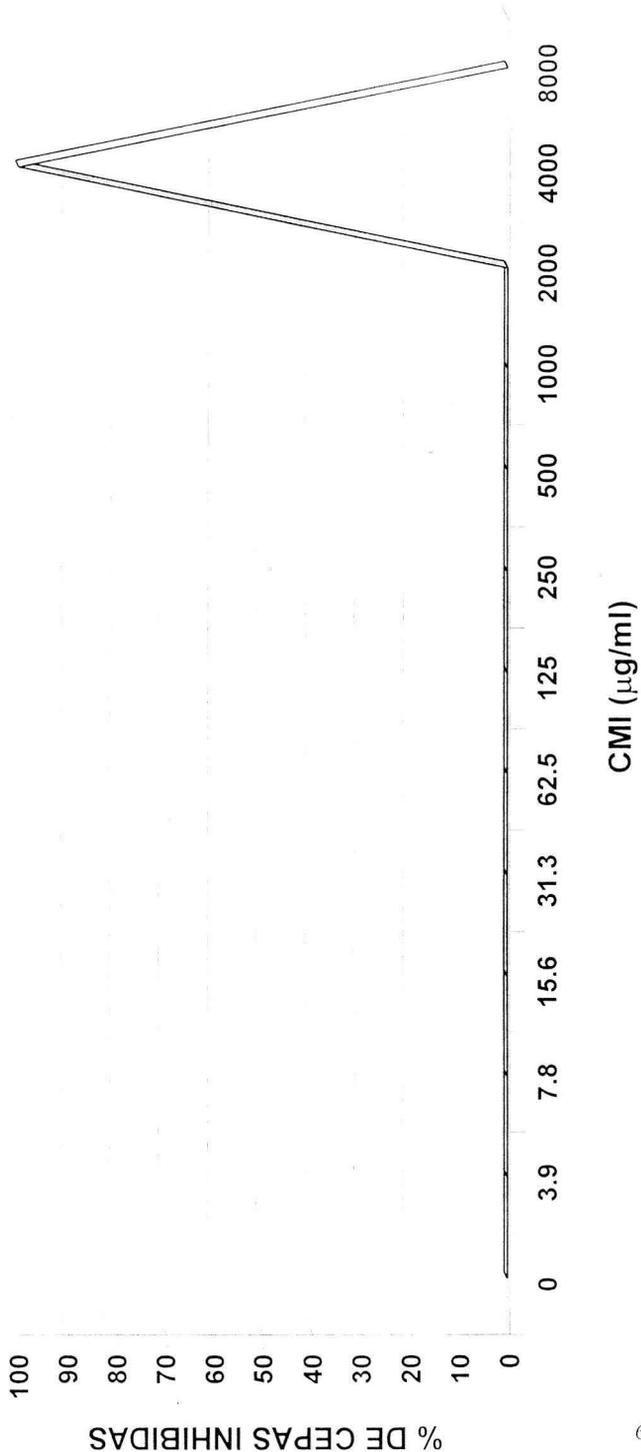


FIGURA 20
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A CEFUROXIMA

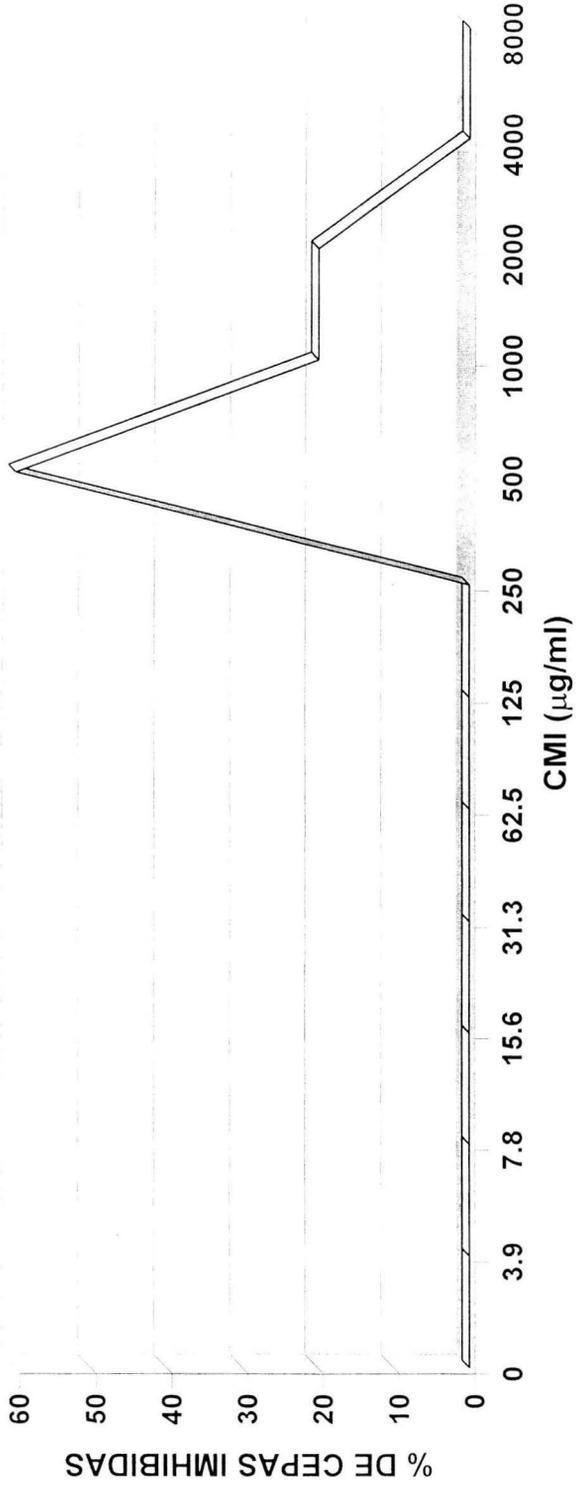
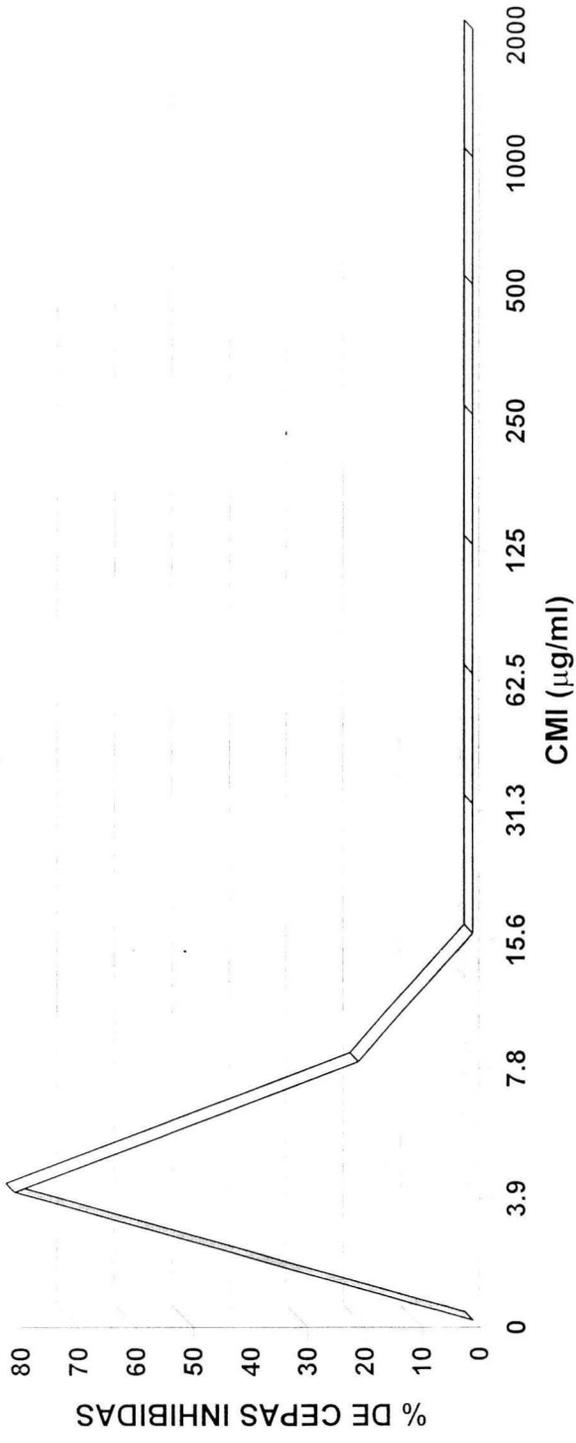


FIGURA 21
SUSCEPTIBILIDAD DE *Hafnia alvei* A AMPICILINA + SULBACTAM



Enterobacterias

Se detectó una distribución de un solo pico para penicilina (figura 22), encontrándose al 100% de las cepas resistentes en el intervalo de 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 23 se puede apreciar que la distribución de la CMI de ampicilina fue bimodal, moderadamente resistente (35%, CMI = 125-500 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (65%, CMI = 501-2000 $\mu\text{g/ml}$). Una distribución similar se obtuvo para dicloxacilina, moderadamente resistente (60%, CMI = 250-1000 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (40%, CMI = 1001-2000 $\mu\text{g/ml}$) (figura 24). En la figura 25 se aprecian 3 poblaciones en la distribución de la CMI de ceftriaxona, susceptible (20%) en el intervalo de 7.8-31.3 $\mu\text{g/ml}$, moderadamente susceptible (20%) en el rango de 31.4-125 $\mu\text{g/ml}$ y resistente (60%) en el intervalo de 126-1000 $\mu\text{g/ml}$. Para cefalotina se detectó una distribución bimodal, moderadamente resistente (10%, CMI = 1000 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (90%, CMI = 4000 $\mu\text{g/ml}$) (figura 26). Para el antibiótico cefuroxima se encontró que el 100% fue resistente en el intervalo de 250-2000 $\mu\text{g/ml}$ (figura 27). Finalmente en la figura 28 se aprecia que la distribución de la CMI del inhibidor sulbactam + ampicilina fue bimodal, sensible (90%) en el intervalo de 3.9-7.8 $\mu\text{g/ml}$ y moderadamente sensible (10%) en el rango de 15.6-62.5 $\mu\text{g/ml}$.

FIGURA 22
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A PENICILINA

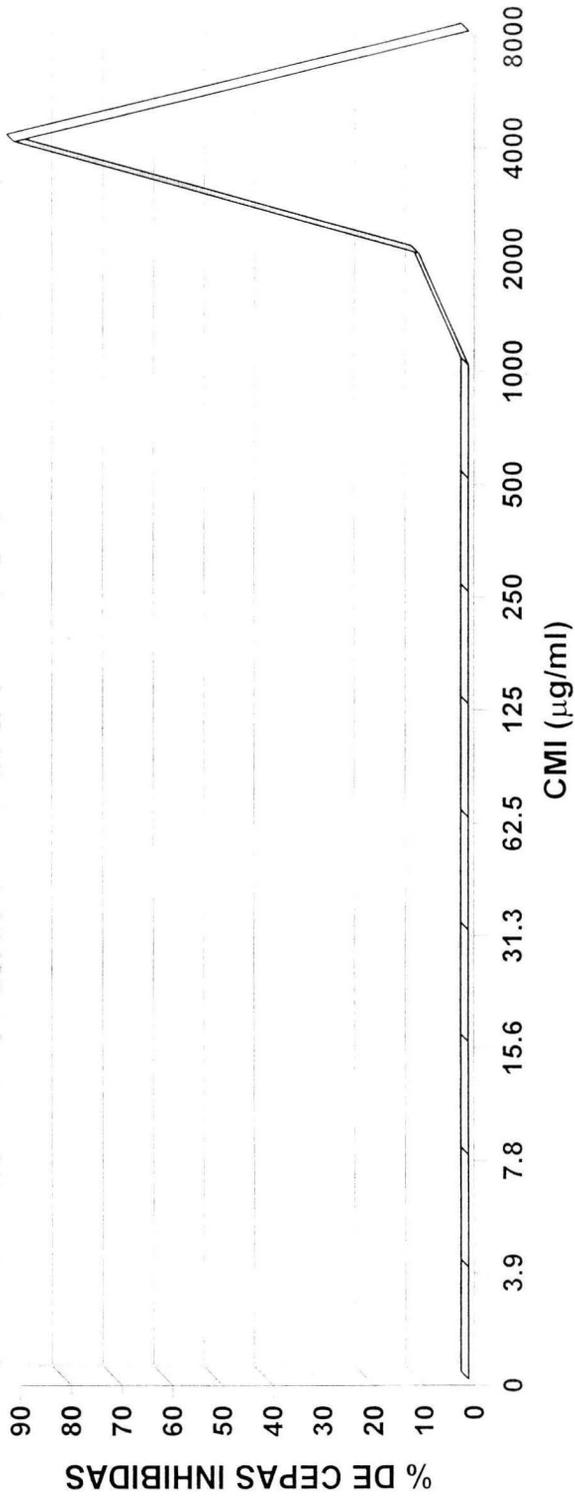


FIGURA 23
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A AMPICILINA

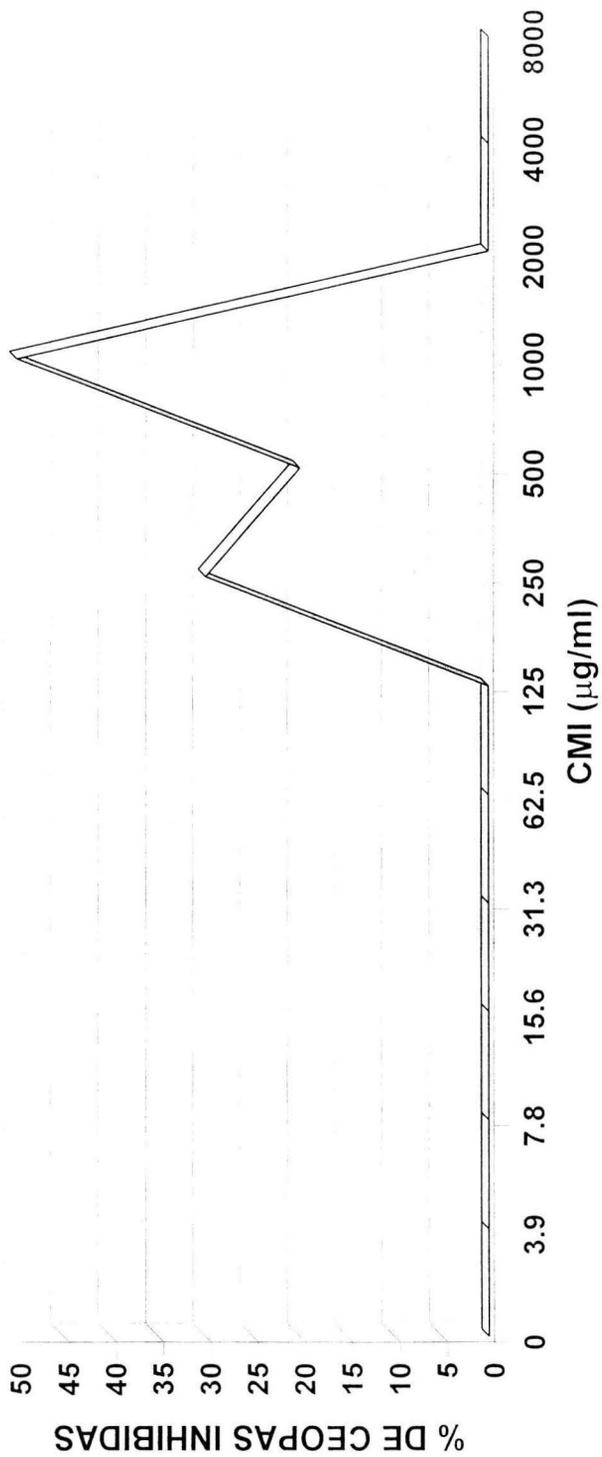


FIGURA 24
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A DICLOXACILINA

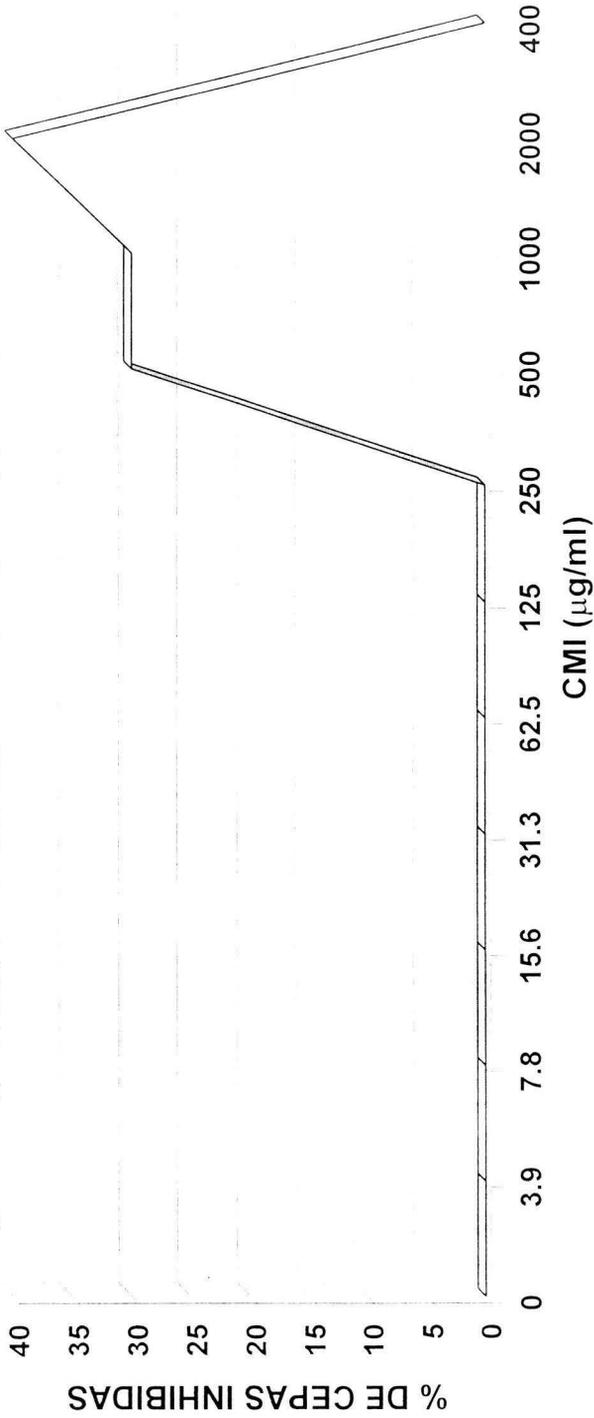


FIGURA 25
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A CEFTRIAXONA

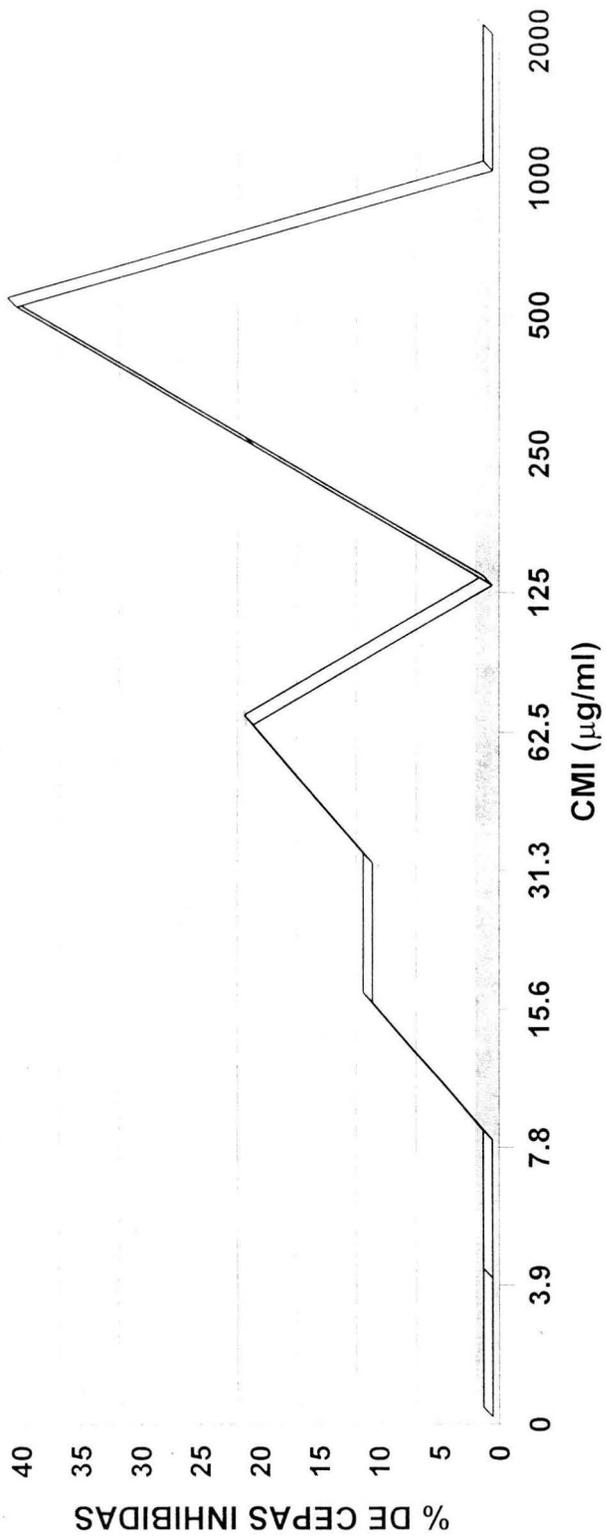


FIGURA 26
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS CEFALOTINA

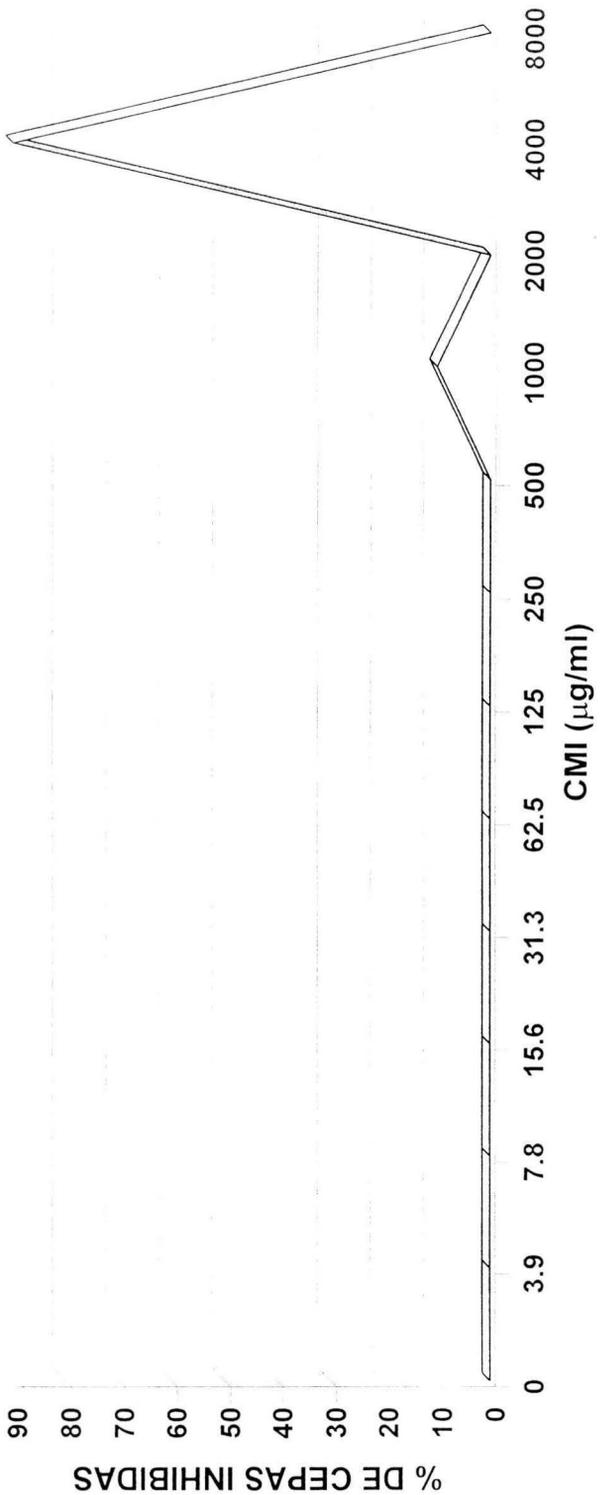


FIGURA 27
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A CEFUROXIMA

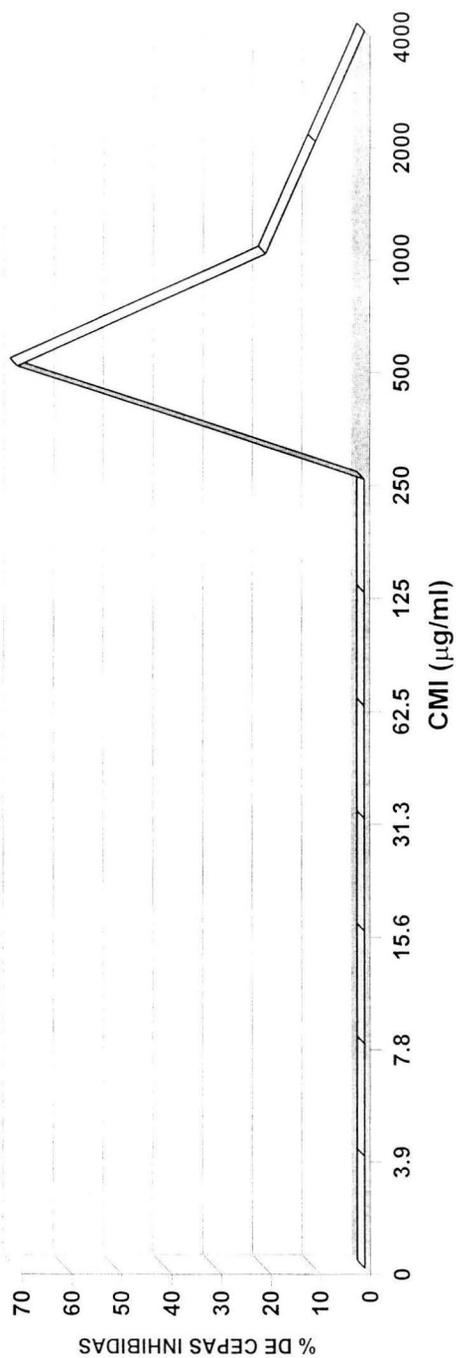
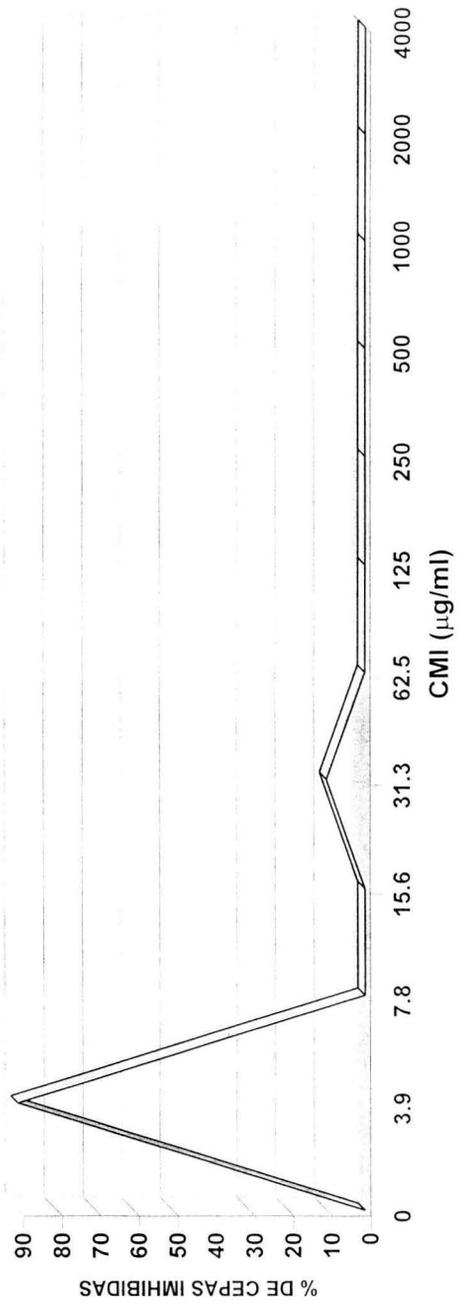


FIGURA 28
SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A AMPICILINA + SULBACTAM



DISCUSIÓN

Identificación de las cepas aisladas del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*

Con el método de identificación API-20E reportamos que el 65.5% de las bacterias aisladas del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum* correspondió a la especie *Aeromonas hydrophila*, 17.2% a *Hafnia alvei*, 6.8% a *Enterobacter cloacae*, 3.5% a *Enterobacter amnigenus*, 3.5% a *Citrobacter freundii* y 3.5% al género *Klebsiella* (tabla 3). Nuestros resultados reflejan que *Aeromonas hydrophila* predominó en el tracto digestivo de *C. humboldtianum*, corroborando lo propuesto por Sugita y cols. (1995). Estos autores en un estudio realizado sobre la flora bacteriana intestinal de 20 carpas comunes (*Cyprinus carpio*) y 13 carpas crucianas (*Carassius carassius*) capturadas en el río urbano de agua dulce en Hikjen, Japón, aislaron un total de 98 cepas de *Aeromonas hydrophila*. Es importante mencionar que estos autores también obtuvieron 3 y 15 cepas de *Aeromonas hydrophila* de 7 muestras de agua y sedimentos del río, respectivamente. Por otra parte Trust en 1975 identificó la flora bacteriana del tracto digestivo del salmón (*Oncorhynchus keta*), el género predominante fue *Aeromonas*, siendo la especie de *Aeromonas hydrophila* la mas frecuente. Otros géneros

comunmente encontrados en este estudio fueron *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Acinetobacter*. En Suecia, Lindberg y cols. (1998) en un trabajo realizado sobre una muestra de 72 peces de agua dulce, aislaron *Enterobacteriaceas* en un 31%, siendo la mas frecuente *Rahnella aquatilis*, una de cada tres fue *Citrobacter freundii*, y también se obtuvo la especie de *Hafnia alvei*. En Noruega, Ringo y cols. (1999) identificaron *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas spp.* y *Carnobacterium* del tracto intestinal de la trucha ártica (*Salvenilus alpinus*). Es importante mencionar que existen serios problemas en la identificación de especies en el género *Aeromonas*, por la pobre correlación que existe entre fenotipos y genotipos, por lo que la técnica de hibridación de ADN diseñada por Ezaki y cols. (1989) ha demostrado ser una eficiente herramienta para identificar a nivel de especie el género *Aeromonas*.

Resistencia a antibióticos

Aeromonas hydrophila

En nuestro estudio reportamos que el 100% de las cepas de *Aeromonas hydrophila* fue resistente al antibiótico ampicilina, 95% a carbenicilina y 40% a cefalotina (figura 2). Los porcentajes encontrados por nosotros son parecidos a los reportados en un estudio realizado sobre un grupo de cepas

clínicas de *Aeromonas sp.* aisladas de pacientes infectados en Taiwán (Wen, *et al.*, 1996). En dicho estudio se encontró que el 100 % de las cepas fue resistente a ampicilina y el 94% a cefalotina. En otro estudio realizado sobre un grupo de cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas a partir de lesiones epidérmicas de 21 tilapias (*Telapia mossambica*) se encontró que el 100% de las cepas fue resistente a la ampicilina (Son, *et al.*, 1997). Por otra parte Miranda y cols (1998) determinaron la susceptibilidad a antibióticos de 172 cepas de *Aeromonas sp* aisladas de 56 abastecimientos de agua para beber, de 60 canales de agua de irrigación, y de 56 sitios de agua con descarga de drenaje. En este estudio la mayoría de las cepas fue resistente a carbenicilina, mientras que el 100% fue sensible a gentamicina, amikacina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol. De esta manera los resultados obtenidos por nosotros reflejan que los antibióticos de 1ª elección como la ampicilina, carbenicilina y cefalotina son ineficaces para el tratamiento por infecciones causadas por esta especie, debido principalmente a la producción de β -lactamasas (figura 7). Si bien se ha descrito que la expresión de β -lactamasas en *Aeromonas hydrophila* puede ser codificada cromosómicamente (Walsh, *et al.*, 1997), no se descarta la probabilidad de que nuestras cepas sean poseedoras de plásmidos que codifican para estas enzimas. Por ejemplo en un estudio realizado sobre 43 cepas de *Aeromonas hydrophila* se encontró

que el 94% de las cepas fue productora de β -lactamasas confiriéndole resistencia principalmente a la ampicilina (Ahmed *et al.*, 1998).

Hafnia alvei

Nosotros reportamos que el 100% de las cepas de *Hafnia alvei* mostró resistencia para ampicilina, ceftriaxona y cefalotina, mientras que el 80% fue resistente a cefotaxima y carbenicilina, y 20% a trimetoprim con sulfametoxazol (figura 3). Nuestros porcentajes reflejan que *Hafnia alvei* presentó resistencia a 5 de los 12 antibióticos probados, lo que refleja probablemente que estas cepas sean poseedoras de plásmidos que les confieren la resistencia a los principales antibióticos β -lactámicos.

Enterobacter sp

Anteriormente describimos que el total de las cepas de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter amnigenus* fue resistente a los antibióticos ampicilina, carbenicilina, cefalotina, ceftriaxona y cefotaxima (figura 4). La resistencia por estas especies a 5 de los 12 antimicrobianos probados refleja la elevada resistencia de el género a estos agentes. Por ejemplo en un estudio realizado en China sobre 29 cepas clínicas de *Enterobacter cloacae*, se encontró que el 82% fue resistente a 9 de los 24 antibióticos probados, además se

comprobó que estas cepas eran poseedoras de un plásmido de 80Kb que les confería la resistencia a estos agentes (Li, *et al.*, 1995). En otro estudio realizado en España en donde se probó la susceptibilidad de antimicrobianos en cepas clínicas de *Enterobacter amnigenus*, se encontró que el 83% fue resistente a ampicilina, 75% a cefazoline y 33% al ácido clavulánico (Capdevila, *et al.*, 1998).

Citrobacter freundii

En nuestro estudio reportamos que la cepa de *Citrobacter freundii* fue resistente a ampicilina y carbenicilina (figura 5). Los resultados de resistencia a estos dos antibióticos no refleja de manera global que esta especie sea resistente a estos agentes, toda vez, que solo se probó una cepa, sin embargo en Japón, se probó la susceptibilidad a seis antimicrobianos β -lactámicos en 2000 cepas aisladas de pacientes infectados, (incluían cepas de *Citrobacter freundii*). Estos autores reportaron que las cepas de *Citrobacter freundii*, así como las de las otras especies fueron resistentes a ceftazidime y piperacilina (Yamaguchi, *et al.*, 1999).

Klebsiella sp.

La cepa bacteriana del género *klebsiella* fue resistente a los antibióticos ampicilina, carbenicilina, cefalotina y cefotaxima (figura 6). Nuestros porcentajes son muy parecidos a los reportados por Ramón (2001) sobre un grupo de cepas clínicas de *Klebsiella sp* aisladas de pacientes infectados. En este estudio el 75.5% fue resistente a ampicilina, 63.6% a carbenicilina y 54.5% a cefalotina.

Producción de β -lactamasas

En nuestro trabajo reportamos que el 100% de las cepas identificadas fue productora de β -lactamasas (figura 7). Nuestros datos son semejantes a los reportados en un estudio realizado en Estados Unidos sobre 12,574 bacterias obtenidas de pacientes atendidos en 83 instituciones médicas diferentes (Thornsberry, *et al.*, 1996). En este trabajo se demostró que las Enterobacterias, específicamente las especies de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii* fueron productoras de β -lactamasas. Por su parte Pitout (1997) trabajó con 80 cepas de *Enterobacter sp.*(entre ellas *E.cloacae*), y demostró que pueden producir distintas clases de β -lactamasas, responsables de la resistencia a los β -lactámicos. Lo mismo fue reportado por Piddock y cols. (1997), los cuales midieron la incidencia de

la producción de β -lactamasas de amplio espectro (específicamente para medir resistencia a cefotaxime y ceftazidime) de 3745 *Enterobacterias* aisladas de pacientes atendidos en 96 hospitales en el Reino Unido. En este estudio se encontró que 409 cepas fueron resistentes a cefotaxime /ceftazidime, de las cuales 338 fueron *Enterobacteriaceas*, 29 *Escherichia coli*, 35 *Klebsiella sp* y 7 *Hafnia alvei*. En otro estudio realizado sobre 31 cepas clínicas de *Enterobacter aerogenes* en el cual se midió la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, se encontró que la selección de la resistencia a los antibióticos se desarrollaba durante la terapia (tratamiento) debido a la selección de mutantes que producían un alto nivel de β -lactamasas del grupo 1 (100%) y una enzima similar a la SHV-4 (93.5%) (Pitout, *et al.*, 1998).

IZT.

Multirresistencia a los antibióticos

En nuestro estudio reportamos que se observaron un total de 7 patrones distintos de multirresistencia (tabla 4). Al realizar un análisis más detallado de estos patrones podemos sugerir que quizás algunos de ellos estén conferidos por plásmidos, de tal forma, que el patrón de multirresistencia CF+CRO+AM+CTX+CB (3 cepas de *Hafnia alvei*, 2 de *Enterobacter cloacae* y 1 de *Enterobacter aminigenus*) podría encontrarse en un plásmido, que a su vez, se encontraría en las 3 especies antes mencionadas, de esta



manera la selección a un antibiótico en particular conduciría de manera indirecta a seleccionar la resistencia a los otros antibióticos. Por otra parte los patrones de resistencia CF+AM+CB (6 cepas de *Aeromonas hydrophila*) y AM+CB (12 cepas de *Aeromonas hydrophila*) se encontrarían probablemente también codificadas por el mismo plásmido.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos β - lactámicos.

Aeromonas hydrophila

En este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas de *Aeromonas hydrophila* fue resistente a los antibióticos penicilina, ampicilina y dicloxacilina (figuras 8, 9 y 10). Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en un estudio realizado en Taiwan sobre 234 cepas de *Aeromonas* (142 *A. hydrophila*, 59 *A. Sobria*, 32 *A. Caviae* y 1 *A. jandaei*) obtenidas a partir de pacientes infectados atendidos en 3 centros hospitalarios (Wen, *et al.*, 1996). En este trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria de 24 antibióticos por el método de dilución en placa (no se determinó la CMI de penicilina y dicloxacilina). Estos autores reportaron que para ampicilina se requirieron de más de 254 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 90% de las cepas, mientras

que en nuestro estudio se necesitaron de 1000-4000 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 85% (figura 9). Para ceftriaxona nosotros reportamos que se requirieron de 3.9-7.8 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 90% de las cepas (figura 11), mientras que estos autores reportaron que necesitaron de 128 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 90% de las cepas. Para cefalotina nosotros necesitamos de 500-2000 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 85% de las cepas (figura 12), sin embargo Wen y col. (1996) detectaron que para inhibir al 90% de la población se requirieron de más de 128 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente en este trabajo se reportó que para cefuroxima se necesitó de 3.9-62.5 $\mu\text{g/ml}$ y 31.3 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina + sulbactam para inhibir al 100% y 70% de las cepas, respectivamente (figura 13 y 14). Estos datos son semejantes a los reportados por Wen y col. (1996) en donde mencionaron que para inhibir al 90% de las cepas, tanto para el antibiótico cefuroxima como del inhibidor de β -lactamasas sulbactam + ampicilina, se necesitaron de 128 $\mu\text{g/ml}$ en cada caso.

Hafnia alvei

Nosotros mencionamos que el total de las cepas de *Hafnia alvei* fue resistente a los antibióticos penicilina y ampicilina, debido a que los intervalos de resistencia se encontraron entre 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$ y 125-1000 $\mu\text{g/ml}$,

respectivamente (figuras 15 y 16). Nuestros resultados se encuentran por arriba de los criterios de susceptibilidad establecidos para Gramnegativos, en donde se ha reportado que la CMI para estos antibióticos es de 8 µg/ml (Alasdair & Wase, 2001). Por otra parte también describimos que el 100% de las cepas fue resistente a la dicloxacilina en el rango de 250-1000 µg/ml (figura 17). Se ha descrito que para la dicloxacilina la CMI es de 1.15 µg/ml, principalmente para Grampositivos (González & Saltigeral, 1990). En este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas fue resistente a ceftriaxona (CMI = 125-1000 µg/ml, figura 18) y cefuroxima (CMI = 250-2000 µg/ml, figura 20). Recientemente se ha descrito que la CMI de ceftriaxona y de cefuroxima para el grupo de las enterobacterias es de 1 µg/ml y 8 µg/ml, respectivamente (Alasdair & Wase, 2001). En este trabajo mencionamos que el antibiótico más eficaz para esta especie bacteriana fue la combinación del inhibidor de β-lactamasas sulbactam más ampicilina, debido a que se necesitaron de concentraciones menores a 7.8 µg/ml para inhibir al 100% de las cepas (figura 21). Con base a estos resultados podemos deducir que esta combinación continúa siendo una alternativa para el tratamiento de infecciones ocasionadas por esta especie.

Enterobacterias

En este estudio reportamos que para penicilina el 100% de las cepas fue resistente (CMI= 2000-4000 $\mu\text{g/ml}$, figura 22), el 75% resistente a ampicilina (CMI = 501-2000 $\mu\text{g/ml}$, figura 23), y el 100% resistente a dicloxacilina (CMI = 250-2000 $\mu\text{g/ml}$, figura 24). Nuestros resultados obtenidos ponen de manifiesto que en la actualidad los antibióticos “considerados como de 1^a elección”, ya no son una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por este grupo, más aún si consideramos que el origen de estas bacterias es el tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*, que “aparentemente” no estan en contacto con bacterias de origen clínico, que en muchos de los casos son poseedoras de plásmidos que les confieren este fenotipo de resistencia.

Por otra parte mencionamos que el 60% de las cepas fue resistente a ceftriaxona (CMI =126-1000 $\mu\text{g/ml}$, figura 25), el 90% resistente a cefalotina (CMI = 4000 $\mu\text{g/ml}$, figura 26) y el 100% resistente a cefuroxima (CMI =250-2000 $\mu\text{g/ml}$, figura 27). Estos resultados contrastan con los reportados en un estudio (no se estudió la efectividad de cefalotina) en el cual se describió que la CMI de ceftriaxona y de cefuroxima para el grupo de las enterobacterias fue de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Alasdair & Wase, 2001).

Finalmente en nuestro estudio encontramos que el 90% de las cepas fue sensible al inhibidor sulbactam + ampicilina, debido a que se necesitaron de 3.9-7.8 µg/ml para inhibir al 90% de las cepas (figura 28). De igual manera esta combinación refleja que hoy en día es una de las mejores opciones no solo para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gramnegativas, sino también por bacterias Grampositivas, por ejemplo en un estudio realizado sobre 70 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas a partir de pacientes infectados que acudieron al servicio de laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-I, ubicado en la FES-Iztacala, se encontró que la CMI para la combinación de ampicilina + sulbactam fue de 31.2 µg/ml (Paniagua, *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto en la actualidad que no existen barreras en la selección de bacterias resistentes a los antibióticos, y que la vida bacteriana (sobrevivencia) se abre camino por si sola, traspasando en muchos de los casos los obstáculos genéticos y ambientales.

Por otro lado a partir de los resultados encontrados en este trabajo podemos argumentar que paulatinamente esta ocurriendo un incremento en la selección de bacterias resistentes, no solo de penicilina, ampicilina y dicloxacilina, si no también de las cefalosporinas de 1ª generación

cefalosporinas de 1^a generación (cefalotina), de 2^a generación (cefuroxima), de 3^a generación (ceftriaxona) y del inhibidor de β -lactamasas sulbactam + ampicilina, debido que para este último las cepas de *Aeromonas hydrophila* se distribuyeron en dos poblaciones diferentes (figura 14), lo que probablemente evidencie que estas bacterias han adquirido un mecanismo nuevo para evadir la acción de las β -lactamasas, o que tal vez, hayan mutado las PBPs, o ambos.

Finalmente con los datos recuperados podemos sugerir que “probablemente” para los antibióticos cefalotina (*Aeromonas hydrophila*, figura 12) y ceftriaxona (Enterobacterias, figura 25) estas bacterias sean productoras de diferentes tipos de β -lactamasas, o que quizás estas se estén produciendo en diferentes concentraciones, debido a que se encontraron tres poblaciones distintas, por lo que resulta importante analizar, e identificar en estudios posteriores las clases y las concentraciones de las β -lactamasas expresadas por estas especies bacterianas.

CONCLUSIONES

1. En este estudio se encontró que las especies de *Aeromonas hydrophila*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus*, *Citrobacter freundii* y el género *Klebsiella sp* son bacterias comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*.
2. Las cepas analizadas de *Aeromonas hydrophila* mostraron una alta resistencia a la penicilina, ampicilina, dicloxacilina y cefalotina, mientras que la cefuroxima y la combinación del inhibidor de β -lactamasas sulbactam más ampicilina fueron los antimicrobianos más eficaces.
- 3.- La combinación del inhibidor de β -lactamasas sulbactam más ampicilina fue el antibiótico más eficaz contra las cepas pertenecientes a la especie de *Hafnia alvei*, así como para las pertenecientes al grupo de las Enterobacterias.
4. A partir de los resultados encontrados en este estudio podemos concluir que está ocurriendo un incremento en la selección de bacterias resistentes a los nuevos antibióticos, debido principalmente a la producción de β -lactamasas, por lo que resulta importante en estudios posteriores analizar e identificar las diferentes clases de estas enzimas.

APÉNDICE

µg/ml	Concentraciones de Antibióticos (ml)						
	Penicilina	Ampicilina	Dicloxacilina	Cefalotina	Cefuroxima	Ceftriaxona	Sulbactam + Ampicilina
2000.0	0.80000	0.40000	0.80000	0.50000	0.40000	0.40000	0.32000
1000.0	0.40000	0.20000	0.40000	0.25000	0.20000	0.20000	0.16000
500.0	0.20000	0.10000	0.20000	0.12500	0.10000	0.10000	0.08000
250.0	0.10000	0.05000	0.10000	0.06250	0.05000	0.05000	0.04000
125.0	0.05000	0.02500	0.05000	0.03125	0.02500	0.02500	0.02000
62.5	0.02500	0.01250	0.02500	0.01563	0.01250	0.01250	0.01000
31.3	0.01250	0.00625	0.01250	0.00781	0.00625	0.00625	0.00500
15.6	0.00625	0.00313	0.00625	0.00391	0.00313	0.00313	0.00250
7.8	0.00313	0.00156	0.00313	0.00195	0.00156	0.00156	0.00125
3.9	0.00156	0.00078	0.00156	0.00098	0.00078	0.00078	0.00063

Cuadro 1. Concentraciones de antibioticos utilizadas para la determinación de la
Concentración Mínima Inhibitoria

Presentación Comercial de los Antibióticos

Penicilina	Penipot: Solución Inyectable de 400,000 unidades en 2ml
Ampicilina	Penbritin: Ampula de 500 mg en 2 ml
Dicloxacilina	Brispen: Ampula de 250 mg en 2 ml
Cefalotina	Klefin: Ampula de 1 g en 5 ml
Cefuroxima	Zinnat: Ampula de 750 mg en 3 ml
Ceftriaxona	Rocephin: Ampula de 500 mg en 2 ml
Sulbactam + Ampicilina	Unasyna: Ampolleta de 500 mg de Ampicilina y 250 mg de Sulbactam en 1.6 ml

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, P.J.F. 1993. Crecimiento, Supervivencia y Reproducción del charal *Chirostoma humboldtianum Valenciennes* (*Atherinidae*) en el embalse San Felipe Tiacaque, Mex. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM.

Ahmed, A; Hafiz, S ; Ahmed, OT; Majeed, H. Syed, S. 1998 Sensitivity pattern and β -lactamase production of clinical isolates of *Aeromonas* strains. JPMA. *JPaK Med Assoc*, **48** (6) : 158- 161.

Alasdair, P.; MacGowan & Richard, W. 2001. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **48**: 17-28.

Albert M.J; Ansaruzzaman M; Talukder K. A; Chopra A.K; Kuhn I; Faruque A.S; Islam M.S; Sack R. B; Mollby R. 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* isolated from children with diarrhea, healthy controls and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 10:3785- 3790.

Allan, B. J & Stevenson, R.M.W. 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can J Microbiol*; **27**: 1114- 1122.

Alvarez, V.J. 1970. Peces Mexicanos (claves). Secretaría de Industria y Comercio. Inst. Nal. Inv. Biol. Pesq. Com. Nal. Cons. Pesq. México. **1**; 122-129.

Amábile Cuevas, C.F. 1988. La resistencia bacteriana a las antibióticos Ciencia y desarrollo Num. 80 año XIV: 57-68.

Araujo, R.M; Arribas R.M; Pares, R. 1991. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J Appl Bacteriol* . 71 182-6.

Ascencio, F ; Martínez, A. W ; Romero, M. J. & Wadstrom T. 1998. Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *Fems Immunol Med Microbiol*. **20** (3) ; 219- 29.

Ascencio, F; Ljungh, A. & Wadstrom, T. 1991. Comparative study of extracellular matrix protein binding to *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish and human infection. *Microbios*; **65**: 135-46.

Austin B. Diseases of fish. Proc 1st. International Workshop on *Aeromonas* and *Plesiomonas*, Manchester, England, 1986: 16.

Baca, D.A. 1986. Acuicultura. Serie agroindustrias FIRA: 287pp.

Barbour C.D. 1966. The sistematics and evolution of the genus *Chirostoma*
Ph. D. Tesis Tulane University, USA.

Barbour, C. D. 1973. The sistematic and evolution of genus *Chirostoma* (
Pisces Atherinidae). Tulane studies in Zoology and Botany, **18** (3): 97- 141.

Bauer, W.M. Kirby; J.C. Sherris & M. Turk. 1966 Antibiotic susceptibility
testing by a standarized single disk method. *Am J. Clin. Pathol.* **45**: 493- 496.

Bernheimer A. W, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic
exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 1974; **9**: 1016-21.

Brenden, R; Janda, J.M. 1987. Detection, quantitation and stability of the
betahaemolysin of *Aeromonas spp.* *J. Med. Microbio*; **24** : 247- 51.

Burke, V; Robinson, J; Berry, R.J. ; Peck, D.; Beaman, J. & Bundell, C.
1983. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and
other infective agents. *J. Infect. Dis.* **148**: 68- 74.

Burke, V., J. Robinson, J. Beaman, M. Gracey, M. Lesmana, R. Rockhill, P. Echeverria, and J. M. Janda. 1983. Correlation of endotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1196-1200.

Capdevila, J.A; Bisbe, V; Gasser, I ; Zuazu, J; Oliv, et; Fernández, F. & Pah Berga A. 1998. *Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin*, **16** (8) : 364- 6 .

Cetnal. 1970. Carta Topográfica, geológica, uso del suelo y climática. SSP. Escala 1: 50000 E-14-A-27.

Chang, C.Y; Thompson, H.; Rodman, N.; Bylander, J. & Thomas. 1997. Pathogenic analysis of *Aeromonas hydrophila* septicemia. *Ann Clin Lab Sci* **27** (4) : 254-9.

Cházaro, O. S. 1989 Estudio sobre algunos aspectos de la biología del charal (*Chirostoma jordani*) en el embalse Trinidad Fabela, Estado de México. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Chopra, I. & P.R. Ball. 1982. Transport of antibiotics into bacteria *Adv. Microbiol. Physiol.* **23**: 183- 240.

Comber, K.R. 1980. Activity of amoxicillin / clavulanic acid (2:1) BEL 2 5000 augmentin in vitro in vivo, current chemotherapy and infectious disease. Proceedings 19th ICAAC, **1**: 343.

Curtiss, N.A:C.; D. Orr, M.G. Boulton & G.W. Ross. 1981. Penicillin binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. Comparison of two strains differing in their resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **7**: 127-136.

De la Cruz G; Moncayo E. 1985 Análisis de la variabilidad en una población del charal *Chirostoma humboldtianum Valenciennes (Atherinidae)* del embalse Huapango, Mex. VI11 Congr. Nal. Zool. (Memorias) **3**: 1-24.

DePaola A; Peeler J.T; Rodrick G.E.1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram- negative bacteria in catfish ponds. *Appl Environ Microbiol.* **61(9)**: 3513.

Dooley JSG ; Mc Cubbin WD; Kay CM; Trust TJ.(1988) Isolation and biochemical characterization of the S- layer protein from pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J Bacteriol* ; **170**: 2631-8.

Dudley M.1995. Bacterial resistance mechanism to beta- lactam antibiotics: assesment of managment strategies. *Pharmacotherapy*, **15**;1PT 2, 95- 145.

Elwell, L.P.; Inamine, J.M & Minshew, B.H. 1978. Common plasmids specifying tobramycin resistance in two enteric bacteria isolated from burn patients. *Antimicrob Agents Chemother* **13**: 312- 317.

Eurell T.E, Lewis DH, Grumbles LC. 1978. Comparison of selected diagnostic tests for detection of motile *Aeromonas septicaemia* in fish. *Am J Vet Res*; **39**: 1384-6.

Ezaki,TY; Hashimoto Y; Yabuuchi E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:224-229.

Fasola EL; Fasching C.F. Peterson L.R. 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of beta- lactam and beta- lactamase inhibitor combinations against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *J. J. Lab. Clin. Med.* **125** : 200-211.

Flores, T.L.1985. Contribución al conocimiento de la biología de hembras del charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) Pisces Atherinidae, del embalse Huapango, Edo. De México. Tesis (Biol.), E.N.C.B. IPN. 50pp.

Fussle R , Biscopig J ; Behr R ; Sziegoeet A. 1994. Development of resistance by *Enterobacter cloacae* during thrapy of pulmonary infections in intensive care patients. *Clin Invest*, **72** (12): 1015-9.

Gámez Ch. G. 1984. Análisis del contenido gastrointestinal del charal *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes (Atherinidae) del embalse Huapango, Mex. Tesis de Licenciatura, Escuela nacional de Ciencias Biológicas- Instituto Politécnico Nacional, México. D. F.

Garau J. 1994. Beta- lactamases: current situation and clinical importance. *Intensive Care Med*, 20 suppl **3** : S 5-9.

García, E. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana), 3^a. ed. Mex. D.F Offset. Larios.

Garibay, R ; Uria, E; Moncayo, E. 1988. Estudio histológico de las gónadas del charal *Chirostoma humboldtianum Valenciennes (Atherinidae)* del embalse Huapango, Méx. *1 Cong. Nal. Ict. Sociedad Ictiológica Mexicana A.C.* Baja California, México. 112.

Geldreich, E.E.1978. Bacterial populations and indicator concepts in faeces, sewage, stormwater and solid wastes. In Berg G (ed) *Indicators of viruses in water and food. Ann Arbor Science*:51-59.

Ghanem, E.H; Mussa, M.E; Eraki, H.M.1993. *Aeromonas*-associated gastroenteritis in Egypt.*Zentralbl Mikrobiol*; 148: 441-7.

González, N.S. & Saltigeral, S.P. Guía de Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios y Antimicóticos. 1992. 2^a Ed. Ed. Interamericana. México, D.F. pp 14.

Goodwin, A.E & Killian, H. S. 1998. *Hafnia alvei*, an emerging pathogen of channel catfish. Aquaculture fisheries centre 23rd Annual Eastern Fish Health Workshop.

Graevenitz, A.V., 1990. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In Lennete, E.H., Balows A. , Hausler Jr. W.J. 1995. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. Washington. D.C. E.U.A. pp. 179- 194.

Gryllos, I; Shaw, J.G; Gavín, R; Merino, S; Tomás J.M. 2000. Rol of *flm* Locus in Mesophilic *Aeromonas* Species Adherence. In Press.

Gunthardt, H. & Peiniekamp A. 1996. Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis*, **22** (6) : 1040-5.

Hartman, B. J. & A. Tomasz. 1984. Low- affinity penicillin binding protein associated with beta- lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol* **158**: 513-516.

Havelaar, A. H; Versteegh, J.M.F.; During M. 1990. The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Zentralbl Hyg.* 190: 236-256.

Hazen, T.C; Fliermans, C.B; Hirsch R.P; Esch G.W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States . *Appl Environ Microbiol*; 36: 731-8.

Hazen, T.C; Raker, M.L; Esch, G.W. & Fliermans, C.B. 1978. Ultrastructure of red- sore lesions on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ; association of the ciliate *Epistylis sp.* and the bacterium *Aeromonas hydrophila*. *J. Protozool*; **25** : 351-5.

Hocutt, H.Ch; Wiley, O.E. 1985. The Zoogeography of North American Freshwater Fishes. Wiley J and Sons (Ed). 487-517.

Huicochea, C.R *et.al.*1987. El charal *Chirostoma humboldtianum* (*Valenciannes*) *Pisces Atherinidae* en el embalse San Felipe Tiacaque, Edo. De México. Ecología y producción, durante el periodo de Enero a Septiembre de

1987. Memorias del XI Simposio de Biologías de Campo.E.N.E.P. Iztacala UNAM.p39.

Igari J. 1994. Nationwide survey on susceptibilities of clinical isolates from urinary tract to antimicrobial agents in Japan. *Jpn J Antibiot*, **47** (3) : 255-67.

INEGI. 1999. Perspectiva Estadística del Estado de México. pp.95.

International Commission on Microbiological specifications for foods. Microorganismos en los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980.

Jacoby G.A. 1994. Extrachromosomal resistance in gram- negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol*, **2**: 10 ; 357-60.

Jawetz, E., JL. Melnick y E. A. Adelberg., 1999. Manual de Microbiología Médica 16 edición., Ed. Manual Moderno, México, D.F. 10: 184-185.

Komathi, A.G; Ananthan, S. & Alavandi, SV. 1998. Incidence and enteropathogenicity of *Aeromonas spp.* in children suffering from accute diarrhoea in Chennai. *Indian J Med Res*, **107** : 252-6.

Kumamoto, Y; Tsukamoto, T. & Hirose, T. 1998. Comparative studies on activities of antimicrobial agents against causative organisms isolated from patients with urinary tract infections. *Jpn J Antibiotic* **51** (2) : 69-111.

Kumate, J. 1981. Antibióticos y quimioterápicos, 2ª. Ed. Méndez Cervantes, México, D.F. pp.51-82.

Kuperstoch-Portnoy, Y.M. 1981. Antibiotic Resistance of Gramnegative bacteria in México: Relationship to drug consumption. En Levy, S.B.; R.C. Clowes & E.L. Koenig (eds). "Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of bacterial plasmids, pp.529-537. Plenum Press. New York.

Leung K-Y, Stevenson RMW. Characteristics and distribution of extracellular proteasas from *Aeromonas hydrophila*.1988. *J Gen Microbiol* ; **134** : 151-60.

Levine M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterhemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155** ; 377-389.

Lindberg, A M; Lyung, A; Ahernes; Lofdahl, S & Molin, G. 1998. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int J Food Microbiol*, **39** (1-2). 11-7.

Li, Y ; Shi, A & Lin L. 1995. An investigation into antibiotic resistance and plasmid pattern of *Enterobacter cloacae* in burn infection. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih*.**11** (5) : 327-9.

Mata, L.J; Gangarosa, E.J; Cáceres, A. ; Perera, D.R. and Mejicanos, M.L.1970. Epidemic Shiga Bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic Investigations in Guatemala *J. Infec. Dis.* **122**: 170-180.

Mattick, K. L. & Donovan, Tj. 1998. The risk to public health of *Aeromonas* in ready- to- eat salad products. *Commun Dis Public Health*, **1** (4) : 267-70.

Mc Garey D.J ; Foley D.P ; Reyer B Jr. ; Frye LC ; Lim DV. 1990. The role of motile *Aeromonads* in the fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS). Proceeding 3rd International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*.

Michel C. A. 1981. A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis* L.) in an Alpine lake : isolation and preliminary study of the causative organism. *J Wildlife Dis* ;**17**: 505-10.

Miranda C.D; Castillo G. 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *Sci Total environ.*224(1-39): 167-76.

Navarrete, S.N.A. 1981. Contribución a la biología del charal *Chirostoma jordani* de la Presa Taxhimay. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Navarrete, S.N.A; Cházaro O.S.1992.Espectro trófico del charal *Chirostoma humboldtianum Valenciennes* (*Atherinidae*) del embalse Tiacaque, México.*Rev. Zool* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 3-29.

Nieto TP, Ellis AE. 1986. Characterization of extracellular metallo- serine proteasas of *Aeromonas hydrophila* strain. *J Gen Microbiol*; **132** :1975-9.

O'Callaghan, C.H.; Morris, A.; Kirby, S.M. & Shingler, S.H. 1972. Novel method for detection of beta- lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; **1** : 283- 288.

Ocampo S.E. 1981. *Cocina Internacional*. CECSA. México.: 196- 220.

Olarte, J. 1992. Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 49: 143-150.

Ohmori, H.; A. Azuma; Y. Zuzuki & Y. Hashimoto. 1977. Factors involved in β -lactam antibiotics. *J Antimicrob. Chemother.* **7**: 127-136.

Paniagua, G.L.; Monroy, P.E. García, G.O. & Vaca, P.S. 1998. Effect of Beta-lactamase Inhibitors on Minimum Inhibitory Concentration of Ampicilin and Amoxicillin for *Staphylococcus aureus* strains. *Rev. Latin Microbiol.* **40**:128-134.

Palumbo, S.A; Bencivengo, M,M; Corral, F.D ; Williams, A,C & Buchanan, R.L. 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* groups isolated from retail foods of animal origin. *J Clin Microbiol*; **27** : 854-7.

Parilla, CMC ; JLV Castellanos ; EOS Castañeda & LN Fernández. 1993. Brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario . *Salud Pública Mex.* 35 . 456- 463.

Pathak, S.P; Bhattacharjee, J.W; Klra, N; Chandra, S.1988. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. *J. Appl Bacteriol*;65: 347-352.

Paula SJ ; Duffey PS; Abbot SL ; Kokka RP ; Ashio LS , Janda JM ; Shimada T , Sakazaki R. 1988. Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. *Infect Immun.*; **56**: 2658- 65.

Piddock, L.J; Walters, R.N; Jin, Y.F.; Turner, H.L; Gascoyne-Binzi, D.M. & Hawkey, P.M. 1997. Prevalence and mechanism of resistance to third generation cephalosporins in clinically relevant isolates of *Enterobacteriaceae* from 43 hospitals in the UK . *J Antimicrob Chemother.*, **39** (2): 177-87.

Pitout, J.D; Moland, E.S.; Sanders, C.C; Thomson, K.S. & Fitzsimmons, S.R. 1997. β -lactamases and detection o beta- lactam resistance in *Enterobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother.*, **41** (1) :35-9.

Pitout, J.D; Thomson, K.S; Hanson, N.D; Ehrhardt, A.F; Coudron, P.; Sanders, C.C. 1998. Plasmid mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(3):596-600.

Popoff, M.Y; C. Coynault; M.Kiredjan, and M. Lemelin. 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr. Microbiol.* **5**: 109-114.

Ramadan, M.A; Tawfik & Shibl, AM. 1995. Effect of β -lactamase expression on susceptibility of local isolates of *Enterobacter cloacae* , *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactam antibiotics. *Chemotherapy* , **41** (3) : 193- 9.

Ramón, M.O. 2001. Frecuencia de infecciones parasitarias y microbianas en un grupo de pacientes clínicamente sanos de la comunidad de Los Reyes Iztacala. Tesis de Licenciatura de Biología. UNAM, FES-Iztacala. Estado de México.

Rice, L.B. 1999. Successful interventions for Gram-negative resistance to extended- spectrum beta-lactam antibiotics. *Pharmacotherapy*, **19** (8pt 2) : 1205- 1285 ; discussion 133 S - 137 S.

Richmond, M.H. 1979 . β - lactam antibiotics and β - lactamases: two sides of continuing story. *Rev. Infect. Dis.* **1**: 30- 36.

Ringo, E. & Olsen, R.E. 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of *Artic charr* (*Salvenilus alpinus L.*) . *J Appl Microbiol*, **86** (1) : 22-8.

Rolinson, G.N. 1994. A review of the microbiology of amoxicillin/ clavulanic acid over the 15 year period 1978- 1993. *J. Chemother* . **6** : 283- 318.

Rosedahl, V.T. 1993. Natural occurring constitutive β -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol*, **77**:229-231.

Rubin, R. 1985. Manual práctico de Piscicultura Rural. Editorial Continental, México; 11: 73-75.

Santos, Y; Toranzo, AE; Depazo, CP ; Nieto, TP ; Barja, JL . 1987. Relationship among virulence for fish, enterotoxigenicity and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. *Aquaculture*, **67**: 29-39.

Schubert R.H.W.1975. The relationship of aerogenic to anaerogenic aeromonads of the "*hydrophila- punctata-group*" in river water depending on the load of waste. *Zentralbl Bakteriol Hyg 1 Abt Orig B*. 160: 237-45..

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Anuario Estadístico de Pesca. 1998.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. 1999. Dirección General de Estadística e Información Ambiental.

Shotts EB ; Hsu TC; Waltman WD .1984. Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathol* . **20** : 37-44.

Sierra, C.J. & J. Sierra. 1977. Reseña histórica de la pesca en México. Edición del Departamento de Pesca. México, 99p.

Son, R; Rusul, G; Shilah, A.M; Zainuri, A; Raha, A.R. & Salmah, L. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Tilapia (*Telapia mossambica*). *Lett Appl Microbiol*, **24** (16) : 479- 82.

Stevenson, RMW; Allan, BJ. 1981. Extracellular virulence factors in *Aeromonas hydrophila* disease processes in salmonids. *Dev Biol Stand* ; 49: 173- 80.

Stecchini, M.L; Domenis, C. 1994. Incidence of *Aeromonas* species in influent and effluent of urban wastewater purification plants. *Lett Appl Microbiol*. 19: 237-9.

Sugita, H; Tanaka, K; Yoshinami, M; Deguchi, Y.1995. Distribution of *Aeromonas* Species in the Intestinal Tracts of River Fish. *Appl Environ Microbiol*: 61:11: 4128- 4130.

Sykes, R.B. & M. Mathew. 1976. The β -lactamases of Gram- negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2** : 115- 157.

Tejedor, J.M.T.; González, M.; Lupiola, P.; & González, L. 1998. Type 1 beta- lactamases of *Enterobacter cloacae* and resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Microbiol (Praha)*, **43** (6) : 683- 6.

Téllez, P.A. 1983. Contribución al conocimiento de la Biología de los machos del charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciannes) Pisces Atherinidae, del embalse Huapango, Edo. De México. Tesis (Biol.) E.N.C.B. I.P.N. 36pp.

Thoesen, J. C., Editor. 1994. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. 4 th ed., Version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society.

Thompson, K.S; Sanders, C.C. & Moland, E.S. 1999. Use of microdilution panels with and without beta-lactamase inhibitors as phenotypic test for beta - lactamase production among *Escherichia coli*, *Kebsiella spp.*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43** (6): 1393- 400.

Thornsberry, C . & Yee, YC. 1996. Comparative activity of eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from the United States, measured by two methods. *Am J Med*, **100** (6A): 265- 385.

Trust, T.J. ; Howard, P.S; Chamberlain, J.B.: Ishiguro, E.E. & Buckley, JT. 1980. Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida* . *FEMS. Microbiol Lett*; **9** : 35-8.

Urriza, M.; Arpin, C.; Raymond, N.; Caumette, P. & M. Capdepu. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas spp.* *Applied and environmental microbiology* **66**: 1:125-132.

Vaca, S ; Miranda, R. & C. Cervantes. 1995. Inorganic- ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **67**: 333-337

Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **27** : 87- 115.

Wen, C.K.; Kwok, W.Y.; Cheng, Y.L.; Ching, T.H.; Hseih, S.L. & Yin, C.C. 1996. Increasing Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Aeromonas* Strains in Taiwan. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. **40**:5; 1260-1262.

Walsh, T.R.; Stun, R.A.; Nabi, J.A. ; MacGowan, A.P. & Bennet, P.M. 1997. Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas spp.* *Antimicrob Chemother*. **40** (2):171-178.

Yamaguchi, K. ; Mathai, D. ; Biedenbach, D.J. ; Lewis, M.T ; Gales, A.C. & Jones R . 1999. Evaluation of the in vitro activity of six broad spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against over 2,000 clinical isolates from 22 medical centers in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis* ; **34** (2) : 123- 34.