

R. 6510

"PLASMIDOS R EN EL GENERO SALMONELLA"

Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor, por la licenciada en Farmacia, Doña ROSARIO YÑIGUEZ OVANDO.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Sevilla, Julio de 1984.



TELEFOS. HOSPITAL 37 84 00 EXT. 1208
FACULTAD 37 31 98
APARTADO 826
SEVILLA - 9

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Y MEDICINA PREVENTIVA

PROF. EVELIO J. PEREA

PROF. EVELIO JOSE PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y el Dr. JOSE CARLOS PALOMARES FOLIA, Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla:

CERTIFICAN: Que la Dra. ROSARIO YÑIGUEZ OVANDO, ha realizado su Tesis Doctoral bajo el título de "PLASMIDOS R EN EL GENERO SALMONELLA"

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Sevilla a veinte de junio de mil novecientos ochenta y cuatro.

Prof. Evelio José Perea

Dr. José Carlos Palomares



A mis Padres.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, en primer lugar al Prof. D. Evelio J. Perea Pérez, Director de esta tesis, e igualmente al Dr. José C. Palomares Folia, codirector de la misma, por sus valiosas sugerencias y orientaciones en la elaboración de este trabajo.

A todo el Departamento de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario, que de una manera u otra han contribuido a que este trabajo saliera adelante y especialmente a mis compañeros del Grupo de Genética, Rufino Jiménez-Díaz, Rosario Gallardo, Mercedes Lomas, M^a Carmen Lozano y Rafael Prados.

Al Departamento de Bioestadística, que han llevado a cabo el estudio estadístico de esta Tesis.

Y finalmente a Jorge, quien con su aliento, me ha hecho más llevadero la terminación de la Tesis.

INDICE

	<u>Págs.</u>
1.4.- TAMPONES.....	16
<i>Tampón de electroforesis.....</i>	16
<i>Tampón fosfato, pH, 6,0, 0,1 M</i>	16
<i>Tampón fosfato, pH, 8,0, 0,1 M</i>	17
<i>Tampón Tris-borato</i>	17
<i>Tampón Tris, pH, 8,0 1 M</i>	17
1.5.- AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	19
2.- METODOS	21
2.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION	21
2.2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTI BIOTICOS	25
2.2.1.- <i>Método disco-placa</i>	25
2.2.1.- <i>Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias</i>	25
Criterios de sensibilidad y resistencia	27
2.3.- TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJU- GACION	27
2.4.- METODOS RAPIDOS PARA LA VISUALIZACION DE PLASMIDOS	28

	<u>Págs.</u>
2.5.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS PLASMIDOS R MEDIANTE LA ELABORA- CION DE RECTA DE CALIBRADO.....	34
2.6.- METODO ESTADISTICO.....	35
III.- RESULTADOS	39
3.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICRO- ORGANISMOS.....	39
3.2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	41
3.3.- PATRONES DE RESISTENCIA.....	50
3.4.- CONJUGACION CON <u>E. COLI</u> K 12 E711.....	59
Transferencia de <u>S. typhi</u>	60
Transferencia de <u>S. typhimurium</u>	60
Transferencia de <u>Salmonella</u> de otros serotipos.....	64
3.5.- COMPROBACION DE LA AUTOTRANSFERIBILI- DAD DE LOS FACTORES R	68
3.6.- DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE CON- JUGACION.....	69
3.7.- VISUALIZACION DE PLASMIDOS R EN CEPAS DE <u>SAMONELLA</u> . CALCULO DE SU PESO MOLE- CULAR.....	71

	<u>Págs.</u>
IV.- DISCUSION	82
4.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.....	82
<i>Gastroenteritis</i>	83
<i>Septicemia</i>	83
<i>Fiebres intestinales</i>	84
4.2.- RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIA- NOS.....	86
4.3.- PATRONES DE RESISTENCIA.....	102
4.4.- CONJUGACION CON <u>E. COLI</u> K12 E711.....	107
4.5.- FRECUENCIA DE CONJUGACION.....	114
4.6.- PLASMIDOS R EN EL GENERO <u>SALMONELLA</u>	114
V .- CONCLUSIONES	125
VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	129

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

Desde que en 1959 Akiba y Ochiai descubrieron la resistencia transferible en bacterias, muchos estudios han descrito la existencia y propiedades de los plásmidos R en los diversos géneros de Enterobacteriaceae, ya sean patógenos (Salmonella o Shigella) o saprófitos (E. coli, Klebsiella, etc...).

La importancia del estudio de los plásmidos R albergados en el género Salmonella viene dada por la alta incidencia de Salmonelosis, sobre todo en su forma gastroenterítica, lo que mantiene a este género entre los patógenos más importantes en nuestra zona geográfica.

Recientemente se ha descrito un incremento de las resistencias en Salmonella en todo el mundo frente a los agentes antimicrobianos. Este incremento de las resistencias se refiere tanto al porcentaje de cepas resistentes a algún antibiótico, como al aumento constante del patrón de resistencia presentado por dichas cepas. El mecanismo genético de estas resistencias suele ser por adquisición de nuevos plásmidos o por la incorporación de transposones a los ya existentes.

Por todo ello, decidimos realizar un estudio de la evolución de las resistencias a los agentes antimicrobianos, así como, de los plásmidos R presentes en las cepas de Salmonella aisladas durante el periodo de 1977-1981.

Las cepas aisladas fueron clasificadas en tres grupos, en función de la patología producida:

Grupo 1º.- S. typhi y S. paratyphi: agentes productores de las fiebres intestinales (fiebres tifoideas y paratifoideas), son enfermedades con un cuadro de larga duración, bacteriemia constante y generalmente persistente, lesiones anatomopatológicas típicas y difusas, hepatoesplenomegalia, etc.. El reservorio de estas Salmonelas es el hombre enfermo o el portador, no se conoce otro reservorio natural; la transmisión es interhumana, directa o, con mayor frecuencia, indirecta.

Grupo 2º.- S. typhimurium: es uno de los principales serotipos productores de gastroenteritis también puede dar lugar a cuadros de bacteriemia con fiebre intermitente, en un 10 % de los casos, la bacteriemia da lugar a procesos focales tales como osteomielitis, artritis, lesiones intravasculares, etc.. Incide preferentemente en personas mayores de 50 años y

con factores predisponentes tales como procesos hemolíticos, neoplasias, enfermedades valvulares y otros. El reservorio de esta *Salmonella* son los animales y su vía de transmisión más frecuente se produce a través de alimentos contaminados, existe otra vía de transmisión menos frecuente, como es la vía persona-persona; esta sobre todo ocurre en niños menores de 2 años o en personas que viven en ínfimas condiciones higiénicas.

Grupo 3º.- Resto de serotipos de *S. enteritidis*: productoras de gastroenteritis. Se caracterizan por su curso con el cuadro de gastroenteritis aguda, sin bacteriemia o a lo sumo con bacteriemia transitoria, y evolución limitada a pocos días. Las Salmonelosis de este tipo se originan a partir de los animales en especial mediante alimentos contaminados.

Para llevar a cabo este trabajo, determinamos en primer lugar la sensibilidad de las cepas de *Salmonella* aisladas a diferentes agentes antimicrobianos (usados ó no en el tratamiento) mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), que se define como la concentración más baja de antibiótico que no permite crecimiento aparente tras 18 horas de incubación a 35º C de un inóculo apro-

ximado de 10^5 bacterias/ml. expresado en $\mu\text{g/ml.}$ Posteriormente estudiamos la capacidad de transferencia por conjugación de las resistencias encontradas en las cepas de Salmonella a E. coli K12 utilizada como receptora. Finalmente detectamos la presencia de plásmidos en todas las cepas resistentes mediante electroforesis en gel de agarosa lo que nos permitió determinar a la vez el peso molecular de estos plásmidos.

Con estos datos pretendemos establecer una posible comparación entre estos tres grupos de Salmonella y ver si el tipo de plásmidos, bien de origen humano o animal, encontrados en cada uno de ellos corrobora esta división y sus diferencias epidemiológicas ó por el contrario sería indicativo de una mayor relación entre estos grupos de Salmonelas.

MATERIAL Y METODOS

II.- MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL

1.1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS

Se utilizaron 316 cepas pertenecientes al género Salmonella, 290 aisladas de heces, 21 de sangre y 5 de otras muestras bacteriológicas, procedentes de enfermos ingresados en el Hospital Universitario de Sevilla durante los años 1977 a 1981.

El aislamiento e identificación de las cepas se realizó según los métodos que se describen más adelante. Dando como resultado:

<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Typhimurium</u>	141
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Montevideo</u>	65
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Enteritidis</u>	35
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Berta</u>	17
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Muenchen</u>	8
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Newport</u>	7
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Agona</u>	6
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Blockley</u>	5

<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Thompson</u>	3
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Heidelberg</u>	2
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Saint-Paul</u>	2
<u>S. enteritidis</u>	<u>ser. Paratyphi B</u>	3
<u>Otros serotipos</u>		6
<u>S. Typhi</u>		16
TOTAL		316

Hoy día se tiende a sustituir esta nomenclatura formal por otra más sencilla, que es usar el nombre del género y serotipo, de esta manera S. typhimurium. Esta designación es la que emplearemos en este trabajo.

El género Salmonella se incluye en la familia Enterobacteriaceae, la extraordinaria importancia médica de numerosos miembros de la familia ha hecho que por razones diagnósticas y epidemiológicas se hayan estudiado con gran profundidad la mayoría de las enterobacteriáceas y esto ha dado lugar a una gran confusión desde los puntos de vista taxonómico y de nomenclatura. En el género Salmonella se han descrito más de 2.000 serotipos diferentes, la mayoría de ellos se denominan erróneamente especies. Existen tres esquemas

taxonómicos para Salmonella y Arizonae. En Estados Unidos se utiliza la clasificación en tres especies recomendada por Edward y Ewing (1.972), S. cholerae-suis, S. typhi, S. enteritidis son las tres especies reconocidas. Todo el resto de Salmonelas se consideran serotipos de S. enteritidis y Arizonae se sitúa en un género diferente.

En el resto del mundo se utiliza el esquema de cuatro subgéneros de Cowan (1974). El subgénero I comprende las salmonelas con unas características bioquímicas típicas, la mayoría de las cepas aisladas del hombre y animales de sangre caliente pertenecen a este subgénero. Los subgéneros II y IV agrupan una serie de salmonelas bioquímicamente atípicas, y el subgénero III contiene todas las Arizonae. Los subgéneros II, III y IV se aíslan exclusivamente de reptiles, en los que se comportan como comensales.

En la octava edición del Manual de Bergey (1974) se describen once tipos de Salmonella, que no tienen la denominación oficial de especies.

En nuestro trabajo hemos utilizado el primer esquema taxonómico mencionado.

CEPAS RECEPTORAS

Las cepas bacterianas que se enumeran a continuación fueron utilizadas como receptoras en los experimentos de conjugación.

E. coli K-12 E711, F^- , lac^- , his^- , pro^- , trp^- , Na^R (Moreno y col., 1971)

E. coli W 3110, F^- , T^- (N. Datta, 1977)

E. coli Hfr H, Rif^R (N. Datta, 1977)

CEPAS CON PLASMIDOS PATRONES

Como bacterias portadoras de plásmidos de peso molecular conocido, se utilizaron las cepas de E. coli que se muestran en la tabla I.

CEPAS PATRONES DE SENSIBILIDAD

Las tres cepas siguientes fueron utilizadas como patrones de resistencia conocida e invariable en la determinación de la sensibilidad a agentes antimicrobianos.

Staphylococcus aureus ATCC 25923

<u>Escherichia coli</u>	ATCC	25922
<u>Bacillus subtilis</u>	ATCC	6336

TABLA I.- PLASMIDOS USADOS COMO PATRONES EN LA ESTIMACION OBJETIVA DEL PESO MOLECULAR DE OTROS ESTUDIADOS. RELACION DE CEPAS DE E. COLI PORTADORAS Y PROCEDENCIA DE LAS MISMAS.

PLASMIDOS	PESO MOLECULAR (Md)	CEPAS PORTADORAS	PROCEDENCIA
RP4	36,0	<u>E. coli</u> HU 57	N. DATTA
R702	46,0	<u>E. coli</u> HU 58	"
RI	62,0	<u>E. coli</u> HU 56	"
RA14	85,0	<u>E. coli</u> HU 59	"
-	35, 8/4, 8/3, 7/3, 4/2, 6/ 2,0/1, 8/1, 4/	<u>E. coli</u> V 517	F. MACRINA

1.2.- PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS

Agarosa tipo II: Medium EEO (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Tritón X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Bromuro de Etidio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Lisozima clorhidrica (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, USA).

Ribonucleasa A, Tipo III (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

1.3.- MEDIOS DE CULTIVOS

1.3.1.- Medios bases de crecimiento

Agar-sangre enriquecido (AS)

Caldo nutritivo (CN)

Caldo infusión cerebro-corazón (BHI)

1.3.2.- Medios de aislamiento

Agar eosina azul de metileno (EMB)

Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)

Agar Hecktoen-entérico (HE)

Agar Salmonella-Shigella (SS)

Caldo selenito-F

1.3.3.- Medios de identificación bioquímica

Agar tres azucares-hierro (TSI)

Agar de movilidad

Agar de citrato de Simmons

Agar urea de Chistensen

Agar fenilalanina

Caldo malonato

Caldo lisina

Caldo ornitina

Agua peptonada

β galactosidasa

Reactivos de Kovacs y Citrato férrico

1.3.4.- Medio para la determinación de la sensibilidad a antibióticos

Agar Mueller-Hinton (MH)

1.3.5.- Medios para la transferencia de plásmidos R

Agar eosina azul de metileno (EMB)

Caldo nutritivo (CN)

Todos los medios de la marca Difco. Michigan. EE.UU.

1.3.6.- Medios para la conservación de microorganismos

Todas las cepas utilizadas se conservaron en leche descremada al 10 % en agua destilada, congeladas a -40° C.

1.4.- TAMPONES

Tampón de electroforesis

Preparado según Eckhardt (1978). Su composición es la siguiente:

Tris base (Sigma).....	89,0 mM
EDTA Na ₂ (Sigma).....	2,5 mM
Acido bórico (Sigma).....	89,0 mM

Una vez disueltos todos los componentes en un litro de agua destilada, se añadieron 1 µg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma) y se ajustó el pH a 8,2.

Tampón fosfato, pH 6,0, 0,1 M.

Se prepararon dos soluciones diferentes:

Solución A: Po ₄ H ₂ Na (Merck).....	0,2 M
Solución B: Po ₄ HNa ₂ (Merck).....	0,2 M

El pH deseado (6.0) se consiguió mezclando 87,5 ml de la solución A con 12,3 ml de la solución B y se completó con agua destilada hasta 200 ml. Esta mezcla se esterilizó en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

Tampón fosfato, pH 8,0, 0,1 M

Se preparó partiendo de las soluciones A y B descritas anteriormente, pero ahora se mezclaron 5,3, ml de la solución A con 94,7 ml de la solución B, completándose hasta 200 ml con agua destilada y esterilizando la mezcla en autoclave durante 20 minutos a 121° C.

Tampón Tris-borato

Fué preparado según Eckhardt (1978):

Tris base	89,0 mM
EDTA Na ₂	12,5 mM
Acido bórico	89,0 mM

Se disolvieron los tres componentes en un litro de agua destilada y se ajustó el pH a 8,2.

Tampón Tris, pH 8,0 1M

Se preparó según Cornelis y col. (1976). Su composición fue la siguiente:

Tris ClH	106,4 g/l
Tris base	39,4 g/l

Los componentes se diluyeron en agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121° C durante 20 minutos ajustándose su pH a 8,0.

1.5.- AGENTES ANTIMICROBIANOS

Se utilizaron en dos formas diferentes:

- en disco
- en polvo valorado

En disco presentaban las siguientes concentraciones:

Acido Nalidixico (Na)	30 µg/ml.
Ampicilina (Am)	10 µg/ml.
Cefalotina (Cf).....	15 µg/ml.
Cloranfenicol (Cm).....	15 µg/ml.
Estreptomicina (Sm).....	10 µg/ml.
Fosfomicina (Fm)	50 µg/ml.
Gentamicina (Gm).....	10 µg/ml.
Kanamicina (Km)	30 µg/ml.
Rifampicina (Rif).....	30 µg/ml.
Tetraciclina (Tc)	15 µg/ml.
Trimetoprim/ sulfametoxazol (Txs)	1,25/23,75 µg/ml.

En la tabla II se muestran los agentes antimicrobianos usados en forma de polvo, así como sus solventes y diluyentes correspondientes.

Tabla II. Agentes antimicrobianos utilizados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Solventes y diluyentes empleados en la solución stock de dichos antimicrobianos.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Solvente</i>	<i>Diluyente</i>
<i>A. Nalidíxico</i>	<i>NaOH 0,1 M</i>	<i>Agua</i>
<i>Ampicilina</i>	<i>Tampón fosfato pH 8,0, 0,1 M</i>	<i>Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 M</i>
<i>Cefalotina</i>	<i>Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 M</i>	<i>Agua</i>
<i>Cloranfenicol</i>	<i>metanol</i>	<i>Agua</i>
<i>Estreptomicina</i>	<i>Agua</i>	<i>"</i>
<i>Fosfomicina</i>	<i>"</i>	<i>"</i>
<i>Gentamicina</i>	<i>"</i>	<i>"</i>
<i>Kanamicina</i>	<i>"</i>	<i>"</i>
<i>Rifampicina</i>	<i>metanol</i>	<i>"</i>
<i>Tetraciclina</i>	<i>Agua</i>	<i>"</i>
<i>Trimetoprim/ sulfametoxazol</i>	<i>NAOH, 0,1 M</i>	<i>"</i>

2.- METODOS

2.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

El aislamiento de las cepas de Salmonella se realizó cultivando las heces a partir de una emulsión previa en agua destilada (para aquellas de consistencia forme) en la proporción de 1 gr. de heces en 10 ml de agua destilada esteril, y las heces líquidas se sembraron directamente.

La primera inoculación y siembra se realizó en el medio agar-sangre enriquecido, en los medios selectivos agar eosina azul de metileno, agar xilosa-lisina-desoxicolato y en caldo de enriquecimiento selenito-F. A partir de este se subcultivó después de seis horas de incubación a 35° en los medios selectivos agar hecktoen-entérico y agar Salmonella-Shigella.

El aislamiento de las cepas de Salmonella a partir de hemocultivos y de otras muestras bacteriológicas se llevó a cabo por los métodos habituales.

En todos los casos se realizó la identificación bioquímica de las colonias sospechosas, así como, la serológica si-

guiendo la metódica de Le Minor, 1972 y Edwards and Ewing, 1972.

Las 316 cepas de Salmonella fueron identificadas inicialmente por sus características bioquímicas de:

Fermentación de glucosa y no de lactosa

Utilización del citrato

No producción de ureasa

Descarboxilación de lisina

Producción de sulfídrico

No producción de indol

No producción de fenilalanina desaminasa

β galactosidasa negativa

Y posteriormente las cepas fueron aglutinadas con antisueros específicos del Instituto Pasteur.

Las cepas aisladas e identificadas las agrupamos basándonos en los criterios de patogenicidad antes expuestos:

Grupo 1º.- Este grupo incluye 16 cepas de S. typhi y 3 de S. paratyphi B.

Grupo 2º.- Integrado por 141 cepas de S. typhimurium.

Grupo 3º.- Formado por 156 cepas de diversos serotipos de S. enteritidis. En la tabla III se expresan las cepas de estos grupos y su procedencia.

TABLA III.-CEPAS DESALMONELAS AISLADAS EN EL H.U.S. DE 1977 A 1981, OBJETO DEL ESTUDIO.

GRUPO	Nº CEPAS		PROCEDENCIA		
			HECES	HEMOCULTIVO	OTRAS MUESTRAS
1º	16	<u>S. typhi</u>	2	12	2
	3	<u>S. paratyphi B</u>	1	2	
2º	141	<u>S. typhimurium</u>	135	5	1
3º	65	<u>S. montevideo</u>	65		
	35	<u>S. enteritidis</u>	34	1	
	17	<u>S. berta</u>	15	1	1
	8	<u>S. muenchen</u>	8		
	7	<u>S. newport</u>	7		
	6	<u>S. agona</u>	6		
	5	<u>S. blockley</u>	5		
	3	<u>S. thompson</u>	3		
	2	<u>S. heidelberg</u>	2		
	2	<u>S. saint-paul</u>	2		
	2	<u>S. dublin</u>	1		1
4	<u>Otros Serotipos</u>	4			

2.2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

2.2.1.- Método disco-placa

La sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos de las bacterias aisladas e identificadas como pertenecientes al género Salmonella, se determinó por el método de Bauer-Kirby (1966), usando los discos de antibióticos anteriormente citados y midiendo el halo de inhibición, clasificando de esta forma a las bacterias como sensibles o resistentes.

2.2.2.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se define como la más baja concentración de antibiótico que no permite crecimiento aparente de un cultivo de 18 horas a 35° C en el que hemos inoculado un número aproximado de 10^5 bacterias/ml. La CMI se expresa en $\mu\text{g/ml}$.

Se determinó la CMI a las 316 cepas de Salmonelas frente a los siguientes agentes antimicrobianos: Na, Am, Cf, Cm, Sm, Fm, Gm, Km, Tc, Txs, siguiendo el método de dilución en agar descrito por Washington II y Barry (1974).

Para la realización de esta técnica, empleamos un aparato replicador, descrito por Steer y col. 1959. Con él pueden ser inoculadas simultáneamente 36 cepas bacterianas en la superficie de una placa de medio de cultivo sólido.

Preparación del inóculo: De un cultivo de 18 horas en medio de agar-sangre enriquecido incubado a 35° C, se re-suspendieron de tres a cuatro colonias en caldo nutritivo y se incubaron a 35° C, hasta alcanzar 10^8 bacterias/ml aproximadamente.

Las placas conteniendo las diluciones seriadas de agentes antimicrobianos son inoculadas con 0,001 ml (aproximadamente 3×10^5 bacterias) mediante el replicador de Steer, empezando siempre por la placa que contiene la menor concentración del agente antimicrobiano. Se incuban a 35° C durante 18 horas.

Las concentraciones de antibióticos empleadas fueron: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 $\mu\text{g/ml}$, para todos los antibióticos probados excepto para la combinación Trimetoprim-sulfametoxazol que se usaron 0,06/1,25, 0,125/2,5, 0,25/5, 0,5/10, 1/20, 2/40, 4/80, 8/160 $\mu\text{g/ml}$.

Como controles de una buena inoculación y viabilidad

de las cepas estudiadas, se emplearon placas de medio sin antibiótico al principio y al final de cada serie de agente antimicrobiano. Para el control de posibles errores en las diluciones de los antibióticos probados, se inocularon las tres estirpes bacterianas patrón descritas en el apartado de material, cuya sensibilidad frente a ellos es conocida e invariable.

Criterios de sensibilidad y resistencia.

Fueron consideradas resistentes, las cepas que crecieron en medio que contenía una concentración de 16 μg de Am, Cf, Tc, Cm, Gm, Km, por ml, de 32 μg de Sm y Na por ml, de 64 μg de Fm por ml y de 4 $\mu\text{g/ml}$ de Trimetropim y 80 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametoxazol.

2.3.- TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION.

El método empleado para esta experiencia fue el descrito por Clowes y Hayes en 1968, con algunas modificaciones de Datta y Hedges en 1972.

Las cepas donadoras y receptoras se cultivan a 35° C

en medio líquido con agitación hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^8 cel./ml.

Se mezcla en la proporción 1 a 10 (donadora-receptora) (Meynell y Meynell, 1970). La mezcla se incuba a 35° C durante 18 horas para permitir el establecimiento de la unión celular y la transferencia de los posibles plásmidos. Aquellas *Salmonelas* que no conjugaron se les volvió a repetir la conjugación pero a una temperatura de 25° C (Nakaya y col., 1976; Chun, y col., 1977).

La selección de los transconjugantes se hizo con todos los antibióticos a que era resistente la cepa donadora y se llevó a cabo inoculando 0,1 ml del cultivo mixto en placas de eosina azul de metileno suplementado con A. Nalidíxico y cada uno de los antibióticos requerido en función de las resistencias de la donadora. Posteriormente los transconjugantes se comprueban para los requerimientos nutritivos de la cepa receptora, más aquellos otros caracteres codificados por el ADN plasmídico transferido.

2.4.- METODOS RAPIDOS PARA LA VISUALIZACION DE PLASMIDOS.

Como paso previo, antes de elegir un método para la de-

tección de plásmidos *R* en nuestras cepas, realizamos un estudio de seis métodos de visualización de plásmidos, usando las cepas de referencia especificadas en el material, cuyo número de plásmidos, así como su peso molecular conocíamos.

El objeto de esto fué poder elegir el mejor método y las condiciones más idóneas para nuestro estudio.

Los métodos ensayados se basan en la propiedad física de los ADNs cromosómico y plasmídico de emigrar a distinta velocidad a través de un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico.

Para el estudio de estos métodos, se utilizó una cubeta de electroforesis de tipo 613x52, vertical Slab Unit (Shandon Southern) de placas de gel cuyas dimensiones eran de 130x170x5 mm.) con doce pocillos (15x10x5 mm.). El gel se preparó con agarosa al 0,8 % en tampón trisborato, pH 8,2. (Figura 1).

METODO 1: Electroforesis directa a partir de una colonia. Descrito por T. Eckhardt (1978).

Se toman una ó dos colonias (10^6 - 10^7 células) de un cultivo bacteriano de 18 horas crecido en medio sólido, y

se resuspende en 100 μ l de una mezcla de lisozima (lisozima, 7500 U/ml; ribonucleasa A tipo III, 0,3U/ml; 50 mg de azul de bromofenol y 20 % de sacarosa, todo ello disuelto en tampón de trisborato a pH 8,2) que se había colocado previamente en los pocillos de la parte superior del gel. La suspensión se hará ligeramente turbia y se incubará de dos a cinco minutos a 35° C.

Después se añaden con cuidado 100 μ l de una mezcla de SDS al 0,2 % en trisborato y 10 % de sacarosa. Se mezcla cuidadosamente con el homogeneizado bacterias-lisozima, permaneciendo las dos capas perfectamente diferenciadas.

Se añade una tercera capa de recubrimiento consistente en 200 μ l de SDS al 0,2 % en trisborato con sacarosa al 5 %.

Finalmente, se recubren todos los pocillos con agarosa caliente (50° C), y una vez que los compartimentos superiores e inferiores de la cubeta de electroforesis se llenaron de tampón, se sometió la placa de gel a una corriente eléctrica de 50 mA y 100 V. durante 4 horas.

METODO 2: Descrito por J. Sánchez. Dpto. de Bacteriología de la Universidad de Bristol (comunicación personal).

Se coloca en un tubo 90 μ l de una solución compuesta de 1mg de lisozima en 1ml de tris 0,25 M, en la cual se disuelven 1 ó 2 colonias de un cultivo de 18 horas en medio sólido. Se tiene 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego se añade 60 μ l de EDTA 0,2M dejándolo otros 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se añaden 60 μ l de una mezcla conteniendo 10 % de sacarosa, 5% de SDS y 0,05 % de azul de bromofenol, todo ello disuelto en buffer de electroforesis.

Se centrifuga durante 5 minutos a 12.000 revoluciones por minuto y el sobrenadante se coloca en los pocillos del gel. Procediendo como en el método anterior.

METODO 3: Descrito por J. Grinsted. Dpto. de Bacteriología de la Universidad de Bristol (comunicación personal)

Se introdujo en un tubo 60 μ l de una mezcla conteniendo 1mg de lisozima en 1ml de tris 0,25M, resuspendiéndose en ella 1 ó 2 colonias de un cultivo de 18 horas en medio sólido, dejando la suspensión 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se añade 60 μ l de EDTA 0,2M mantenién-

dose de nuevo 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se adiciona 7'5 μ l de una mezcla que contenía sacarosa al 10 %, 5 % de triton X-100 y 0'05 % de azul de bromofenol.

Se centrifuga 5 minutos a 12.000 revoluciones por minuto y el sobrenadante se lleva a los pocillos del gel.

Por último, se continuó como en el método 1.

METODO 4: Descrito por R. Jiménez-Díaz, Dpto. de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla. (comunicación personal).

Se pone en un tubo 60 μ l de la mezcla de lisozima cuya composición hemos especificado en los métodos anteriores y se disuelve en ella 1 ó 2 colonias de un cultivo de 18 horas de un medio sólido y se mantiene 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego añadimos 60 μ l de una mezcla conteniendo 5 % de SDS, 10 % de sacarosa y 0'05 de azul de bromofenol y se incubó a 37° C durante 30 minutos.

El contenido del tubo se pone en el pocillo del gel procediéndose a continuación como en los métodos anteriores

METODO 5: Descrito por A. Avril y D. Sherratt (1979)
Molec. Gen. Genet. 175, 267-274.

Se resuspende 1 ó 2 colonias en 300 μ l de buffer de electroforésis.

Se adiciona 75 μ l de una mezcla, que contiene un 5 % de SDS, 10 % de sacarosa y 0,05 de azul de bromofenol en buffer de electroforésis, la mezcla se agita brevemente y se calienta a 65° C durante 30 minutos.

Transcurrido el tiempo se vuelve a agitar en un agitador de tubos aproximadamente 10 segundos, y se pone la muestra en el pocillo del gel, siguiendo a continuación la pauta de los métodos anteriores.

METODO 6: Descrito por A. Avril y D. Sherratt (1979).
Mol. Gen. Gent. 175, 267-274.

Se resuspende 1 ó 2 colonias en 150 μ l de un buffer conteniendo un 15 % de sacarosa, lisozima 0,63 mg/ml, EDTA sódico 0,07 M y tris CLH 0,05 M pH 8,0.

A continuación se añade 150 μ l de una mezcla lítica (Clewell and Helinski, 1969). Se deja reposar durante 5 minutos.

Luego centrifugamos a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos, y el sobrenadante se lleva a el pocillo del gel, continuando el método como los anteriores.

En todos los métodos probados los geles una vez finalizada la electroforesis, se tiñen 15 minutos con una solución de Bromuro de etidio ($1\mu\text{g/ml}$ en tampón trisborato). Se visualiza con un transiluminador de rayos ultravioletas tipo G61 (U.V. products, Inc. San Gabriel. California, U.S.A.), fotografiándose con una cámara polaroid x 70 Land film, a través de un filtro rojo (Wratten nº 9)

2.5.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS PLASMIDOS R MEDIANTE LA ELABORACION DE UNA RECTA DE CALIBRADO.

Nos interesaba conocer ahora el peso molecular de los plásmidos R hallados en las especies de Salmonella, mediante un método sencillo y para ello se procedió a la elaboración de una recta de calibrado, utilizando para ello plásmidos de peso molecular conocido.

Sabemos que la emigración relativa del ADN en el gel

de agarosa bajo la corriente eléctrica está inversamente relacionada con el logaritmo del peso molecular del plásmido.

En cada electroforesis utilizamos bacterias que contenían plásmidos de peso molecular conocido.

Si representamos sobre un papel logarítmico en ordenadas el peso molecular y en abcisas la movilidad relativa del ADN (Meyers y col, 1976; Macrina y col, 1978; Willshow y col. 1979) de los plásmidos tipo de peso molecular conocido, mencionados en el apartado del material, conociendo la movilidad relativa de estos plásmidos en una electroforesis determinada y comparándola con sus pesos moleculares, podemos trazar la recta patrón de cada una de las electroforesis y así calcular el peso molecular de todos los plásmidos que se estudian en la misma de peso molecular desconocido.

2.6.- METODO ESTADISTICO

El método estadístico utilizado fue el test de KUULLBACK y LEIBLER con la corrección de K.U.. Es un test parecido al de la χ^2 pero más sensible cuando se comparan pequeñas muestras.

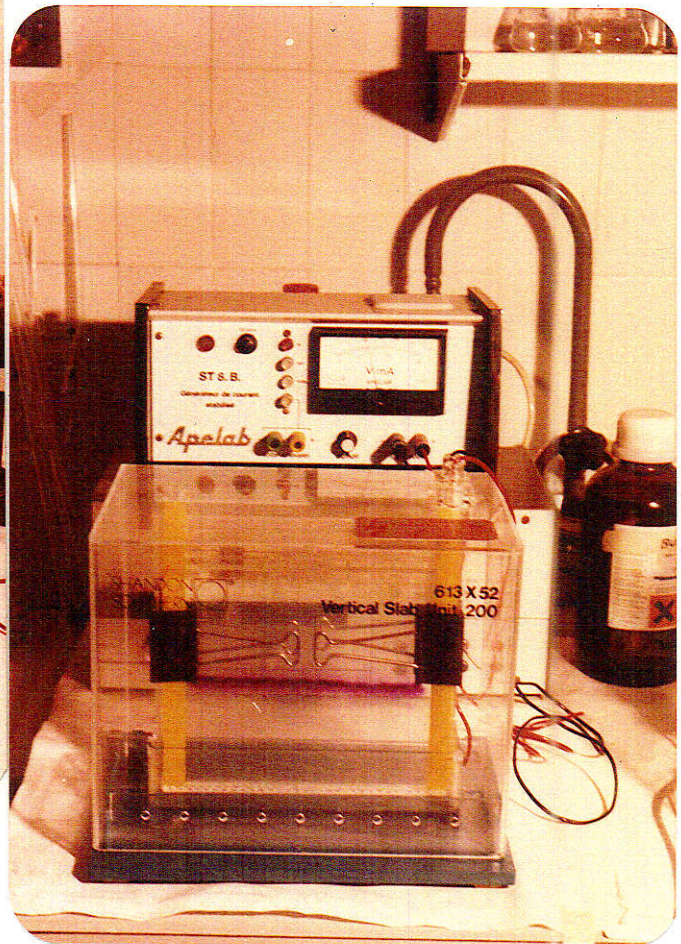
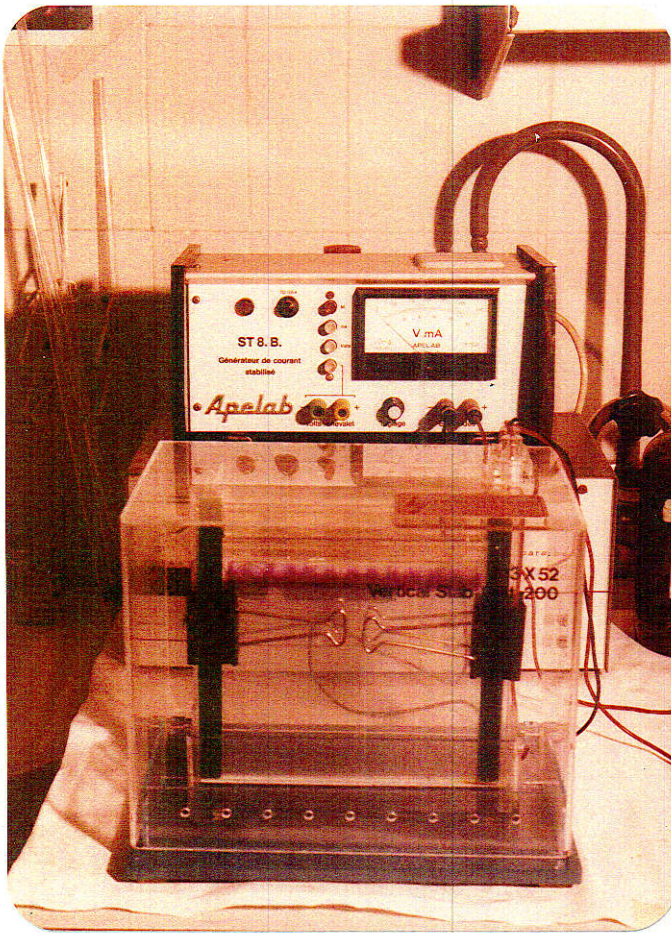


Figura 1.- Aparato donde se llevó a cabo las electroforesis de las cepas de Salmonelas.

1 2 3 4 5 6 7 8

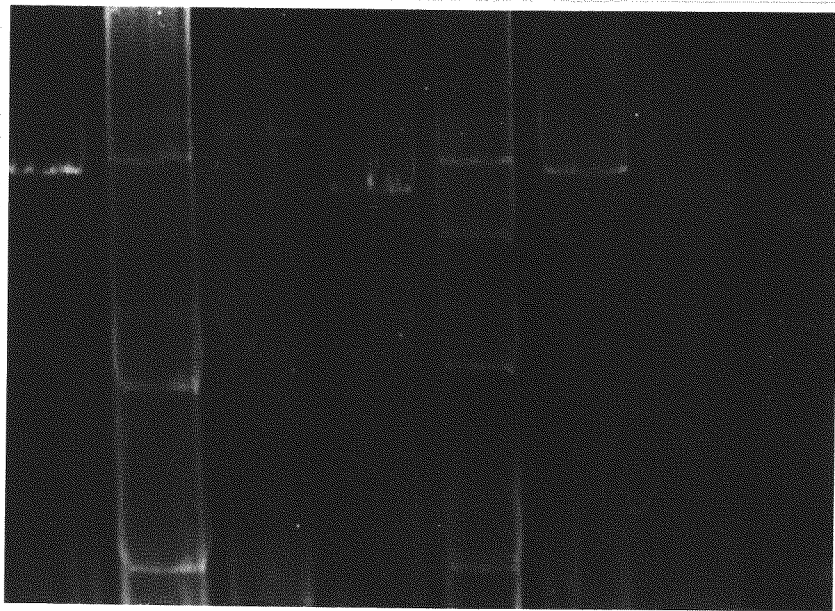


Figura 2.- Electroforesis en gel de agarosa al 0'8 % durante 4 horas a 100 V y 50 mA, de las cepas de salmonelas estudiadas y que eran portadoras de plásmidos.

RESULTADOS

III.- RESULTADOS

3.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

El 91'8 % de las cepas de Salmonella fueron aisladas de heces, el 6,6 % de sangre y el 1'6 % de otras muestras bacteriológicas.

El serotipo más frecuentemente aislado fue S. typhimurium (44'6 %) seguido de S. montevideo (20'5 %) y S. enteritidis (11'2 %). Tabla IV.

En la Tabla IV mostramos los distintos serotipos y especies de Salmonella en función del año de aislamiento, correspondiendo los mayores porcentajes durante 1977 a S. montevideo (40 %) y S. typhimurium (30 %). En 1978 disminuye el porcentaje de S. montevideo hasta el 22,2 % y S. typhimurium al 27'7 %. Durante 1979 aumenta el porcentaje de S. typhimurium alcanzando un 54'6 % y sigue bajando el porcentaje de S. montevideo hasta un 10'6 %. También hay un aumento de S. berta de 1'8 % en 1978 a un 12 % en 1979. En 1980 y 1981 siguen correspondiendo los mayores porcentajes a S. typhimurium y S. montevideo. Con respecto a S.

TABLA IV.- PORCENTAJE DE DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES Y SEROTIPOS DE SALMONELLA DURANTE 1977-1981.

CEPAS	Nº CEPAS (%)	1977	1978	1979	1980	1981
<u>S. typhimurium</u>	141 (44'6)	30	27'7	54'6	38'5	62'6
<u>S. montevideo</u>	65 (20'5)	40	22'2	10'6	22'8	13'4
<u>S. enteritidis</u>	35 (11'2)	8	11'1	12'0	10'0	13'4
<u>S. berta</u>	17 (5'4)	-	1'8	12'0	8'5	2'9
<u>S. muenchen</u>	8 (2'5)	-	9'2	-	2'8	-
<u>S. newport</u>	7 (2'3)	2	7'4	1'3	-	1'4
<u>S. agona</u>	6 (1'8)	8	-	1'3	1'4	-
<u>S. blockley</u>	5 (1'6)	-	5'5	1'3	1'4	-
<u>S. thompson</u>	3 (0'9)	4	-	1'3	-	-
<u>S. heidelberg</u>	2 (0'6)	-	-	-	2'8	-
<u>S. saint-paul</u>	2 (0'6)	-	-	-	2'8	-
<u>Otros serotipos</u>	9 (2'8)	4	1'8	-	4'2	1'4
<u>S. typhi</u>	16 (5'2)	4	7'4	5'3	4'2	4'4
<u>Total Cepas</u>	316	50	54	75	70	67

enteritidis, el tercero en frecuencia de aislamiento los porcentajes no sufren grandes cambios a lo largo de estos años, igual le ocurre a S. typhi.

En la gráfica 3 se representa el número de aislamiento de Salmonella en los distintos meses del año. Como podemos apreciar la mayor incidencia coincide en los meses de Junio a Octubre. Esta distribución en el tiempo se mantiene constante en los años estudiados.

3.2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

Una vez identificadas todas las cepas se les realizó un antibiograma por el método de dilución en agar con el replicador de Steer, a las 316 cepas de Samonella estudiadas frente a una serie de agentes antimicrobianos elegidos por lo representativo de su uso clínico, que fueron: Na, Am, Cf, Cm, Sm, Fm, Gm, Km, Tc, y Txs.

Los resultados obtenidos en la determinación de la sensibilidad de las cepas de Salmonella estudiadas, están representados en las tablas : V, VI y VII.

Globalmente durante estos cinco años, frente a Salmo-

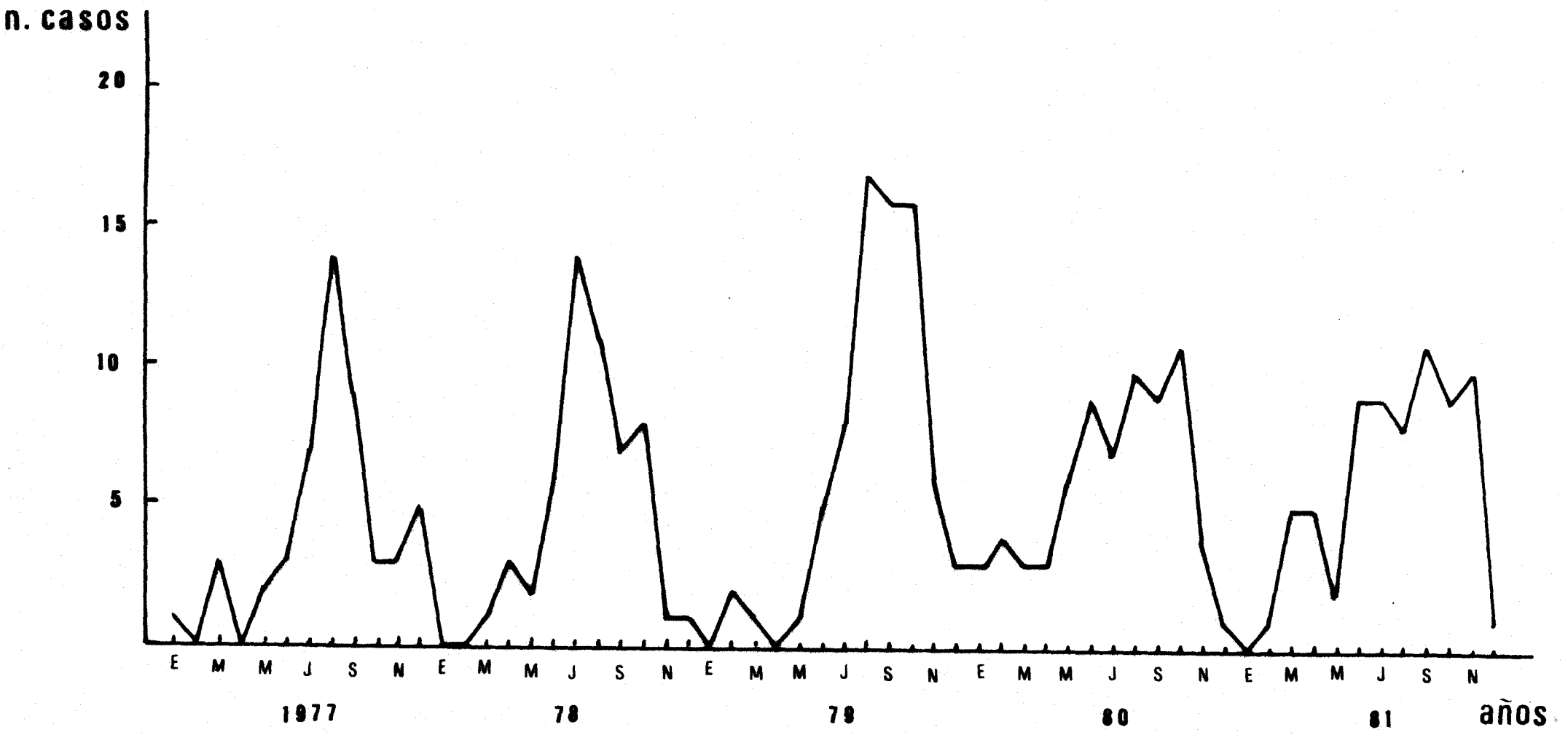


FIG. 3 FRECUENCIAS DE SALMONELLA EN LOS DISTINTOS MESES DEL AÑO, DURANTE 1977-1981.-

TABLA V.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS A LAS QUE SE INHIBIERON EL 50 y 90 % DE LAS SALMONELAS DEL GRUPO 1 POR AÑO DE AISLAMIENTO.

ANTIMICROBIANOS	1977		1978		1979		1980		1981	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>Ac. Nalidixico</i>	4	4	4	4	2	4	4	8	2	4
<i>Ampicilina</i>	1	2	1	1	1	4	1	1	1	2
<i>Cefalotina</i>	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1
<i>Cloranfenicol</i>	4	8	8	8	4	8	4	4	8	8
<i>Estreptomicina</i>	16	32	32	64	16	16	32	32	32	32
<i>Fosfomicina</i>	8	16	8	64	8	8	2	4	8	32
<i>Gentamicina</i>	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
<i>Kanamicina</i>	2	4	2	4	1	2	1	4	4	8
<i>Tetraciclina</i>	4	4	8	64	1	8	4	4	8	16
<i>Trimetoprim-sulfametoxazol</i>	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5	0.06/ 1.25	0.06/ 1.25	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5

TABLA VI.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS A LAS QUE SE INHIBIERON EL 50 y 90 % DE LAS SALMONELAS DEL GRUPO 2 POR AÑO DE AISLAMIENTO.

ANTIMICROBIANOS	1977		1978		1979		1980		1981	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>Ac. Nalidíxico</i>	4	8	4	16	4	4	8	8	4	8
<i>Ampicilina</i>	4	8	4	8	4	4	4	>128	4	8
<i>Cefalotina</i>	4	8	4	8	2	4	4	16	4	4
<i>Cloranfenicol</i>	8	8	4	8	8	64	8	32	8	8
<i>Estreptomina</i>	16	16	16	128	16	128	16	>128	16	32
<i>Fosfomicina</i>	8	16	8	16	8	32	8	32	8	32
<i>Gentamicina</i>	1	1	4	4	1	1	2	4	2	2
<i>Kanamicina</i>	4	4	4	4	2	8	4	>128	8	8
<i>Tetraciclina</i>	8	16	8	64	8	>128	8	>128	8	16
<i>Trimetoprim-- sulfametoxazol</i>	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5	0.06/ 1.25	0.25/ 5	0.06/ 1.25	0.25/ 5	0.125/ 2.5	4/ 80	0.06 1.25	0.5/ 10

TABLA VII.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS A LAS QUE SE INHIBIERON EL 50 y 90 % DE LAS SALMONELAS DEL GRUPO 3 POR AÑO DE AISLAMIENTO.

ANTIMICROBIANOS	1977		1978		1979		1980		1981	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>Ac. Nalidixico</i>	4	8	4	8	4	4	4	8	4	8
<i>Ampicilina</i>	4	8	8	8	2	4	8	>128	4	8
<i>Cefalotina</i>	4	4	4	4	2	4	4	8	4	8
<i>Cloranfenicol</i>	8	8	4	8	8	8	8	8	8	8
<i>Estreptomocina</i>	16	16	16	16	8	16	8	>128	8	16
<i>Fosfomicina</i>	8	16	4	8	8	32	8	16	8	8
<i>Gentamicina</i>	1	2	2	2	1	1	2	4	2	4
<i>Kanamicina</i>	4	4	4	4	2	4	4	8	4	8
<i>Tetraciclina</i>	4	8	8	16	4	16	8	16	8	16
<i>Trimetoprim-- sulfametoxazol</i>	0.06/ 1.25	0.125/ 2.5	0.125/ 2.5	0.25/ 5	0.06/ 1.25	0.25/ 5	0.125/ 2.5	2/ 40	0.06/ 1.25	0.5/ 10

nella typhi y Paratyphi B, Trimetoprim—sulfametoxazol aparece como el agente antimicrobiano más activo, inhibiendo al 90 % de las cepas estudiadas a una concentración de 0,125/2,5 µg/ml, seguido de Gentamicina que lo hace a una concentración de 1 µg/ml.

Del resto de los agentes antimicrobianos estudiados Ampicilina y Cefalotina muestran una actividad muy parecida, inhibiendo al 90 % de las cepas a 2 µg/ml, mientras que Kanamicina y Ac. Nalidíxico lo hacen a 4 µg/ml y Cloranfenicol requirió 8 µg/ml para inhibir al 90 % de las cepas probadas.

Los antibióticos que presentaron una actividad menor fueron Tetraciclina, Fosfomicina y Estreptomicina, los dos primeros inhibieron al 90 % de las cepas a 16 µg/ml y Estreptomicina a 32 µg/ml.

Frente a las cepas de Salmonella typhimurium, Trimetoprim—sulfametoxazol inhibe al 90 % de las cepas a una concentración de 1/20 µg/ml, y Gentamicina lo hace a una concentración de 2 µg/ml.

Cefalotina y Ac. Nalidíxico inhiben al 90 % de las

cepas estudiadas a 8 $\mu\text{g/ml}$, mientras que Cloranfenicol y Fosfomicina lo hacen a 16 $\mu\text{g/ml}$; Kanamicina y Ampicilina requieren 32 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el 90 % de las cepas probadas.

Tetraciclina y Estreptomicina fueron los antibióticos menos activos, mostrando una C.M.I. 90 de 64 $\mu\text{g/ml}$ y 128 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

En cuanto a las cepas de Salmonella de otros serotipos, Trimetoprim—sulfametoxazol inhibe al 90 % de las cepas a una concentración de 0,5/10 $\mu\text{g/ml}$ y Gentamicina lo hace a 2 $\mu\text{g/ml}$.

Del resto de los antibióticos ensayados, Kanamicina y Cefalotina presentaron una C.M.I. 90 de 4 $\mu\text{g/ml}$, Ac. Nalidixico y Cloranfenicol de 8 $\mu\text{g/ml}$ y Fosfomicina y Tetraciclina de 16 $\mu\text{g/ml}$.

Ampicilina y Estreptomicina son los antibióticos que presentaron menor actividad, la Ampicilina requirió 32 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 90 % de las cepas estudiadas y la Estreptomicina 64 $\mu\text{g/ml}$.

Las cepas Salmonella typhi, sólo presentaron resistencia

a tres antibióticos, que fueron Estreptomicina, Fosfomicina y Tetraciclina, 8 cepas fueron resistentes a Estreptomicina, 2 a Tetraciclina y 1 a Fosfomicina. Tabla VIII. En este grupo hemos de tener en cuenta, que el número de cepas aisladas es muy pequeño.

TABLA VIII.- CEPAS RESISTENTES DE S. TYPHI AISLADAS ENTRE 1977 y 1981.

Antibióticos	1977	1978	1979	1980	1981	Total
Estreptomicina	1	2	-	3	2	8
Tetraciclina	-	1	-	-	1	2
Fosfomicina	-	1	-	-	-	1
Total de Cepas	3	3	4	3	3	16

En la Tabla IX.- se muestran los porcentajes de resistencias de las cepas de Salmonella typhimurium a cada uno de los agentes antimicrobianos ensayados. De las 141 cepas estudiadas 76 (54,0 %) fueron resistentes a uno o más de los agentes antimicrobianos probados. La resistencia a Tetraciclina fue la más frecuente (48'2 %) seguida de

la resistencia a Estreptomicina 27'6 %.

La frecuencia de cepas resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y a Cefalotina fue baja un 2'8 % y 4'9 % respectivamente, del total de aislamientos.

No se encontró ninguna cepa resistente a Ac. Nalidíxico ni a Gentamicina, ya que todas las cepas se inhibieron a concentraciones menores de 32 y 8 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Observamos un aumento de los porcentajes globales de cepas resistentes de un 43 % en 1977 a un 57 % en 1981. Los incrementos más significativos de resistencia lo presentan Ampicilina que pasa de 0 % en 1977 a un 11'9 % en 1981 y Tetraciclina de un 35'7 % a un 54'7 % respectivamente.

En cuanto a las cepas de Salmonella de otros serotipos. Tabla X.- De las 159 cepas estudiadas 63 (39'6 %) presentaron resistencia a uno o más de los agentes antimicrobianos estudiados. La resistencia a Tetraciclina 19'5 % fue la más frecuente y en segundo lugar a Estreptomicina (12'5 %).

Los porcentajes de resistencia más bajos lo dieron Cefalotina (1'8) y a continuación la combinación Trimetoprim-sulfametoxazol. (3'1).

TABLA IX.- PORCENTAJE DE RESITENCIAS DE LAS CEPAS DE S. TYPHIMURIUM AISLADAS ENTRE 1977 y 1981

ANTIMICROBIANOS (Nº CEPAS)	PORCENTAJE DE RESISTENCIA					Total (141)
	1977 (14)	1978 (18)	1979 (40)	1980 (27)	1981 (42)	
<i>Ac. Nalidíxico</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Ampicilina</i>	0	0	5'0	25'9	11'9	9'9
<i>Cefalotina</i>	0	0	2'5	18'5	2'3	4'9
<i>Cloranfenicol</i>	7'1	0	17'5	14'8	7'1	10'6
<i>Estreptomicina</i>	7'1	44'4	30'0	40'7	16'6	27'6
<i>Fosfomicina</i>	7'1	5'5	5'0	7'4	9'5	7'1
<i>Gentamicina</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Kanamicina</i>	7'1	0	22'5	22'2	4'8	12'7
<i>Tetraciclina</i>	35'7	44'4	30'0	37'0	54'7	48'2
<i>Trimetoprim- sulfametoxazol</i>	0	0	0	14'8	0	2'8
Porcentaje Cepas Resistentes (nº)	43	66'6	42'5	63'0	57'1	54'0
Cepas resistentes)	(6)	(12)	(17)	(17)	(24)	(76)

TABLA X.- PORCENTAJE DE RESISTENCIAS DE LAS CEPAS DE SALMONELLA DE OTROS SEROTIPOS AISLADOS
ENTRE 1977 y 1981.

ANTIMICROBIANOS (Nº CEPAS)	PORCENTAJE DE RESISTENCIA					Total (159)
	1977 (33)	1978 (33)	1979 (31)	1980 (40)	1981 (22)	
<i>Ac. Nalidíxico</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Ampicilina</i>	3'0	6'1	6'4	25'0	9'1	10'6
<i>cefalotina</i>	0	3'0	3'2	2'5	0	1'8
<i>Cloranfenicol</i>	3'0	0	3'2	10'0	4'5	4'4
<i>Estreptomicina</i>	3'0	12'1	6'4	25'0	13'6	12'5
<i>Fosfomicina</i>	3'0	3'0	3'2	2'5	4'5	6'2
<i>Gentamicina</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Kanamicina</i>	12'2	0	0	10'0	4'5	5'6
<i>Tetraciclina</i>	9'1	21'2	16'1	22'5	31'8	19'5
<i>Trimetoprim-- sulfametoxazol</i>	6'1	0	0	5'0	4'5	3'1
<i>Porcentaje cepas resistentes (Nº total de cepas resistentes)</i>	33'3 (11)	39'4 (13)	25'8 (8)	55'0 (22)	40'9 (9)	39'6 (63)

Tampoco encontramos ninguna resistencia a Gentamicina ni a Ac. Nalidíxico.

El incremento de los porcentajes de cepas resistentes en este grupo de Salmonella fue de un 33'3% en 1977 a un 40'9 % en 1981. Los incrementos más significativos de resistencia lo muestran la Tetraciclina que pasa de un 9'1 % en 1977 a un 31'8 % en 1981 y Estreptomicina de un 3'0 % en 1977 a 13'6 % en 1981.

De las 149 cepas de Salmonella resistentes encontramos once serotipos diferentes. Salmonella typhimurium fue el más frecuente, representando el 51 % de las cepas resistentes y su proporción ha ido aumentando cada año. Le sigue en frecuencia S. montevideo 20'1 %, S. enteritidis con un 9'3 %.

Tabla XI.-

3.3.- PATRONES DE RESISTENCIA

Los patrones de resistencia de las diez cepas de Salmonella typhi resistentes se expresan por año de aislamiento en la Tabla XII. Todas fueron monorresistentes excepto una que fue resistente a dos antibióticos. No se ha apreciado un

TABLA XI.- CEPAS DE SALMONELLA RESISTENTES A UNO O MAS DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PROBADOS POR AÑO DE AISLAMIENTO.

CEPAS	NUMERO DE CEPAS RESISTENTES						
	Total Nº (%)	1977	1978	1979	1980	1981	
Grupo 1 <u>S. typhi</u>	10 (6'7)	1	3		3	3	
Grupo 2 <u>S. typhimurium</u>	76 (51'0)	6	12	17	17	24	
Grupo 3	<u>S. montevideo</u>	30 (20'1)	4	5	5	12	4
	<u>S. enteritidis</u>	14 (9'3)	2	4	1	3	4
	<u>S. berta</u>	7 (4'6)			2	4	1
	<u>S. agona</u>	5 (3'3)	4			1	
	<u>S. muenchen</u>	2 (1'3)		2			
	<u>S. newport</u>	1 (0'6)		1			
	<u>S. thompson</u>	1 (0'6)	1				
	<u>S. heidelberg</u>	1 (0'6)				1	
	<u>S. saint-paul</u>	1 (0'6)				1	
	<u>S. infantis</u>	1 (0'6)		1			
<i>Total</i>	149	18	28	25	42	36	

aumento de resistecia a lo largo de estos años.

TABLA XII.- PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DE S. TYPHI.

AÑOS	PATRONES DE RESISTENCIA	Nº CEPAS
1977	Sm	1
1978	Sm	2
	Fm Tc	1
1979	-	
1980	Sm	3
1981	Sm	2
	Tc	1

Fm.: Fosfomicina; Sm.: Estreptomicina y Tc.: Tetraciclina.

En la Tabla XIII, se muestran los patrones de resistencia de las 76 cepas de Salmonella typhimurium resistentes. De estas 76 cepas 28 (36,9%) fueron resistentes a un sólo agente antimicrobiano. Destacando 19 cepas (25%) resistentes a Tetraciclina y 5 cepas (6'5%) resistentes a Estreptomicina. Las cepas monorresistentes han ido disminuyendo en estos años, en 1977 el porcentaje de cepas monorresistentes era de

un 83'4 y en 1981 este porcentaje fue de 41'6.

Las cepas multirresistentes (resistencias a dos ó más agentes antimicrobianos) fueron las más frecuentemente encontradas, de las 76 cepas lo fueron 48 (63'1 %). Así como vimos anteriormente que las cepas monorresistentes han ido disminuyendo a lo largo de estos años, las cepas multirresistentes han aumentado considerablemente y hemos pasado de un porcentaje de 16'6 en 1977 a un 58'4 en 1981.

De estas cepas multirresistentes, 24 (31'5%) presentaron resistencia a dos antibióticos. Se han registrado 7 tipos diferentes de patrones de resistencia, y el que se ha dado con más frecuencia, ha sido SmTc en 9 cepas (11'8 %).

10 cepas mostraron resistencia a tres antibióticos, lo que representa un porcentaje del 13'1 del total de cepas resistentes. Encontramos cinco tipos distintos de patrones de resistencia. El que se dió con más frecuencia fue: Sm Km Tc en 3 cepas (3'9 %).

La resistencia a cuatro antibióticos la encontramos en 11 cepas (14'4 %). También encontramos cinco tipos diferentes de patrones de resistencia. El que hallamos mayor número de veces fue Cm Sm Km Tc en cinco ocasiones (6'5 %).

TABLA XIII.- PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DE S. TYPHIMURIUM.

AÑO	PATRONES DE RESISTENCIA	Nº CEPAS (%)
1977	Tc	4 (66,8)
	Fm	1 (16,6)
	Cm Sm Km Tc	1 (16,6)
		} (83,4)
1978	Tc	3 (25,0)
	Sm	4 (33,3)
	Sm Tc	4 (33,3)
	Fm Tc	1 (8,4)
		} (58,3)
		} (41,7)
1979	Fm	1 (5,9)
	Km	1 (5,9)
	Km Tc	3 (17,6)
	Sm Tc	2 (11,8)
	Am Sm	2 (11,8)
	Cm Sm Tc	2 (11,8)
	Sm Km Tc	1 (5,9)
	Cm Sm Km Tc	4 (23,4)
	Cf Cm Sm Fm	1 (5,9)
		} (11,8)
		} (41,2)
		} (17,7)
		} (29,3)
1980	Tc	2 (11,7)
	Sm	1 (5,9)
	Cm	1 (5,9)
	Sm Tc	1 (5,9)
	Cm Tc	1 (5,9)
	Sm Km	1 (5,9)
	Sm Km Tc	1 (5,9)
	Sm Fm Tc	1 (5,9)
	Sm Km Fm	1 (5,9)
	Am Cf Sm Txs	2 (11,7)
	Am Sm Km Tc	2 (11,7)
	Am Cf Tc Txs	1 (5,9)
	Am Cf Cm Sm Km Tc	1 (5,9)
	Am Cf Cm Sm Km Tc Txs	1 (5,9)
		} (23,5)
		} (17,7)
		} (17,7)
		} (29,3)
1981	Tc	10 (41,6)
	Fm Tc	3 (12,5)
	Am Tc	3 (12,5)
	Sm Tc	2 (8,2)
	Am Sm	1 (4,2)
	Sm Km Tc	1 (4,2)
	Cm Sm Tc	1 (4,2)
	Sm Fm Tc	1 (4,2)
	Cm Km Tc	1 (4,2)
	Am Cf Cm Sm Tc	1 (4,2)
		} (37,4)
		} (16,8)

En lo que se refiere a los patrones con resistencia a cinco, seis y siete antibióticos, los hemos encontrado con el mismo porcentaje de 1'3.

Los patrones de resistencia de las 63 cepas de Salmonella de otros serotipos, se expresan por año de aislamiento en la tabla XIV.

Al contrario de lo encontrado en el grupo anterior; las cepas resistentes a un sólo antibiótico fueron las más frecuentemente encontradas. De las 63 cepas, 41 (65'1 %) son monorresistentes. Destacando 21 cepas 33'3 % resistente a Tetraciclina y 9 cepas 14'2 % resistente a Fosfomicina.

No obstante la resistencia a un sólo antibiótico ha ido disminuyendo en estos años, en 1977 el porcentaje de cepas resistentes era de un 81,8 y en 1981 este porcentaje fue de 66'7.

Hemos encontrado 22 cepas multirresistentes lo que representa un porcentaje del 34'9. Estas cepas multirresistentes han ido aumentando su número a lo largo de los años estudiados, así en 1977 el porcentaje de aislamiento era de 18'2 y en 1981 fue de 33,3.

De estas 22 cepas multirresistentes 11 cepas (17'4 %)

TABLA XIV.- PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DE SALMONELLA
DE OTROS SEROTIPOS

AÑO	PATRONES DE RESISTENCIA	Nº CEPAS (%)
1977	<i>Fm</i>	5 (45,4)
	<i>Km</i>	3 (27,2)
	<i>Tc</i>	1 (9,1)
	<i>Fm Tc TxS</i>	1 (9,1)
	<i>Am Cm Sm Fm Km Tc TxS</i>	1 (9,1)
		} (81,8)
1978	<i>Tc</i>	6 (46,6)
	<i>Sm</i>	2 (15,3)
	<i>Fm</i>	2 (15,3)
	<i>Am Tc</i>	1 (7,6)
	<i>Sm Tc</i>	1 (7,6)
	<i>Am Cf Sm</i>	1 (7,6)
		} (76,7)
		} (15,2)
1979	<i>Tc</i>	4 (50,0)
	<i>Fm</i>	1 (12,5)
	<i>Am Cf</i>	1 (12,5)
	<i>Am Sm</i>	1 (12,5)
	<i>Am Cf Cm Sm Tc</i>	1 (12,5)
		} (62,5)
		} (25,0)
1980	<i>Tc</i>	5 (22,7)
	<i>Cm</i>	4 (18,3)
	<i>Km</i>	1 (4,5)
	<i>Am</i>	1 (4,5)
	<i>Am Sm</i>	4 (18,3)
	<i>Fm Km</i>	1 (4,5)
	<i>Am Sm Tc</i>	3 (13,8)
	<i>Sm Km Tc</i>	1 (4,5)
	<i>Am Sm Km</i>	1 (4,5)
	<i>Am Cf Sm TxS</i>	1 (4,5)
		} (50,0)
		} (22,8)
		} (22,8)
1981	<i>Tc</i>	5 (55,6)
	<i>Fm</i>	1 (11,1)
	<i>Am Sm</i>	1 (11,1)
	<i>Sm Tc</i>	1 (11,1)
	<i>Am Cm Sm Km Tc TxS</i>	1 (11,1)
		} (66,7)
		} (22,2)

presentaron resistencia a dos antibióticos. Se han registrado cinco combinaciones distintas de patrones de resistencia, Am Sm ha sido el patrón de resistencia más frecuentemente encontrado, en seis ocasiones 9'5 %.

Presentaron resistencia a tres antibióticos 7 cepas, (11'1 %) del total de cepas resistentes. El patrón de resistencia que hemos aislado más veces fue Am Sm Tc, en tres ocasiones 4'7 % y encontramos cinco tipos distintos de patrones de resistencia.

El porcentaje de cepas resistentes a cuatro, cinco, seis y siete antibióticos fue del 1'5 % para los cuatro tipos de patrones de resistencias.

3.4.- CONJUGACION CON E. COLI K12 E711.

La conjugación con la cepa de E. coli K12 E711, de probada capacidad receptora, se realizó para poner de manifiesto la posible existencia de resistencias transferibles por conjugación en cada una de las cepas resistentes aisladas.

Transferencia de S. Typhi

De las 10 cepas de Salmonella typhi resistentes, ninguna transfirió resistencia alguna.

Transferencia de S. Typhimurium

Los resultados de la conjugación de las cepas de S. typhimurium se expresan en las tablas XV, XVI, XVII, donde podemos ver, que de las 76 cepas resistentes 47 (62 %) transfirieron resistencias a E. coli K12 E711, es decir, se puso de manifiesto en ellas la presencia de plásmidos R autotransferibles.

La transferencia de resistencia fue mucho más frecuente en las cepas multirresistentes que en las monorresistentes, 87 % y 17 % respectivamente.

Desglosando estos resultados por patrones de resistencia las cepas monorresistentes transfirieron 5/28 (17'8%). Los marcadores Fm y Tc no lograron transferirse.

En cuanto a las cepas resistentes a dos antibióticos el índice de transferencia fue de 20/24 (83,3%). El patrón de resistencia que no se transfirió: FmTc.

TABLA XV.- PORCENTAJE DE TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA DE S. TYPHIMURIUM POR AÑO DE AISLAMIENTO.

	1977	1978	1979	1980	1981	TOTAL
<i>Cepas estudiadas</i>	14	18	40	27	42	141
<i>Cepas resistentes</i>	6	12	17	17	24	76
<i>Cepas resistentes que transfieren (%)</i>	1 (17)	8 (67)	16 (94)	12 (71)	10 (42)	47 (62)
<i>Cepas resistentes que no transfieren (%)</i>	5 (83)	4 (33)	1 (6)	5 (29)	14 (58)	29 (38)
<i>Cepas monorresistentes</i>	5	7	2	4	10	28
<i>Cepas multirresistentes</i>	1	5	15	13	14	48
<i>Cepas monorresistentes que transfieren (%)</i>	0	4 (57)	1 (50)	0	0	5 (17)
<i>Cepas multirresistentes que transfieren (%)</i>	1 (100)	4 (80)	15 (100)	12 (92)	10 (71)	42 (87)

TABLA XVI.- CEPAS DE S. TYPHIMURIUM QUE TRANSFIRIERON SU RESISTENCIA.

AÑO	Nº CEPAS	PATRON RESISTENCIA	PATRON TRANSFERIDO
1977	1	Cm Sm Km Tc	Cm Sm Km Tc
1978	4	Sm	Sm
	4	Sm Tc	Sm Tc
1979	1	Km	Km
	3	Km Tc	Km Tc
	2	Am Sm	Am Sm
	2	Sm Tc	Sm Tc
	2	Cm Sm Tc	Cm Sm Tc
	1	Sm Km Tc	Sm Km Tc
	4	Cm Sm Km Tc	Cm Sm Km Tc
	1	Cf Fm Sm Cm	Sm Cm
1980	1	Sm Tc	Sm Tc
	1	Cm Tc	Cm Tc
	1	Sm Km	Sm Tc
	1	Sm Km Tc	Sm Km Tc
	1	Sm Fm Tc	Sm Tc
	2	Am Cf Sm Txs	Am Sm Txs
	2	Am Sm Km Tc	Am Sm Km Tc
	1	Am Cf Tc Txs	Am Cf Tc Txs
	1	Am Cf Cm Sm Km Tc	Cm Sm Km Tc
	1	Am Cf Cm Sm Km Tc Txs	Cm Sm Km Tc Txs
	1981	2	Sm Tc
3		Am Tc	Am Tc
1		Am Sm	Am Sm
1		Sm Km Tc	Sm Km Tc
1		Cm Sm Tc	Cm Sm Tc
1		Cm Km Tc	Cm Km Tc
1		Am Cf Cm Sm Tc	Am Cf Cm Sm Tc

Cm: Cloranfenicol; Sm: Estreptomina; Km: Kanamicina; Tc: Tetraciclina; Am: Ampicilina; Cf: Cefalotina; Fm: Fosfomicina; Txs: Trimetoprim-sulfametoxazol.

TABLA XVII.- CEPAS DE S. TYPHIMURIUM QUE NO TRANSFIRIERON SU RESISTENCIA.

AÑO	Nº CEPAS	PATRON DE RESISTENCIA
1977	1	<i>Fm</i>
	4	<i>Tc</i>
1978	3	<i>Tc</i>
	1	<i>Fm Tc</i>
1979	1	<i>Fm</i>
1980	2	<i>Tc</i>
	1	<i>Cm</i>
	1	<i>Sm</i>
	1	<i>Sm Fm Km</i>
1981	10	<i>Tc</i>
	3	<i>Fm Tc</i>
	1	<i>Sm Fm Tc</i>

Ocho cepas resistentes a tres antibióticos transfirieron su resistencia de un total de 10 cepas (80'0 %). En una ocasión no paso el patrón de resistencia completo y el marcador que no se transfirió fue la Fm.

Las cepas resistentes a cuatro antibióticos fueron 11 y todas ellas transfirieron el patrón resistencia completo excepto en dos casos, en uno no se transfirió FmCf, y en otro la Cf.

Hubo tres cepas resistentes (una a cinco, una a seis y la otra a siete antibióticos) que transfirieron su resistencia pero en dos de ellas no se logró pasar los marcadores AmCf de sus respectivos patrones de resistencias.

Transferencia de Salmonella de otros serotipos

El porcentaje de cepas de Salmonella de otros serotipos que transfirieron su resistencia fue del 46. Igual que en el grupo anterior la transferencia de resistencia fue mayor en las cepas multirresistentes que en las monorresistentes con porcentaje del 100 y 17 respectivamente. Tabla XVIII.

En las cepas monorresistentes el índice de transferen-

TABLA XVIII.- PORCENTAJE DE TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA DE SALMONELLA DE OTROS SEROTIPOS POR AÑOS DE AISLAMIENTO.

AÑO	1977	1978	1979	1980	1981	TOTAL
<i>Cepas estudiadas</i>	33	33	31	40	22	159
<i>Cepas resistentes</i>	11	13	8	22	9	63
<i>Cepas resistentes que transfieren (%)</i>	5 (45)	5 (38)	2 (25)	13 (59)	3 (33)	29 (46)
<i>Cepas resistentes que no transfieren (%)</i>	6 (55)	8 (62)	6 (75)	9 (41)	6 (67)	34 (54)
<i>Cepas monorresistentes</i>	9	10	5	11	6	41
<i>Cepas multirresistentes</i>	2	3	3	11	3	22
<i>Cepas monorresistentes que transfieren (%)</i>	3 (33)	2 (20)	0	2 (18)	0	7 (17)
<i>Cepas multirresistentes que transfieren (%)</i>	2 (100)	3 (100)	3 (100)	11 (100)	3 (100)	22 (100)

cia fue 7/41 (17'0%). Los marcadores que no se transfirieron fueron: Fm, Tc y Cm.

Todas las cepas multirresistentes transfirieron resistencias, pero en tres ocasiones no pasó el patrón de resistencia completo. Los marcadores que no se transfirieron fueron Fm, Tc y AmCf.

Tampoco la resistencia a Fosfomicina se consiguió transferir ni como única resistencia ni formando parte de un patrón de resistencia. Todos los datos dichos anteriormente quedan reflejados en las tablas XIX y XX.

Tanto en el grupo de S. typhimurium como en el de Salmonella de otros serotipos independiente del marcador, empleado para seleccionar, pasaron siempre las mismas resistencias.

Conjugación a 25° C.

A todas las cepas que no conjugaron a 35° C, se les volvió a repetir la conjugación a 25° C obteniéndose los siguientes resultados: las 66 cepas monorresistentes que no conjugaron a 35° C, tampoco lo hicieron a 25° C. Y de las 9 cepas multirresistentes (7 resistentes a dos antibióticos y 2 a tres

antibióticos) a 25° C conjugaron dos (22'2 %).

TABLA XIX.- CEPAS DE SALMONELLA DE OTROS SEROTIPOS QUE TRANSFIRIERON SU RESISTENCIA.

AÑO	Nº CEPAS	PATRON DE RESISTENCIA	PATRON TRANSFERIDO
1977	3	<i>Km</i>	<i>Km</i>
	1	<i>Fm Tc Txs</i>	<i>Tc Txs</i>
	1	<i>Am Fm Cm Sm Km Tc Txs</i>	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>
1978	2	<i>Sm</i>	<i>Sm</i>
	1	<i>Am Tc</i>	<i>Am Tc</i>
	1	<i>Sm Tc</i>	<i>Sm Tc</i>
	1	<i>Am Cf Sm</i>	<i>Am Cf Sm</i>
1979	1	<i>Am Cf</i>	<i>Am Cf</i>
	1	<i>Am Sm</i>	<i>Am Sm</i>
	1	<i>Am Cf Cm Sm Tc</i>	<i>Cm Sm Tc</i>
1980	1	<i>Km</i>	<i>Km</i>
	1	<i>Am</i>	<i>Am</i>
	1	<i>Fm Km</i>	<i>Km</i>
	4	<i>Am Sm</i>	<i>Am Sm</i>
	3	<i>Am Sm Tc</i>	<i>Am Sm</i>
	1	<i>Sm Km Tc</i>	<i>Sm Km Tc</i>
	1	<i>Am Sm Km</i>	<i>Am Sm Km</i>
	1	<i>Am Cf Sm Txs</i>	<i>Am Cf Sm Txs</i>
1981	1	<i>Am Sm</i>	<i>Am Sm</i>
	1	<i>Sm Tc</i>	<i>Sm Tc</i>
	1	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>

TABLA XX.- CEPAS DE SALMONELLA DE OTROS SEROTIPOS QUE NO TRANSFIRIERON SU RESISTENCIA.

AÑO	Nº CEPAS	PATRON DE RESISTENCIA
1977	5 1	<i>Fm</i> <i>Tc</i>
1978	6 2	<i>Tc</i> <i>Fm</i>
1979	4 1	<i>Tc</i> <i>Fm</i>
1980	5 4	<i>Tc</i> <i>Cm</i>
1981	5 1	<i>Tc</i> <i>Fm</i>

3.5.- COMPROBACION DE LA AUTOTRANSFERIBILIDAD DE LOS FACTORES R

Para comprobar que se trataban realmente de plásmidos R autotransferibles los transconjugantes resultantes de la conjugación con E. coli K12 E711 de cada una de las Salmo-

nelas resistentes, fueron a su vez usados como donadores en nuevos experimentos de conjugación con dos cepas diferentes: E. coli W3110 y E. coli Hfr H.

Nuestros resultados confirmaron dicha hipótesis, ya que fueron transferidas a ambas cepas absolutamente todas las resistencias que previamente habían sido introducidas en E. coli K12 E711. Es decir las cepas receptoras E. coli W3110 y E. coli Hfr H, expresaron los mismos patrones de resistencia que los transconjugantes de E. coli K12 E711.

3.6.- DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE CONJUGACION

Dado que las cepas de Salmonella multirresistentes transfieren su resistencia en una proporción muy alta, es interesante saber la frecuencia de conjugación de dichas cepas. Para ello tomamos 10 cepas de Salmonelas multirresistentes con distintos patrones de resistencia para hallar la frecuencia de conjugación y los resultados obtenidos se contemplan en la Tabla XXI.

TABLA XXI.- FRECUENCIA DE CONJUGACION

CEPAS	PATRON RESISTENCIA TRANSFERIDO	FRECUENCIA DE CONJUGACION (a)
<u>S. montevideo</u>	Am Sm	4×10^{-7}
<u>S. berta</u>	Am Sm Tc	2×10^{-6}
<u>S. typhimurium</u>	Cm Km Tc	4×10^{-9}
<u>S. typhimurium</u>	Sm Km Tc	1×10^{-9}
<u>S. typhimurium</u>	Cm Sm Km Tc	4×10^{-4}
<u>S. montevideo</u>	Am Cf Cm Sm Tc	2×10^{-4}
<u>S. typhimurium</u>	Am Cf Cm Sm Tc	8×10^{-5}
<u>S. enteritidis</u>	Am Cm Sm Km Tc Txs	4×10^{-6}
<u>S. agona</u>	Am Fm Cm Sm Km Tc Txs	5×10^{-6}
<u>S. typhimurium</u>	Am Cf Cm Sm Km Tc Txs	5×10^{-6}

(a) Determinación media de tres experimentos

El intervalo de frecuencia de transferencia está comprendido entre 2×10^{-4} y 4×10^{-9} .

3.7.- VISUALIZACION DE PLASMIDOS R EN CEPAS DE SAMONELLA. CALCULO DE SU PESO MOLECULAR.

Se procedió a la detección de plásmidos que pudieran estar implicados en los procesos de transferencia de resistencias.

De los seis métodos de visualización de plásmidos que ensayamos, con cepas portadoras de plásmidos de peso molecular conocido, enumeradas en el apartado del material, nos ofreció los mejores resultados el método de electroforesis directa de una colonia de *T. Eckhardt* y este fue el método utilizado para detectar los plásmidos en las cepas de Salmonella estudiadas. La electroforesis la efectuamos a 100 V y 50 mA durante 4 horas y utilizando un gel de una concentración de agarosa del 0'8 %.

Se les hizo electroforesis a todas las cepas resistentes, tanto a las que conjugaron como a las que no transfirieron su resistencia, para detectar en estas últimas la presencia de plásmidos no autotransferibles.

Las 10 cepas de S. typhi resistentes que no transfirieron su resistencia, no mostraron ninguna banda de ADN plas

médico.

Los resultados obtenidos en las 73 cepas de S. typhimurium y en las 62 cepas de Salmonella de otros serotipos, se muestran en las tablas XXII y XXIII respectivamente. Entre las 29 cepas de S. typhimurium y las 34 cepas de Salmonella de otros serotipos que no transfirieron su resistencia, sólo en dos cepas de S. typhimurium (nº 39 y 70), se visualizó un plásmido en cada una con pesos moleculares de 2 y 20 Mdalton respectivamente.

En ambos grupos los plásmidos detectados en las cepas que transfirieron resistencia presentaron una gran variabilidad en cuanto a su peso molecular, oscilando entre 20 y 118 Mdaltons, algunos iban asociados con otros plásmidos de peso molecular más bajo.

Pero prácticamente más de la mitad de los pesos moleculares de los plásmidos están comprendidos entre 40-60 Mdal. en el grupo de S. typhimurium y entre 30-60 Mdal. en el de Salmonella de otros serotipos.

Globalmente, cabe destacar 10 cepas (nº 14-17, 26, 27, 42, 63, 64 y 96) que presentaron un plásmido de 58 Mdal. asociado con la transferencia de un patrón de resistencia a

Sm Tc. Igualmente 5 cepas (nº 6, 31, 32, 33, 34) que presentaron un plásmido de 45 Mdal. asociado con la transferencia de patrón de resistencia a Cm Sm Km Tc, 3 cepas (41 124 y 69) con un plásmido de 118 Mdal. asociado a la transferencia de un patrón de resistencia a Sm Km Tc. y 6 cepas (68, 116, 117, 118, 119, 133) con un plásmido de 60 Mdal. asociado a la transferencia de un patrón de resistencia a Am Sm.

La incidencia de plásmidos R en las cepas de Salmonella estudiadas fue del 23'1 %. La frecuencia de cepas portadoras de plásmidos se ha ido incrementando, alcanzando la máxima frecuencia en 1980 con un 31'4 %. Se han obtenido 73 cepas con plásmidos R, tabla XXIV.

Entre las cepas de Salmonella resistentes la incidencia de plásmidos R fue del 50'3 % siendo S. typhimurium la que presentó mayor número de plásmidos R, con un porcentaje del 63'0 %. En el grupo de Salmonella de otros serotipos la incidencia de plásmidos R fue del 43'5 % .- Tabla XXV.

En la Tabla XXVI están detalladas las cepas de Salmonella, que presentaron más de un plásmido. Estas representan un 18'0 % del total de cepas con plásmidos. Como puede apreciarse excepto una el resto son S. typhimurium.

TABLA XXII.- PLASMIDOS IDENTIFICADOS EN LAS CEPAS DE S. TYPHIMURIUM POR AÑOS DE AISLAMIENTO.

AÑO	NUMERO	PATRON RESISTENCIA	Nº CEPAS	PATRON TRANSFERIDO	PLASMIDOS (MDAL.)
1977	1	<i>Fm</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	2-5	<i>Tc</i>	4	<i>no</i>	<i>no</i>
	6	<i>Cm Sm Km Tc</i>	1	<i>Cm Sm Km Tc</i>	45/4,4/2,6
1978	7-10	<i>Sm</i>	4	<i>Sm</i>	40
	11-13	<i>Tc</i>	3	<i>no</i>	<i>no</i>
	14-17	<i>Sm Tc</i>	4	<i>Sm Tc</i>	58
	18	<i>Fm Tc</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
1979	19	<i>Fm</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	20	<i>Km</i>	1	<i>Km</i>	28
	21-23	<i>Km Tc</i>	3	<i>Km Tc</i>	96
	24-25	<i>Am Sm</i>	2	<i>Am Sm</i>	72
	26-27	<i>Sm Tc</i>	2	<i>Sm Tc</i>	58
	28-29	<i>Cm Sm Tc</i>	2	<i>Cm Sm Tc</i>	80
	30	<i>Sm Km Tc</i>	1	<i>Sm Km Tc</i>	60
	31-34	<i>Cm Sm Km Tc</i>	4	<i>Cm Sm Km Tc</i>	45/32
	35	<i>Cf Cm Sm Fm</i>	1	<i>Sm Cm</i>	57

TABLA XXII.- CONTINUACION

AÑOS	NUMERO	PATRON RESISTENCIA	Nº CEPAS	P. TRANSFERIDO	PLASMIDOS (MDAL.)
1980	36-37	<i>Tc</i>	2	<i>no</i>	<i>no</i>
	38	<i>Cm</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	39	<i>Sm</i>	1	<i>no</i>	2
	40	<i>Sm Fm Km</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	41	<i>Sm Km Tc</i>	1	<i>Sm Km Tc</i>	118
	42	<i>Sm Fm Tc</i>	1	<i>Sm Tc</i>	58
	43-44	<i>Am Cf Sm Txs</i>	2	<i>Am Sm Txs</i>	55/ 26/ 5'1/2, 6/1, 9/1,7.
	45-46	<i>Am Sm Km Tc</i>	2	<i>Am Sm Km Tc</i>	47
	47	<i>Am Cf Tc Txs</i>	1	<i>Am Cf Tc Txs</i>	50/3, 5/2,5
	48	<i>Am Cf Cm Sm Km Tc</i>	1	<i>Cm Sm Km Tc</i>	85
	49	<i>Am Cf Cm Sm Km Tc Txs</i>	1	<i>Cm Sm Km Tc Txs</i>	105
	1981	50-59	<i>Tc</i>	10	<i>no</i>
60-62		<i>Fm Tc</i>	3	<i>no</i>	<i>no</i>
63-64		<i>Sm Tc</i>	2	<i>Sm Tc</i>	58
65-67		<i>Am Tc</i>	3	<i>Am Tc</i>	60/40
68		<i>Am Sm</i>	1	<i>Am Sm</i>	60
69		<i>Sm Km Tc</i>	1	<i>Sm Km Tc</i>	118
70		<i>Sm Fm Tc</i>	1	<i>no</i>	20
71		<i>Cm Sm Tc</i>	1	<i>Cm Sm Tc</i>	65
72		<i>Cm Km Tc</i>	1	<i>Cm Km Tc</i>	52/115
73		<i>Am Cf Cm Sm Tc</i>	1	<i>Am Cf Cm Sm Tc</i>	74

TABLA XXIII.-PLASMIDOS IDENTIFICADOS EN LAS CEPAS DE SALMONELLA DE OTROS SEROTIPOS POR AÑO DE AISLAMIENTO.

AÑO	NUMERO	PATRON RESISTENCIA	Nº CEPAS	PATRON TRANSFERIDO	PLASMIDOS (MDAL.)
1977	74-78	<i>Fm</i>	5	<i>no</i>	<i>no</i>
	79-81	<i>Km</i>	3	<i>Km</i>	62
	82	<i>Tc</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	83	<i>Fm Tc Txs</i>	1	<i>Tc Txs</i>	36
	84	<i>Am Fm Cm Sm Km Tc Txs</i>	1	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>	48
1978	85-90	<i>Tc</i>	6	<i>no</i>	<i>no</i>
	91-92	<i>Sm</i>	2	<i>Sm</i>	38
	93-94	<i>Fm</i>	2	<i>no</i>	<i>no</i>
	95	<i>Am Tc</i>	1	<i>Am Tc</i>	40
	96	<i>Sm Tc</i>	1	<i>Sm Tc</i>	58
	97	<i>Am Cf Sm</i>	1	<i>Am Cf Sm</i>	25
1979	98-101	<i>Tc</i>	4	<i>no</i>	<i>no</i>
	102	<i>Fm</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	103	<i>Am Sm</i>	1	<i>Am Sm</i>	48
	104	<i>Am Cf Cm Sm Tc</i>	1	<i>Cm Sm Tc</i>	80

TABLA XXIII.- CONTINUACION.

AÑO	NUMERO	PATRON RESISTENCIA	Nº CEPAS	PATRON TRANSFERIDO	PLASMIDOS (MDAL.)
1980	105-109	<i>Tc</i>	5	<i>no</i>	<i>no</i>
	110-113	<i>Cm</i>	4	<i>no</i>	<i>no</i>
	114	<i>Km</i>	1	<i>Km</i>	42
	115	<i>Am</i>	1	<i>Am</i>	52
	116-119	<i>Am Sm</i>	4	<i>Am Sm</i>	60
	120	<i>Fm Km</i>	1	<i>Km</i>	30
	121-123	<i>Am Sm Tc</i>	3	<i>Am Sm</i>	36
	124	<i>Sm Km Tc</i>	1	<i>Sm Km Tc</i>	118
	125	<i>Am Sm Km</i>	1	<i>Am Sm Km</i>	20
	126	<i>Am Cf Sm Txs</i>	1	<i>Am Cf Sm Txs</i>	<i>nt</i>
1981	127-131	<i>Tc</i>	5	<i>no</i>	<i>no</i>
	132	<i>Fm</i>	1	<i>no</i>	<i>no</i>
	133	<i>Am Sm</i>	1	<i>Am Sm</i>	60
	134	<i>Sm Tc</i>	1	<i>Sm Tc</i>	40
	135	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>	1	<i>Am Cm Sm Km Tc Txs</i>	110/2,3

nt (No ensayado.)

TABLA XXIV.- INCIDENCIA DE PLASMIDOS R EN LAS CEPAS DE SALMONELLA POR AÑO DE AISLAMIENTO.

AÑO	Nº CEPAS TESTADAS	Nº CEPAS CON PLASMIDOS	PORCENTAJE CON PLASMIDOS
1977	50	6	12,0
1978	54	13	24,0
1979	75	18	24,0
1980	70	22	31,4
1981	67	14	21,0
TOTAL	316	73	23,1

TABLA XXV.- INCIDENCIA DE PLASMIDOS R EN LAS DISTINTAS
 CEPAS DE SALMONELLA RESISTENTES.

CEPAS	Nº CEPAS RESISTENTES	Nº CEPAS CON PLASMIDOS R	PORCENTAJE DE PLASMIDOS R.
<u>S. typhi</u>	10	0	-
<u>S. typhimurium</u>	73	46	63,0
<u>S. montevideo</u>	28	13	46,4
<u>S. enteritidis</u>	14	5	35,7
<u>S. berta</u>	7	2	28,6
<u>S. agona</u>	6	3	50,0
<u>S. muenchen</u>	2	1	50,0
Otros serotipos	5	3	60,0
TOTAL	145	73	50,3

} 43,5

TABLA XXVI.- CEPAS DE SALMONELLA PORTADORAS DE DOS O MAS PLASMIDOS.

SEROTIPO/AÑO	Nº CEPAS PATRON	TRANSFERIDO	Nº PLASMIDOS	P. M. (Mdal.)
<u>S. typhimurium</u> /77	1	<i>Cm Sm Km Tc</i>	3	45/4, 4/2,6.
<u>S. typhimurium</u> /79	4	<i>Cm Sm Km Tc</i>	2	45/32
<u>S. typhimurium</u> /80	1	<i>Am Cf Tc Txs</i>	3	50/3,5/2,5.
<u>S. typhimurium</u> /80	2	<i>Am Sm Txs</i>	6	55/26/5,1/2,6/ 1,9/1,7
<u>S. typhimurium</u> /81	3	<i>Am Tc</i>	2	60/40
<u>S. typhimurium</u> /81	1	<i>Cm Km Tc</i>	2	115/52
<u>S. enteritidis</u> /81	1	<i>Am Cm Km Sm Tc Txs</i>	2	110/2,3

DISCUSSION

IV.- DISCUSION

4.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

El tracto digestivo del hombre representa un ecosistema complejo en cuyo equilibrio influyen constituyentes bióticos (microorganismos y células gastrointestinales) y abióticos (sustancias químicas).

En cuanto a la flora microbiana normal, estudios recientes demuestran que la mayoría de los microorganismos son anaerobios estrictos (Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium y Peptoestreptococcus... etc). Las bacterias facultativas (E. coli, Klebsiella, Proteus, S. faecalis y otros) se encuentran en una proporción cien veces inferior. (DRASAR, 1974; JAWETZ y col, 1979); DUCLUZEAU et RAIBAUD, 1982).

Entre las bacterias enteropatógenas que ocasionalmente se encuentran en el intestino humano, se incluyen todas las especies del género Salmonella.

Estas bacterias pueden causar tres tipos diferentes de cuadros clínicos:

.- Gastroenteritis.:-

Se produce después de la ingestión de grandes cantidades de microorganismos. El periodo de incubación es de 8 a 48 horas. La diarrea dura de 3 a 4 días y luego desaparece rápidamente, aunque los síntomas de infección pueden persistir de 2 a 3 semanas. Las salmonelas invaden áreas focales del intestino delgado y grueso pero casi nunca hay diseminación sanguínea ni a otros tejidos. El reservorio animal es importante en la transmisión de esta enfermedad. Estas gastroenteritis no parecen inducir una adecuada inmunidad y los episodios de infección se repiten incluso por el mismo serotipo y en el mismo individuo, esto hace que este síndrome continúe siendo un importante problema clínico y de salud pública en el futuro. Los serotipos más frecuentemente implicados son S. enteritidis y S. typhimurium (RUBIN y col. 1977; JAWETZ y col. 1979).

.- Septicemia.:-

Tras la infección por vía oral se produce una invasión inmediata del torrente circulatorio. Se distingue este cuadro clínico de otras salmonelosis en las que también hay paso de Salmonella a sangre, por las siguientes característi-

cas:

* Se da una alta incidencia (8-10 %) de infecciones focales como osteomielitis, meningitis, lesiones intravasculares etc.

* Se da principalmente en personas mayores, alrededor de los 50 años.

* Va casi siempre asociado a una serie de factores predisponentes como son, valvulopatías, procesos hemolíticos, enfermedades neoplásicas y otros.

* Esta producido principalmente por S. Choleraesuis y S. typhimurium, este último serotipo es de gran interés porque no solo produce con bastante frecuencia septicemia e infección focal sino que es uno de los serotipos más comúnmente causantes de gastroenteritis. (RUBIN y col. 1977; JAWETZ y col. 1979).

.- Fiebres intestinales.:-

Las bacterias a partir del intestino delgado alcanzan los ganglios linfáticos intestinales pasando a la linfa y posteriormente a la sangre desde donde se diseminan a los órganos principales, hígado, riñones e intestino. Este tipo de infecciones son producidas sobre todo por S. typhi y S.

paratyphi. El reservorio de estas Salmonella es el hombre, no hay reservorio animal. (RUBIN y col. 1977; JAWETZ y col. 1979).

En nuestro estudio, de las 316 cepas de Salmonella estudiadas un 91'8 % fueron aisladas de heces, un 6'6 % de sangre y un 1'6 % de otras muestras bacteriológicas. La distribución de estos porcentajes de aislamiento coinciden con los encontrados por otros autores. (RYDER y col. 1980, BETRIU y col. 1982).

De estas 316 cepas de Salmonella, el serotipo más frecuente fue S. typhimurium (44'6 %) le siguen en frecuencia S. montevideo (20'5 %) y S. enteritidis (11,2 %). El resto de los serotipos se aislaron en porcentajes mucho menores. Salmonella typhi presentó un porcentaje de aislamiento del 5'2 %, Tabla IV. Estos datos son similares a los encontrados por otros autores Americanos y Europeos (BISSET y col. 1974; RYDER y col. 1980; BLASER y col. 1981; PETIT y col. 1981). A excepción de S. montevideo, que en nuestro estudio se aisló en un porcentaje muy superior a los encontrados por dichos autores.

En cuanto a los meses de mayor incidencia de Salmone-

losis, coincidimos con otros autores y con resultados previos de nuestro Departamento en que el máximo de aislamiento de todas las Salmonella se da entre los meses de Junio a Octubre, Figura 3. (FINLAND y col. 1977; RUBIN y col. 1977; NOGALES y col. 1981; ALES, J.M. 1982).

4.2.- RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

1.- El agente antimicrobiano que presentó mayor actividad frente a las cepas de S. typhi y S. paratyphi B estudiadas en estos cinco años fue la combinación de Trimetoprim y sulfametoxazol, puesto que inhibió al 90 % de las cepas a una concentración de 0,125/2,5 µg/ml. Ampicilina fue también un antibiótico muy activo frente a S. typhi y S. paratyphi B, presentando una CMI_{90} de 2 µg/ml. El Cloranfenicol, uno de los antibióticos de elección en la fiebre tifoidea, mostró una CMI_{90} de 8 µg/ml. Fosfomicina presentó una actividad menor inhibiendo al 90 % de las cepas a una concentración de 16 µg/ml. Nos hemos referido sólo a estos antibióticos porque son las únicas alternativas de tratamiento de la fiebre tifoidea. Tabla V.

Aunque son muy pocas las cepas de este grupo estudiadas para obtener conclusiones, podemos decir que ninguna presentó resistencia a los agentes antimicrobianos anteriormente mencionados exceptuando un 6 % que fueron resistentes a Fosfomicina. De los demás agentes antimicrobianos estudiados sólo presentaron resistencias a Estreptomicina y Tetraciclina Tabla VIII.

Hemos revisado los datos obtenidos por otros autores y así: CHUN y col., de un total de 949 cepas de S. typhi aisladas en Corea de 1968-1975, un 10 % fueron resistentes a Estreptomicina, 40 % a Sulfamidas y un 1'5 % presentaron múltiples resistencias. No hubo ninguna cepa resistente a Ac. Nalidíxico ni a Trimetoprim-sulfametoxazol.

En América, BISSET y col. de 115 cepas de S. typhi aisladas de 1971-1972, encuentran un 20 % de las cepas resistentes a Estreptomicina y un 16 % multirresistentes.

En Europa, PARADELIS y col. de 59 cepas de S. typhi aisladas de 1970 a 1978, encuentran diez cepas resistentes a Cloranfenicol con una CMI de 60 µg/ml estas cepas fueron sensibles al resto de los antibióticos probados (Ampicilina, Cefalosporinas y Aminoglucósidos). Las demás cepas fueron

sensibles a todos los antibióticos probados, la CMI_{90} para Ampicilina fue de $0'6 \mu\text{g/ml}$ y para Cloranfenicol de $8 \mu\text{g/ml}$.

LASZLO, V.G. encontró sobre 2.227 cepas de Salmonella typhi aisladas en Hungría de 1974 a 1976, sólo tres cepas que presentaron multirresistencias.

Más recientemente PETIT y col., de nueve cepas de S. typhi aisladas en Francia de 1976 a 1978 ninguna fue resistente.

En España, ABAD y col. de 39 cepas de S. typhi aisladas de 1977 a 1978 no encuentran ninguna cepa resistente a Ampicilina, Cloranfenicol y Trimetoprim—sulfametoxazol.

BETRIU y col. en 1982 estudian 22 cepas de S. typhi y tampoco encuentran ninguna cepa resistente a Ampicilina ni a Cloranfenicol y para Ampicilina obtienen una CMI de $0'25 \mu\text{g/ml}$ para el 90 % de las cepas y para Cloranfenicol de $4 \mu\text{g/ml}$.

Sólo en dos trabajos de la bibliografía consultada hayan los valores de CMI de S. typhi frente a los distintos agentes antimicrobianos usados en el tratamiento de la fiebre tifoidea principalmente, Ampicilina y Cloranfenicol. Obteniendo valores más bajos de CMI_{90} de S. typhi frente a Ampicilina

que los nuestros, esto puede ser debido a que en nuestro trabajo usamos como concentración más baja la de 1 $\mu\text{g/ml}$. La CMI_{90} de S. typhi frente a Cloranfenicol fue similar a la obtenida por nosotros.

Nuestros resultados son parecidos a los obtenidos por otros autores, poniéndose de manifiesto la escasa resistencia presentada por S. typhi frente a los agentes antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea, siendo excepcional la resistencia a Cloranfenicol obtenida por PARADELIS y col.

Respecto a otros antibióticos, la resistencia más frecuente encontrada por nosotros fue a Estreptomicina, en esto también coincidimos con los autores consultados.

2.- En S. typhimurium, durante estos cinco años Trimetoprim--sulfametoxazol y Gentamicina fueron los agentes antimicrobianos más activos, con una CMI_{90} de 1/20 y 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Cefalotina y Ac. Nalidíxico inhiben al 90 % de las cepas a 8 $\mu\text{g/ml}$, mientras Cloranfenicol y Fosfomicina lo hacen a 16 $\mu\text{g/ml}$ y Ampicilina y Kanamicina requirieron 32 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir al 90 % de las cepas probadas. Tetraciclina y Estreptomicina fueron los agentes antimicrobianos menos activos, con una CMI_{90} de 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$ respectiva-

mente. Tabla VI.

En la literatura consultada hay muy pocos trabajos que determinen la CMI de S. typhimurium frente a distintos agentes antimicrobianos, y ninguno separa S. typhimurium del resto de los serotipos al determinar su sensibilidad, cosa que a nosotros nos parece importante dadas las diferencias de sensibilidad existentes frente a los diversos agentes antimicrobianos, entre S. typhimurium y el resto de los serotipos.

ABAD y col., determinaron la CMI₉₀ de 89 cepas de diferentes especies de Salmonella aisladas de 1977 a 1978 frente a Ampicilina, Cloranfenicol y Trimetoprim--sulfametoxazol con los siguientes resultados: el 90 % de las cepas fueron inhibidas por 4 µg/ml de Ampicilina, por 16 µg/ml de Cloranfenicol y por 2/40 ug/ml de Trimetoprim--sulfametoxazol.

MAS y col., sobre 36 cepas de Salmonella sp encuentra una CMI₉₀ para Ampicilina de 4 µg/ml para Cloranfenicol de 8 µg/ml y para Trimetoprim--sulfametoxazol de 6'25 µg/ml

Estos trabajos son poco comparables con el nuestro dado que no separan S. typhimurium del resto de los serotipos, cosa que se debe hacer siempre por la razón anteriormente

expuesta y fueron realizados en años anteriores.

De las 141 cepas de S. typhimurium estudiadas por nosotros 76 cepas (54 %) fueron resistentes a uno ó más de los agentes antimicrobianos probados, Tabla IX. Este porcentaje de resistencia es similar al de otros autores, BISSET y col., obtiene un porcentaje de resistencia para S. typhimurium aisladas de 1971 a 1972 del 49 %; NEU y col., del 57'6% en S. typhimurium aisladas en 1973; y RYDER y col. del 59 % en S. typhimurium aisladas en 1975.

Los antibióticos a los que más frecuentemente presentaron resistencia las cepas de S. typhimurium fueron Tetraciclina y Estreptomina, en esto coincidimos con todos los autores consultados, (BISSET y col. 1974; NAKAYA y col. 1975; MARSIK y col, 1975, ANDERSON y col. 1977; AVRIL y col. 1978; RYDER y col 1980 y PLAZAS y col. 1982).

No encontramos ninguna cepa de S. typhimurium resistente a Ac. Nalidixico ni a Gentamicina. RYDER y col. 1980; AVRIL y col. 1978 tampoco obtuvieron ninguna cepa de S. typhimurium resistentes a estos dos agentes antimicrobianos. Otros autores como BISSET y col. 1974; TANAKA y col. 1976 no encontraron resistencia a Gentamicina y el porcentaje

resistencia a Ac Nalidixico fue del 0'1 % y 1'2 % respectivamente.

En la Tabla IX podemos observar como hay un aumento global significativo de la resistencia de S. typhimurium ($P < 0,05$). Prácticamente podemos decir que de 1977 a 1980 ha habido un incremento en la frecuencia de resistencia a todos los agentes antimicrobianos probados. Este aumento es significativo para Ampicilina ($P < 0,025$), Estreptomicina ($P < 0'025$) y Kanamicina ($P < 0'025$).

En cambio desde 1980-1981 se ha producido un descenso de la frecuencia de resistencia en todos los agentes antimicrobianos ensayados excepto Tetraciclina y Fosfomicina en que la frecuencia de resistencia ha seguido aumentando y este aumento es significativo para Tetraciclina ($P < 0'05$) pero no para Fosfomicina.

Este incremento de la resistencia en los años setenta es citado por la mayoría de los autores tanto Japones como Americanos y Europeos (NAKAYA y col. 1975; NEU y col. 1975; TANAKA y col. 1976; VOOGD y col. 1973; BRASSEUR y col. 1980 y CHERUBIN, C. E. 1981).

Nos vamos a referir más detenidamente a aquellos tra-

bajos más similares al nuestro en que las cepas de Salmonella están separadas por especies y serotipos.

CHERUBIN, C.E., en 1981 hace un estudio de la evolución de la resistencia de S. typhimurium de 1963 a 1973 en Estados Unidos, basándose en los trabajos de distintos autores.

De 1962 a 1963, KAYE y col. estudiaron 35 cepas de S. typhimurium en la ciudad de Nueva York y encontraron un 20 % resistentes a Ampicilina y Tetraciclina. En 1967, el 25 % de las cepas de S. typhimurium aisladas en los Estados Unidos fueron resistentes a Ampicilina; 31 % a Tetraciclina y 34 % a Estreptomicina. (SCHROEDER y col. 1968).

De Diciembre de 1968 a Marzo de 1969, el porcentaje de resistencia a Ampicilina de las cepas de S. typhimurium aisladas en el Noreste de Estados Unidos fue del 23 %. De Abril a Agosto de 1969, este porcentaje fue del 16 %, de cepas de S. typhimurium aisladas en el mismo lugar y de Marzo a Septiembre de 1970, fue sólo del 13 %. (WINSHELL y col. 1969; NEU y col. 1971; CHERUBIN y col. 1972.). Estas discrepancias sugieren variaciones estacionales en la resis-

tencia de las cepas de S. typhimurium. Estas inexplicables variaciones estacionales fueron más tarde mencionadas por NEU y col. en S. typhimurium aisladas en 1973 en el mismo lugar que las anteriores. Estos autores observan una cíclica, (quizás estacional) variación de la resistencia de S. typhimurium, a los antibióticos, pero no se observa en otros serotipos. La resistencia de S. typhimurium fue más alta en los meses de Invierno y más baja en la Primavera y Verano.

De 1971 a 1972, se estudian 691 cepas de S. typhimurium aisladas en California, el porcentaje de resistencia a Ampicilina fue del 39'7 %; a Estreptomicina del 42'8 %; a Tetraciclina del 37'6 % y a Kanamicina del 26'2 %. (BISSET y col. 1974). En 1973, las cepas de S. typhimurium, aisladas en el Noreste de los Estados Unidos, fueron un 37 % resistentes a Ampicilina; un 45'6 % resistentes a Estreptomicina; un 45 % resistente a Tetraciclina y un 29'4 % resistente a Kanamicina. (NEU y col. 1975).

Termina el autor de este trabajo resumiendo, que en este periodo de 10 años, en los Estados Unidos, la frecuencia de resistencia a Ampicilina, Estreptomicina, Tetraciclina y Kanamicina ha aumentado lentamente en S. typhimurium.

RYDER y col. estudian el incremento de la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas en los Estados Unidos entre 1967 y 1975. Encuentran que el incremento de la resistencia de S. typhimurium fue significativo para Estreptomicina (34 % a 47 %), Sulfamidas (26 % a 46 %), Ampicilina (25 % a 43 %), Kanamicina (3 % a 39 %) y Tetraciclina (31 % a 46 %). Los porcentajes difieren de los nuestros lo que puede deberse a que son años, metodología, y áreas geográficas distintas.

La causa de estos incrementos de la resistencia permanece aun desconocida. Puede achacarse al inapropiado tratamiento antibiótico en Salmonelosis complicadas, así como al amplio uso por parte del hombre de agentes antimicrobianos para profilaxis y tratamiento de otras infecciones (STOLLEY y col. 1972 y SIMMONS y col. 1974). Aproximadamente un tercio de las personas hospitalizadas toman antibióticos (KUNICH C. M. 1979).

También está el hecho de que muchos antibióticos a los cuales las cepas de Salmonella son sensibles in vitro son ineficaces in vivo (DAWKINS y col. 1967; RUBIN y col. 1977). De los diez agentes antimicrobianos usados en este estudio sólo tres, Ampicilina, Cloranfenicol y la combinación

Trimetoprim-sulfametoxazol parecen ser efectivos en el tratamiento de las salmonelosis extraintestinales (RUBIN y col. 1977 y COHEN y col. 1978.).

En este incremento de la resistencia puede influir también el uso de antibióticos en la alimentación de los animales domésticos (JUKES, T.H. 1971). Es un hecho confirmado que estas dosis de antibióticos en la alimentación animal causan un incremento de la resistencia a antibióticos en la flora intestinal de los animales (ANDERSON, E.S., 1968; MERCER y col. 1971; SIEGEL y col. 1974; LINTON, A.H. 1977; RICHMON, M.H. 1977).

Las salmonelas resistentes de origen animal pasan a la población humana y les causan enfermedades (THRELFALL y col. 1978; LYONS y col. 1980), esto es particularmente importante en *S. typhimurium* y los demás serotipos excepto *S. typhi* que tiene como único reservorio el hombre. Además los plásmidos R pueden ser transferidos a la flora intestinal humana (SMITH, H.W. 1969; LINTON y col. 1977), y la resistencia a múltiples antibióticos puede ser transferida de un género a otro (FALKOW, S. 1975).

CHERUBIN, C.E. 1981, no está de acuerdo con la tesis

de que la resistencia de los serotipos de Salmonella proceda directamente de la resistencia en el reservorio animal.

El descenso de la resistencia encontrado por nosotros entre 1980 y 1981 es inexplicable por el momento, ya que no hay trabajos publicados sobre S. typhimurium aisladas en estos dos años. Tan sólo un estudio realizado en Bilbao de 131 cepas de Salmonella sin separar en especies ni serotipos, aisladas en 1981. De las cuales el 27 % son resistentes a uno o más antibióticos (CISTERNA y col. 1982). Porcentaje más bajo que el obtenido por nosotros.

Dado que el 96 % de nuestras cepas de S. typhimurium fueron aisladas de pacientes con gastroenteritis cabría pensar que el descenso de la resistencia podría deberse a la tendencia cada vez más generalizada de no usar antibióticos en las gastroenteritis agudas no complicadas, pues parece ser que los antibióticos no contribuyen de una manera importante a la mejoría clínica, prolongan el estado de portador intestinal después de la terapia y estimulan la aparición de cepas multirresistentes (DIXON, J.M.S. 1965; ASERKOFF y col. 1969; RYDER y col. 1980).

En cuanto al aumento de la resistencia a Tetraciclina-

na en estos años, podría influir el que la Tetraciclina es uno de los antibióticos que más se usa en España como suplemento en la alimentación de los animales de granja, de ahí que al ser la infección por Salmonella a partir de los animales importante, la mayor resistencia se dirige al antibiótico más utilizado en los animales domésticos. Este hecho es corroborado por un trabajo de VAN LEEVWEN y col. 1979, que demuestra como la proporción de Salmonella resistente a Tetraciclina tanto en cerdos como en humanos descendió considerablemente en Holanda al abandonarse el uso de incorporar Tetraciclina como suplemento en la alimentación de los animales domésticos.

3.- Nos vamos a referir ahora al tercer grupo de Salmonella considerado en este trabajo, que son las Salmonella de otros serotipos, siguen siendo Trimetoprim-sulfametoxazol y Gentamicina los agentes antimicrobianos más activos inhibiendo al 90% de las cepas a una concentración de 0'5/10 y 2 µg/ml respectivamente. El Ac. Nalidíxico y la Ampicilina presentaron la misma actividad que en el grupo anterior, es decir una CMI_{90} de 8 y 32 µg/ml respectivamente. Todos los demás agentes antimicrobianos probados mostraron una CMI_{90} más baja que en el grupo anterior, excepto la Fosfomicina

que presentó igual CMI_{90} , esta fue de 16 $\mu\text{g/ml}$. Cefalotina y Kanamicina inhiben al 90 % de las cepas a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, Cloranfenicol lo hace a 8 $\mu\text{g/ml}$, Tetraciclina a 16 $\mu\text{g/ml}$ y el antibiótico que presentó menor actividad fue, igual que en los grupos anteriores, la Estreptomicina con una CMI_{90} de 64 $\mu\text{g/ml}$. Tabla VII. En la bibliografía consultada no hemos encontrado ningún trabajo donde determinen la CMI de Salmonella de otros serotipos, sólo los citados en el apartado anterior y que se refieren a todas las Salmonella.

En este grupo un 39'6 % de las cepas fueron resistentes a uno o más de los antibióticos ensayados, tabla X. Este porcentaje es más alto que los obtenidos por autores Americanos como (SCHROEDER y col., NEU y col. BISSET y col., y RYDER y col., cuyos porcentajes de resistencia fueron del 16'0 %; 16'6 %, 22'9 %; y 23'4 % respectivamente), esto se puede explicar porque son años anteriores a los nuestros, la metodología es distinta, emplean el método de difusión en la determinación de la sensibilidad y el área geográfica también es distinta. Sólo hacemos referencia a autores americanos pues son los únicos que separan S. typhimurium del resto de los serotipos.

Las resistencias a Tetraciclina y Estreptomicina fueron las más frecuentemente encontradas en este grupo de Salmonella de otros serotipos. En esto coinciden casi todos los autores consultados (BISSET y col. 1974; NAKAYA y col. 1975; MARSIK y col. 1975; ANDERSON y col. 1977; AVRIL y col. 1978; RYDER y col. 1980 y PLAZA y col. 1982).

Al igual que en S. typhimurium tampoco encontramos en este grupo ninguna resistente a Ac. Nalidíxico ni a Gentamicina. BISSET y col.; TANAKA y col. no encuentran resistencia a Gentamicina y los porcentajes de resistencias a Ac. Nalidíxico son del 2'1 y 1 % respectivamente. AVRIL y col.; RYDER y col. obtienen unos porcentajes de resistencias a Gentamicina del 1'5 % y 0'2 % respectivamente y Ac. Nalidíxico de 0'5 % en ambos trabajos.

En la tabla X vemos como hay un incremento global aunque estadísticamente no significativo de las resistencias en las cepas de Salmonella de otros serotipos de un 33 % en 1977 a un 41 % en 1981, este incremento de la resistencia es citado por todos los autores consultados (NAKAYA y col. 1975; NEU y col. 1975; TANAKA y col. 1976; VOOGD y col. 1976; BRASSEUR y col. 1980; y RYDER y col. 1980 y CHERUBIN

C.E. 1981). De 1977 a 1980 se ha producido un incremento de la resistencia en todos los antibióticos estudiados siendo este incremento significativo para Ampicilina ($P < 0,05$) y Estreptomicina ($P < 0,05$) y de 1980 a 1981 ha habido un descenso de la resistencia en todos los antibióticos excepto Fosfomicina y Tetraciclina que han seguido aumentando, este incremento no es significativo para ninguno de los dos antibióticos. En cuanto a la evolución que han seguido en estos cinco años, la resistencia a los distintos antibióticos, es prácticamente la misma que para S. typhimurium, y me remito a lo ya expuesto para las cepas de S. typhimurium.

Entre las cepas resistentes, S typhimurium fue el serotipo más frecuente con un porcentaje del 51 % tabla XI. En esto coinciden casi todos los autores consultados (SCHROEDER y col. 1969; WINSHELL y col. 1970; CHERUBIN y col. 1972; NAKAYA y col. 1975; NEU y col. 1975; RYDER y col 1980; PETIT y col. 1981 y PLAZA y col. 1982).

Para BISSET y col. 1974. S. heidelberg fue el serotipo más frecuente de todas las cepas resistentes. Es la única excepción encontrada en la literatura.

4.3.- PATRONES DE RESISTENCIA

El patrón de resistencia más frecuente entre las cepas de S. typhi estudiadas fue la Estreptomicina. Todas las cepas fueron monorresistentes excepto una, que presentó resistencia a dos antibióticos (Fm Tc). No encontramos ninguna resistencia a Cloranfenicol, Ampicilina y Trimetoprim-sulfametoxazol. Tabla XII.

Para BISSET y col., de las 42 cepas de S. typhi resistentes aisladas de 1972-1977, el patrón de resistencia más frecuente fue la Estreptomicina 55 % seguido del patrón SmTc-CmSu. No encontró ningún otro patrón de resistencia.

Para CHUN y col., los patrones de resistencia más frecuentes encontrados en 949 cepas de S. typhi aisladas de 1968 a 1975, fueron la Estreptomicina y Sulfamida solos y combinados entre sí, mientras que solamente un 15 % fueron resistentes a cuatro ó más antibióticos, entre ellos Cloranfenicol y Ampicilina.

El brote epidémico de S. typhi resistentes a Cloranfenicol, Estreptomicina, Tetraciclina y Sulfamida, producido en Méjico entre 1972-1973 (OLARTE y col. 1973; DATTA y col.

1974) fue una excepción. Generalmente S. typhi presenta muy poca resistencia a los antibióticos (MANTEN y col. 1966; VOOGD y col. 1968; NEU y col. 1975; LASZLO, V.G. 1976; PETIT y col. 1981 y BETRIU y col. 1982).

Patrones de resistencia de S. typhimurium

En S. typhimurium las cepas multirresistentes fueron las más frecuentes 63 %, mientras que la frecuencia de las cepas monorresistentes fue del 37 %. Estas cepas monorresistentes han ido disminuyendo considerablemente a lo largo de estos cinco años y así de un 83'4 % en 1977 pasan al 41'6 % en 1981. Por el contrario las cepas multirresistentes han sufrido un notable incremento y de una frecuencia del 16'6% en 1977 a una frecuencia del 58'4% en 1981, tabla XIII.

Los autores Japoneses, Americanos y Europeos (NAKAYA y col.; WINSHELL y col.; BISSET y col.; NEU y col.; RYDER y col. y PETIT y col.) coinciden con nosotros en que fueron más frecuentes las cepas de S. typhimurium multirresistentes que las monorresistentes.

Podemos observar en la tabla mencionada anteriormente una gran variedad de patrones de resistencias (25 en total).

Las cepas de S. typhimurium resistentes a dos antibióticos fueron las más frecuentemente aisladas 31'8 %, le siguen las resistentes a cuatro antibióticos 14 %, a tres antibióticos 13 %. Para las cepas resistentes a cinco, seis y siete antibióticos hemos encontrado el mismo porcentaje de aislamiento 1'3 %.

En esto coinciden con nuestros resultados NAKAYA y col. y PETIT y col., mientras que todos los autores Americanos (BISSET, NEU y RYDER) obtienen las resistencias a cinco y seis antibióticos como las más frecuentes. Esto va a depender del área geográfica, del año en que se realizó el estudio y de los antibióticos y métodos empleados.

El patrón de resistencia que aislamos un mayor número de veces fue Estreptomicina-Tetraciclina 12 %, seguido de Estreptomicina-Tetraciclina-Cloranfenicol-Kanamicina 6'5 %.

Tan sólo un trabajo, el de los japoneses NAKAYA y col., especifica los antibióticos que componen los distintos patrones de resistencias de las cepas de S. typhimurium aisladas por ellos de 1966-1972, coinciden con nosotros en que el patrón de resistencia más frecuente fue Estreptomicina-Tetraciclina. También hacen un estudio de la evolución

de dichos patrones a lo largo de los años estudiados, obteniendo los mismos resultados que nosotros con porcentajes de frecuencia muy parecidos a los nuestros.

Patrones de resistencia de Salmonella de otros serotipos

En este grupo al contrario de lo que pasaba en S. typhimurium, las cepas monorresistentes fueron las más frecuentes con un porcentaje del 65 %, estas resistencias han ido disminuyendo a lo largo de los años estudiados, y de un porcentaje del 81'8 % en 1977 han pasado al 66'7 % en 1981. Las cepas multirresistentes se aislaron en un porcentaje del 35 %, estas cepas al igual que en el grupo anterior, han ido aumentando en los años estudiados, así en 1977 el porcentaje de aislamiento era del 18'2 % y en 1981 fue del 33'3 % tabla XIV.

Comparando la evolución de los patrones de resistencias de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos, vemos que en ambos grupos las cepas monorresistentes han ido disminuyendo y las multirresistentes aumentando, pero en las cepas de Salmonella de otros serotipos tanto la disminución como el aumento han sido más moderados que en las cepas de S. typhimurium.

Los autores japoneses y franceses (NAKAYA y col. y PETIT y col.) coinciden con nuestros resultados, en el sentido de que las cepas de Salmonella de otros serotipos monorresistentes fueron más frecuentes que las multirresistentes, en cambio los autores americanos (WINSCHEKK y col., BISSET y col., NEU y col., y RYDER y col.) encuentran las cepas multirresistentes más frecuentes que las monorresistentes. No sabemos el porqué de estos resultados, podríamos sugerir que en Estados Unidos la presión antibiótica haya sido mayor y se hayan seleccionado más las cepas multirresistentes.

También existen en las cepas de Salmonella de otros serotipos, una gran variedad de patrones de resistencias (20 patrones distintos). Al igual que ocurría en el grupo anterior, las cepas resistentes a dos antibióticos fueron las que se aislaron un mayor número de veces, 17'4 % a continuación las cepas resistentes a tres antibióticos 11'1 % y las cepas resistentes a cuatro, cinco, seis y siete antibióticos encontramos el mismo porcentaje de aislamiento 1'5 %. En esto coinciden todos los autores consultados (NAKAYA y col.; BISSET y col.; NEU y col.; PETIT y col.) excepto RYDER y col., que encuentra más frecuente la resistencia a tres antibióticos, seguida de la resistencia a dos antibióticos.

El patrón de resistencia más aislado fue Ampicilina-Estreptomicina 9'5 %, le sigue Ampicilina-Estreptomicina-Tetraciclina 4'7 %.

De todos los autores anteriormente citados tan sólo NAKAYA y col. especifican los antibióticos que componen los distintos patrones de resistencias. Para ellos el patrón de resistencia más frecuente fue Estreptomicina-Tetraciclina. La evolución de los patrones de resistencia a lo largo de los años estudiados esta expuesta en el grupo anterior ya que no separan S. typhimurium del resto de los serotipos.

4.4.- CONJUGACION CON E. COLI K12 E 711

Transferencia de S. typhi.:

Ninguna de las diez cepas de S. typhi resistentes, transfirió su resistencia. Como se ha descrito un aumento de la frecuencia de conjugación en las cepas de S. typhi, cuando se realiza la conjugación a 25° C (CHUN y col. 1977 y LASZLO, V.D. 1976), se volvió a repetir a todas las cepas la conjugación a 25° C y tampoco conjugó ninguna. Pero hay que tener en cuenta que nuestras cepas eran resistentes

a uno y dos antibióticos solamente, y en la literatura consultada solo transfirieron resistencias las cepas de S. typhi resistentes a cuatro ó más antibióticos (BISSET y col. 1974; CHUN y col. 1977 y LASZLO y col. 1976).

De las 76 cepas de S. typhimurium resistentes, 47 (62 %) transfirieron su resistencia a E. coli K12 E711. Mientras que el grupo de Salmonella de otros serotipos, el porcentaje de cepas que transfirieron su resistencia fue del 46 %. Tablas XV y XVIII.

Al igual que ocurría en S. typhi, también se ha descrito en cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos que la frecuencia de conjugación aumenta, cuando se realiza el experimento de conjugación a 25° C. (YOSHIBA y col. 1974 y NAKAYA y col. 1976). A todas las cepas de S. typhimurium y Salmonella de otros serotipos que no conjugaron, se les volvió a repetir la conjugación a 25° C. De las 57 cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos monorresistentes que no conjugaron a 37° C tampoco lo hicieron a 25° C y de las 9 cepas multirresistentes (2 cepas resistentes a tres antibióticos y 7 cepas resistentes a dos antibióticos) a 25° C conjugaron 2 (22,2 %).

En los trabajos que vamos a citar a continuación nos referimos a los porcentajes de transferencia a 37° C.

WINSHELL y col., encuentran un porcentaje de transferencia de resistencia en las cepas de S. typhimurium del 63'5 % y en las Salmonella de otros serotipos dicho porcentaje fue del 42'8 %.

NAKAYA y col., obtienen para S. typhimurium un porcentaje de transferencia del 85'0 % y para las cepas de Salmonella de otros serotipos del 21'0 %.

MARSIK y col. en 1975, obtiene un porcentaje de transferencia de resistencia del 66'7%. Pero en este trabajo el número de cepas es muy pequeño y no las separa en los distintos serotipos. Estos autores coinciden con nuestros resultados variando un poco los porcentajes según el área geográfica.

BISSET y col. en 1974, encuentra mayor porcentaje de transferencia en las cepas de Salmonella de otros serotipos que en las cepas de S. typhimurium y estos porcentajes son 88'6 % y 56'0 % respectivamente. Aunque este autor realiza la conjugación sólo con las cepas multirresistentes y no con todas las cepas resistentes.

Por último en un estudio muy reciente, publicado por RANGNEKAR, V.M. y col. en 1983. De 145 Salmonella typhimurium aisladas en Bombay entre 1978 y 1980, el 95'3 % transfirieron su resistencia a E. coli K12. Pero hay que tener en cuenta que todas son multirresistentes. Nosotros teniendo en cuenta sólo las cepas de S. typhimurium multirresistentes el porcentaje de transferencia de resistencia sería del 88'0 %.

En ambos grupos la transferencia de la resistencia fue mayor en las cepas multirresistentes que en las monorresistentes. Tabla XV y XVIII. Esto concuerda con todos los autores consultados (WINSHELL y col.; NAKAYA y col.; MARSIK y col.; BISSET y col.

En S. typhimurium, las cepas monorresistentes transfirieron su resistencia un 17 %, en las cepas resistentes a dos antibióticos el 83'3 % transfirieron su resistencia, un 80'0 % de las cepas resistentes a tres antibióticos transfirieron su resistencia y las cepas resistentes a cuatro, cinco seis y siete antibióticos todas pasaron su resistencia a E. coli K12 E711, tablas XV, XVI, y XVII..

En lo que respecta a las Salmonella de otros serotipos

en las cepas monorresistentes el índice de transferencia fue de 7/41 (17 %). Todas las demás cepas multirresistentes fueron capaces de pasar parte o todo su patrón de resistencia. Tablas XVIII, XIX y XX.

TANAKA y col. sobre un total de 1980 cepas de Salmonella sp aisladas 1955 a 1973 el porcentaje de transferencia más alto fue de las cepas resistentes a cuatro antibióticos (86'6 %), seguidas de la de las cepas resistentes a tres antibióticos (73'6 %), el porcentaje de transferencia de las cepas resistentes a dos y a un antibiótico fue del (39'9 %) y del (2'2 %) respectivamente. Aunque no especifica que Salmonella son, es el único trabajo de los consultados que expone los porcentajes de transferencia según el patrón de resistencia.

Los patrones que no se transfirieron fueron:

- .- Los que codificaban resistencia a un solo antibiótico, Fosfomicina, Tetraciclina y Cloranfenicol. La Fosfomicina no se consiguió transferir ni como resistencia única ni formando parte de un patrón de resistencia mayor, por lo que suponemos que esta resistencia sea de origen cromosómico.
- .- Los que codificaron resistencia a dos antibióticos, Fosfomicina-Tetraciclina.

.- Los que codificaban resistencia a tres antibióticos Estreptomomicina-Fosfomicina-Tetraciclina y Estreptomomicina-Fosfomicina-Kanamicina.

En S. typhimurium, en 6 ocasiones no pasó el patrón de resistencia completo, a pesar de que se realizó la selección de los transconjugantes con todos los antibióticos a los que mostraban resistencia los donantes. De estas 6 cepas, en 2 de ellas no pasaron los antibióticos Ampicilina-Cefalotina, 2 cepas no pasaron la Cefalotina, 1 no transfirió Fosfomicina-Cefalotina y otra no transfirió la Fosfomicina.

Igualmente 7 cepas de Salmonella de otros serotipos no transfirieron su patrón de resistencia completo, 2 de ellas no pasaron la Fosfomicina, 1 cepa la Ampicilina-Cefalotina y 3 no lograron transferir la Tetraciclina.

Esta incapacidad de pasar toda la resistencia por conjugación se podría explicar por varias razones:

- Que el patrón de resistencia fuese la suma de la acción de dos plásmidos, de los que sólo uno es transferido a la cepa receptora. En estos casos es frecuente la movilización del plásmido no transferible por el factor R, de tal forma que al seleccionar con todos y cada uno de los anti-

bióticos del patrón de resistencia, se obtendría el paso del factor no transferible gracias a la movilización realizada por el plásmido transferible (MEYNELL, 1972; FALKOW, 1975; ELWELL y col. 1977; LAUFS y KAULFERS, 1977).

- Que la resistencia fuese de localización cromosómica y por tanto difícil de promover su transferencia mediante el factor R.

- Diferentes sistemas de modificación-restricción que impiden la expresión de algunos genes codificados por el plásmido entrante, ya que su ADN es degradado.

Las dos últimas posibilidades son las que podrían explicar nuestro caso.

Vimos anteriormente que la resistencia a Cefalotina es una de las que menos se transfieren por conjugación, esto también fue observado por NEU y col. en 1975. De 218 cepas de Salmonella resistentes aisladas en 1973 logran transferir por conjugación todas las resistencias por ellos probadas, (Am Cf Cm Km Su Sm) exceptuando la Cefalotina.

4.5.- FRECUENCIA DE CONJUGACION

El intervalo de la frecuencia de conjugación encontrada por nosotros está comprendida entre 2×10^{-4} y 4×10^{-9} Tabla XXI.

Así como hay varios trabajos en los que se expresa la frecuencia de conjugación de S. typhi, (OLARTE y col. 1973; DATTA y col. 1974 y CHUN y col. 1977). En todos los trabajos consultados sólo hay uno, el de PETIT y col. 1981, en que venga expresado la frecuencia de conjugación de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos, ellos encuentran una frecuencia de conjugación que varia entre 2×10^{-5} y 4×10^{-6} .

4.6.- PLASMIDOS R EN EL GENERO SALMONELLA

De las 10 cepas de S. typhi resistentes, ninguna logró transferir su resistencia y no se llegó a detectar ningún plásmido.

Revisando la bibliografía, vemos que los plásmidos

R albergados por cepas de S. typhi han sido descritos en menor proporción y siempre aparecen en cepas resistentes a cuatro o más antibióticos. Los plásmidos R más comunes descritos son los que codifican resistencias a Cm Sm Tc Su (DATTA y col.. 1974; RUSU y col. 1976; LASZLO y col. 1976, CHUN y col. 1977, SHARMA y col. 1979). En nuestro estudio no encontramos ninguna cepa de S. typhi multirresistentes, todas fueron monorresistentes y una resistente a dos antibióticos (Fm Tc).

Recientemente se ha descrito una cepa de S. typhi que tiene un plásmido R, que codifica una β -lactamasa y esta le confiere resistencia a Benzylpenicilina, Carbenicilina y Ampicilina (Raul ZEMELMAN y col, 1981), en nuestro país también muy recientemente se ha descrito una cepa de S. typhi que tiene un plásmido R que le confiere resistencia a Cloranfenicol (GALVEZ, R. y col 1982).

De las 63 cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos que no transfirieron su resistencia sólo encontramos dos plásmidos no autotransferibles, son los albergados en las cepas de S. typhimurium números 39 y 70 cuyos pesos moleculares son 2 y 20 Mdaltos respectivamente.

Según IOBEN y MITSUHASI (1977), los plásmidos auto-transferibles poseen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 100 Mdaltons, mientras que los plásmidos que carecen de esta capacidad tendrían unos pesos moleculares comprendidos entre 2 y 10 Mdaltons.

La incidencia de plásmidos R en las cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos fue del 23'1 %. La frecuencia de cepas portadoras de plásmidos se ha ido incrementando a lo largo de estos años, alcanzando la máxima incidencia en 1980 con un 31'4 %, Tabla XXIV. Entre las cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos resistentes, la incidencia de plásmidos R fue del 50'3 %. Siendo S. typhimurium la que presentó mayor número de plásmidos R con un porcentaje del 63'0 %, mientras que en Salmonella de otros serotipos la incidencia de plásmidos R fue 43'5 %. Tabla XXV.

WINSHELL y col. estudian 30 cepas de S. typhimurium aisladas de 1968-1969 multirresistentes y obtienen una incidencia de plásmidos R del 63'3 %. En 14 cepas de Salmonella de otros serotipos la incidencia de plásmidos R fue del 43'0%. Hay que tener en cuenta que aunque los resultados son pare-

cidos a los nuestros son años anteriores, a los estudiados por nosotros, estos autores sólo estudian los plásmidos R en las cepas multirresistentes y no en las monorresistentes con lo que los porcentajes obtenidos son más altos. No estudian otras características de estos plásmidos R.

BISSET y col., obtienen una incidencia de Plásmidos R en las cepas de S. typhimurium aisladas en 1971-1972 del 56'0 % y en las cepas de Salmonella de otros serotipos del 88'6 %. Es el único trabajo de los consultados en que la incidencia de plásmidos R en las cepas de Salmonella de otros serotipos es mayor que en S. typhimurium. Sólo se estudian los plásmidos R en las cepas multirresistentes y no estudian otras características de los mismos.

NAKAYA y col. en 1975, estudian 1151 cepas de Salmonella aisladas entre 1966 y 1972, y encuentran una incidencia global de plásmidos R de 23'3 %. Entre las cepas resistentes esta incidencia fue del 27'3 %, estos autores también observan un incremento del número de plásmidos en estos años estudiados, los porcentajes no son comparables con los nuestros pues son áreas geográficas y años distintos. Las cepas de S. typhimurium son las que presentaron un mayor

número de plásmidos R con una frecuencia de 85'0 %, mientras que en las cepas de Salmonella de otros serotipos esta frecuencia fue del 50'7 %.

CHERUBIN y col., trabajando con 100 cepas de S. typhimurium multirresistentes aisladas en 1973 halla una incidencia de plásmidos R de 83'0 % y de 54 cepas de Salmonella de otros serotipos la incidencia de plásmidos R encontrada fue de 77'0 %.

PETIT y col.. Estudian los plásmidos R de 11 cepas de S. typhimurium y 7 de Salmonella de otros serotipos aisladas de 1976-1978, las 18 cepas multirresistentes y encuentran plásmidos en 13 de ellas (72'2 %). Hallan el peso molecular de los plásmidos albergados en cuatro de estas cepas, viendo que están comprendidos entre 67'9 y 74'7 Mdaltons, en una de ellas encuentra un pequeño plásmido no conjugativo de 1'3 Mdaltons.

PALOMARES y col., en 1982, encuentran la mayor incidencia de plásmidos R en S. typhimurium, y los pesos moleculares de los plásmidos R de S. typhimurium y Salmonella de otros serotipos oscilan entre 30 y 65 Mdaltons.

Según HELINSKI, D.R. (1976), el peso molecular de los plásmidos R es variable y suele oscilar entre 30 y 50 Mdal. para los conjugativos y suele ser menor de 10 Mdal. para los no conjugativos.

Tanto en las cepas de S. typhimurium como en las cepas de Salmonella de otros serotipos, los plásmidos detectados en dichas cepas que transfirieron resistencia a antibiótico, presentaron una gran variabilidad en cuanto a su peso molecular, oscilando entre 20 y 118 Mdaltos, pero prácticamente más de la mitad de los pesos moleculares de los plásmidos están comprendidos entre 40 y 60 Mdal. en el grupo de S. typhimurium y entre 30 y 60 Mdal. en el de Salmonella de otros serotipos. Tablas XXII y XXIII.

Así como hay bastantes trabajos en los que se determina la incidencia de plásmidos R en las cepas de Salmonella, hay muy pocos en los que se determine el peso molecular de dichos plásmidos.

Aunque en ambos grupos encontramos 24 cepas en que plásmidos del mismo peso molecular están asociados con la transferencia del mismo patrón de resistencia, se observa en los dos grupos de Salmonella, plásmidos relacionados con

con el mismo patrón de resistencia pero con pesos moleculares muy diferentes. Ejemplos cepas número 30 con un plásmido de peso molecular de 60 Mdal. y patrón de resistencia a Sm Km Tc y la cepa número 41 con el mismo patrón de resistencia y un plásmido de 118 Mdal., igualmente la cepa número 84 con un plásmido de peso molecular de 48 Mdal. y patrón de resistencia a Am Cm Sm Km Tc Txs y la cepa n° 135 con el mismo patrón de resistencia y dos plásmidos con pesos moleculares de 110 y 2'3 Mdal.; así como plásmidos de pesos moleculares similares y patrones de resistencia diversos, cepa número 68 con un plásmido de peso molecular de 60 Mdal. y patrón de resistencia a Am Sm y cepa número 30 con un plásmido del mismo peso molecular y un patrón de resistencia a Sm Km Tc.

De todo ello podemos deducir que el peso molecular de los plásmidos no está en relación con los genes de resistencia que posee. Si tenemos en cuenta la estructura general de un plásmido de resistencia a antibióticos autotransferible (plásmido R) Fig. 4, observamos que gran parte del ADN plasmídico está dedicado a funciones no relacionadas con la resistencia, e incluso partes con un tamaño relativamente importante en las que no se ha encontrado ninguna

función conocida. Por ello, en un plásmido de gran tamaño es posible encontrar pocos genes de resistencia mientras que en otro menor podemos encontrar más genes de resistencia y faltar otros de funciones distintas, lo que justificaría un menor tamaño.

Otros factores que pueden intervenir en la variabilidad de los plásmidos son los transposones (*Tn*) y las secuencias de inserción (*IS*), que son fragmentos de ADN de diferentes tamaños que poseen la capacidad de movilizarse de un punto del cromosoma ó de un plásmido a otro punto ó a otro plásmido, independiente de los mecanismos de recombinación-integración intrínsecos de la bacteria huésped. Las *IS* son capaces de integrarse en cualquier molécula de ADN presente en el citoplasma y son generalmente de pequeño tamaño, por lo que no suelen codificar ningún tipo concreto de información genética, mientras que los *Tn* además de cambiar de punto de integración, pueden transportar otro tipo de información, por ejemplo los más conocidos son los de resistencia a uno o varios antibióticos, aunque existen de otros tipos.

Así pues un mismo plásmido puede dar lugar a otros en función de sucesivas adquisiciones ó pérdidas de *IS* ó *Tn*

con lo que las bacterias tienen en ellos una fuente importantísima de variabilidad y evolución.

Ellos por tanto podrían también ayudarnos a comprender la variabilidad encontrada en los plásmidos detectados por nosotros en las cepas de Salmonella aisladas.

En 12 cepas de S. typhimurium y en 1 cepa de S. enteritidis se detectó más de un plásmido, 9 de estas cepas presentaron dos plásmidos de pesos moleculares muy diferentes, 2 cepas mostraron 3 plásmidos de pesos moleculares también muy distintos y en las 2 cepas restantes se visualizaron 6 plásmidos de pesos moleculares diferentes si exceptuamos los dos últimos que presentan pesos moleculares de 1'9 y 1'7 Mdal. respectivamente pudiéndose tratar del mismo plásmido. Tabla XXVI.

Sería muy interesante estudiar con mayor profundidad los plásmidos de estas cepas, que representan un 17'8 % del total de cepas de Samonella typhimurium y de Salmonella de otros serotipos con plásmidos R, para poder averiguar la función que desempeñan.

NAKAYA y col. en 1975 encontró varias cepas con dos o tres plásmidos, estas cepas representaron un 18'0 % del total de cepas con plásmidos.

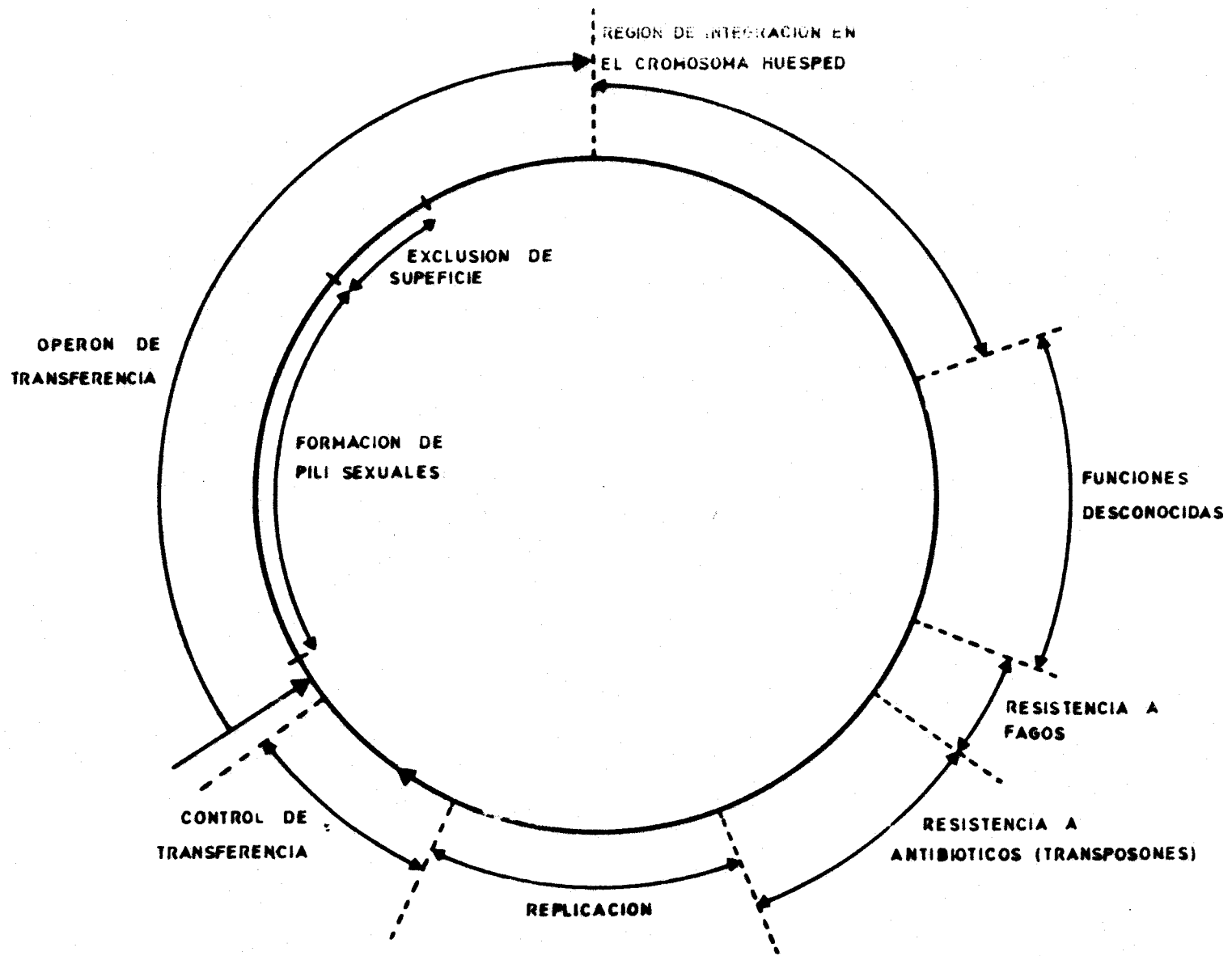


FIG.4. ESTRUCTURA GENERAL DE UN PLASMIDO DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS AUTOTRANSFERIBLE

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1.- El serotipo más frecuentemente aislado fue S. typhimurium (44'6 %).

2.- El agente antimicrobiano que presentó mayor actividad frente a todas las cepas de Salmonella estudiadas fue la combinación Trimetoprim—sulfametoxazol.

3.- S. typhimurium fue el serotipo que presentó mayor resistencia a los agentes antimicrobianos ensayados, 54'0 % de las cepas, mientras que en las cepas de Salmonella de otros serotipos la resistencia fue del 39'6 %. En ambos grupos la resistencia más frecuente fue a Tetraciclina y Estreptomina. No hubo ninguna cepa resistente a Ac. Nalidíxico ni a Gentamicina. En el grupo de S. typhi sólo se detectó resistencia a Estreptomina, Tetraciclina y Fosfomicina.

4.- En el grupo de S. typhimurium, predominaron las cepas multirresistentes (63'1 %) sobre las monorresistentes (36'9 %). El patrón de resistencia más frecuente fue Sm Tc (11'8 %).

5.- En las cepas de Salmonella de otros serotipos, hubo

un predominio de las cepas monorresistentes (65'1 %). El patrón de resistencia más frecuente fue Am Sm (9'5 %).

6.- Se ha producido un aumento global de la resistencia en los años estudiados tanto en el grupo de las cepas de S. typhimurium como en el de Salmonella de otros serotipos, este aumento ha sido estadísticamente significativo para el primer grupo pero no para el segundo. En ambos grupos, se observó un incremento de las cepas multirresistentes.

7.- Las cepas de S. typhi, presentaron resistencia a un sólo antibiótico, (a Tetraciclina, a Estreptomicina y a Fosfomicina), excepto una que lo fue a Estreptomicina y Fosfomicina. No se aislaron cepas resistentes a Cloranfenicol, Ampicilina ni Trimetoprim—Sulfametoxazol.

8.- S. typhimurium fue el serotipo que mayor porcentaje de resistencia transferible mostró (62 %) y el que mayor variedad y nº de plásmidos (63 %).

9.- En el grupo de Salmonella de otros serotipos la frecuencia de transferencia de resistencia fue del 46 % y la incidencia de plásmidos R fue del 43'5 %.

10.- De las 10 cepas de S. typhi resistentes ninguna logró transferir su resistencia, ni se visualizó en ellas ningún plásmido.

11.- De los seis métodos utilizados en la visualización de plásmidos, el método de electroforesis directa de T. ECKHARDT fue el que nos dió los mejores resultados.

12.- Los pesos moleculares de los plásmidos R aislados en las cepas de Samonella estudiados oscilaron entre 20 y 118 Mdaltons.

13.- No se encontró ninguna relación entre el peso molecular de dichos plásmidos R y el número de resistencias transferidas.

14.- Las cepas de S. typhimurium y de Salmonella de otros serotipos, cuyo reservorio principalmente es animal, presentaron plásmidos R parecidos y sus pesos moleculares oscilaban entre 20 y 118 Mdaltons. Por el contrario las cepas de Salmonella que tienen como único reservorio natural al hombre (S. typhi y S. paratyphi) no presentaron plásmidos R. Se detectó pues una relación entre el reservorio de las cepas y la presencia de plásmidos R autotransferibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABAD, C., VELASCO, A.C. y RODRIGUEZ-NORIEGA, A.: Determinación de la C.M.I. de 89 cepas de Salmonella frente a Clo-ranfenicol, Ampicilina y Sulfametoxazol-Trimetoprim . In Proc-eding of the First Mediterranean conference on Chemothera-phy. Madrid, August, 1978.

ANDERSON, E.S., Y LEWIS, M.J.: Drug resistance and its transfer in S. typhimurium. Nature. London., 206, págs. 579-583, 1965.

ANDERSON, E.S.: Drug resistance in Salmonella typhimurium and its implication. Br. Med. J., 3, págs. 333-339, 1968.

ANDERSON, E.S.: The geographical predominance of resistance Systems of various compatibility groups in Salmonella. En "R plasmids: Their properties and possible control". Ed. Springer-Verlag. Vienna, 1977.

ANDERSON. E.S.: The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteriaceae. Ann. Rev. Microbiol., 22, págs. 131-140, 1968.

ASSERKOFF, B., y BENNETT, J.V.: Effect of antibiotic thera-phy in acute salmonellosis on the fecal excretion of Salmone-llas. N. Engl. J. Med., 281, págs. 636-640, 1969.

AVRIL, J.L., DABERNAT, H.J., GERBAUD, G.R., HORODNICEAU, LAMBERT-ZECHOVSKY, N., LE MINOR, S. MENDEZ, B. y CHAB-BERT, Y.A.: Groupes d'incompatibilité des Plasmides R chez-les souches de Salmonella Epidémiques. Ann. de Microbiologie ./.
./.

./. 128 B, págs. 165-175, 1977.

AVRIL, J.L., BRIFFOD, J.: *La résistance des Salmonella aux antibiotiques*, *Médecine et Maladies Infectieuses.*, 8, págs. 172-176, 1978.

AVRIL, A., y SHERRATT, D.: *De ssection of the transpositium process, a transposon-encoded site specific recombination system*. *Molec. gen. Genet.*, 175, págs. 267-274, 1979.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., y TURCK, M.: *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, págs. 493-496, 1966.

BETRIU, C., DE LA TORRE, F., LOPEZ, O., y RODRIGUEZ-AVIAL, C.: *Estudio in vitro de la sensibilidad de cepas de Salmonella frente a seis antibióticos*. *Inmunologica.*, 3, págs. 266-270, 1982.

BIDWELL, J.L., LEWIS, D.A., y REEVES, D.S.: *A rapid single colony lysate method for the selective visualización of plasmids in Enterobacteriaceae, including Serratia Marcescens*. *J. Antimicrobial Chemother.*, 8 págs. 481-485, 1981.

BISSET, M.L., ABBOTT, S.I. Wood, R.M.: *Antimicrobial resistance and R factor in Salmonella isolated in California (1971-1972)*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 5 págs. 161-168, 1974.

BLASER, M.J.: *Salmonella bacteremié reports to the center for disease control, 1968-1979*. *J. Infect. Dis.*, 143, págs. 743-746, 1981.

BRASSEUR, P.: *Les infections á Salmonella non typhiques*.
./.

./. Etude bactériologique, clinique, épidémiologique de 491 cas diagnostiques au C.H.U. de Rouen (1970-1978). Doctoral (M.D.) Thèse. Université de Rouen, 1980.

BUCHANAN, R.E. y GIBBONS, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8^a ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

BURTON, G.C., HIRS, D.C., BLENDEN, D.C., y ZEIGLER, J.L.: The effects of Tetracycline on the Establishment of *Escherichia coli* of Animal origin, and "in vivo" transfer of antibiotic resistance, in the intestinal tract of man. En "*The Microbial Flora of Man*", Ed. Academic Press. London.

CHABBERT, Y.A. y GERBAUD, R.G.: Surveillance épidémiologique des plasmides responsables de la résistance au Chloramphenicol de *S. typhi*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*., 125 A págs. 153-166, 1974.

CHABBERT, Y. A. y ROUSSEL, A.: Taxonomy and epidemiology of R plasmids as molecular species. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 (Suppl. C.), 25, 1977.

CHABBERT, Y.A.: Résistance des Salmonelles aux antibiotiques. *Gazete Médicale de France.*, 82, págs. 1767-1772, 1975.

CHERUBIN, C.E., SZMUNESS, M., y WINTER, J.: Antibiotic resistance of *Salmonella*. *Northeastern, United States, J. Med.* 72, págs. 369-372, 1970.

CHERUBIN, C.E.: Antibiotic resistance of *Salmonella* in Europe and the United States. *Review of Infectious Disease.*, 3, págs. 1105-1126, 1981.

CHUN, D., SEOL, S.X., CHO, D.T., y TAK, R.: Drug resistance and R plasmids in Salmonella typhi isolated in Korea. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 11, págs. 209-213, 1977.

CISTERNA, R., ROJO, P.: Valoración de las resistencias a antimicrobianos en los géneros Salmonella, Shigella, y Campylobacter. Reunión internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

CLEWELL, D.B.: y HELINSKI, D.R.: Supercoiled circular DNA-protein comple in E. coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. N.A.S.*, 62, págs. 1159-1166, 1969.

CLOWES, R.C., y HAYES, W.: *Experiments in microbial genetic*. Ed. Backwell Sci. Pub. Oxford, 1968.

CLOWES, R.C.: Molecular structure of bacterial plasmid. *Bacteriol. Rev.*, 36, págs. 361-405, 1972.

CLOWES, R.C.: Molecular biology of R factors. *Antibiotics Chemother.*, 20, pág. 175, 1976.

COHEN, M.S., GARGAROSA, E.J.: Nonthyphoid Salmonellosis. *South. Med. J.*, 71, págs. 1540-1545, 1978.

CORNELIS; G., BENNET, P.M., y GRINSTED, J.: Properties of p 601, a lac plasmid originating in Yersinia enterocolitica 842. *J. Bacteriol.*, 127, 1058-1062, 1976.

COWAN, S.T.: *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge Univ. Press, 1974.

CURTISS III, R., FENWICK, J.R., GOLDSCHMIDT, R, y FALKINHAN III, J.O.: Mechanism of conjugation. En "R-Factors. Drug resistance plasmid." Ed. University Park Press. Tokio, 1977.

DATTA, N.: Epidemiology and classification of plasmids. En "Microbiology". Ed. Schessinger. ASM. Washington. D.C., págs. 9-15, 1975.

DATTA; N.: Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution. J. Antimicrobial Chemother., 3,, págs. 19-23, 1977.

DATTA, N.: R factors in *Enterobacteriaceae*. En "R-Factors. Drug resistance plasmid." Ed. University Park Press. Tokio, 1977.

DATTA, N., OLARTE, J.: R-Factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella disenteriae* isolated during epidemics in Mexico: Classification by compatibility. Antimicrob. Agents Chemother., 5 págs. 310-317, 1974.

DATTA, N., HUGHES, V.M., NUGENT, M.E., y RICHARDS, H.: Plasmids and transposons and their stability and mutability in bacteria isolated during an outbreak of hospital infection Plasmid., 2, págs. 182-189, 1979.

DAWKINS, A.T., HORNICK, R.B., Evaluation of antibiotics in a typhoid model. Antimicrob. Agentd. Chemother., 66 págs 6-10, 1967.

DIFCO.: Manual. Detroit. U.S.A., 1975.

DIXON, J.M.S.: Effect of antibiotic treatment on duration of excretion of *Salmonella typhimurium* by children. Br. Med. J., 2, págs. 1343-1345, 1965.

DRASAR, B.S.: Some factors associated with geograophical variations in the intestinal microflora. En "The normal microbial flora of man". Ed. Academic Press. London. 1974.

DUCLUZEAU, R., y RAIBAUD, P.: La flora microbiana del tubo digestivo: Composición, equilibrio y efectos sobre el huésped. Reunión Internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

ECKHARDT, T.: A rapid method for the identification of plasmid deoxirribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1, págs. 1584-1587, 1978.

EDWARD, P.R., y EWING, W.H.: Identification of the Enterobacteriaceae. Ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 1972.

FALKOW, S.: Infectious Multiples Drug Resistance. Ed. Pion Limited. London, 1975.

FALKOW, S.: The prevalence and ecology of R-factors. In Infectious multiple drug resistance. Pion, London, págs. 58-75, 1975.

FINLAND, M, MILDRED, M.D., BARNES, M.S.: Salmonellosis y Shigellosis et Boston City hospital, J.A.M.A., págs. 229-233, 1974.

GALVEZ, R., PEREZ, J.A., MARISCAL, A., y ESPIGARES, M.: Caracterización del enzima Cloranfenicol-Acetil-Transferasa de un plásmido R de S. typhi. Reunión Internacional sobre Infecciones Intestinales. Granada, 1982.

GARDNER, P.: Antibiotics in animal feeds: The need for better epidemiologic studies. *J. Infect. Dis.*, 138, págs. 101-104, 1978.

GILMAN, R.M., TERMINEL, M., LEVINE, M., HERNANDEZ-MENZA, P., CALDERONE, E., VAZQUEZ, V., MARTINEZ, E., SNYDER M.J., y HORNICK, R.B.: Comparasion of Trimetoprim-Sulfamethoxazole and Amoxicillin in the therapy of Chloramfenicol-resistant and Chloramfenicol-sensible Typhoid Fever, *J. Infect Dis.*, 132, págs. 630-635, 1975.

GILL, F.A., HOOK, E.W.: Salmonella strains whith transferable and antimicrobial resistance, *J.A.M.A.*, 198, págs. 1267-1269, 1966.

GUERRY, P., LEBLANC, D.J., y FALKOW, S.: General method for the isolation of plasmid deoxirribonucleic ac. *J. Bacteriol.* 116, págs. 1064-1066, 1973.

HELINSKI, D.R.: *Federation proccedings*, 35, págs. 2026-2029, 1976.

IOBE, S., y MITSUHASHI, S.: Genetic and biomoleculer properties of R plasmids. En "*R Factor: Drug resistance plasmid*". Ed. University Park Press. Tokyo. 1977.

JACOB, A.E., SHAPIRO, J.A., YAMANOLO, L, SMITH, D.L. COHEN, S.N. and BERG, D.: En "*DNA, insertion elements, plasmids and episomes*", Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1977.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L. Y ADELBERG, E.A., *Manual de Microbiología médica*. Ed. Manual Moderno, México, 1978.

JONSSON, M, RUTBERG, L., y TUNEVALL, G.: Transferable resistance to antibiotics in gram-negative bacteria isolated in a hospital for infectious diseases. *Scand. J. Infect. Dis.*, 4, págs. 209-215, 1972.

JUKES, T.M.: *The present status and background of antibiotic*.
./.

tic in the feeding of domestic animals. *Ann. N.X. Acad. Sci.*, 182, págs. 362-379, 1971.

KADO, C.I., y LIU, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriology*, 145, págs. 1365-1373, 1981.

KAYE, D. MERSELIS, J.G., HOOK, E.W.: Susceptibility of *Salmonella* species to four antibiotic. *N. Engl. J. Med.*, 269, págs. 1084-1086, 1963.

KUNIN, C.M.: Problems in antibiotic usage. In G.L. MANDELL R.G., DOUGLAS, J.R., y BENNETT, J.E.: *Principles and practice of infectious diseases*. Wiley, New York, págs. 383-395, 1979.

LASZLO, V.G.: Studies on R factor in *Salmonella typhi* strains. En "*Plasmids, medical and theoretical aspects*". Ed. Avicem, Springer Verlag. Viena, 1976.

LAUFS, R. y KAULFERS, P.M.: Molecular characterization of a plasmids specifying Ampicilin resistance and its relationship to other R Factors from *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.*, 103, págs. 277-280, 1977.

LEBEK, G.: Epidemiological investigations of R factors in man and animals in Switzerland. En "*Bacterial Plasmids and antibiotic resistance*". Ed Avicem. Praga. Springer Verlag. Viena, 1974.

LE MINOR, S.: Le diagnostic de laboratoire des bacilles gram negatif. *Enterobacteries (I)*. Ed. De le Tourelle. París, 1972.

LE MINOR, L., LEMINOR, S.: Origine et repartition en sérotypes des souches isolées in France et receses au centre nationale des *Salmonella* de 1977-1979. *Rev. Epidémiol. Santé Publiqué.*, 29, págs. 45-55, 1981.

LINTON, A.H.: Antibiotic resistance: the present situation reviewed. *Vet. Rec.*, 100, págs. 354-360, 1977.

LINTON, A.H., HOWE, K., BENNETT, P.M., RICHMOND, M.H., WHITESIDE, E.J.: The colonization of the human gut by antibiotic resistant Escherichia coli from chickens. *J. Appl. Bacteriol.*, 43, págs. 465-469, 1977.

LOTHAR, SACHS.: *Estadística aplicada*. Ed. Labor, S.A., Barcelona, 1980.

LYONS, R.W., SAMPLES, C.L., DESILVA, H.N., ROSS, K.A., JULIAN, E.M., CHECKO, P.J.: An epidemic of resistant Salmonella in a nursery: animal to human spread. *J.A.M.A.*, 243, págs. 546-547, 1980.

MACRINA, F.I. KOPECKO, D.J., JONES, K.R., AYERS, D.J. and MCCOWEN, S.M.: A multiple plasmid-containing Escherichia coli strain convenient source of size reference plasmid molecule. *Plasmid*. 1, págs. 417-420, 1978.,

MANTEN, A, QUINEE, P.A., KAMPELMACHER, E.H.: Incidence of resistance to Tetracycline and Chloramphenicol among Salmonella bacteria found in the Netherlands in 1963 and 1964. *Zentralbl. Bacteriol. Hyg.*, 200, págs. 13-20, 1966.

MARSICK, F.J.: PARISI, J.J. and BLENDEN, D.C.: Transmissible drug resistance of Escherichia coli and Salmonella from humans, animals and their rural environments. *J. infect. Dis.* 123, págs. 296-302, 1975.

MAS, G., DIEZ ENCISO, M., VELASCO, A.C. y PEDRAZA, A.: Suceptibilidad "in vitro" de patógenos intestinales. Reunión internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

MCHUGH, G.L., MOELLERING, R.C., HOPKINS, C.C. SWARTZ, M. N.: Salmonella typhimurium resistant to silver nitrate, Chloranphenicol and Ampicillin. A new threat in burn units?. *Lancet.*, 1, págs. 235-240. 1975.

MERCER, H.D., BOCURULL. D., GAINES, S. WILSON, S., BENNETT, J.V.: Characteristics of antimicrobial resistance of Escherichia coli from animal: relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agents. *Applied Microbiology.*, 22, págs. 700-705, 1971.

MEYERS; J. SANCHEZ, L.P., ELWELL, P. y FALKOW, S.: Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and Characterization plasmid deoxirribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127, págs. 1529-1537, 1976.

MEYNELL, G.G., MEYNELL, E.: *Theory and practice in experimental bacteriology.* Ed. Cambridge University Press. London, 1970.

MEYNELL, G.C.: *Bacterial plasmids.* Ed. Macmillan. London, 1972.

MITSUHASHI, S.: *R factor. Drug resistance plasmid,* Ed. University Park Press., Tokyo. 1977.

MITSUHASHI, S. HAJIMA, H.: *Microbial drug resistance.* Ed University Park Press. Tokyo, 1975.

MITSUHASHI, S.: *Plasmids, medical and theoretical aspects.* Ed. Avicem Springer Verlag Viena, 1976.

MORENO; M., DAMASO, D., PEREA, E.J., MARCO, M.L. y MANCHADO, P.: *Transmisión de factores de resistencia a los an-*
./.

./.. tibióticos entre bacterias: conjugación y transducción. *Antibiot. y Quimioter.*, I, págs. 211-220, 1971.

NAKAYA, R., YOSHIDA, Y., TERAWAKI, Y.: Antibiotic resistance and plasmids in *Salmonella* isolated from humans in Japan (1966-1972). EN "Microbial Drug Resistance", Ed. University Park Press, Tokyo, 1975.

NEU, H.C., WINSHELL, E.B., WINTER, J., CHEMBIN, C.: Antibiotic resistance of *Salmonella* in Northeastern United States 1968-1969. *N.Y. State. J. Med.*, 71, págs. 1196-1200, 1971.

NEU, H.C., CHERUBIN, C.E., ALONGO, E.D.: Antimicrobial resistance and R-factors in *Salmonella* isolated from human and animal. En "Drug inactivating enzymes and antibiotic resistance". Ed. Avicem. Praga. Springer-Verlag. Berlin, 1975.

NEU, H.C., CHERUBIN, C.E., LONGOS, E.D., FLOUTON, B., WINTER, J.: Antimicrobial resistance and R-Factor transfer among isolates of *Salmonella* in the Northeastern United States: a comparison of human and animal isolates. *J. Infect. Dis.*, 132, págs. 617-622, 1975.

NOGALES, M.C., PALOMARES, J.C., MARTIN, E., BOROBIO, M.V., PEREA, E.J.: Etiología bacteriana en gastroenteritis infantiles durante 1977-1979. *Revista Española de Pediatría*, XXXVII, págs. 219-220, 1981.

NOVICK, R.P., CLOWES, R.C., COHEN, S.N., CURTISS, III, R. y DATTA, N.: Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriological Rev.*, 40, pág. 168, 1976.

O'BRIEN, T.F., HOPKINS, J.D., GILLEECE, E.S.: Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the the United States. *J. Med.*, ./..

307, págs. 1-6, 1982.

OLARTE, J., GALINDO, E. JOACHIM, A.: Sensibility of Salmonella, Shigella, and enteropathogenic Escherichia coli especies to Cephalothin, Ampicillin, Chloranphenicol, and Tetracycline. Antimicrobial. Agents. Chemother., 2 págs. 787-793, 1962.

OLARTE, J., GALINDO, E.; Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, Ampicillin and other antimicrobial agents: strain isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. Antimicrob. Agents. Chemother., 4, págs. 596-601, 1973.

PALOMARES, J.C., PEREZ, E.J.: Comparison between plasmids of Salmonelle and other enterobacteria isolated from the same patientes. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur), 133 A.: págs. 301-310, 1982.

PARADELIS; A.G., STATHOPOULOS, G.A., GRIGORIADOU-EDIPIDES, S.A., LOGARES, G. SRASSASIS, L. SALPIGIDES, G., EDIPIDES, T.: Multiresistant strains of Salmonellae sensitive to cephradine. In procceding of the first Mediterranean conference on Chemotherapy, Madrid, 1978.

PEREA, E.J.: ans DAZA, R.M.: R. Factors to aminoglycoside antibiotics. En "2nd International symposium on antibiotic resistance". Ed. aviceum. Praga. Springer-Verlag, Viena, 1974.

PEREA, E.j.: DAZA, R.m., BOROBIO, M.V., ANDRES, I y ORTIZ, J.M.: Characterization of and R factor to Fosfomycin. En "3rd International Symposium on antibiotic Resistance". ed. Aviceum. Praga. Springer-Verlag. Viena, 1976.

PEREA, E.J., PALOMARES, J.C., GALLARDO, R. YÑIGUEZ, R.: Evolución de las resistencias en Salmonella y Shigella. Reunión Internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

PEREA, E.J.: Enfermedades infecciosas: patogénesis y Diagnósticos. Salvat Editores S.A., 1983.

PETIT, S., JOLY, B.: LAFEUILLE, B. ELUZEL, R.: Etude de la résistance au Chloranfenicol de Salmonella et identification des plasmides R. Ann. Microbiol. (Inst. pasteur). 132 A, págs. 69-80, 1981.

PLAZAS, J., BLESA, M.C., ARROYO, M.A. y TORRES, M.A.: Especies más frecuentes de Salmonella en Alicante y su resistencia a antibióticos. Reunión Internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

RANGNEKAR, V.M., BANKER, D.D., JHALA, H.I.: Antimicrobial resistance and incompatibility groups of R Plasmids in Salmonella typhimurium isolated from human source in Bombay from 1978 to 1980. Antimicrobial Agents Chemother. 23, págs. 54-58, 1983.

REINLEIN, A.: Epidemiología de Salmonella y Shigella. Reunión Internacional sobre infecciones intestinales. Granada, 1982.

RICHMOND, M.H.: R Factors in man and his environment. Ed. A.S.M. Washington. D.C., 1975.

RICHMOND, M.H.: The survival of-plasmids in the absence of antibiotic selection Pressure. En "R-factors: their properties and possible control. "Springer-Verlag, Viena, 1977.

RICHMOND, M.H.: Resistant E. coli of Farm origin and their, possible danger to man. En "Plasmids. Medical and theoretical Aspects". Ed. Avicem.

RUBIN, R.M., WEINSTEIN, L. Salmonellosis.: Microbiologic, pathologic and clinical features. Stratton Intercontinental, New York, 137p, 1977.

RUSU, V., BARON-DOROBAT, O. DIAMANDI, S., LAZARRAE, D.: Salmonella typhi strain with transmissible multiple resistance Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., A234, 502, 1976.

RYDER, R.W., BLAKE, P.A.: MURLIN, A.C., CATER, G.P., POLLARD, R.A., MERSON, M.H., ALLEN, S.D., BRENNER, D.J.: Increase in antibiotic resistance among isolates of Salmonella in the United States, 1967-1975, Infect. Dis., 142: págs. 485-495, 1980.

SCHROEDER, S.A., TERRY, P.M., BENNETT, J.V.: Antibiotic resistance and transfer factors in Salmonella, United States, J.A.M.A., 205, págs. 903-910, 1967.

SHARM, K.B., BHEENBHAT, M., PASRICHA, A., VAZE; S., Multiple antibiotic resistance among Salmonellae in India. The British Society for Antimicrob. Chemother, págs. 15-21, 1979.

SIEGEL, D. HUBER, W.G. ENLOE, F.: Continuous nontherapeutic use of antibacterial drugs in feed and drug resistance of the gram-negative enteric flora of foodproducing animals. Antimicrob. Agents. Chemother., 6 págs. 697-701, 1974.

SIMMONS, H.E., STOLLEY, P.D.: This is medical progress?. J.A.M.A., 227; págs. 1023-1028, 1974.

SMITH, W.H.: Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *Lancet.*, 1, págs. 1174-1176, 1969.

STEERS, E., FOLTZ, E.L., GRAVES, B.S., RIDEN, J.: An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility of antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 9, págs. 307-311, 1959.

STOLLEY, P.D., BECKER, M.H., McEVILLA, J.D., LASAGNA, L., GAINOR, M., SLOANE, L.M.: Drug prescribing and use in an American community. *Ann. Intern. Med.*, 76, págs. 537-540, 1972.

TANAKA, T.: IKEMURA, K, TSUNODA, M., SASAGAWA, I, MITSUHASHI, S.: Drug resistance and distribution of R factors in *Salmonella* strains. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 9, págs. 61-64, 1976.

THRELFALL, E.J., WARD, L.R., ROWE, B.: Spread of multiresistant strains of *Salmonella typhimurium* phage types 204 and 193 in Britain. *Br. Med. J.*, 2, 997, 1978.

TIMMIS, K.N. PUHLER, A. Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Ed. Elsevier-North-Holland Biomedical Press. 1979.

TIMONEY, J.F.: The epidemiology and genetics of antibiotic resistance of *Salmonella typhimurium* isolated from diseased animal in New York. *J. Infect. Dis.*, 137, págs. 67-73, 1978.

VAN LEEVWEN, W.J., VAN EMBDEN, J., QUINEE, P., KAMPELMACHER, E.H., MANTEN, A., VAN SCHOTHORST, M., VOOGD, C.E.: Decrease of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 16, págs. 237-239, 1979.

VOOGD, C.E., QUINEE, P., MANTEN, A., VALKENBURG, J.J.: Incidence of resistance to tetracycline, Chloranphenicol and Ampicillin among *Salmonella* species isolated in the Netherlands in 1969, 1970 and 1971. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 39, págs. 321-329, 1973.

WASHINTONG II, J.A., BARRY, A.L.: Dilution tests procedures. En "Manual of Clinical Microbiology". Ed. ASM. Washington. D.C., 1974.

WATANABE, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Rev.*, 27, págs. 87-93, 1973.

WATANABE, T., NISHIDA, H., OGATA, C., ARAI, T., SATO, S.: Episome-Mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae* VII. Two types of naturally occurring R factors. *J. Bacteriol.*, 88, págs. 716. 1964.

WILLETTS, N.S.: Genetics of conjugation. En "R-Factors. Drug resistance Plasmid". Ed. University Park Press. Tokyo, 1977.

WILLSHOW, G.A., SMITH, H.R., ANDERSON, E.S.: Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmids DNA in drug resistant *Enterobacteria*. *J. Gen. Microbiol.*, 114, págs. 15-23, 1979.

WINSHELL, E.B., CHERUBIN, C., WINTER, J., NEU, H.C.: Antibiotic resistance of *Salmonella* in the Eastern United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1969, págs. 86-89, 1969.

YOSHIDA, Y., TERAWAKI, Y., NAKAYA, R.: Temperature sensible R plasmid originated from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, págs. 361-369, 1974.

YOSHIKAWA, M., SAKAI, K.: Facilitation of the transfer of R factor by the resident R factor. *J. Bacteriol.*, 102, págs. 285, 1970.

YOUMANS, G.P., PATERSON, P.Y., SOMMERS, H.M.: *The biologic and clinical basis of infectious diseases*. Ed. W.B. Saunders Co. London, 1975.

ZEMELMEN, R., FABRES, H., MONCADA, M.A.: β -lactamasa activity in a strain of Salmonella typhi. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8, págs. 243-245, 1981.

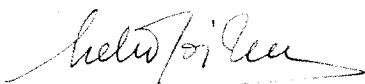
FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
ROSARIO INIGÜEZ OVANDO
titulada "Plásmidos R en el Género Salmonella"

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "cum
laude"

Sevilla, 9 de NOVIEMBRE de 1.984

El Vocal,



El Presidente,

El Vocal,



El Secretario,

El Vocal,



El Doctorado,

