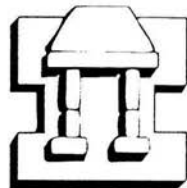




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA



IZTACALA

Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas de *Ambystoma
mexicanum*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA.

P R E S E N T A :

ALINA URIBE GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. SERGIO VACA PACHECO

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

ABRIL 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

NOV 2 1977
BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD

DEDICATORIAS

A mi mamá,
por darme la vida deseándolo; por su apoyo y confianza a lo largo de mis estudios. Por ayudarme a distinguir las letras, por compartir su tiempo conmigo en nuestra mesa. Valga este logro, mamá, para expresarte que te quiero mucho.

A Edgar,
Por tener la paciencia de explicarme el hardware y el software; por hacer las veces de una enciclopedia. Por ser mi hermano querido.

A Saúl,
Por compartir sus loqueras conmigo, por sus buenos y oportunos consejos. Por ayudarme a forjar mi carácter con sus palabras, a pesar de la distancia, que no ha mellado el cariño especial que le tengo.

A mis amigos Antonio, Balfre, Alejandra, Benji, Daniel e Ivonne,
Por tantos momentos compartidos, en la escuela, en el campo, en las reuniones. Por este crecer juntos en lo académico, en la vida. Por seguir cercanos, a pesar de las discrepancias.

A Adrián,
Por llenarme de paz.

A Martha,
Por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo, por su amistad y su cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir mi formación desde el CCH.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, porque en ella pude asomarme a la Biología y comprender qué es la vida, más allá del circo humano. Porque satisfizo mis necesidades de formación profesional y emocional; porque en ella disfruté sus jardines, el canto de los pájaros, las enseñanzas de mis maestros, la compañía de mis amigos.

A la Profesora Gloria Luz, por su alegría y su empeño en el trabajo. Por brindarme la confianza para desarrollar la última etapa de mi carrera en su laboratorio. Por compartir la pasión por el basquet ball y las comidas.

Al Profesor Eric, por sus enseñanzas, por su paciencia. Por su charla y su trato amistoso.

A la Profesora Susana, por su trato amable, por su dedicación, por compartir sus conocimientos conmigo y por expresarme su afecto. Reciba mi afecto Profesora Susana.

Al Profesor Rodolfo, por su rápida revisión de la tesis y por sus atinadas sugerencias que permitieron enriquecer el trabajo.

Al Profesor Sergio, por su apoyo para el desarrollo de este trabajo y por facilitar los trámites de titulación.

INDICE

RESUMEN	3
IZT.	
INTRODUCCIÓN	4
Características de <i>Ambystoma mexicanum</i>	
Características de <i>Aeromonas hydrophila</i>	
Resistencia bacteriana a antibióticos	
Resistencia a antibióticos β -lactámicos	
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y METODOS	15
Descripción del muestreo	
Descripción del Sistema de Identificación para Gram negativos API-20E.	
Detección de β -lactamasas	
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos β -lactámicos	
RESULTADOS	21
Bacterias identificadas	
Resistencia bacteriana a antibióticos	
Patrones de multirresistencia	
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos β -lactámicos	
DISCUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

Actualmente el ajolote (*Ambystoma mexicanum*) tiene su hábitat natural restringido solamente a los canales de Xochimilco. El ajolote es considerado como una especie bajo protección especial, por lo cual se han creado colonias para ayudar a su conservación. Por su condición de cautiverio llegan a estar propensos a diferentes enfermedades, muchas de estas de origen bacteriano. Para este proyecto se trabajó con la colonia de ajolotes de la FES- Iztacala con el propósito de aislar e identificar las bacterias patógenas de *Ambystoma mexicanum*, y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6 antibióticos β -lactámicos por el método de dilución en placa. El 46.3% de las bacterias identificadas fue *Aeromonas hydrophila*, el 11.5% *Citrobacter brakii*, el 7.7% *Citrobacter freundii*, el 19.2% *Escherichia coli*, el 3.8% *Hafnia alvei*, el 7.7% *Morganella morganii*, y el 3.8% *Providencia rettgeri*. El 100% de las cepas produjo β -lactamasas. Las cepas de *Aeromonas hydrophila* mostraron una alta resistencia a la penicilina, ampicilina, y cefalotina, mientras la ceftriaxona fue el antibiótico más eficaz tanto para *Aeromonas hydrophila* como para las demás bacterias, seguido por cefuroxima y la combinación de sulbactam más ampicilina que también mostraron una alta eficacia como antimicrobianos. Con estos resultados se concluye que hay un incremento en la selección de cepas resistentes a los nuevos antibióticos β -lactámicos debido a la producción de β -lactamasas.

INTRODUCCIÓN

Pocos animales son tan representativos de la fauna de México como el anfibio extraño y mítico llamado axolotl, cuyo nombre significa en náhuatl “monstruo del agua”. Posteriormente este organismo fue denominado ajolote en español (Smith, 1989).

Descripción de *Ambystoma mexicanum*

Caracterización taxonómica de *Ambystoma* descrita por Shaw (1789).

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Gnathostomata
Clase	Amphibia
Subclase	Lisamphibia
Orden	Urodela
Familia	Ambystomatidae
Género	Ambystoma
Especie	<i>Ambystoma mexicanum</i>

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Ambystoma mexicanum*

Ambystoma mexicanum tiene las siguientes características morfológicas: son organismos alargados, gris oscuro con numerosas manchas negras y penachos branquiales externos

(éstos se alargan o se acortan según la cantidad de oxígeno que hay en su hábitat acuoso). Los ajolotes adultos pueden alcanzar los 30cm de longitud. Poseen dientes prevomerianos, los ojos tienen diafragmas amarillos, iridiscentes. Este organismo es capaz de regenerar miembros perdidos, incluso parte del cerebro. En la larva, la aleta caudal se extiende más allá de las extremidades posteriores para formar la aleta dorsal en el cuerpo que se reduce a un pliegue en las formas adultas. El cuerpo tiene surcos y la cola contribuye a la natación que se realiza mediante ondulaciones del cuerpo (Álvarez, 1980).

Este anfibio presenta neotenia (alcanza su madurez sexual sin cambiar su morfología larvaria); las larvas neoténicas alcanzan al año su madurez sexual, tienen actividad sexual nocturna y frecuentemente ovopositan en la mañana durante la época invernal. Las larvas deben separarse para evitar el canibalismo (Calderón 1986). *Ambystoma* presenta gran cantidad de mecanismos hormonales que han sido estudiados ampliamente para explicar el proceso regenerativo que posee. Se alimenta de moluscos, gusanos, pulgas del agua (larvas nauplius de *Artemia*), pequeños crustáceos, larvas de insecto, lombrices y renacuajos.

Su hábitat característico son los lugares húmedos: lagos, aguas estancadas, canales de riego y orillas de ríos con poca corriente. Esta especie es original de los lagos de Xochimilco y de Chalco, en el Valle de México (Duhon, 1997), y sobrevive hoy solamente en los canales de los jardines flotantes del lago de Xochimilco ya que su hábitat presenta cierto grado de contaminación y muestra tendencia a la desecación (Calderón 1986). Debido a esto actualmente se considera una especie en peligro de extinción por lo cual ya cuenta con protección especial, según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994.

La familia Ambystomatidae cuenta con registros fósiles desde el Oligoceno y el Pleistoceno (Duellman, 1986). Su distribución es por toda Norteamérica, desde el sureste de Canadá y el este de Alaska hasta el sureste la zona transversa volcánica al borde de la Meseta Central Mexicana (Brandon, 1989). La familia se caracteriza por tener los premaxilares pareados; el exoccipital, proótico y opistoótico están fusionados; los dientes son pedicelados; el número de cromosomas diploide es de 28 (Duellman, 1986).

El género *Ambystoma* tiene una historia nomenclatural extremadamente compleja, y está integrado por 28 especies; de las cuales 15 se encuentran distribuidas en nuestro territorio, siendo una de éstas *Ambystoma mexicanum*.

A través de la historia de México, el ajolote ha sido una fuente de alimento nutritivo y sabroso para los habitantes de algunas zonas del país; además, este anfibio se aprovechaba con fines terapéuticos contra afecciones respiratorias como asma y bronquitis, fama que perdura actualmente en sitios como el mercado de Sonora en la Ciudad de México.

El cautiverio representa actualmente una excelente alternativa en la preservación de organismos silvestres que, en el caso de anfibios y reptiles, ha permitido establecer desde los requerimientos básicos de mantenimiento (temperatura, humedad, iluminación, etc.), aspectos de etología (tanto reproductiva como social), preferencias alimenticias, longevidad, biología reproductiva (número, tamaño y peso de las crías o huevos), hasta aspectos veterinarios (Villamar, 1998).

El establecer los requerimientos básicos de mantenimiento de los anfibios ha permitido no solamente conocer aspectos de su biología y comportamiento, sino la formación de diversas colonias con la finalidad de usarlos como animales de laboratorio, debido a la facilidad de mantenimiento y producción, especialmente de la especie *Ambystoma mexicanum*.

Uno de los problemas más serios que se presentan en las diversas colonias de ajolotes que existen para reforzar su protección, aprender más de este anfibio y ayudar a la investigación, son las enfermedades no infecciosas e infecciosas. Entre las primeras se encuentran las causadas por la pobre calidad del agua, nutrición inadecuada, un deficiente control de la temperatura y condiciones estresantes del medio ambiente. También se presentan en los ajolotes la neoplasia, tumores benignos, melanoma, teratomas y neuroepitelioma olfatorio. Respecto a las enfermedades infecciosas, se han reportado muchos signos clínicos en ajolotes; los más comunes son anorexia, letargo, hemorragias cutáneas o ulceraciones, edema, anemia y decoloración de la piel. Los agentes responsables de estas enfermedades pueden ser bacterias o virus. Prácticamente no se conoce nada acerca de enfermedades virales en ajolotes. Varios patógenos bacterianos pueden causar enfermedades en ajolotes y otros anfibios. Especies de *Aeromonas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Mima* y *Alcaligenes* son comúnmente aisladas de animales enfermos. *Aeromonas hydrophila* ha sido implicada específicamente como una causa frecuente de enfermedades en ajolotes. (Duhon, 1989)

Características de *Aeromonas hydrophila*

El género *Aeromonas* comprende 4 especies; *A. caviae*, *A. sobria*, *A. salmonicida* y *A. hydrophila*. Esta última es la especie que con más frecuencia es aislada, la cual se caracteriza por ser un bacilo recto Gram negativo, anaerobio facultativo, con extremos redondeados o coroides, de 0.3 a 1.0 μm de diámetro y 1.0 a 3.5 μm de largo. Estas bacterias pueden encontrarse como bacilos aislados, en pares o formando cadenas cortas, móviles por un flagelo polar. En cultivos de 2 a 4 horas puede presentar flagelos laterales. La flagelación lofótrica es excepcional. Su nutrición es quimioorganotrófica. Produce oxidasa y catalasa. Fermenta la glucosa con producción de ácido y gas. Reduce el nitrito a nitratos. Produce gran número de exoenzimas como; amilasa, DNAsa, lipasa, fosfatasa, aerolisina, enterotoxinas, fosfolipasas, aciltransferasas, quitinasa y proteasas. La temperatura de crecimiento oscila entre 10–41°C. Algunas cepas de *Aeromonas hydrophila* son bioquímicamente más activas a 22 °C que a 37 °C. Crecen en caldo nutritivo con NaCl de 3.5% a 6.5%. Sobre el agar sangre la mayoría de las cepas muestra una amplia zona de β hemólisis. Pocas cepas fermentan la lactosa. El contenido de Guanina y Citosina de su ADN es de 57 a 63 mol %.

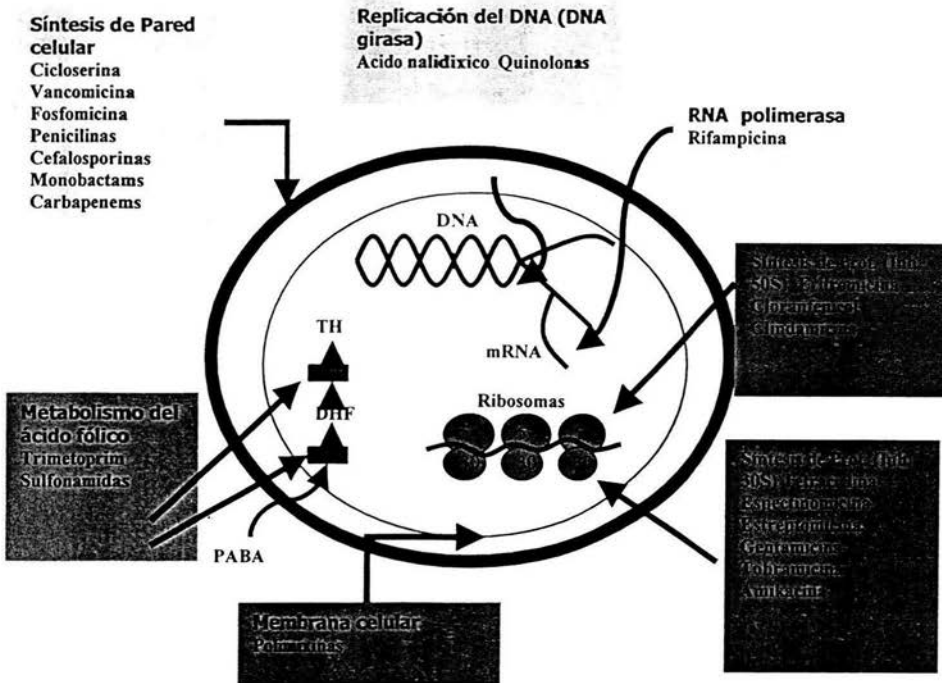
Tiene una distribución cosmopolita. Puede encontrarse en aguas residuales, en aguas dulces y saladas con valores de pH de 5.2 a 9.8 y temperaturas de 4 a 45 °C . Se ha aislado también de suelos y alimentos e infecta principalmente a peces, anfibios, reptiles y mamíferos como el hombre (Austin, B. *et al.*, 1996).

Resistencia bacteriana a antibióticos

En 1912 fue reportada por primera vez la resistencia bacteriana a antibióticos por Morgenroth y Kaufman. Posterior a la introducción de diversos antibióticos se reportaron cepas resistentes a sulfanilamida (Maclean, *et al.*, 1964), a penicilina (Abraham *et al.*, 1941) y a estreptomicina (Murray. *et al.*, 1964).

En Japón fue descrita por primera vez la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos (Watanabe, 1963) esto se confirmó después con 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 responsable de esta epidemia contenía un plásmido que le confería resistencia a varios antibióticos.

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 diferentes e incluso de géneros diferentes. En la siguiente figura se ilustran los sitios de acción de los principales grupos de antibióticos.



Figural. Sitios de acción de diferentes agentes antimicrobianos. PABA, ácido para aminobenzoico; DHF, ácido dihidrofólico; TH, ácido tetrahidrofólico.

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, originando un compuesto sin actividad antibacteriana (ácido peniciloico) (Sykes & Mathew, 1976) (figura 2).

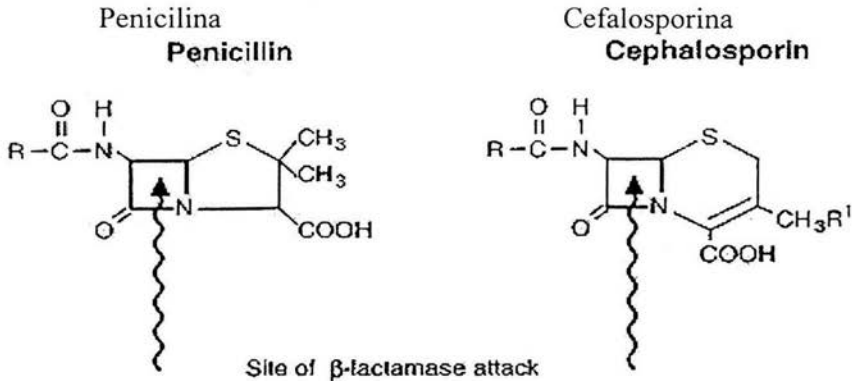


Figura 2. Sitio de hidrólisis por β -lactamasa

Las β -lactamasas pueden ser codificadas por plásmidos o, como en el caso de algunas bacterias Gramnegativas, por el cromosoma bacteriano (es probable que la mayoría produzca cuando menos una β -lactamasa y que éstas sean específicas de género y especie; (Sykes & Mathew, 1976).

Las β -lactamasas de las bacterias Grampositivas se excretan extracelularmente y destruyen el antibiótico antes que entre en contacto con la superficie de la célula, en tanto que las producidas por las Gramnegativas se sitúan en el espacio periplásmico presentando una barrera para la difusión de las cefalosporinas al interior de las células (Sykes & Mathew, 1976).

A diferencia de la mayor parte de los microorganismos Grampositivos en los que la producción de β -lactamasas suele ser el único factor de resistencia, en los Gramnegativos

existe un mecanismo secundario de resistencia (“resistencia intrínseca”) el cual consiste en parte en una 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 han descrito varias clases de β -lactamasas: TEM-1 (clase A), KOXY (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 (Rosedahl, 1993), la mayoría son inducibles y tienen una actividad extracelular (Richmond, 1979).

Otro mecanismo 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 (penicillin binding proteins). En 1960 se usó la meticilina, un compuesto derivado de la penicilina y resistente a β -lactamasa, su introducción como antimicrobiano 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 (cefotaxima, cefamandol, y cefuroxima) y a las de tercera generación (cefotaxima, moxalactam, cefoperazone 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 estrategia utilizada contra cepas productoras de β -lactamasas es la combinación de β -láctamicos con inhibidores de β -lactamasas, uno de ellos es un producto natural obtenido de *Streptomyces clavuligerus* (ácido clavulánico) y el otro es sintético (sulbactam). 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)

OBJETIVOS

GENERAL

- Aislar y caracterizar cepas bacterianas patógenas de *Ambystoma mexicanum*

PARTICULARES

- Aislar e identificar cepas bacterianas a partir de ajolotes enfermos del Laboratorio de Herpetología de la FES-Iztacala.
- Determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas a 12 antibióticos por el método de Kirby-Bauer
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ampicilina, penicilina, ceftriaxona, cefuroxima, cefalotina, sulbactam+ampicilina para las cepas bacterianas, por el método de dilución en placa.
- Detectar la producción de β -lactamasas en las cepas identificadas que muestren resistencia a antibióticos β -lactámicos...

MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se utilizó una muestra aproximada de 18 ajolotes adultos (hembras y machos) los cuales se encuentran en el Vivario de la FES-Iztacala. Se tomaron los ajolotes de las peceras aleatoriamente y con un hisopo estéril se tomó la muestra de las branquias y de la cola de los organismos. Cada uno de los hisopos se colocó en un tubo de ensaye con caldo BHI (infusión corazón y cerebro), se anotaron los datos correspondientes en cada tubo. Los tubos se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala para su incubación en la estufa a (38° C por 24 h). Posteriormente se procedió a sembrar las muestras bajo la técnica de estriado y quema con asas estériles en medio de cultivo enriquecido y selectivo; SS (Salmonella- Shigella) y se incubaron a (38° C por 24 h). Obtenido el crecimiento óptimo se realizaron varias resiembras de las colonias lactosa + y lactosa – con el propósito de purificarlas. Después se procedió a aplicar el sistema de identificación API 20-E, fabricado por el laboratorio francés bioMérieux SA. Una vez aisladas e identificadas las diferentes cepas se mantienen en Stocks para bacterias a temperaturas de 6-7 °C.

Descripción del Sistema de Identificación para Gram negativos API-20E.

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

API-20E consta de 20 microtubos conteniendo substratos deshidratados. Estos tubos se inoculan con una suspensión bacteriana que hidrata los medios.

Durante la incubación (37°C por 24 h), hay cambios de color que se producen ya sea espontáneamente o por la revelación por adición de reactivos. Por último la lectura se realiza con la tabla de lectura y la identificación mediante el API-20E index o el programa informe.

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 anotaron las referencias de cada una de las cepas en la lengüeta y se colocó la galería en la cámara de incubación. 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 es positiva aparece en uno o dos minutos una coloración púrpura. El resultado de esta reacción se anotó ya que constituye el test número 21 de la identificación.

Preparación del inóculo:

Con la ayuda de una pipeta pasteur estéril se recogió una colonia de la placa de agar y se realizó una suspensión bacteriana en 5 ml de solución salina (NaCl 0.85%) se homogeneizó cuidadosamente la suspensión. Después 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 anotaron en la hoja de resultados las reacciones espontáneas, y si la glucosa resultó positiva y/o 3 o más tests son positivos, se efectuó el revelado de los tests que requirieron 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 10 minutos. Un color rosa o rojo indicó una reacción positiva.

Test NO₂: Se adicionó una gota de NIT1 y NIT2 en el tubo GLU. Se esperó de 2 a 3 minutos. Un color rojo indicó una reacción positiva.

Identificación de las bacterias.

La identificación de las bacterias se realizó mediante el sistema computarizado API-20E, en la hoja de resultados se anotó en cada test el valor que le correspondió (1, 2 ó 4). El test de la oxidasa (número 21) se le asignó el valor 4 siempre que resultó positivo. Se sumaron los valores de los test positivos para cada grupo y se obtuvo un código de 7 cifras. El programa

informático para identificación se utilizó introduciendo manualmente en el teclado la secuencia numérica 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 ello se tomaron 5 colonias de cada cepa, crecida en agar de Mueller-Hinton (MH), y con un hisopo estéril se procedió a inocular sobre la totalidad de la superficie del agar de MH.

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 MH. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o 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 de fabricante respecto a los puntos de corte.

Los antibióticos utilizados fueron los siguientes:

Amikacina =AK

Ampicilina =AM

Carbencilina =CB

Cefalotina =CF

Cefuroxima =CTX

Ceftriaxona =CRO

Cloranfenicol =CL

Gentamicina =GE

Netilmicina =NET

Nitrofurantoína =NF

Pefloxacina =PEF

Trimetoprim + Sulfametoxazol =SXT



U.N.A.M. CAMPUS

Detección de β -lactamasas

IZT.

Para la detección de β -lactamasas se utilizaron discos impregnados con la cefalosporina cromogénica nitrocefina (BBL). Este compuesto cambió de color amarillo a rojo cuando el enlace amida del anillo β -lactámico se hidrolizó por la β -lactamasa. Para realizar la detección se tomó un disco impregnado con nitrocefina y se humedeció con una gota de agua estéril, enseguida se colocó con una asa estéril una colonia aislada (crecida en agar de MH durante 24 horas a temperatura ambiente) de la cepa bacteriana. Se observó la ocurrencia de cambio de color durante un período máximo de 1-2 minutos (O' Callaghan, C.H.et al., 1972).

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

La concentración mínima inhibitoria de ampicilina, penicilina, cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona y ampicilina+sulbactam se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton 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

(37°C por 24 horas). Cada cultivo se diluyó (1:3) con caldo nutritivo estéril en un pozo del sembrador, para posteriormente hacer las réplicas series de cajas de MH conteniendo diluciones dobles seriadas de cada antibiótico en el rango de concentración de 3.9 a 2000 µg/ml. La CMI es la mínima concentración del antibiótico que inhiba el crecimiento visible después de incubar 24 horas a 37°C.

RESULTADOS

La colonia de *Ambystoma mexicanum* tiene aproximadamente 200 organismos adultos, la muestra para este trabajo fue de 18 organismos.

Se identificaron 7 especies de bacterias. El 46.3% de las bacterias aisladas de *Ambystoma mexicanum* corresponde a *Aeromonas hydrophila*, el 11.5% *Citrobacter braakii*, el 7.7% *Citrobacter freundii*, el 19.2% *Escherichia coli*, el 3.8% *Hafnia alvei*, el 7.7% *Morganella morganii*, y el 3.8% *Providencia rettgeri*. (Tabla 2)

Cepas aisladas de <i>Ambystoma mexicanum</i>	Número de cepas	Porcentaje
<i>Aeromonas hydrophila</i>	12	46.3
<i>Citrobacter braakii</i>	3	11.5
<i>Citrobacter freundii</i>	2	7.7
<i>Escherichia coli</i>	5	19.2
<i>Hafnia alvei</i>	1	3.8
<i>Morganella morganii</i>	2	7.7
<i>Providencia rettgeri</i>	1	3.8

Tabla 2. Muestra las 7 especies de bacterias aisladas de *Ambystoma mexicanum*

Resistencia a antibióticos de cada especie de bacterias.

Aeromonas hydrophila

En la figura 2 se aprecia que el 100% de las cepas fue resistente a ampicilina y carbenicilina, 90% a cefalotina y cloranfenicol, 80% a trimetoprim+sulfametoxazol, 50% a nitrofurantoína, 40% a ceftriaxona y gentamicina, 33% a netilmicina y el 8.3 a cefuroxima.

Citrobacter brakii

El 100% de las cepas fue resistente a cefalotina, ampicilina, trimetoprim+sulfametoxazol, carbenicilina y nitrofurantoína, 67% a amikacina, 33% a cloranfenicol y netilmicina. Mientras que el 100% de las cepas resultaron sensibles a ceftriaxona, cefuroxima, gentamicina y pefloxacina. (Figura 3).

Citrobacter freundii

Fue resistente el 100% de las cepas a cefalotina, cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim+sulfametoxazol, cefuroxima y carbenicilina, 50% a gentamicina, pefloxacina y netilmicina. Y el 100% de las cepas fue sensible a nitrofurantoína, amikacina y ceftriaxona. (Figura 4).

Morganella morganii

El 100% de las cepas mostró resistencia a cefalotina, ampicilina, trimetoprim+sulfametoxazol, cefuroxima, gentamicina, carbenicilina y nitrofurantoína; 50% a ceftriaxona, amikacina y pefloxacina. El 100% de las cepas fue sensible a cloranfenicol y netilmicina. (Figura 5).

Providencia rettgeri

El 100% de las cepas fue resistente a ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol, trimetoprim+sulfametoxazol nitrofurantoína, ceftriaxona, amikacina, pefloxacina y cefuroxima. Y el 100% sensible a gentamicina y netilmicina. (Figura 6).

Hafnia alvei

El 100% de las cepas fue resistente a ampicilina, carbenicilina, netilmicina, cefalotina, amikacina, nitrofurantoína, ceftriaxona, cefuroxima, pefloxacina, gentamicina. El 100% sensible a trimetoprim+sulfametoxazol, cloranfenicol. (Figura 7).

Escherichia coli

EL 100% de las cepas fue resistentes a cefalotina, cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim+sulfametoxazol y carbenicilina, el 80% a amikacina, ceftriaxona, 60% a gentamicina, netilmicina, nitrofurantoína y 40% a cefuroxima y pefloxacina. (Figura 8).

FIGURA 2.
RESISTENCIA DE *Aeromonas hydrophila* A ANTIBIÓTICOS

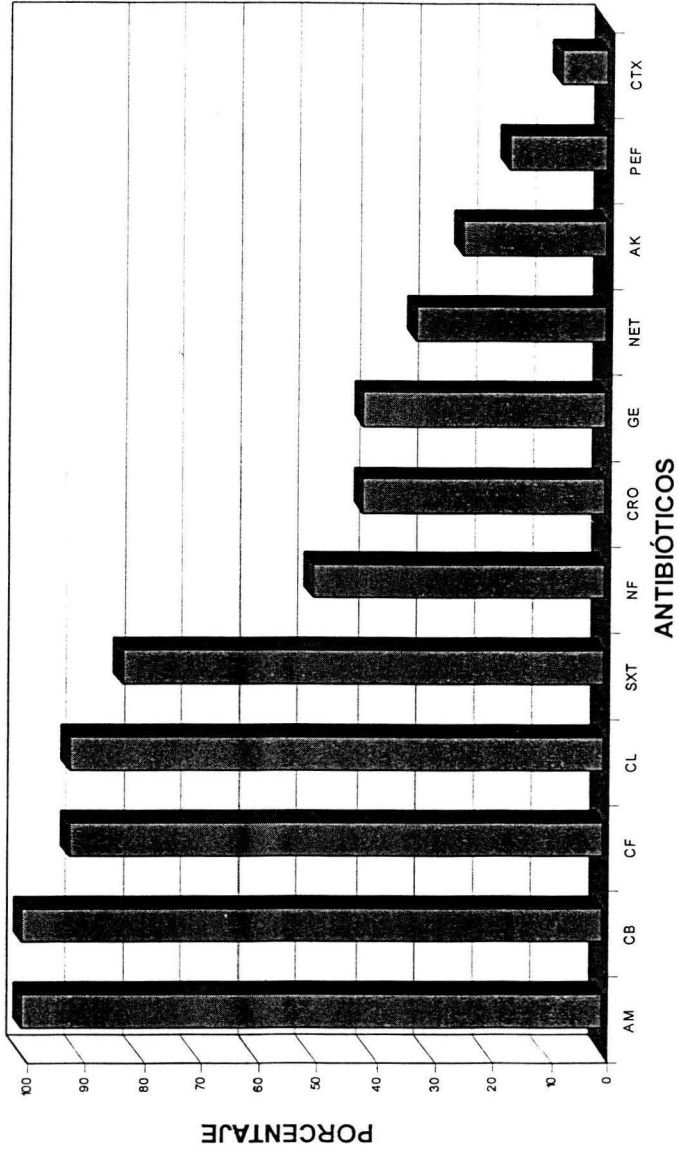


FIGURA 3.
RESISTENCIA DE *Citrobacter brakii* A ANTIBIÓTICOS

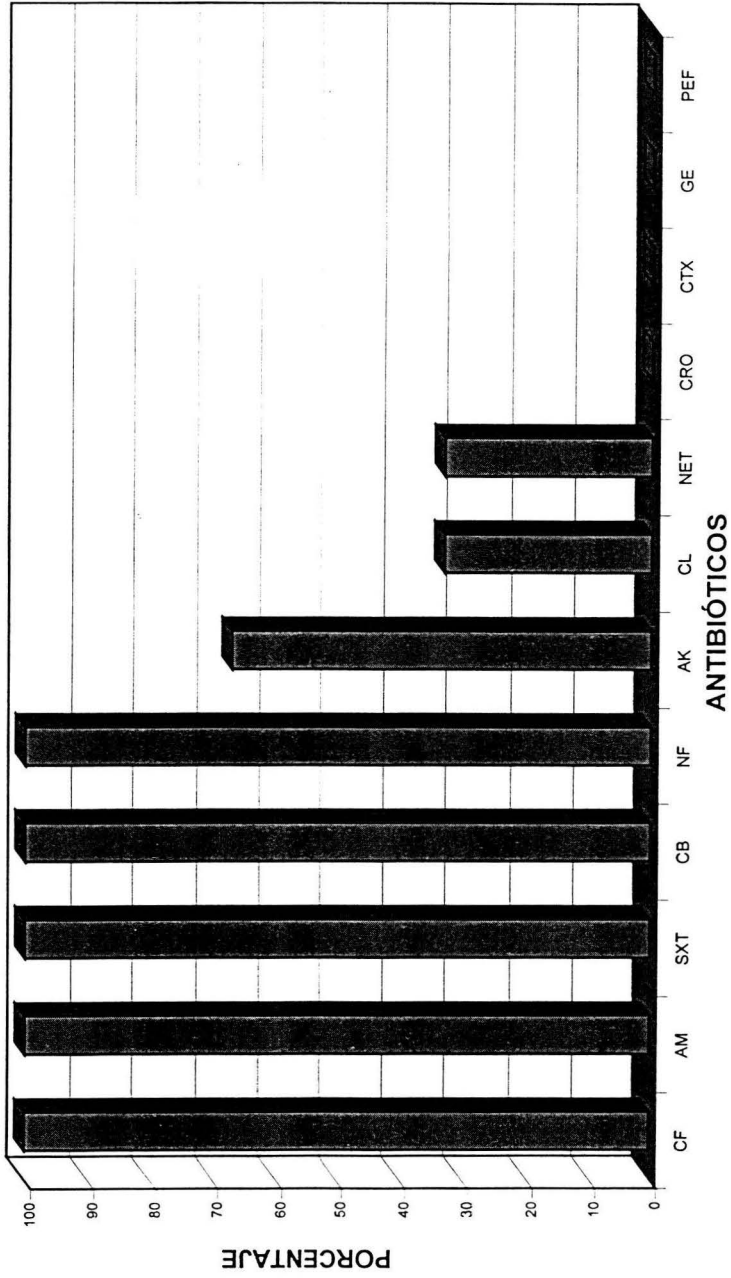


FIGURA 4.
RESISTENCIA DE *Citrobacter freundii* A ANTIBIÓTICOS

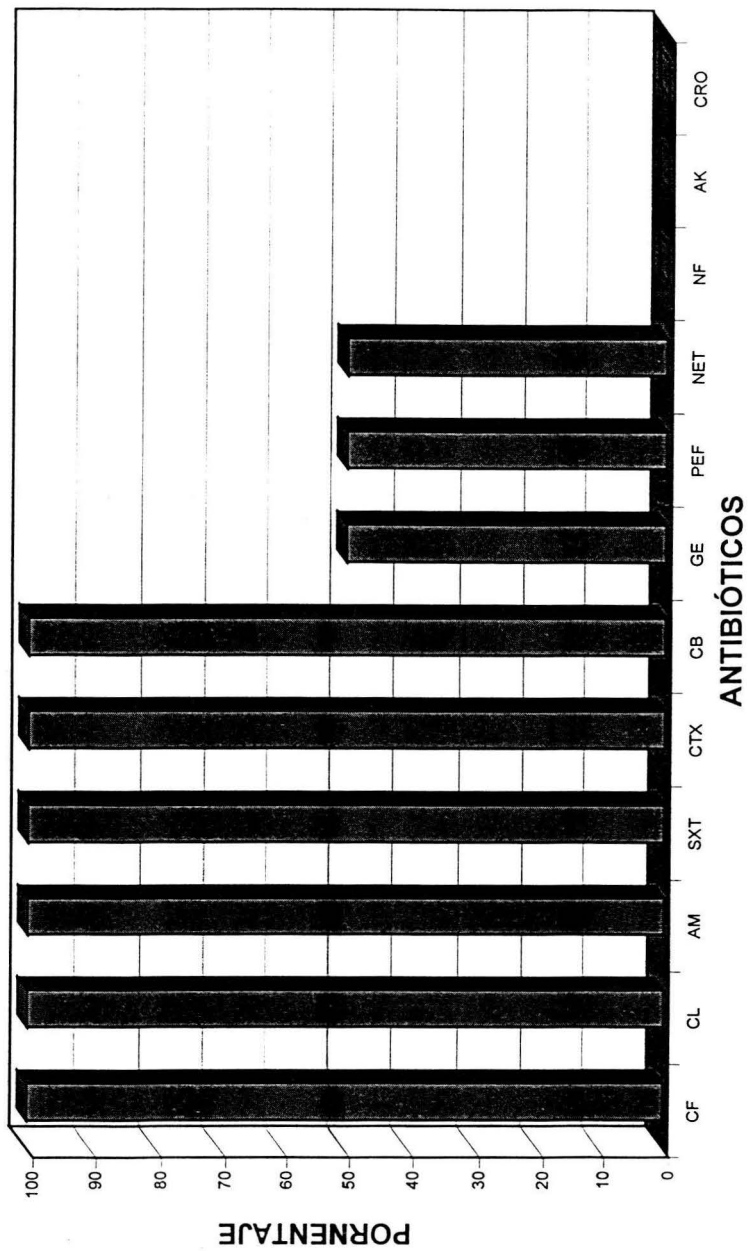


FIGURA 5.
RESISTENCIA DE *Morganella morganii* A ANTIBIÓTICOS

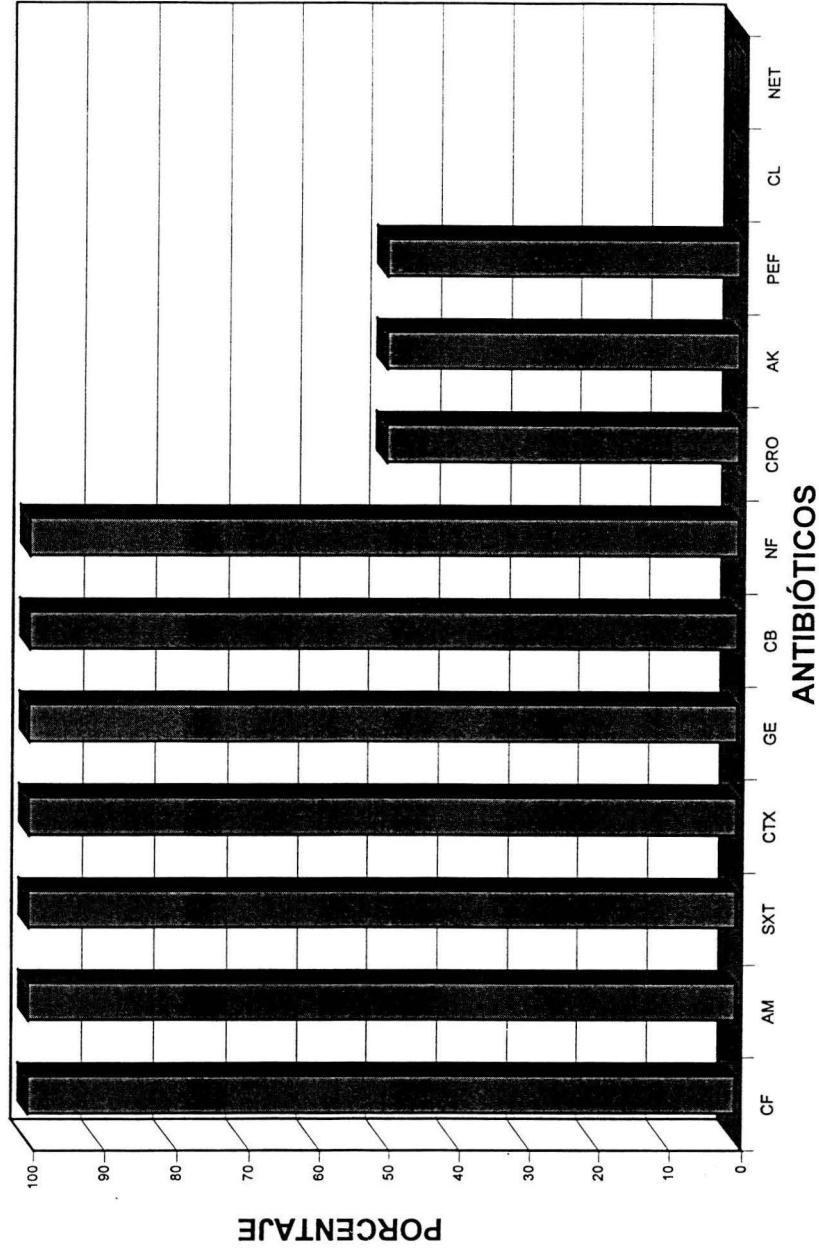


FIGURA 6.
RESISTENCIA DE *Providencia rettgeri* A ANTIBIÓTICOS

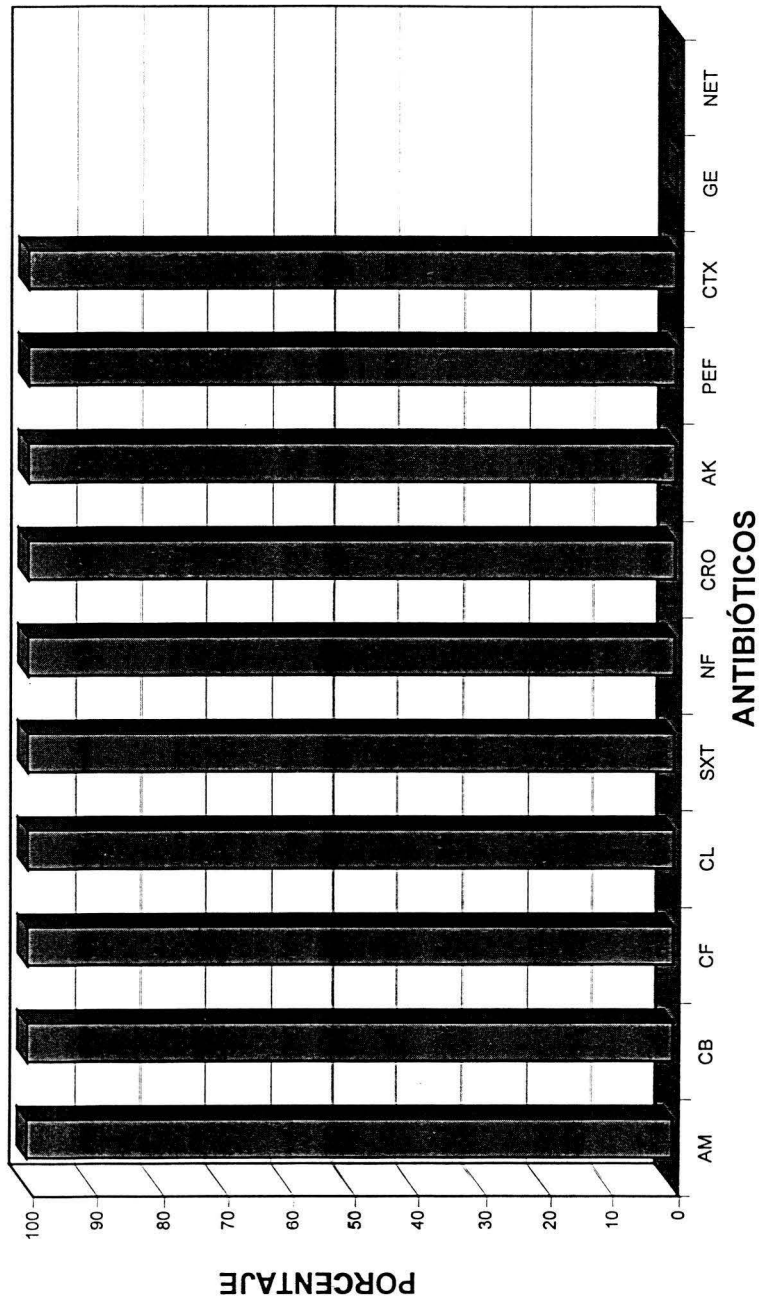


FIGURA 7.
RESISTENCIA DE *Hafnia alvei* A ANTIBIÓTICOS

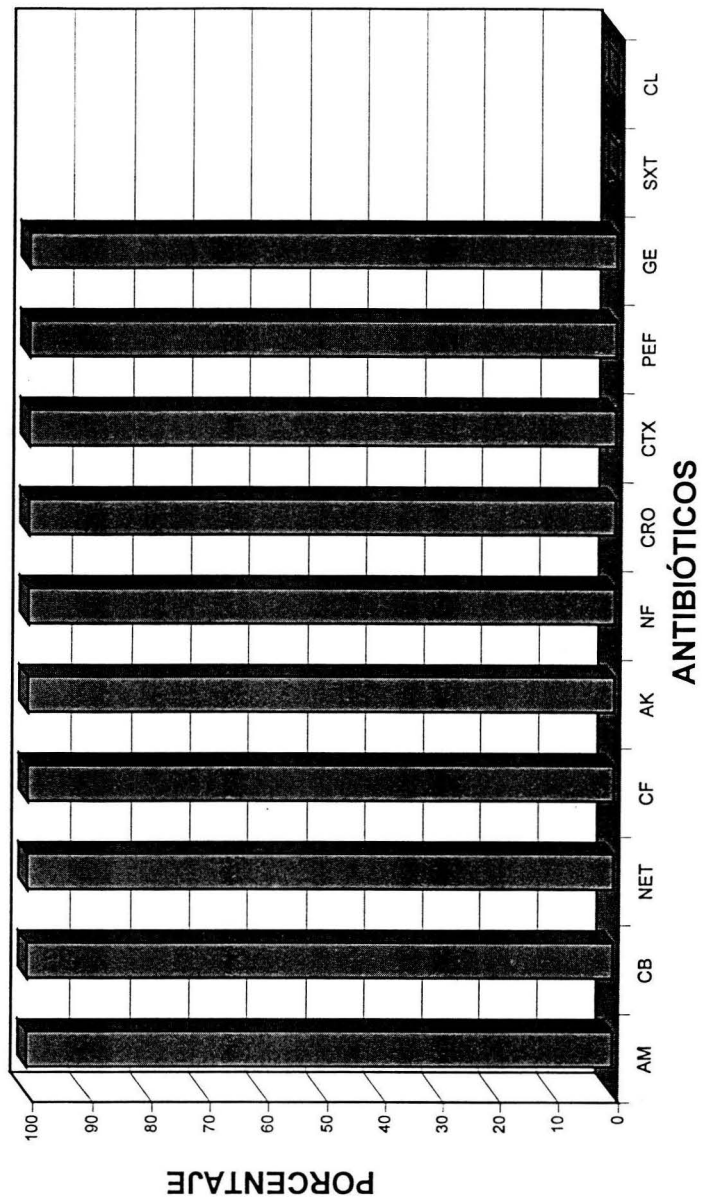
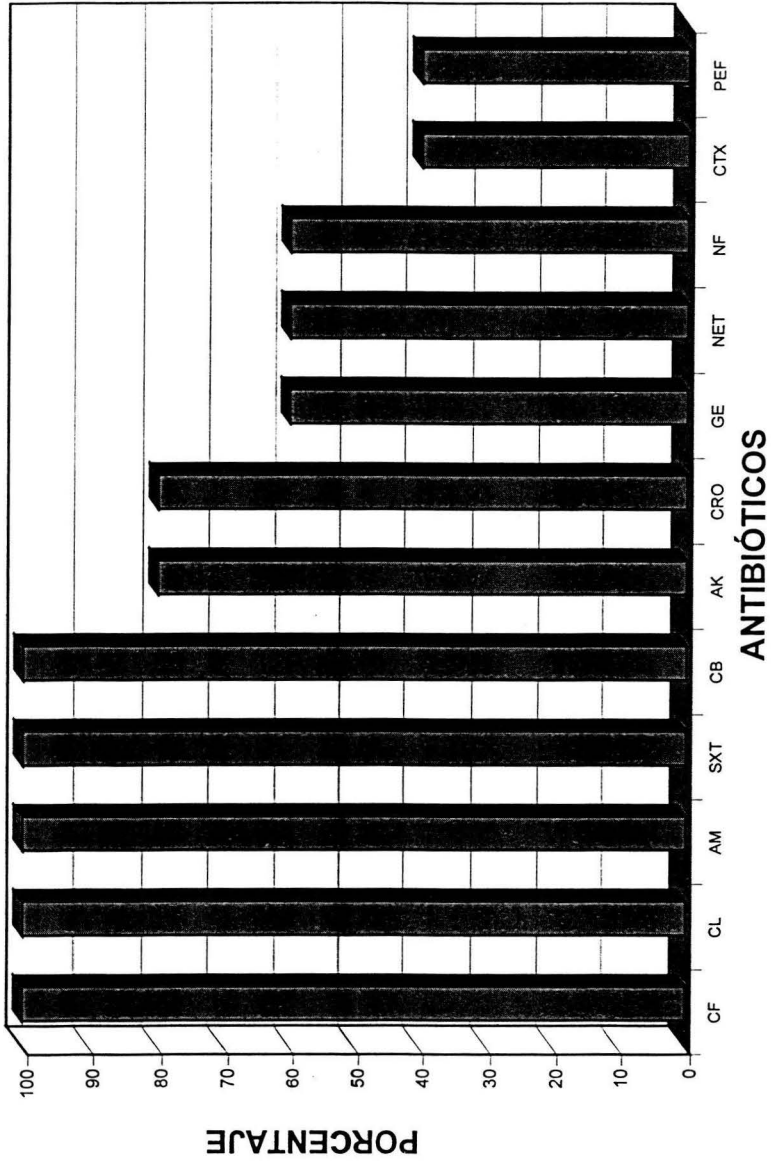


FIGURA 8.
RESISTENCIA DE *Escherichia coli* A ANTIBIÓTICOS



Patrones de resistencia

En la tabla 3 se aprecian 7 diferentes patrones de resistencia, 4 cepas de *Aeromonas hydrophila* tuvieron el mismo patrón de multiresistencia (NF-CB-PEF-SXT-AK-AM-CL-CF), sin embargo 14 cepas presentaron patrones de resistencia distintos entre sí.

Patrones de resistencia más frecuentes	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Citrobacter brakii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
NF-CB-PEF-SXT- AK AM-CL-CF	4	-	-	-	-	-	-
CF-CL-CRO-AM-AK-SXT-CTX-GE-NET-PEF-CB-NF	-	-	-	1	1	-	1
CF-CL-AM-AK-SXT-GE-NET-PEF-CB-NF	1	2	-	-	-	-	-
CF-CL-CRO-AM-AK-SXT-CTX-GE-PEF-CB-NF	1	-	-	-	-	1	-
CF-CL-CRO-AM-AK-SXT-GE-NET-PEF-CB-NF	-	-	-	2	-	-	-
CF-CL-AM-AK-SXT-CTX-GE-PEF-CB-NF	-	-	1	-	-	1	-
CF-CL-AM-AK-SXT-GE-PEF-CB-NF	1	1	-	-	-	-	-
TOTAL	7	3	1	3	1	2	1

Tabla 3. Patrones de multiresistencia a los antibióticos en las cepas identificadas.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 6 antibióticos β -lactámicos.

En la figura 9 se aprecia que la CMI de penicilina para las cepas fue unimodal en el rango de 125 a 2000 $\mu\text{g/ml}$. Siendo para ampicilina la CMI bimodal con una población resistente en el rango de 62.5 a 500 $\mu\text{g/ml}$ y otra altamente resistente en el intervalo de 500 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10). La distribución de frecuencia de la CMI de cefuroxima fue bimodal con una población sensible en el rango 3.9 a 31.3 $\mu\text{g/ml}$ y otra intermedia con el intervalo de 31.3 a 125 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 11). También para cefalotina la distribución fue bimodal con una población intermedia en el pico 62.5 $\mu\text{g/ml}$ y otra altamente resistente en el pico 500 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 12). El 100% de las cepas fue sensible a ceftriaxona (CMI = 3.9 $\mu\text{g/ml}$; Figura 13).

En la figura 14 se muestra la distribución de la CMI de ampicilina+ el inhibidor de β -lactamasas sulbactam para todas las cepas estudiadas. Como puede apreciarse, la población bacteriana se distribuyó en tres subpoblaciones, dos de ellas sensibles (CMI= 3.9 y 15.6 $\mu\text{g/ml}$) y una resistente (CMI= 250 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 9. CMI DE PENICILINA PARA LAS CEPAS AISLADAS DE *Ambystoma mexicanum*

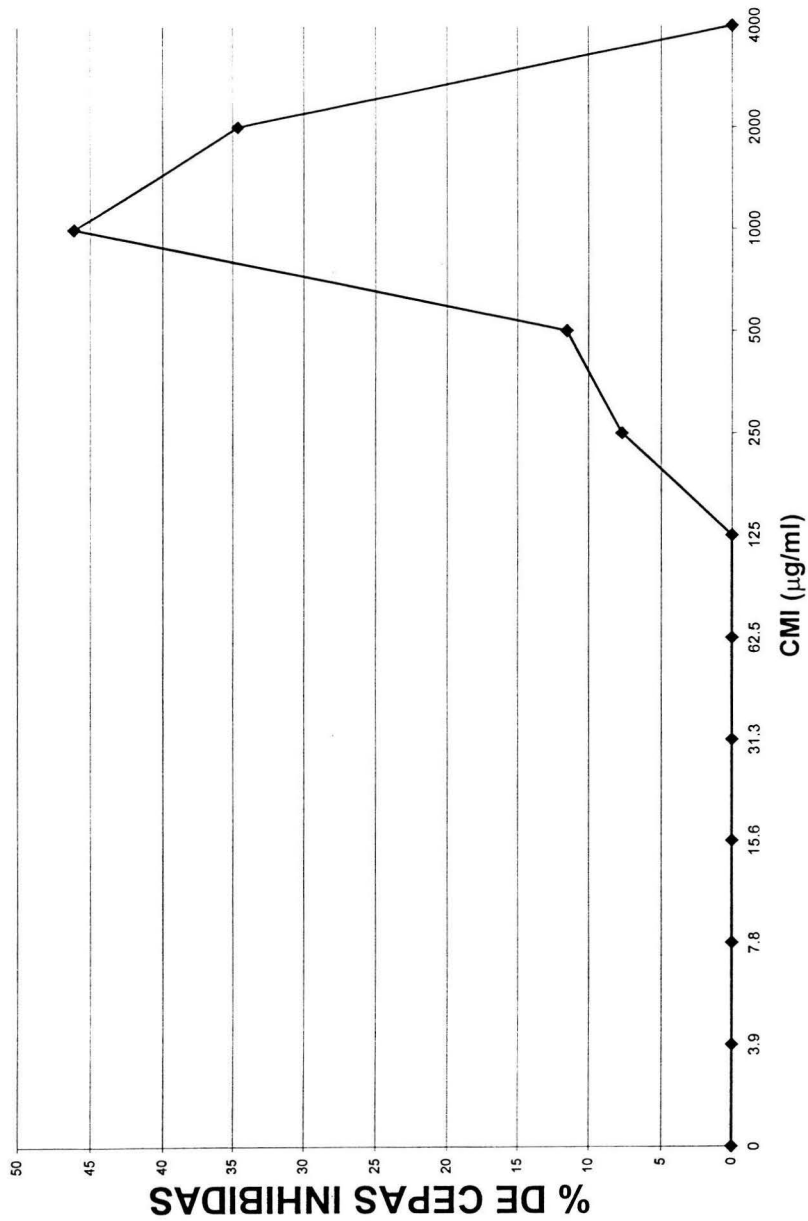


Figura 10. CMI DE AMPICILINA PARA LAS CEPAS AISLADAS DE *Ambystoma mexicanum*

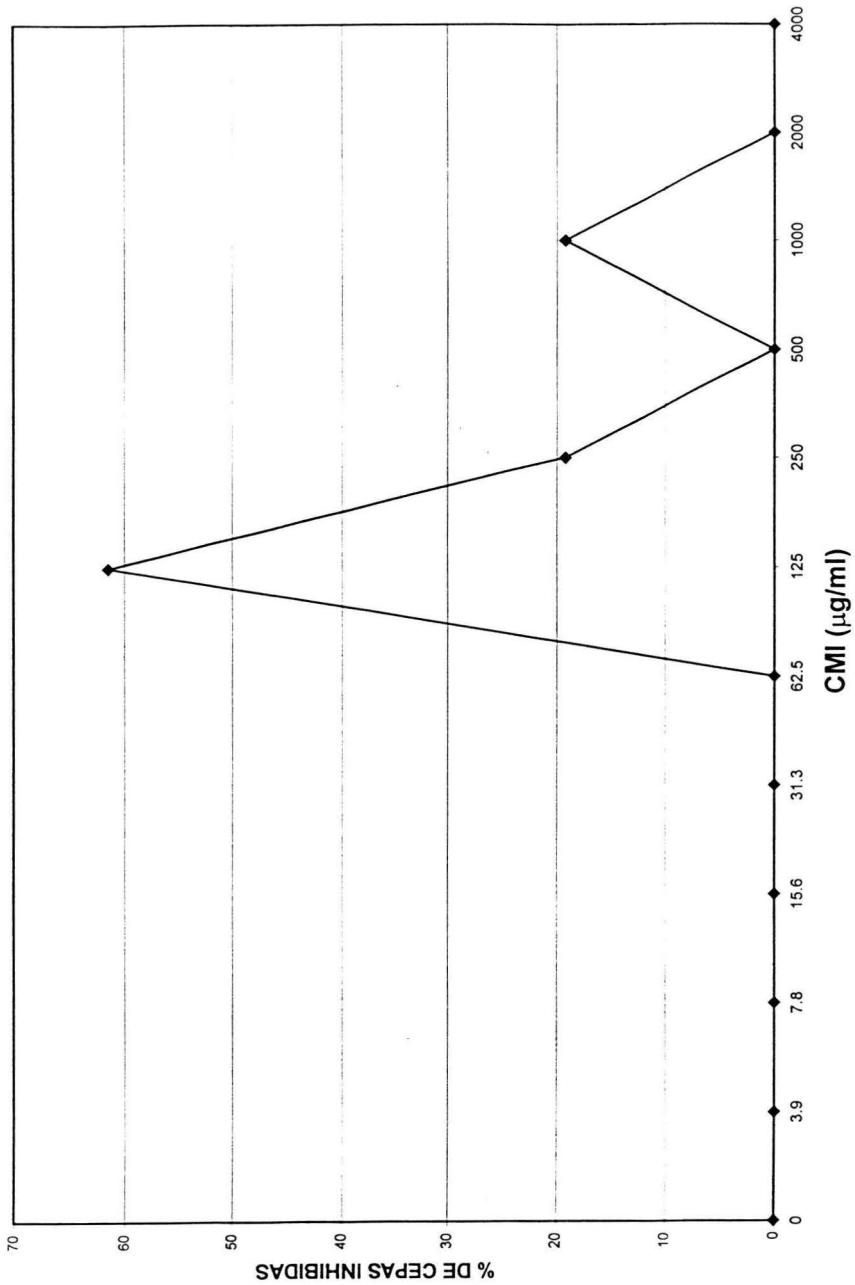
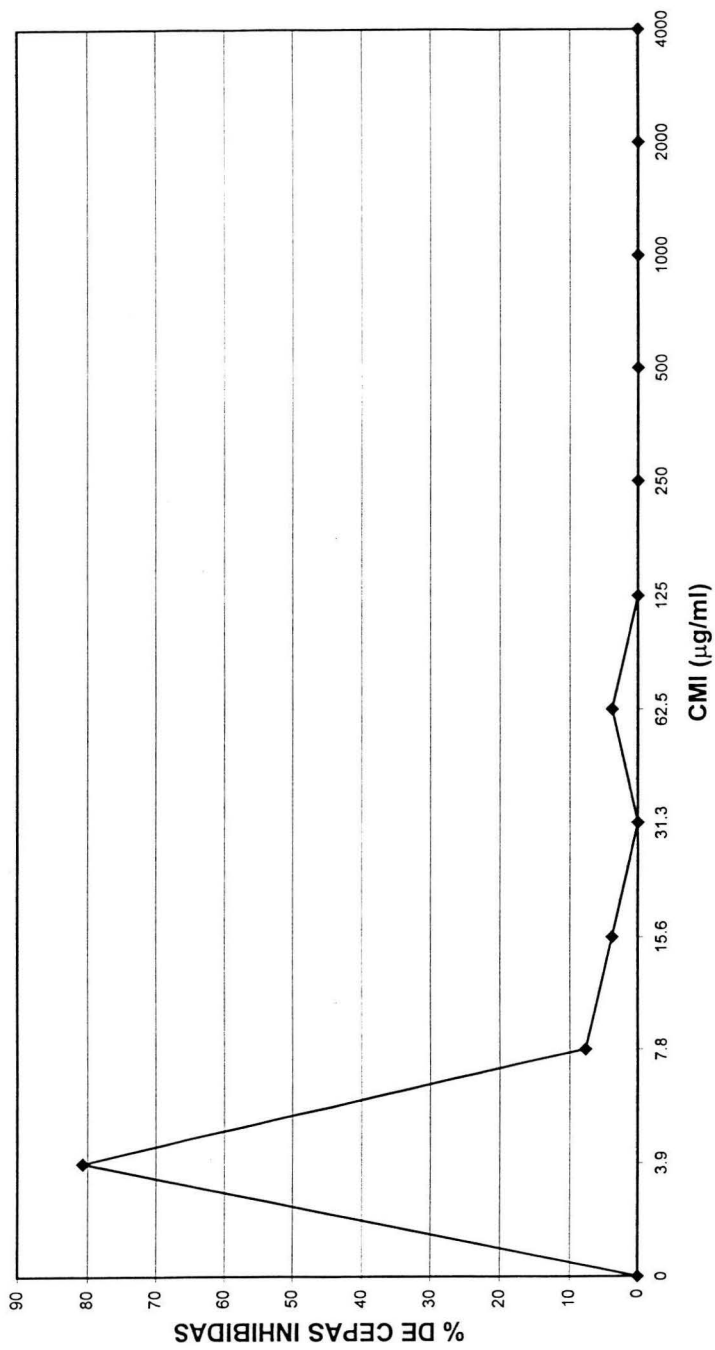


Figura 11. CMI DE CEFUROXIMA PARA LAS CEPAS AILADAS DE *Ambystoma mexicanum*



Falta página

N° 36

Figura 12. CMI DE CEFALOTINA PARA LAS CEPAS AISLADAS DE *Ambystoma mexicanum*

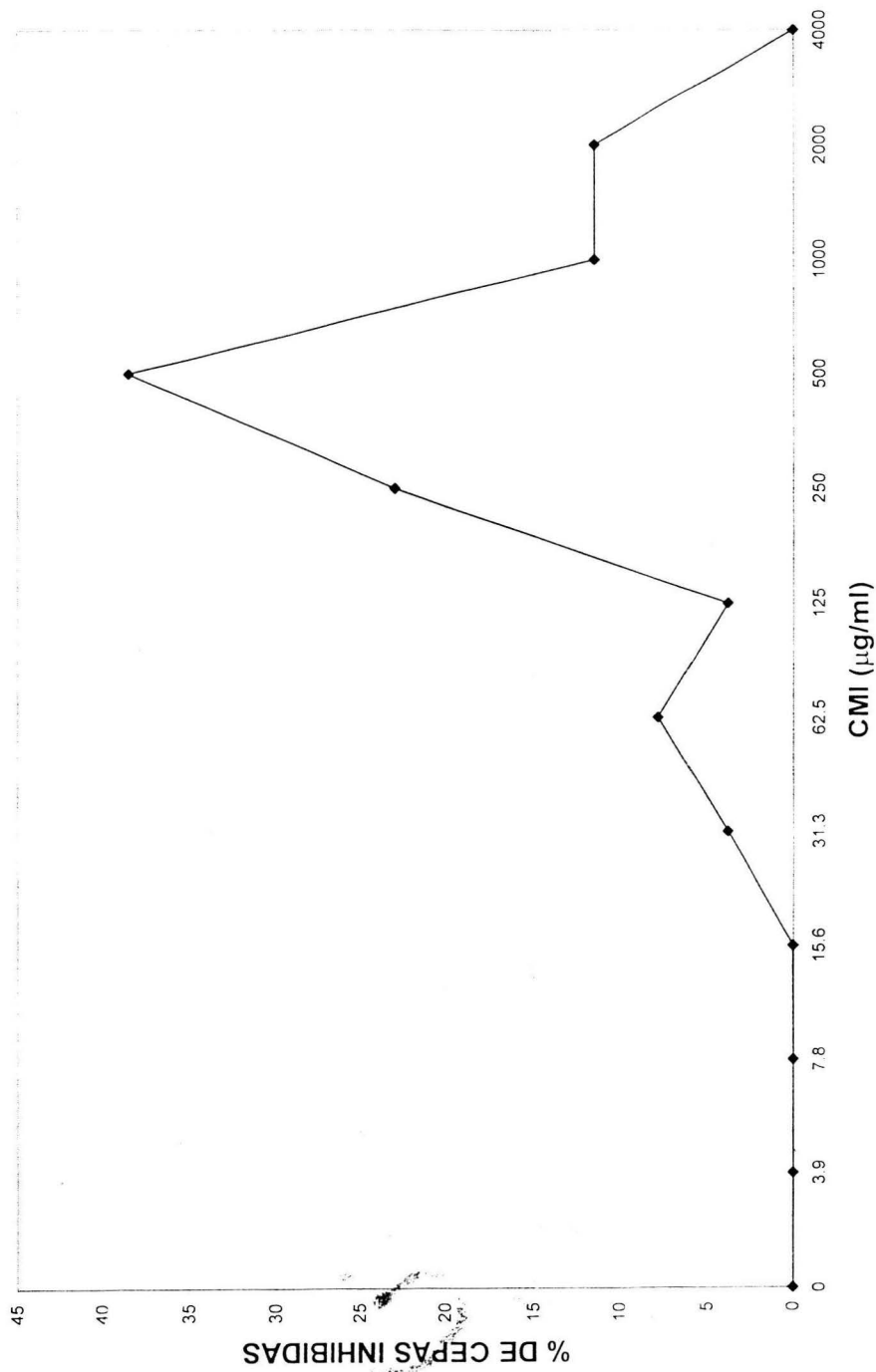


Figura 13. CMI DE CEFTRIAXONA PARA LAS CEPAS AISLADAS DE *Ambystoma mexicanum*

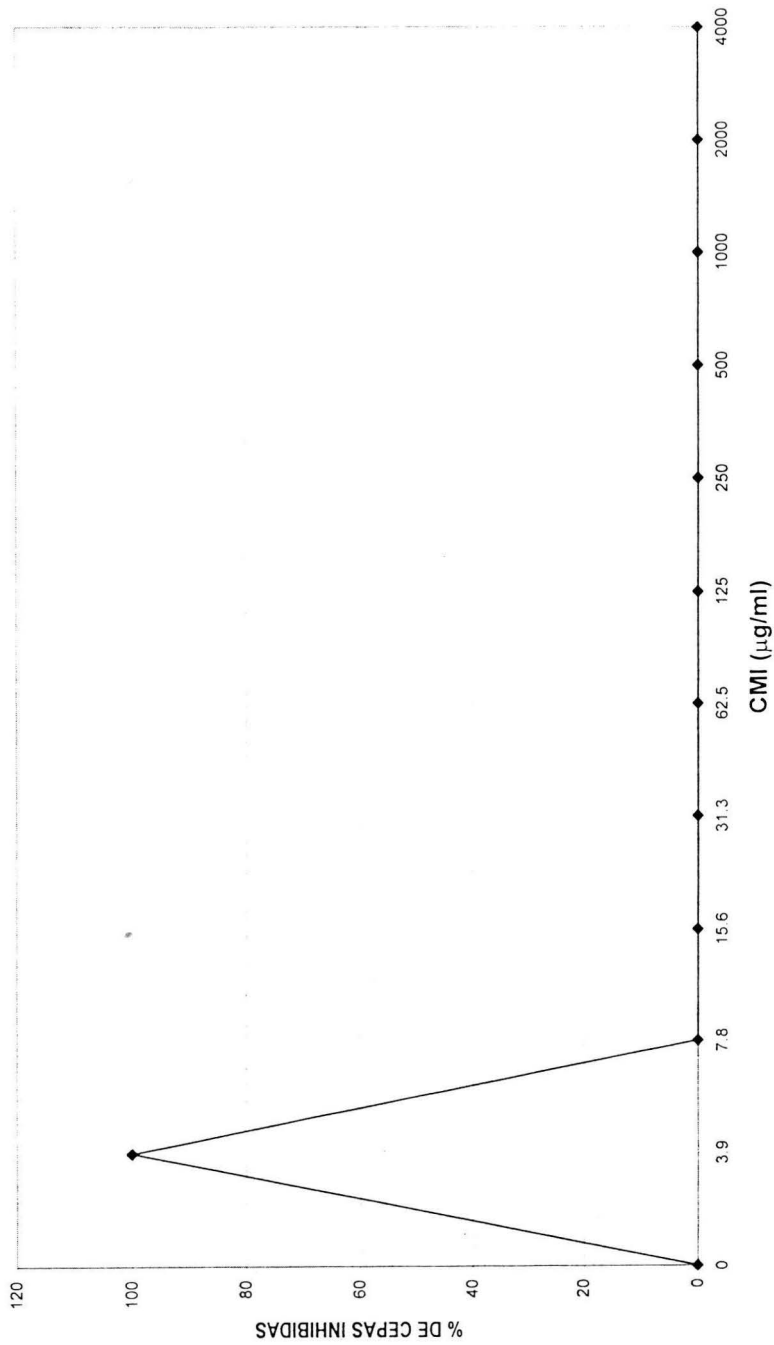
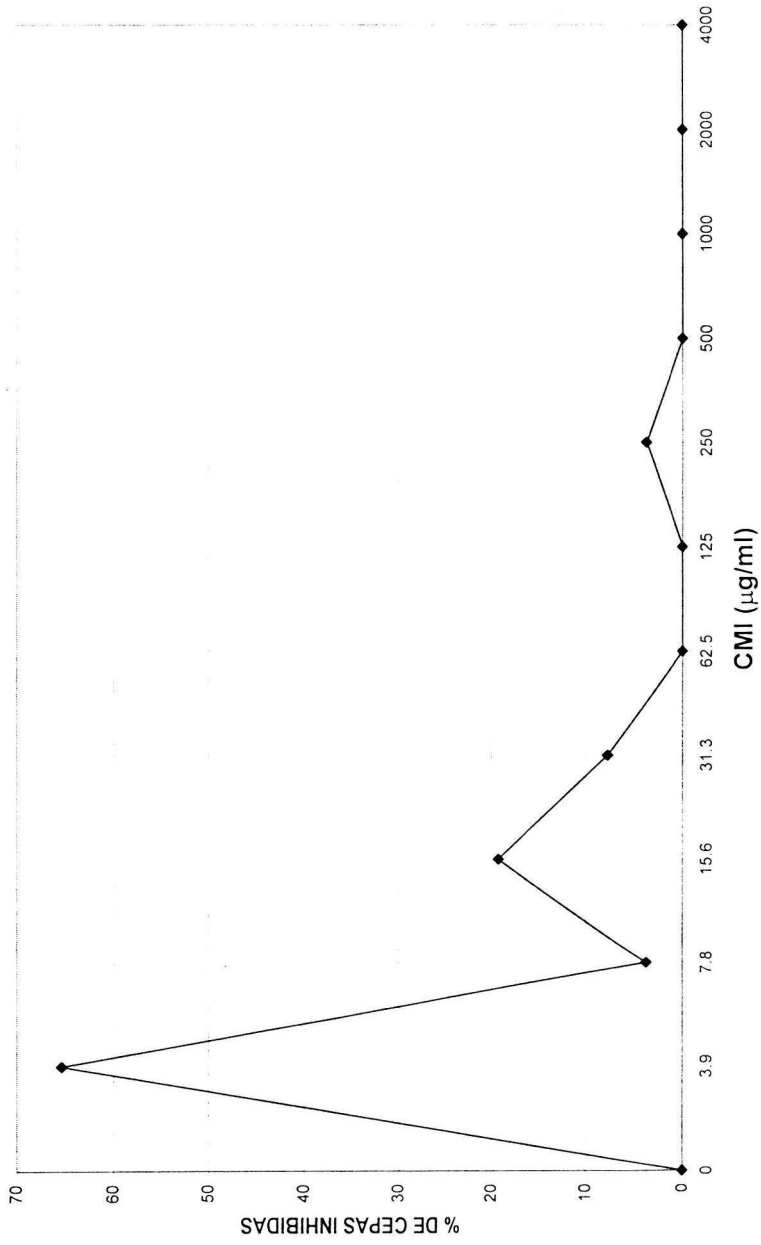


Figura 14. CMI DE AMPICILINA+SULBACTAM PARA LAS CEPAS AISLADAS DE *Ambystoma mexicanum*





U.N.A.M. CAMPUS

DISCUSION

La colonia de *Ambystoma mexicanum* ubicada en el Vivario de la FES Iztacala tiene aproximadamente 200 organismos, la muestra para este trabajo fue de 18 organismos adultos (ambos sexos), los cuales presentaban manchas blancas en las branquias y en la cola; siendo estas partes de donde se aislaron las bacterias. El principal patógeno bacteriano aislado fue *Aeromonas hydrophila* seguido de *Escherichia coli* y *Citrobacter brakii* (tabla 2).

IZT.

Todas las cepas de *Aeromonas hydrophila* fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos ampicilina y carbenicilina, y alrededor del 80% lo fueron a cloranfenicol, cefalotina y trimetoprim-sulfametoxazol (figura 2).

Cuatro cepas de *Aeromonas hydrophila* mostraron el mismo patrón (NF-CB-PEF-SXT- AK-AM-CL-CF) de multirresistencia a 8 antibióticos de los 12 probados. Tres cepas (*E. coli*, *H. alvei* y *P. reiferii*) mostraron el mismo patrón de multirresistencia (CF-CL-CRO-AM-AK-SXT-CTX-GE-NET-PEF-CB-NF). Una cepa de *A. hydrophila* y 2 de *C. Brakii* mostraron el mismo patrón de multirresistencia (CF-CL-AM-AK-SXT-GE-NET-PEF-CB-NF). Estos resultados ponen de manifiesto que la población microbiana que infecta a *A. mexicanum* es altamente resistente a los antibióticos.

Debido a que el 100% de las cepas presentó resistencia a ampicilina, se les midió la producción de β -lactamasas por hidrólisis de la cefalosporina cromogénica nitrocefín.

dando positivo todas ellas. Así mismo se determinaron las CMI's de 6 antibióticos β -lactámicos, detectando tres subpoblaciones: sensible, intermedia y resistente. La distribución de la CMI de penicilina para las cepas fue unimodal con una población altamente resistente (CMI =1000 μ g/ml) (figura 9). Siendo para ampicilina la distribución de la CMI bimodal con una población resistente (CMI =125 μ g/ml) y otra altamente resistente (CMI =1000 μ g/ml) (Figura 10). Así como cefuroxima que también la distribución de la CMI fue bimodal con una población sensible (CMI =3.9 μ g/ml) y otra intermedia (CMI =62.5 μ g/ml). La distribución de la CMI de cefalotina fue bimodal con una población intermedia (CMI =62.5 μ g/ml) y otra altamente resistente (CMI =500 μ g/ml). El caso de la ceftriaxona fue unimodal la distribución de la CMI con una población sensible (CMI =3.9 μ g/ml) En la figura 14 se muestra la distribución de la CMI de ampicilina+ el inhibidor de β -lactamasas sulbactam para todas las cepas estudiadas. Como puede apreciarse, la población bacteriana se distribuyó en tres subpoblaciones, dos de ellas sensibles (CMI= 3.9 y 15.6 μ g/ml) y una resistente (CMI= 250 μ g/ml).

Los porcentajes de resistencia a ampicilina de las cepas reportadas en este trabajo son similares a los descritos por otros autores. Wen et al., (1996) reportaron que el 100% de las cepas de *Aeromonas sp* aisladas de pacientes infectados en Taiwán fue resistente a ampicilina; igualmente el 100% de las cepas de *A. hydrophila* aisladas de lesiones epidérmicas de 21 tilapias fue resistente a ampicilina (Son et al., 1997). Estos resultados indican que la ampicilina, considerada anteriormente como de primera elección, no constituye una opción terapéutica para combatir las infecciones causadas por estas bacterias debido, muy probablemente a que éstas han adquirido plásmidos de resistencia que

codifican para β -lactamasas, como ha sido reportado para 43 cepas de *A. hydrophila*, de las cuales 94% produjeron β -lactamasas (Ahmed et al., 1998).

El hecho de que la distribución de la CMI de Ampicilina + sulbactam haya presentado tres picos diferentes sugiere fuertemente que la población bacteriana está formada por cepas que: a) producen tres β -lactamasas diferentes o, b) producen β -lactamasas en distinta concentración. Para distinguir entre estas posibilidades sería conveniente determinar cuantitativamente la producción de β -lactamasas de las cepas pertenecientes a cada una de las subpoblaciones (Livermore y Brown, 2001). Si las concentraciones fuesen similares, esto implicaría que se trata de β -lactamasas diferentes, con distinta sensibilidad al inhibidor, en cuyo caso sería pertinente determinar cuantitativamente esta propiedad. Sería conveniente, además, amplificar por PCR el gen (o los genes) de β -lactamasa, utilizando oligonucleótidos descritos para los diversos genes que codifican esta enzima (Massova y Mobashery, 1998) .

Consideramos que este trabajo es importante dada la carencia de artículos publicados sobre bacterias aisladas de ajolotes, ya que previo a la redacción de esta tesis realizamos una exhaustiva búsqueda bibliográfica sobre el campo, sin encontrar ninguna referencia al respecto. La consulta bibliográfica fue realizada con el poderoso buscador Hermes ([www.ibt.unam.mx/biblioteca/bases de datos/hermes](http://www.ibt.unam.mx/biblioteca/bases_de_datos/hermes)) en las secciones Life Sciences y Agriculture, Biology and Environmental Sciences del Current Contents durante los últimos 365 días (periodo máximo de consulta en este banco de información) y en el Biological and Agriculture Index durante el periodo 1993-2001. La consulta a esas bases de datos arrojó trabajos sobre fisiología, regeneración, biología del desarrollo y genética del ajolote, pero no sobre aspectos microbiológicos.

En conclusión, este trabajo es de los pocos realizados sobre aspectos microbiológicos del ajolote y llama la atención el alto porcentaje de cepas multirresistentes a antibióticos que aislamos y la gran prevalencia de cepas productoras de β -lactamasas. Estas poblaciones bacterianas representan un peligro de infección no sólo para los ajolotes de la colonia del vivario, sino también para los demás organismos mantenidos en este centro de apoyo. Los datos presentados aquí serán de utilidad para orientar la prescripción de antibióticos a los animales del vivario que presenten infecciones bacterianas y permitirán realizar un manejo más adecuado de los organismos.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Florey, H. W., Gardener, A. D., Heatley, N. G., and Jennings, M. A., 1941 Further Observations on Penicillin. *Lancet* 2: 177-188.

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

Alvarez del Villar. 1983. Los Cordados. Ed Texto e Imagen. S.A. México.

Austin, B., Altwegg M. A., Gosling, P. J. and Joseph S., 1996 The genus *Aeromonas*. WILEY, New York. E.U. A

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

Brandon, R.A. 1989. Natural History of the Axolotl and its Relationship to other Ambystomatid Salamanders. In Armstrong, J.B. and Malacanski, G. M. (eds.) *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press. USA.

Calderón, S. I. y Rodríguez, D. M. 1986. Estado Actual de las especies del genero *Ambystoma* (Amphibia: Caudata) de algunos lagos y lagunas del eje neovolcanico central. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México.

Chopra, I and Ball P.R..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, Orr D. Boulton M.G.and. Ross G.W. 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

Duellman, W.E., Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill. USA.

Duhon, S. T. 1997. The Axolotl and its Native Habitat Yesterday and Today. Axolotl Newsletter 26: 14-17.

Livermore, D:M: and Brown D.F.J. 2001. Detection of β -lactamase-mediated resistance. JAC 48 S1:59-64.

MaClean, I. H., Rogers, K. B., and Fleming A., 1939 M.& B. 693 and Pneumococci. Lancet. 1: 562-568.

Massova, I. And Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin binding proteins and β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 42(1):1-17.

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.

Murray, R., Kilham, L., Wilcot, C., and Finland, M., 1964. Developmental of Streptomycin resistance of Gram-negative bacilli in vitro and during treatment. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 63: 470-474.

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

- Ohmori, H., Azuma A. and Hashimoto Y. 1977. Factors involved in β -lactam antibiotics. *J Antimicrob. Chemother.* 7: 127-136.
- Richmond, M.H. 1979. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two sides of continuing story. *Rev. Infect. Dis.* 1: 30-36.
- Rolinson, G. N. 1994. A review of the microbiology of amoxicillin / clavulanic acid over the 15 year period 1978-1993. *J.Chemoter.* 6: 283-318.
- Rosedahl, V.T. 1993. Natural occurring constitutive β -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 229-231.
- Smith, H. M. 1971. Synopsis of the Herpetofauna of Mexico. Analysis of the literature on the Mexican Axolotl. Vol. I. Natural History Books. U. S. A.
- Smith, H. M. 1989. Discovery of the Axolotl and its Early History in Biological Research. In Armstrong, J.B. and Malacanski, G. M. (eds.) *Developmental Biology of the Axolotl.* Oxford University Press. USA.
- Son R., Rusul G., Shilah A.M., Zainuri A., Raha A.R. and Salmah I. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish Tilapia (*Telapia mossambica*). *Lett. Appl. Microbiol.* 24(16):479-482.
- Sykes, R.B. and Mathew M. 1976. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2 : 115-157.
- Villamar, D.T. 1998. Contribución al conocimiento de las preferencias térmicas en anguidos (Reptilia, Sauria). Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México.
- Watanabe, T., 1963. Effective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 227: 87-115.

Wen C.K., Kwok W.Y , Cheng, Y.L., Ching T.H. , Hseih, S.L. and Yin C.C. 1996.
Increased antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan.
Antimicrob. Agents and Chemother. 40(5):1260-1262.