

T.D. 175

B

UNIVERSIDAD LITERARIA DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIVERSOS FACTORES QUE
AFECTAN AL AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE
AGUAS. DETERMINACION DE RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS
Y SU TRANSMISION EN LAS CEPAS AISLADAS.

Elena Alcaide Moreno

1985



UMI Number: U607631

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607631

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.




ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

R. 18762335

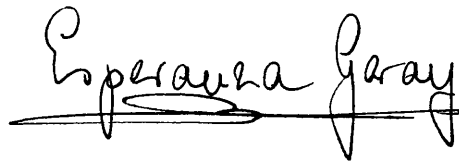
R. 4465

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIVERSOS FACTORES QUE
AFECTAN AL AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE
AGUAS. DETERMINACION DE RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS
Y SU TRANSMISION EN LAS CEPAS AISLADAS.

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
Elena Alcaide Moreno



Dirigida por la Dra. D^a Esperanza
Garay Aubán. Departamento de Micro-
biología.



Burjastt, Mayo de 1985



BURJASOT (Valencia)

Spain

Teléf. (96) 363 00 11

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

EDUARDO VICENTE PEDROS, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD LITERARIA DE VALENCIA,

CERTIFICO: Que Elena Alcaide Moreno ha realizado en el Departamento de Microbiología de esta Facultad el trabajo titulado "ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIVERSOS FACTORES QUE AFECTAN AL AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE AGUAS. DETERMINACION DE RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS Y SU TRANSMISION EN LAS CEPAS AISLADAS", que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y, para que así conste, extiendo el presente Certificado en Burjasot, a 15 de Mayo de 1985.

Prof. Dr. Eduardo Vicente Pedrós

He de hacer constar mi agradecimiento a la Dra. Esperanza Garay Aubán , Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de C.Biológicas, por la dirección de esta Tesis y por su valiosa orientación y ayuda constante durante la realización de la misma.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento al Dr. Sergio Ferrer i Soler y Daniel Ramón-Vidal, licenciado en C.Biológicas, por su orientación a la hora de realizar el aislamiento del ADN plasmídico.

Al Dr. Rafael Borrás, profesor del Dpto. de Microbiología de la Fac. de Medicina de Valencia, por su asesoramiento en la identificación serológica de las cepas estudiadas.

Al Dr. Federico Uruburu Fernandez, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Fac. de C.Biológicas y al Dr. Eduardo Vicente Pedrós Jefe del mismo Departamento por el apoyo prestado.

A Manuel Serra Galindo, licenciado en C.Biológicas por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

A Rosa Aznar Novella, licenciada en C.Biológicas, por su amistad, comprensión y colaboración en la realización de este trabajo.

A todos los miembros del Departamento que en algún momento me han brindado su apoyo y amistad, gracias

A Pepe

INDICE

Pag.

INTRODUCCION

I. EL GENERO SALMONELLA

1. ASPECTOS HISTORICOS.....	1
2. TAXONOMIA.....	5
2.1.Aspectos culturales.....	6
2.2.Caracteres bioquímicos.....	7
2.3.Caracteres antigénicos:Subdivisión en serotipos.....	8
3.HABITATS.EPIDEMIOLOGIA.....	15
3.1. <u>Salmonella</u> en el hombre.....	16
3.2. <u>Salmonella</u> en animales.....	23
4. SUPERVIVENCIA DE <u>SALMONELLA</u> EN AGUAS.....	24
5. PROBLEMATICA DE LA METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO DE <u>SALMONELLA</u>	27
5.1. Preenriquecimiento.....	28
5.2. Enriquecimiento selectivo.....	30
5.3. Temperatura de incubación.....	32
5.4. Medios sólidos delectivos.....	33

II. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIOTICOS.

PLASMIDOS DE RESISTENCIA

1. DESCUBRIMIENTO DE LOS FACTORES DE RESISTENCIA.....	35
2. RELACIONES ENTRE PLASMIDOS.CLASIFICACION.....	37
3. NATURALEZA MOLECULAR Y REPLICACION DE LOS PLASMIDOS DE RESISTENCIA.....	39
4. LA CONJUGACION BACTERIANA.....	42
5. MECANISMOS DE RECOMBINACION ILEGITIMA. SIGNIFICADO EVOLUTIVO.....	46
6. APARICION DE PLASMIDOS DE RESISTENCIA.EVOLUCION.....	49

7. PRESENCIA DE BACTERIAS CONTENIENDO PLASMIDOS EN LA NATURALEZA. IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA.....	51	
<u>OBJETO DEL TRABAJO Y PLANIFICACION.....</u>	57	
<u>MATERIAL Y METODOS</u>		
I. PUNTOS DE MUESTREO.DESCRIPCION..		
1. ALBUFERA.....	60	
2. ESTACION DEPURADORA.....	61	
II. MATERIAL		
1. MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION		
DE <u>SALMONELLA</u>	62	
1.1. Medios de preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo.....	62	
1.2. Solución de novobiocina sódica.....	63	
1.3. Medios sólidos selectivos de aislamiento.....	63	
1.4. Medios para la identificación de <u>Salmonella</u>	64	
1.5. Otros medios.....	64	
1.6. Reactivos.....	65	
1.7. Antisueros.....	66	
2. MEDIOS PARA PRUEBAS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA.....		66
2.1. Medio de Mueller-Hinton.....	66	
2.2. Medio LB.....	66	
2.3. Medio BTB-lactosa agar.....	67	
3. PRODUCTOS.....	67	
3.1. Implicados en la obtención del ADN plasmídico.....	67	
3.2. Colorantes.....	67	
3.3. Otros productos.....	68	
3.4. Soluciones de antibióticos.....	68	

	<u>Pag.</u>
4. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	69
 III. METODOS	
1. RECOGIDA DE MUESTRAS.....	70
2. PREENRIQUECIMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.....	70
3. PREENRIQUECIMIENTO Y TEMPERATURA DE INCUBACION.....	71
4. PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.....	72
4.1. Aislamiento.....	72
4.2. Identificación.....	73
5. ANALISIS ESTADISTICO.....	74
6. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.....	76
7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.....	76
8. TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA.....	77
9. AISLAMIENTO DEL ADN PLASMIDICO.....	78
9.1. Método de Godson y Vapnek.....	78
9.2. Método de Birnboim y Doly.....	80
9.3. Método de Kado y Liu.....	81
10. ESTIMACION DE LA PUREZA Y CONCENTRACION DEL ADN AISLADO.....	82
11. EXTRACCION DEL ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	83
12. TRATAMIENTO DEL ADN PLASMIDICO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.....	84
13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	85
14. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS PLASMIDOS.....	86
15. CURACION CON BROMURO DE ETIDIO.....	86

RESULTADOS Y DISCUSION

- I. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS FACTORES QUE AFECTAN
 EL AISLAMIENTO DE SALMONELLA

	<u>Pag.</u>
1. PREENRIQUECIMIENTO.....	88
2. CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.....	90
3. MEDIOS SOLIDOS SELECTIVOS.....	92
4. TEMPERATURA DEL AGUA.....	93
5. CARACTERISTICAS DEL PUNTO DE MUESTREO.....	94
6. TRATAMIENTO ESTADISTICO.....	96
II. ESTUDIO CUANTITATIVO DE <u>SALMONELLA</u> , COMPARANDO DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO.....	101
III. CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS AISLADAS.....	106
IV. DETERMINACION DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS Y SU TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS AISLADAS	
1. DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.....	111
2. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.....	113
3. TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA.....	114
V. AISLAMIENTO DE PLASMIDOS DE RESISTENCIA	
1. CURACION CON BROMURO DE ETIDIO.....	117
2. DETECCION DE PLASMIDOS.....	119
3. TRATAMIENTO DEL PLASMIDO DE RESISTENCIA A TETRACICLINA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.....	122
<u>CONCLUSIONES</u>	125
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	129
<u>APENDICE ESTADISTICO</u>	156

INTRODUCCION

I. EL GENERO SALMONELLA

1. ASPECTOS HISTORICOS

La fiebre tifoidea ha existido como tal desde la época de Hipócrates, sin embargo la primera descripción precisa corresponde a Thomas Willis of Wiltshire, en Inglaterra, hacia el año 1659. En la época moderna ha sido responsable de frecuentes y graves epidemias en campos de batalla y grandes núcleos de población, propagándose a través de aguas y alimentos contaminados.

En 1739, John Huxham de Devon, distinguió dos tipos de fiebres entéricas: pútidas malignas (tifus) y lentas nerviosas (fiebres tifoideas). Los médicos franceses describieron a principios del siglo XIX, el hinchamiento y ulceración de las placas de Peyer y la hipertrofia de los ganglios linfáticos mesentéricos, aparecidos en pacientes muertos a causa de la denominada "fiebre mucosa" (Prost, 1804).

Aunque los patólogos ya habían observado las características ulceraciones intestinales, especialmente en la proximidad del "cecum" (Petit y Sarres, 1813), no se distinguió claramente entre fiebre entérica y tuberculosis intestinal hasta que Pierre Bretonneau, de Tours, describió, en 1822, la enfermedad por él denominada dothienteritis (del griego dothien:

lesión epidérmica localizada), como una manifestación clínica específica causada por un agente determinado, aunque desconocido. Hasta aquel momento se había considerado posible que todas las afecciones febriles correspondían a una misma enfermedad, con síntomas y manifestaciones que variaban de paciente a paciente, dependiendo de las circunstancias particulares de la enfermedad. Poco después Pierre Louis (1829), agrupó a los distintos aspectos correspondientes a la fiebre entérica bajo la denominación "fiebre tifoidea". El término tifus, derivado del griego (estupor) ya había sido usado en relación con la fiebre entérica desde su introducción por de Sauvages en 1759.

Los términos tifus y tifoidea continuaron sin embargo confusos y no claramente delimitados, hasta que en 1837, William Gohard de Filadelfia y el médico inglés Sir William Jenner, en 1849, escribieron elocuentes monografías separando ambas enfermedades. Jenner pudo aplicar su propia experiencia personal, ya que en el transcurso de su investigación, él mismo contrajo ambas infecciones.

Una vez establecidos y definidos ambos términos, se iniciaron los estudios referentes a su epidemiología y patogénesis. Piedvache en Francia (1849) y Murchinson en Inglaterra (1858), demostraron que la fiebre tifoidea era una enfermedad contagiosa. Murchinson opinaba que se debía a una "corrupción" no específica del aire y agua que, una vez contraída, podía a su vez ser transmitida por ingestión de aire, agua o alimentos que habían estado en contacto con una persona infectada. El inglés William Budd, de Devon, realizó un estudio

profundo de un brote epidémico aparecido en Cowbridge en 1853. Rechazando la teoría de la generación espontánea, opinó que la fiebre tifoidea se originaba a partir de un caso anterior y que se diseminaba una toxina específica con las heces del enfermo. Pettenkofer (1868) teorizó sobre el papel de las aguas del subsuelo y se preocupó de las mejoras en los sistemas de abastecimiento de aguas y de las regulaciones acerca de los alimentos derivados de animales acuáticos.

La primera observación del bacilo tifoideo corresponde a C.J. Eberth en 1880, en secciones de ganglios linfáticos y bazo correspondientes a enfermos muertos de fiebre tifoidea. Robert Koch (1880), confirmó el descubrimiento y G.Gaffley, un cirujano de campaña ruso, consiguió cultivar al microorganismo en cultivo puro. Por aquel entonces y debido a la ausencia de caracteres diferenciales, resultaba muy incierta la separación de este microorganismo del resto de las bacterias entéricas, hasta que en 1896, Durham, Pfeiffer y Kolle, demostraron que el suero procedente de un animal inmunizado con el bacilo tifoideo, producía una aglutinación frente al mismo tipo de bacilo. Independientemente, Widal en París (1896) y Grunbánnm en Londres (1896), demostraron que el suero procedente de pacientes afectados aglutinaba a los bacilos tifoideos, abriéndose de este modo el vasto campo del serodiagnóstico.

La primera vacuna antitífica fue preparada por Sir Almroth Wrigth a partir de bacterias destruidas por el calor, y se utilizó para inmunizar a más de 3000 soldados en la India en 1898. Se produjo un espectacular descenso de 8.9 a 2.3 casos de

fiebre tifoidea por mil. Sin embargo se dieron algunos casos fatales , en que la enfermedad se contrajo a pesar de la vacunación. Achard y Bensande (1896) aislaron cepas de pacientes con fiebres tifoideas , que sin embargo dieron una reacción serológica negativa, segun la técnica de Widal. Denominaron a esta infección, fiebre paratifoidea y "bacillo paratifico" al agente responsable. En otro caso similar, descrito por Gwyn (1898), se denominó al microorganismo responsable "paracoli bacillus". Schottmüller (1901), confirmó que ambos microorganismos, aunque responsables de casos clinicos de fiebre tifoidea, eran distintos del bacilo tifico tipico, tanto culturalmente como serológicamente. Denominó al primero de ellos "paratífus A" y al segundo "paratífus B". Habia aparecido un nuevo grupo de enfermedades causadas por bacterias muy similares.

Efectivamente, en 1925, apareció un grave brote entre las tropas británicas de la península de Gallipoli, que habian sido vacunadas contra la fiebre tifoidea original. De este modo se procedió al reforzamiento de las vacunas ya existentes con los nuevos tipos paratíficos A y B.

El análisis antigénico comenzó cuando Castellani describió, en 1902, un método para absorber antisueros, se diferenciaron los antígenos somáticos y flagelares (Smith y Reagh, 1903) que se denominaron respectivamente O yH (Weil y Felix, 1918a,b,1920). Andrews (1922,1925) demostró que a su vez los flagelares podian ser difásicos, más tarde Felix y Pitt (1934), observaron un antígeno de superficie (Vi) que podia prevenir la aglutinación del bacilo tifico.

Ya habían sido aisladas bacterias similares a las paratíficas, a partir de animales infectados. Salmon y Smith en 1885, aislaron "Bacillus cholera-suis" de cerdos afectados de cólera porcino. Otras fueron aisladas a partir de cuadros de intoxicación alimentaria (Gaffky y Paak, 1885; Gärtner, 1888) o animales afectados (Loeffler, 1892). Se creó un Género bacteriano para incluir a todos los microorganismos, denominado "Salmonella" por Lignières en 1900, en honor a D.E. Salmon (Salmonella subcommittee, 1934). Gracias a los estudios de White (1925) y Kauffmann (1930), se estableció la clasificación serológica que lleva su nombre y que fué posteriormente desarrollada en extenso por Kauffmann (1966, 1978). El esquema antigénico de Kauffmann-White contenía 100 serotipos en 1941 (Kauffmann, 1941). En 1978 dicho esquema contenía aproximadamente 2.000 serotipos.

Las fiebres tifoideas han constituido un estudio que ha atraído, durante varias décadas, el interés de un gran número de investigadores, que han abordado aspectos tan variados como la bacteriología, taxonomía, higiene, epidemiología, inmunología y patogeneidad.

2. TAXONOMIA.

El Género Salmonella pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, móviles por flagelos peritricos, generalmente, o inmóviles, que no forman endosporas o microcistos y no son

ácido-alcohol resistentes. Reducen los nitratos a nitritos, con algunas excepciones, son catalasa positivos, con dos excepciones, y oxidasa negativos. Poseen metabolismo quimioorganotrofo, respiratorio y fermentativo. Crecen bien sobre peptona, extracto de carne y medio McConkey, algunas crecen sobre D-glucosa como única fuente de carbono, otras requieren vitaminas y/o aminoácidos. No son halófilas y producen ácido y frecuentemente gas, a partir de diversos carbohidratos y polialcoholes. Estudios de hibridación ADN / ADN, han revelado una elevada homología entre los Géneros de la Familia (Figura 1).

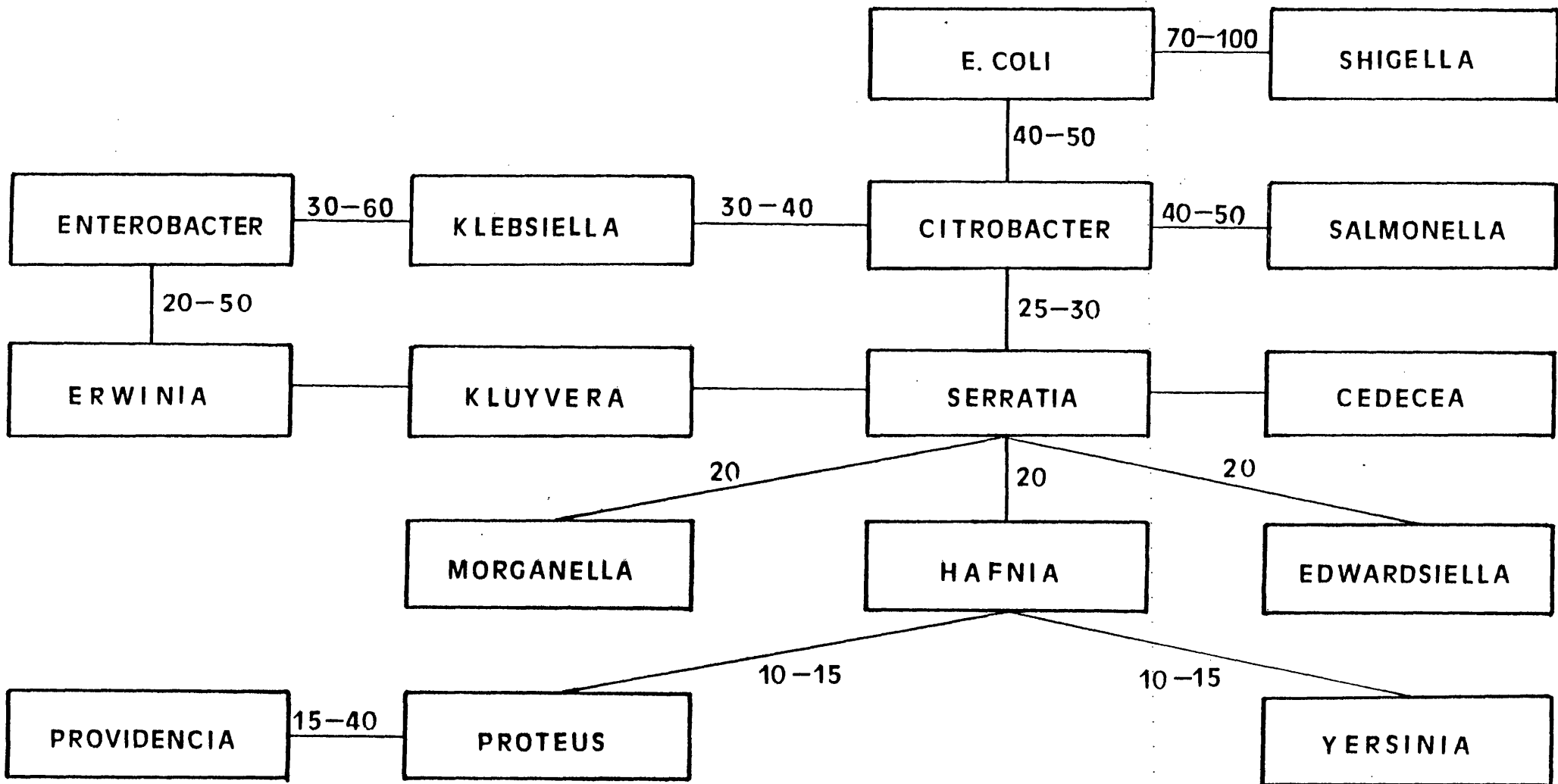
Las enterobacterias son de habitat originalmente intestinal, excepto un Género (Erwinia), incluyen miembros tradicionalmente considerados como patógenos y otros con carácter patógeno oportunista, asociados normalmente con infecciones gastrointestinales. Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua, vegetales, frutas, cereales y todo tipo de animales, desde los insectos hasta el hombre. Algunos Géneros son importantes patógenos de vegetales.

Las salmonellas cumplen los requisitos descritos para la Familia Enterobacteriaceae. Son generalmente móviles por flagelos peritricos, a excepción de un serotipo aviar (Salmonella pullorum-gallinarum), que es inmóvil, o de mutantes no flagelados procedentes de cepas normalmente móviles.

2.1. Aspectos culturales .

Después de 18-24 horas de incubación, las colonias de

Figura 1. Relaciones ADN/ADN entre los miembros de la Familia Enterobacteriaceae, indicando el porcentaje de hibridización (Reproducido del Manual Bergey's of Systematic Bacteriology)



Salmonella , presentan un diámetro de 2 a 4 mm, aunque algunos tipos dan lugar a colonias "enanas". En algunos casos aparecen, al cabo de varios días de cultivo, formas mucosas, pero este tipo de colonias suele desaparecer al cabo de algunos meses de conservación. Es raro aislar de los cultivos cepas R, a excepción de los procedentes de muestras ovinas, en donde predomina esta última forma.

La mayoría de salmonellas producen gas a partir de la glucosa y son prototrofas. Las cepas auxotrofas suelen corresponder a serotipos en los que el poder patógeno está restringido a un huésped particular, como Salmonella typhi , Salmonella paratyphi A, Salmonella sendai , propias del hombre; Salmonella abortus-ovis , exclusivo de los óvidos y Salmonella pullorum-gallinarum en las aves.

2.2. Caracteres bioquímicos .

Las principales características aparecen en la Tabla I . Las más sobresalientes son:

-La producción de SH_2 sobre agar con hierro de Kligler o agar triple-azúcar-hierro, por parte de la mayoría de serotipos.

-la utilización de citrato como única fuente de carbono.

-la mayoría poseen lisina y ornitina descarboxilasa.

-carecen de ureasa.

-no desaminan el triptófano ni la fenilalanina.

Tabla I. Características bioquímicas de los principales Subgéneros de Salmonella

	Subgénero I	Subgénero II	Subgénero III	Subgénero IV
Indol	-	-	-	-
Rojo Metilo	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	+	+
SH ₂ (en agar TSI)	+	+	+	+
Urea de Christensen	-	-	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	d	+	(+)	d
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina (22°C)	-	-	-	-
Crecimiento en KCN	-	-	-	+
Utilización del Malonato	-	+	+	-
Acido a partir de glucosa	+	+	+	+
Gas a partir de glucosa	+	+	+	+

Tabla I. (continuación)

	Subgénero I	Subgénero II	Subgénero III	Subgénero IV
Lactosa	-	-	d	-
Sacarosa	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	-	-
Salicina	-	-	-	d
D-Adonitol	-	-	-	-
Inositol	d	(-)	-	d
D-Sorbitol	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-
L-Ramnosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+
Celobiosa	-	-	-	(-)
α -metil-D-glucósido	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	-	-	-	-

Tabla I. (continuación)

	Subgénero I	Subgénero II	Subgénero III	Subgénero IV
Melibiosa	+	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	-
Mucato	+	+	d	-
Lipasa	-	-	-	-
Desoxirribonucleasa a 25°C	-	-	-	-
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-
Pigmento amarillo	-	-	-	-
D-Manosa	+	+	+	+

+: prueba positiva para el 90-100% de las cepas; -: prueba positiva para el 0-10% de las cepas

(+): prueba positiva para el 76-89% de las cepas; (-): prueba positiva para el 11-25% de las cepas

d: prueba positiva para el 26-75% de las cepas

-normalmente no fermentan sacarosa, salicina, inositol y amigdalina.

-no producen lipasas ni desoxirribonucleasas.

La primera edición del Manual Bergey's de sistemática bacteriológica (1984), no contempla ya la subdivisión de la familia Enterobacteriaceae en Tribus, que sí aparecía en ediciones anteriores. La séptima edición del Manual Bergey's, incluía los Géneros Salmonella y Shigella en la Tribu Salmonellae; la octava edición (1974), ya no contenía tal Tribu, quedando ambos Géneros incluidos en la Tribu Escherichiae. Las nuevas aportaciones taxonómicas han desaconsejado el mantenimiento de las Tribus (Brenner, 1984). Se mantiene la subdivisión del Género Salmonella en varios subgéneros de Kauffmann (1960, 1963a, 1964), basados en caracteres bioquímicos (Tabla II). A los 4 ya establecidos se ha añadido recientemente un subgénero V (Le Minor, 1984), propuesto por Le Minor, Verón y Popoff (1982).

El porcentaje en bases G+C del Género oscila entre 50-52 mol% (Marmur, Falkow y Mandel, 1963), similar a Escherichia, Shigella y Citrobacter. Todas las cepas pertenecientes a Salmonella presentan al menos un 80 % de similitud en la secuencia polinucleotídica.

2.3. Caracteres antigénicos: subdivisión en serotipos

Las salmonellas, como todas las enterobacterias, pueden poseer tres tipos de antígenos: somáticos (O), superficiales o

Tabla II . Características diferenciales de los Subgéneros de Salmonella.

	Subgénero				
	I	II	III	IV	V
β -gactosidasa (prueba del ONPG)	-	- ó x	+	-	+
Producción de ácidos a partir de:					
Lactosa	-	-	- ó x	-	-
Dulcitol	+	+	-	-	+
Mucato	+	+	d	-	+
Galacturonato	-	+	d	+	+
Utilización de:					
Malonato	-	+	+	-	-
d-Tartrato	+	- ó x	- ó x	- ó x	-
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+	+	-
Crecimiento con KCN	-	-	-	+	+
Habitat de la mayoría de las cepas:					
Animales de sangre caliente	+	-	-	-	-
Animales de sangre fría y ambiente	-	+	+	+	+

Símbolos: +, positivo para el 90% o más de las cepas en 1-2 días; d, positivo para el 11-89% de las cepas en 1-2 días; -, positivo para el 0-10% de las cepas en 1-2 días; x, lenta e irregularmente positivo (de 3 a 7 días).

capsulares (Vi) y flagelares (H).

A) Los antígenos somáticos o de la pared celular, son termoestables y alcohol resistentes. La especificidad viene determinada por el componente polisacárido del complejo lipopolisacárido-proteína, que presenta caracter de endotoxina. Se han determinado numerosos factores antigénicos O, reflejados por números, de los cuales 67 se utilizan en el serodiagnóstico. Todos los factores O designados por un mismo símbolo son muy similares, aunque no siempre antigenicamente idénticos. A su vez se clasifican en: mayores, antígenos que identifican el correspondiente grupo O (por ejemplo el factor O:4, caracteriza el grupo B de Salmonella) y que son determinados por el locus rfb , situado a 66 min. del mapa cromosómico de S. typhimurium LT2, entre his y metG . Los antígenos menores, no poseen apenas valor discriminante (por ejemplo todas las cepas de Salmonella pertenecientes a los grupos O:A, B y D, tienen el antígeno O:12)

Otros antígenos somáticos menores provienen de modificaciones químicas de antígenos mayores y por ello pueden no tener la misma importancia que ellos como herramienta taxonómica. Estas modificaciones pueden consistir en acetilaciones de azúcares pertenecientes al complejo polisacárido o deberse a conversiones fágicas, pudiendo darse efectos acumulativos, como en el caso de las salmonellas pertenecientes al grupo E, en el cual la presencia del fago ϵ_{15} , convierte la fórmula 3,10 (ramnosa-manosa-acetil galactosa- α -manosa) en 3,15 y el fago ϵ_{34} , convierte a la 3,15 (ramnosa-manosa-galactosa- β -manosa), en

la 3,15,34 (adición de glucosa a la galactosa). De este modo, S. anatum pasa a denominarse S. newigton y ésta a su vez S. minneapolis . Ejemplos similares se dan con bastante frecuencia en el esquema de Kauffmann-White (Le Minor, 1984). Para reconocerlos, todos los factores antigénicos asociados a conversiones fágicas aparecen subrayados en dicho esquema. En otros casos, la lisogeneización, da lugar a cambios en la fórmula antigénica O, que no producen modificaciones en la denominación del correspondiente serotipo (por ejemplo en los grupos A, B y D la presencia del antígeno O:1 puede faltar. Así, la denominación S. typhimurium se da tanto en las cepas "1 + " como en las cepas "1 - "). Los fagos responsables de estas conversiones en Salmonella son todos idénticos en morfología (Vieu y cols., 1965), pero su acción está limitada a ciertos grupos O y son diferentes serológicamente entre ellos (Le Minor, 1968).

La pérdida de la capacidad de sintetizar las cadenas polisacáridicas completas da lugar a las formas R. Se han descrito varios estados R debidos a diferentes mutaciones y conversiones fágicas (Stocker y Mäkelä, 1971, 1978; Lüderitz y cols., 1971). El cambio de las formas S a R, da lugar a una pérdida de la patogeneidad y carácter autoaglutinable de las cepas. También se han descrito formas T₁ y T₂ , intermedias entre S y R (Kauffmann, 1956, 1957).

B) Antígenos superficiales o capsulares. Estos antígenos, comunes en otros géneros como Escherichia y Klebsiella , se presentan en algunos serotipos de Salmonella . Los antígenos capsulares pueden enmascarar a los somáticos, para

lo cual se pueden someter las cepas a un calentamiento a 100°C, que los solubiliza y desenmascara a los O. Solamente se conoce un antígeno de este tipo en Salmonella, el Vi, y se da únicamente en tres serotipos: S.typhi, S.paratyphi C y S. dublin (Le Minor, 1981). Las cepas pertenecientes a estos serotipos, pueden presentarlo o carecer de él. La presencia de antígenos Vi está controlada por los genes Vi A y Vi B, situados a 69 y 137 min. respectivamente, en el mapa cromosómico de S.typhimurium (Sanderson, 1972).

C) Antígenos flagelares. Los flagelos son polímeros de flagelina, molécula de proteína cuya composición en aminoácidos es constante para cada tipo antigénico. Son termolábiles y producen una aglutinación rápida y débil, frente a los correspondientes antisueros. La presencia de los flagelos y su movilidad está controlada por numerosos genes (fla y mot), situados a 48 y 62 min. en el mapa cromosómico de S.typhimurium. Unos pocos serotipos (S.enteritidis, S.typhi), solo producen un antígeno flagelar, se dice entonces que el antígeno H es monofásico. La mayoría sin embargo pueden producir alternativamente dos antígenos H, se habla entonces de antígenos flagelares difásicos. Por ejemplo S.typhimurium puede producir flagelos con el antígeno "i" ó con "1,2". Todas las células que produzcan el "i", darán lugar a clones conteniendo este antígeno, sin embargo aparecerán con una frecuencia de 10^{-3} - 10^{-5} , células con los antígenos 1 y 2. Se puede utilizar el antisuero específico anti-i o anti-1,2 para obtener la fase opuesta 1,2 ó i respectivamente. Esto se conoce como inversión de

fase y permite la selección de bacterias con la fase flagelar distinta del antisuero empleado, tratándose de una técnica ampliamente utilizada para la identificación completa de los serotipos de Salmonella. Añadiéndose conjuntamente los dos tipos de antisueros, para las dos fases flagelares, a un medio semisólido, se obtiene la inmovilización completa del microorganismo.

El gen responsable de la producción de la fase 1 del antígeno flagelar, es el H_1 , que se encuentra en el minuto 62 sobre el mapa cromosómico de Salmonella. El H_2 y el vh_2 , responsables de la fase 2 y la variación de fase respectivamente, se encuentra ambos en el minuto 83. Algunos serotipos (S.paratyphi A, S.abortus-equi), son monofásicos debido a que el gen vh_2 no es funcional (Le Minor, 1971).

Los antígenos flagelares, de la fase 1, fueron originalmente designados por letras minúsculas y los de la fase 2, o no específicos, por números. Una vez agotado el alfabeto, se empleó la letra z con subíndices (se conoce hasta la z_{61}). Posteriormente y debido a la complejidad antigénica, se añadieron letras a la fase 2. De este modo se conocen en la actualidad algo más de 2.000 combinaciones antigénicas para Salmonella, recogidas en el ya mencionado esquema de Kauffmann-White (Le Minor, 1984).

D) Biovariedades (o biotipos). Dentro de una misma serovariedad existen cepas que muestran diferentes pautas de fermentación de azúcares. Estas variaciones, que constituyen las biovariedades, están determinadas por la presencia o ausencia de

enzimas y pueden servir como marcadores o presentar importancia epidemiológica (por ejemplo las cepas xilosa+ y xilosa- de S.typhi).

La taxonomía del Género Salmonella , presenta en la actualidad numerosos problemas aun no satisfactoriamente resueltos (Le Minor, 1984). Si se acepta el principio de que dos bacterias que presentan un parentesco del 70% o superior, mediante estudios de hibridación ADN/ADN, pertenecen a la misma genoespecie, el denominado "Género" Salmonella es en realidad, una especie (Crosa y cols., 1973), que comprende 5 subgéneros (los 5 subgéneros ya mencionados), es decir, 5 subespecies. Ello haría necesario encontrar un nombre aceptable para la especie tipo de cada una de las 5 subespecies. Sin embargo, los esquemas actualmente en uso no son fáciles de cambiar hacia un sistema racional y ajustado a las nuevas normas de nomenclatura (Brenner, 1978). Existen numerosos nombres de Salmonella , que no se ajustan a las normas actuales de nomenclatura, ya que originalmente se hizo referencia a la enfermedad que producían o al tipo de animal del que se aislaron por primera vez (S.typhi, S.paratyphi A, S.cholerasuis , S.typhimurium , S.abortusovis). Estas denominaciones siguen vigentes hoy en día en bacteriología clínica, aunque las denominaciones antiguas no son totalmente correctas, al haberse encontrado un mayor espectro de huéspedes para muchas de ellas. La nomenclatura posterior tuvo en cuenta la localización geográfica del primer aislamiento (S.london , S.panama , S.stanleyville) y más recientemente, los nuevos tipos pertenecientes a los Subgéneros II, III y IV

(descritos a partir de 1966), se han designado simplemente por su fórmula antigénica.

Se han propuesto diferentes clasificaciones en especies a lo largo de la historia, así Borman, Stuart y Wheeler, en 1944, propusieron la división del Género en 3 especies: S. choleraesuis (especie tipo), "S. typhosa" (S. typhi) y "S. kauffmannii", esta última incluyendo a todos los restantes serotipos. Kauffmann y Edwards (1952), mantuvieron las 2 primeras pero designaron a la tercera "S. entérica", con la misma finalidad. Ewing (1966), también se adhirió al mantenimiento de las tres especies, de tal modo que S. enteritidis incluyera todas las serovariedades que no fueran S. typhi o S. choleraesuis . Posteriormente (Le Minor y cols., 1970) se propuso elevar los subgéneros de Kauffmann a la categoría de especies : "S. kauffmannii " (Subgénero I) , S. salamae (Subgénero II) , S. arizonae (Subgénero III) y "S. houtenae" (Subgénero IV). Dentro de cada una aparecerían las serovariedades o fórmulas antigénicas. El mismo Kauffmann (1971, 1973), desechó todas las propuestas anteriores y definió la especie como " un grupo de fagotipos serofermentativos relacionados" , en su "Realität theorie " (1978).

Muy recientemente y en base a extensos estudios de taxonomía numérica y relaciones ADN/ADN, Le Minor, Véron y Popoff (1982), han propuesto los siguientes cambios en la nomenclatura de Salmonella :

El Género consistiría en una única especie, S. choleraesuis , que comprende 6 subespecies:

- a) cholerasuis, correspondiente al anterior Subgénero I.
- b) salamae, correspondiente al anterior Subgénero II.
- c) arizonae, correspondiente a las serovariedades monofásicas del Subgénero III.
- d) diarizonae, correspondiente a las serovariedades difásicas del Subgénero III.
- e) houtenae, correspondiente al Subgénero IV.
- f) bongori, constituido por cepas positivas para el dulcitol, ONPG y KCN.

Cada subespecie tendria su correspondiente cepa tipo.

3. HABITATS. EPIDEMIOLOGIA.

El habitat principal de Salmonella lo constituye el tracto intestinal del hombre y animales. Las salmonellas pueden estar adaptadas a un huésped particular, tener un amplio espectro de huéspedes o presentar habitats aún desconocidos.

Los serotipos propios de huéspedes particulares normalmente producen enfermedades que cursan con bacteriemia y no crecen sobre medios mínimos sin factores de crecimiento. S.typhi, S. paratyphi A y S. sendai, son serotipos estrictamente humanos. En estos casos la enfermedad se transmite de persona a persona a través de alimentos o material fecal contaminado. S. gallinarum-pullorum, S. abortus-ovis y S. typhi-suis son serotipos aviarios, ovinos y porcinos.

Los serotipos ubicuos de Salmonella (como S.

typhimurium) producen síntomas clínicos muy diversos, desde infecciones asintomáticas leves hasta cuadros graves muy similares a las fiebres tifoideas, especialmente en niños o animales altamente susceptibles, siendo responsable de la mayoría de las toxiinfecciones de origen alimentario en adultos.

Algunas salmonellas se localizan en determinadas regiones geográficas (S. sendai en los países del Oriente, S. berta en Norteamérica). Las cepas pertenecientes a los Subgéneros II y III, proceden generalmente del contenido intestinal de animales poiquiloterms y rara vez de homeoterms, a diferencia del Subgénero I . Las cepas de los Subgéneros IV y V, muestran una procedencia fundamentalmente ambiental y son raramente patógenas para el hombre. La mayor parte de las salmonellas registradas en los Centros Nacionales de Referencia de los distintos países pertenecen al Subgénero I.

En la mayor parte de los casos, los cultivos de Salmonella aislados a partir de animales de sangre caliente, para los cuales son frecuentemente patógenas, pertenecen al Subgénero I. Por el contrario, cepas aisladas de animales de sangre fría, son normalmente de los Subgéneros II y III y parecen no solo tener su patogeneidad disminuida, sino incluso formar parte de la flora intestinal normal de estos animales (Le Minor y Véron, 1982).

3.1. Salmonella en el hombre

La acción patógena de Salmonella depende del

serotipo, la cepa, la dosis, las condiciones del medio y el estado de salud del huésped. Algunos serotipos son muy patógenos para el hombre, siendo otros prácticamente inoocuos.

La cantidad de salmonellas necesaria para producir la infección varía en función de los factores citados, pero oscila entre 10^5 y 10^9 (Le Minor, 1984). Evidentemente esta dosis se rebaja en el caso de niños de corta edad, pacientes inmunodeprimidos o afectados por enfermedades de la sangre. Factores locales gastrointestinales, tales como la acidez gástrica, parecen influir en el número de microorganismos viables; el bajo pH les es claramente desfavorable. Enfermedades gástricas (o gastrectomías), que modifican las condiciones normales, por ejemplo disminuyendo la acidez, han sido asociadas con infección por salmonellas (Yoshikawa y cols., 1980). La alteración de la flora intestinal por administración oral de antibióticos, puede ser la causa de una infección debida a un bajo inóculo. La edad parece asimismo un factor importante en la epidemiología de las salmonelosis. La mayoría de las infecciones por salmonellas no tíficas, se dan en niños de edades inferiores a 5 años y especialmente a 1 año (Yoshikawa y cols., 1980). Esta elevada predisposición parece estar relacionada con la alta frecuencia de contaminación fecal-oral, disminuida actividad antibacteriana de la flora intestinal o de la inmadurez de los sistemas inmunitarios. La alteración de los sistemas inmunitarios celulares o humorales, o ambos, parece otro factor de predisposición hacia la enfermedad, aunque persisten incertidumbres acerca de si son estas alteraciones la causa

desencadenante, o su asociación con tratamientos quimioterápicos, radioterápicos, quirúrgicos y hemolíticos. La hemólisis reviste particular importancia, ya que hemoglobinopatías, tales como malaria y bartonellosis, han sido relacionadas con una mayor incidencia de infecciones por Salmonella (Foote y Hook, 1979). Las infecciones por Schistosoma, también se han asociado a un aumento en las salmonelosis, localizándose en este caso la bacteria, aparentemente, en el interior del tegumento de los Schistosoma maduros (Rocha y cols., 1971; Lo Verde y cols., 1980). Finalmente, las afecciones crónicas de la vesícula biliar, particularmente la colelitiasis, favorecen el desarrollo de un estado portador crónico de Salmonella, con excreción biliar persistente del microorganismo.

Las salmonellas forman parte de las bacterias enteropatógenas invasivas. Tras una destrucción del borde en cepillo de las células intestinales, las bacterias penetran en las células por una invaginación de la membrana, llegando poco a poco a la lámina propia. La multiplicación microbiana en las zonas de penetración causa lesiones ulcerativas. El mecanismo de la pérdida de líquido no está totalmente aclarado, se puede suponer que resulta de la estimulación de la adenil-ciclasa por las prostaglandinas, sintetizadas después de la reacción inflamatoria, a nivel de la mucosa. El argumento en favor de esta hipótesis es que la indometacina, que inhibe la síntesis de prostaglandinas, inhibe también la secreción de líquido intestinal, al menos en infecciones experimentales en ratones con S.typhimurium.

La patogenia de la fiebre tifoidea podria ser la siguiente: después de haber pasado la barrera intestinal, las bacterias llegan al nivel de los ganglios mesentéricos, donde se multiplican. Una parte de la población bacteriana pasa, por via linfática, a la corriente sanguínea, lo que explicaria la septicemia. Otra parte de la población se lisa, liberando el lipopolisacárido tóxico, que transportado por via sanguínea llegará al simpático abdominal, provocando la ulceración de las placas de Peyer. Transportada a nivel de los ventriculos cerebrales, la endotoxina, provocará el abatimiento, el "tuphos", que ha hecho dar su nombre a la fiebre tifoidea (Le Minor y Véron, 1982).

Además de la fiebre tifoidea, causada por S. typhi y otros cuadros similares, designados generalmente fiebres paratifoideas, originados por otros serotipos, fundamentalmente S.paratyphi A , B o C , u otros, existen numerosos cuadros clinicos producidos por salmonellas, designados globalmente salmonellosis o enterocolitis (gastroenteritis), que pueden aparecer ya a las 8 horas después de la ingestión del microorganismo y que se caracterizan por las náuseas vómitos, dolores musculares, cefaleas, fiebre, escalofrios, diarrea intensa y dolores abdominales (Yoshikawa y cols, 1980).Se trata en este caso de infecciones intestinales agudas pero localizadas, en donde se da invasión del epitelio intestinal sin destrucción importante de la mucosa. Aunque pueden alcanzar gravedad, debido basicamente a la deshidratación y desequilibrio electrolitico, llegando al choque hipovolémico, pérdida de sangre por las heces,



dilatación tóxica del colon e incluso bacteremia, normalmente remiten espontáneamente, sin requerir terapia antimicrobiana, recomendándose la dieta de rehidratación oral (OMS). El tratamiento en cada caso particular depende de la gravedad de la infección y de las posibles complicaciones, quedando a juicio del médico.

Después de la curación clínica puede persistir una excreción de Salmonella por el paciente, que puede alargarse hasta más de un año, denominándose en este caso como estado portador crónico. Este hecho es más frecuente tras una infección tifoidea, aunque puede darse también tras infecciones producidas por otros serotipos distintos de S.typhi (Musher y Rubenstein , 1973). Los portadores asintomáticos suponen un peligro para la salud pública ya que aproximadamente un 5% de los pacientes clínicamente curados, pueden continuar eliminando Salmonella en las heces. Si se tiene en cuenta que el microorganismo puede sobrevivir a los tratamientos de depuración de aguas residuales, cuando estos no llevan incorporado un tratamiento específico de desinfección y que en muchos casos ni siquiera se da la depuración primaria o secundaria de estos efluentes, se entiende el gran riesgo que significa la existencia de estos portadores sanos entre la población.

Un típico ejemplo del ciclo de las salmonellas hasta llegar nuevamente al hombre, sería el siguiente:

Las aguas residuales de una población son tratadas en una planta depuradora, cuyo efluente es vertido a un área costera donde viven organismos filtradores (ostras, moluscos en general).

Estos concentran a las bacterias y son ingeridos por el hombre, insuficientemente cocinados o incluso crudos, causando la infección correspondiente. Este ciclo se ha comprobado utilizando marcadores epidemiológicos, tales como fagos (Rische, 1973). Las salmonellas no parecen multiplicarse en los moluscos contaminados, pero su número en ellos puede llegar a provocar la infección dado que estos organismos filtran varios litros de agua por hora.

La incidencia de la fiebre tifoidea desciende al aumentar el nivel de desarrollo de un país (control de los sistemas de depuración de aguas, pasteurización de leche y derivados, etc.). La ausencia de medidas higiénicas favorece la contaminación fecal del agua y alimentos y, por tanto, la incidencia de las fiebres tifoideas. Por el contrario, las infecciones por Salmonella de origen alimentario producidas por serotipos ubicuos, van en continuo aumento, permaneciendo su incidencia elevada aun en países desarrollados.

Salmonella puede asociarse a cualquier tipo de alimentos, relacionándose especialmente con abastecimientos a grandes cantidades de individuos, debido a contaminación primaria o secundaria.

La salmonellosis en el hombre aumenta continuamente, en la Republica Federal de Alemania, el número de casos registrados en 1978, fue de 33.251, frente a 5.000 en 1965, este número se había duplicado ya en 1970. El aumento de las detecciones, obedeció a la eficaz investigación registrada desde 1961, en virtud de la Ley General de Epidemias (Sinell, 1980). En

Estados Unidos, en 1978 y 1979, se registraron más de 29.000 casos de aislamiento de Salmonella en humanos (Yoshikawa y cols., 1980). En España, los datos que se poseen corresponden a los casos recogidos por las Jefaturas locales de Sanidad y también se aprecia un aumento considerable en los últimos años, ya que mientras en 1975, se registraron 2.185 casos, en 1983 se alcanzó la cifra de 5.536. En la ciudad de Valencia se vienen registrando unos 200 casos anuales de fiebres tifoideas, desde 1975, como se puede comprobar en la Tabla siguiente:

Tabla III . Número de casos de fiebres tifoideas registrados en Valencia desde 1975 hasta 1983.(Datos de la Jefatura de Sanidad de Valencia)

Año	Número de casos
1975	239
1976	188
1977	102
1978	250
1979	149
1980	164
1981	234
1982	211
1983	217

3.2. Salmonella en animales

Las salmonelosis en animales son responsables de graves pérdidas económicas. En los países de la Europa occidental son más frecuentes los abortos en ovejas y vacas producidos por S.abortus-ovis y S.dublin, respectivamente, que los debidos a Brucella. La producción de grandes cantidades de animales a nivel industrial (especialmente aves), que mantiene a un gran número de ellos en un espacio limitado, favorece las infecciones. La contaminación de la carne para consumo humano se da en los mataderos, cámaras de lavado y operaciones de desplumado, eviscerado y troceado.

Las salmonelosis animales implican contaminación del hombre a través de los alimentos y ocasionalmente, se puede dar una penetración de las salmonellas transportadas por el aire a las instalaciones de cría masiva de animales. Las zoonosis por salmonellas pueden persistir en algunas zonas gracias a la supervivencia del microorganismo en el suelo o a través de restos muy infectados de los abortos. Los suplementos proteicos para la alimentación animal (harinas de carne o pescado), presentan un elevado nivel de contaminación, que procede, probablemente, de una falta de higiene en los mataderos y factorías que fabrican dichos complementos proteicos. Si se realiza la pesca en aguas contaminadas con Salmonella, estos microorganismos pueden ser recuperados con el pescado, aunque no se produzca infección en el mismo.

Aunque se han realizado numerosos estudios sobre la

incidencia de las salmonelosis en animales, quedan todavía muchas lagunas. Se sabe que los animales domésticos, las aves salvajes y los reptiles, constituyen un importante reservorio para las salmonellas. La presencia de estas bacterias puede suponer desde simplemente un paso transitorio por el tracto intestinal, sin estado patológico aparente, hasta una enfermedad persistente con una elevada mortalidad (Edwards y Galton, 1967).

4.SUPERVIVENCIA DE SALMONELLA EN AGUAS

Los miembros del género Salmonella han sido aislados de una amplia variedad de habitats. Su capacidad para sobrevivir en ambientes adversos ha sido abordada en numerosos estudios (Thomason y cols., 1977; Fuks y Devescovi, 1984). Se ha evaluado tanto la importancia del hombre y los animales como origen de las salmonellas presentes en el agua (Varness y cols., 1978; Wagenet y Lawrence, 1974; Walter y Bottman, 1967), como la transmisión de Salmonella de aguas contaminadas a la flora, fauna y suelo cercanos a ellas (Dondero y cols., 1977).

Las salmonellas de los medios acuáticos proceden de la polución de tipo fecal. De hecho no pertenecen al ecosistema acuático ya que, en condiciones normales, no crecen y proliferan más que en el tracto intestinal. Sin embargo pueden sobrevivir un cierto tiempo en el agua (19 días en laboratorio para S. brandenburg , Oger y cols., 1976; Mitchell y cols. , 1975).

La supervivencia de Salmonella en aguas, se ve afectada por numerosos y complejos factores físico-químicos, como

la temperatura, el pH y la composición química del agua y bacteriológicos. Normalmente la presencia de enteropatógenos en aguas se asocia con elevados recuentos de coliformes fecales (Spino, 1966; Claudon y cols., 1971; Cook y cols., 1974; McFeters y cols., 1974; Sayler y cols., 1976; Alcaide y cols., 1982; Fuke y Devescovi, 1984). Sin embargo han sido aisladas salmonellas en lagos y aguas superficiales donde los recuentos de coliformes eran bajos, e incluso en ausencia de éstos (Cherry, 1972; Dondero y cols., 1977; Evison y Tosti, 1980).

En relación con la supervivencia de indicadores como coliformes y estreptococos fecales, en determinados ambientes la supervivencia de Salmonella parece ser similar. En agua de pozo, la supervivencia de coliformes y estreptococos, está en el mismo orden que la de las salmonellas, según estos datos la presencia o ausencia de indicadores sí representaría un buen índice de la presencia o ausencia de patógenos (McFeters y cols., 1974). Esto se ha visto confirmado por diversos autores en diferentes lugares :en aguas dulces y marinas de Canadá (Dutka y Kwann, 1980), en aguas costeras en Málaga (Borrego y cols., 1983), en aguas costeras en Yugoslavia (Fuks y Devescovi, 1984) y en crustáceos (Hood y cols., 1983). Por otra parte estudios realizados en aguas frías de países nórdicos se ha observado mayor supervivencia de Salmonella que de E. coli a 4°C y pH 6 (Gosselin y cols., 1980) y mayor resistencia a la cloración de aquella que coliformes totales, fecales y estreptococos fecales (Baylet, 1981).

En aguas costeras, el significado higiénico de los

aislamientos de salmonellas se evalúa en función de la dilución de las aguas de desecho, que vierten cerca de las playas y del índice de gérmenes coliformes (Yoshpe-Purer y Shuval, 1972). La mayor supervivencia de Salmonella que de coliformes y estreptococos observada por algunos investigadores (Yoshpe-Purer y Shuval, 1972; McCambridge y McMeekin, 1981) se ha intentado explicar por una mayor resistencia de las primeras a la radiación solar. Sin embargo en otros estudios, realizados por Carney y cols., (1975) en la bahía de Chesapeake, no se encontraron salmonellas a pesar de detectarse elevados números de coliformes totales y fecales. Estos autores concluyen que las salmonellas no sobreviven en aguas marinas debido a que son debilitadas o alteradas por las altas concentraciones de sales, entre otros factores ambientales.

Los brotes de salmonellosis por transmisión hídrica, son desafortunadamente comunes en todo el mundo. Budd, en 1956, fué el primero en afirmar que el contagio de la fiebre tifoidea se debía al consumo de aguas contaminadas con materias fecales. Hay numerosas referencias a epidemias, tanto de fiebres tifoideas, como de salmonellosis, en las que el agente vector del germen causante fué el agua: Ross, en 1966, atribuye la epidemia ocurrida en Riverside (California, EEUU) en 1965, a la presencia de S. typhimurium en las aguas de abastecimiento de la ciudad. También se atribuye a un origen hídrico un brote de fiebre tifoidea, señalado por Pumarola (1971), en Manresa, consecuencia de contaminación fecal de una canalización de aguas de abastecimientos. Harvey y Price (1981a), exponen una serie de

casos de fiebres tifoideas y paratifoideas, producidas por S.typhi y S.paratyphi B, presentes en aguas superficiales naturales en Gran Bretaña.

Como se ha visto, las salmonellas son bastante comunes en el medio ambiente, siendo probablemente las responsables de la mayoría de los brotes epidémicos esporádicos de enfermedades de conocida transmisión hidrica (Garay, 1975).

El hecho de que no exista una relación, en todos los casos, entre los indicadores y la presencia de Salmonella en aguas, implica la necesidad de complementar los análisis bacteriológicos de las mismas con la búsqueda directa de gérmenes patógenos. La existencia de métodos sencillos y fiables para la detección de patógenos, aseguraría los resultados de las pruebas de calidad de aguas, desde un punto de vista sanitario (Cherry y cols., 1972).

5. PROBLEMATICA DE LA METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO DE SALMONELLA

El aislamiento de salmonellas se encuentra afectado por numerosos factores. Algunos de ellos son conocidos, otros estan menos claramente definidos, pero no existe, por el momento, una técnica óptima que pueda ser fácil y simplemente descrita. La recuperación de Salmonella es un proceso dinámico y los aportes en esta área son continuos. La capacidad del bacteriólogo para diferenciar los microorganismos, basada en su experiencia es, finalmente, el punto primordial en el éxito de un

aislamiento.

Los principales problemas que presenta el aislamiento de microorganismos patógenos a partir de aguas, son las bajas cantidades en que se encuentran y el hecho de estar en minoría frente a otros organismos, no patógenos, estrechamente relacionados con ellos. Estos deben ser inhibidos en lo posible mediante el uso de medios selectivos, cuidando de no extremar las condiciones selectivas que podrían afectar la recuperación de los propios gérmenes patógenos.

Generalmente las técnicas de aislamiento de Salmonella siguen una serie de etapas: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y uso de medios sólidos selectivos.

5.1. Preenriquecimiento

El preenriquecimiento consiste en la inoculación, en el primer paso de un aislamiento, de un medio líquido no selectivo para recuperar microorganismos que se encuentran en estado subletal y por tanto, son incapaces de multiplicarse si son trasladados directamente a un medio selectivo.

Thomson (1953, 1955) estableció que ocasionalmente cultivos en un medio como caldo nutritivo, pueden ser ventajosos sobre los cultivos en medio de enriquecimiento. la base para esta afirmación fue la investigación de la supervivencia de S.paratyphi B en harina infectada artificialmente. Cuando se inoculaba harina en caldo nutritivo, podía recuperarse S.paratyphi B durante 45 semanas. Cultivos paralelos en caldo

Selenito F, permanecían viables hasta 21 semanas y posteriormente no eran recuperables. Esto podía sugerir que la viabilidad de Salmonella disminuía con el tiempo, en un medio relativamente tóxico como el Selenito F. Las escasas salmonellas, presentes en determinados materiales, con viabilidad disminuida no serían capaces de reproducirse en un proceso de enriquecimiento directo.

El empleo de preenriquecimiento, o enriquecimiento en dos etapas (Grunnet, 1975), ha sido recomendado para muestras de materiales sometidos a desecación, calentamiento, irradiación, congelación o con bajo pH (Thatcher y Clark, 1968). Edel y Kampelmacher (1973), llevaron a cabo un estudio comparativo del aislamiento de Salmonella en estado subletal, en nueve laboratorios europeos, demostrando que el preenriquecimiento mejoraba los resultados en todos ellos. Harvey y Price (1977) encontraron resultados similares con muestras de lodos y aguas residuales.

Como contrapartida, cuando se cultivan en medios no selectivos materiales altamente contaminados, se corre el peligro de que el crecimiento de las escasas salmonellas presentes se vea enmascarado o inhibido por el de otras bacterias. Algunos investigadores (Edgar y Soar, 1979; Alcaide y cols., 1984), utilizando distintos medios de enriquecimiento, han encontrado resultados satisfactorios empleando el enriquecimiento directo de las muestras, observando que el preenriquecimiento no supone una mejora en la recuperación de Salmonella .

5.2. Enriquecimiento selectivo

Los caldos Selenito y Tetracionatode Muller-Kauffmann, han sido los más ampliamente utilizados como medios de enriquecimiento de salmonellas (Cherry y cols., 1972; Kenner y Clark, 1974; Dondero y cols., 1977; A.P.H.A., 1980; Bailey y cols., 1981).

Guth en 1916, fue el primer investigador que empleó selenito sódico en medio líquido para aislar S.typhi . El medio se hizo de uso general cuando Leifson en 1936, desarrolló varios medios líquidos conteniendo diferentes concentraciones de selenito sódico, hasta encontrar el más adecuado (Selenito F). Posteriormente diversos investigadores han realizado modificaciones en el medio original (Stokes y Osborne, 1955; Harvey y Price, 1964; Callaghan y Brodie, 1968; Iveson y MacKay-Scollay, 1969), algunas de ellas encaminadas al aislamiento específico de S.typhi . Actualmente se emplean tanto el Selenito F como el Selenito-cistina (North y Bartram, 1953).

Algunos serotipos como S.choleraesuis , no son aislados eficientemente con estos medios. Cuando se emplea agar Bismuto Sulfito como medio sólido tras el enriquecimiento en caldo Selenito, se observa una zona de inhibición de crecimiento en la superficie de la placa, debida probablemente al efecto inhibitorio combinado de ambos medios (Harvey y Price, 1979).

En 1923, Muller, describió un medio de enriquecimiento conteniendo yoduro y tiosulfato sódico, que interaccionaban formando tetracionato. Kauffmann (1930, 1935), modificó este medio añadiendo sales biliares y verde brillante para inhibir el

crecimiento de Proteus . Posteriores modificaciones del medio, tendieron a variar la concentración de tetracionato (Knox y cols., 1943; Rolfe, 1946). Otros investigadores emplearon este medio adicionado de novobiocina sódica (Jeffries, 1959) y de lauril sulfato sódico (Jameson, 1961). El interés de este medio se ha centrado en su empleo a temperaturas superiores a 37°C.

Además de estos dos , apareció en 1956 el caldo Rappaport (Rappaport y cols., 1956), que basa su selectividad en el empleo de una solución hipertónica de cloruro de magnesio (4% peso/volumen). Bajo condiciones de deshidratación, muchos coliformes mueren, mientras que Salmonella y Shigella permanecen viables. Además el medio contenía oxalato de verde malaquita (106 mg/ml), como inhibidor. Iveson y Kovacs (1967) , demostraron la superioridad de este medio frente al Selenito F y al tetracionato de Muller-Kauffmann. Vassiliadis y cols.(1976 a) , modificaron el medio original disminuyendo la concentración de oxalato de verde malaquita a 36 mg/ml, demostrando la mayor eficacia del nuevo medio (R10 ó RV) frente al descrito por Rappaport. Diversos estudios (Vassiliadis y cols., 1981; Harvey y Price, 1980), demostraron la mayor efectividad del medio cuando se emplean inóculos pequeños.

El caldo R10 ha sido comprobado en aislamientos de Salmonella , a partir de una amplia variedad de materiales: productos cárnicos (Vassiliadis y cols., 1972, 1976 b 1977, 1981; Harvey y Price, 1981b , aguas residuales (Trichopoulos y cols., 1975; Vassiliadis y cols., 1978; Alcaide y cols., 1982) y heces (Vassiliadis y cols., 1979). Ha sido comprobada la eficacia del

medio, en el aislamiento de salmonellas, a 43°C.

La adición de novobiocina sódica, aumenta la selectividad de los caldos de enriquecimiento. Este antibiótico ejerce una inhibición selectiva, actuando sobre la flora competitiva de Salmonella, principalmente sobre Proteus, no afectando a las salmonellas sino en elevadas concentraciones.

Jeffries (1959), Boothroyd (1973) y Hoben (1973), emplearon novobiocina sódica, en cantidades de 5 a 40 µg/ml, en caldo tetracionato, para inhibir el crecimiento de Proteus, Pseudomonas y E.coli. Otros investigadores (Hargrove y cols., 1971; Restaino y cols., 1977; Moats, 1978; Restaino y cols, 1982) , han añadido diferentes concentraciones de dicho antibiótico a varios medios sólidos selectivos, demostrando el efecto inhibitorio del mismo sobre la flora acompañante de Salmonella.

5.3. Temperatura de incubación de los caldos de enriquecimiento

Otro factor a tener en cuenta en la recuperación de Salmonella es la temperatura de incubación de los caldos de enriquecimiento. La elevación de la temperatura de incubación por encima de 37°C, fue descrita en 1908 por MacConkey y en 1938 por Wilson, para incrementar la selectividad de los medios de enriquecimiento. Harvey y Thomson (1953), emplearon la temperatura de 43°C, aumentando la eficiencia del caldo Selenito F. Otros autores han confirmado las ventajas de uso de elevadas temperaturas de incubación en el enriquecimiento de salmonellas

(Georgala y Boothroyd, 1964; Spino, 1966; Burman, 1967). La razón de este aumento es la capacidad de Salmonella , frente a otros microorganismos afines, de multiplicarse a temperaturas relativamente altas (Haines y Elliot, 1944).

5.4. Medios sólidos selectivos

En cuanto a los medios sólidos selectivos, corrientemente se emplean tres tipos:

1. Agares con verde brillante. El verde brillante es un colorante del grupo del trifenilmetano. Un miembro de este grupo, verde de malaquita, fue empleado por Loeffler en 1903. Posteriormente (Conradi, 1908), se usó el verde brillante. Sobre este medio original se realizaron múltiples modificaciones, como adición de taurocolato sódico (Fawcus, 1909; Wilson y Blair, 1931; Hoyle, 1943), de detergentes aniónicos (Grunnet, 1975) o deoxicolato sódico (Papadakis y cols., 1972). Kristensen y cols. (1925), observaron la propiedad de las salmonellas de producir álcali en agar verde brillante-lactosa, dando colonias claramente diferenciadas, al añadir rojo fenol al medio. El agar verde brillante-rojo fenol-lactosa ha sido el medio más empleado de los de este grupo (Kauffmann, 1930; Corry y cols., 1969).

Este tipo de agares no se recomiendan para el aislamiento de S.typhi.

2. Agares con sales biliares. Los medios con sales biliares fueron descritos por MacConkey en 1908. Estos medios son adecuados para el aislamiento de S.typhi y la mayoría de

serotipos de Salmonella. Normalmente Proteus spp no crece bien en estos medios. Una modificación del medio original, agar Hektoen entérico (King y Metzger, 1968), resultó más eficaz que aquél (Isenberg y cols., 1969) y que el agar verde brillante, en el aislamiento de Salmonella.

3. Agares con bismuto sulfito. Wilson (1923) y Wilson y Blair (1926), demostraron que S.typhi, en presencia de un carbohidrato fermentable, es capaz de reducir el sulfito a sulfuro. Utilizaron una combinación de bismuto sulfito y sulfito sódico en los medios sólidos y en los caldos de enriquecimiento empleados para el aislamiento de Salmonella. Wilson y Blair (1927), describieron distintas modificaciones que mejoraban el medio originalmente descrito. El agar bismuto sulfito es el único entre los agares selectivos en el que la diferenciación de Salmonella es independiente de la fermentación de lactosa.

El aislamiento de salmonellas a partir de aguas naturales es importante por varias razones: los serotipos encontrados reflejan las posibles infecciones en una localidad y proveen de información en estudios epidemiológicos y además el agua es un material idóneo en estudios comparativos de técnicas de aislamiento (Harvey y Price, 1974)

II. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIOTICOS. PLASMIDOS DE RESISTENCIA

1. DESCUBRIMIENTO DE LOS FACTORES DE RESISTENCIA.

El uso de sulfamidas y antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, ha tenido una gran influencia durante los últimos cuarenta años, pero con el transcurso del tiempo, ha surgido el problema de la aparición de organismos resistentes a una o varias de estas drogas. Aparte de su obvia importancia médica, el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de la resistencia a antibióticos proporciona una interesante perspectiva de estudio en biología fundamental (Falkow, 1975).

Los organismos resistentes aparecieron con bastante rapidez tras el empleo de sustancias tóxicas. La primera referencia a una resistencia bacteriana data de 1887, tratándose de la "aclimatación" de Bacillus subtilis al cloruro de mercurio y al ácido bórico. En 1907, Ehrlich, detecta resistencias a los arseniatos en tripanosomas. De manera similar aparecen resistencias a los antibióticos producidos biológicamente, ya en 1944 hay referencias de gonococos y meningococos resistentes a la estreptomicina (Koch, 1981).

Inicialmente se propusieron dos teorías para explicar el origen de la resistencia microbiana a antibióticos. Una de ellas sostenía que las células resistentes lo son por mutación

espontánea independientemente de la presencia de la droga. La otra teoría consideraba que las células resistentes son producto de la interacción entre la droga y la célula bacteriana. En 1943, los experimentos de fluctuación de Luria y Delbrück, demostraron la aparición de mutaciones sin una exposición previa al agente antimicrobiano, por lo que quedó establecido que la resistencia microbiana a antibióticos se había desarrollado únicamente por selección de mutantes espontáneos.

Sin embargo esto no explicaba adecuadamente la aparición de cepas multirresistentes. En 1956, investigadores japoneses, describieron unas cepas de Shigella flexneri, aisladas de pacientes tratados con un solo antibiótico, resistentes a tetraciclina, estreptomina, cloramfenicol y sulfamidas, resistencias difíciles de explicar en base a un acúmulo de mutaciones aleatorias.

Estas cepas fueron aisladas con relativa frecuencia en Japón a partir de 1957, sin relación directa con el tratamiento dado al paciente. Posteriormente se aislaron cepas de E.coli con el mismo patrón de resistencias que la Shigella causante de la enfermedad. Ninguna explicación de todos estos hechos fue aceptable hasta que, en 1959, Akiba y Ochiai, demostraron que las resistencias eran transmisibles de unas células a otras por incubación conjunta.

En 1960, Mitsuhashi, Watanabe y Nakaya, demostraron que la transferencia dependía del contacto celular directo, siendo por tanto, una forma de conjugación bacteriana. Mitsuhashi propuso el término factor R, por similitud con el factor F, para designar a

los elementos transmisibles determinantes de resistencia a antibióticos.

Asimismo, Mitsuhashi, demostró que cepas sensibles de E.coli y Shigella, aisladas de brotes epidémicos, no daban lugar a mutantes multirresistentes por exposición a un solo antibiótico. Los mutantes a una sola droga obtenidos, no eran tampoco capaces de transmitir esa resistencia.

Más tarde se publicaron referencias a cepas portadoras de factores R en otras partes del mundo (Datta, 1962; Lebek, 1969; Voogd y cols., 1968, 1973, 1977). Actualmente estos factores R son llamados preferentemente plásmidos de resistencia (Novick y cols., 1976).

Desde la primera detección de cepas multirresistentes, el problema de su aparición ha sido reconocido como un fenómeno ampliamente extendido con vastas implicaciones médicas y considerable interés genético.

2. RELACIONES ENTRE PLASMIDOS. CLASIFICACION

Cuando fueron descritos los plásmidos de resistencia, su analogía con el factor F llamó la atención de algunos investigadores. Un hecho que resaltó esta similitud fue que al introducir determinados plásmidos de resistencia en células F+, se inhibía la función de F. Meynell y Datta (1965), estudiaron la relación entre ambos, concluyendo que la inhibición de la fertilidad reflejaba una estrecha relación entre los plásmidos F y R. Los plásmidos que inhiben la fertilidad de F, llamados fi+,

producen el mismo tipo de pelo sexual que F. Al encontrarse en la misma célula, el represor del plásmido de resistencia actúa sobre la síntesis del pelo sexual en F, que normalmente está desreprimida, ejerciendo una represión en trans. Los plásmidos que no dan lugar a este fenómeno se denominan fi-.

Los distintos plásmidos están asimismo relacionados en función de su capacidad de coexistir en la misma célula hospedadora, es decir en función de su compatibilidad o incompatibilidad.

La incompatibilidad se define como la incapacidad de dos plásmidos diferentes de coexistir de un modo estable en la misma célula, en ausencia de una continuada presión selectiva. Los grupos de plásmidos que son incompatibles con otros se han venido denominando tanto grupos de compatibilidad como de incompatibilidad, siendo que los miembros de estos grupos son incompatibles entre sí, parece más lógico hablar de grupos, clases o tipos de incompatibilidad (Novick y cols., 1976).

La incompatibilidad está relacionada con el mecanismo de replicación de los plásmidos, de manera que únicamente un tipo de replicón, de cada grupo de incompatibilidad, puede ser mantenido en la célula huésped. Hay dos procesos involucrados en la herencia de los replicones :

Uno por el que se mantiene constante la concentración celular de cada replicón en las bacterias en división (mecanismo de regulación del número de copias).

Otro que distribuye los replicones en las células hijas (mecanismo de partición).

Se piensa que estos mecanismos son responsables de la incompatibilidad entre plásmidos (Novick y Hoppensteadt, 1978). Por tanto, si dos plásmidos son incompatibles es que sus replicones son similares, los grupos de incompatibilidad reunirían pues a los plásmidos pertenecientes a una misma especie molecular. Entre los miembros de estos grupos existe una elevada homología que puede llevar a pensar que proceden de un ancestro original (Falkow, 1975).

En los plásmidos de menor tamaño la incompatibilidad se expresa de forma más débil que en los mayores, que poseen menos copias por célula y por ello se segregan con mayor rapidez (Pritchard y Grover, 1981).

La incompatibilidad y la inhibición de la fertilidad señalan la existencia de grupos de plásmidos, que pueden representar líneas filogenéticas a través de las cuales se pudieron haber transmitido los mecanismos de transferencia y replicación y adquirido los genes responsables de la resistencia a antibióticos.

3. NATURALEZA MOLECULAR Y REPLICACION DE LOS PLASMIDOS DE RESISTENCIA

Los plásmidos se encuentran en la célula hospedadora como moléculas de ADN de doble cadena en forma de círculo covalentemente cerrado, superenrollado. Resulta probable que la circularidad esté relacionada con la existencia de un origen y un final de replicación adyacentes, como simplificación del control

de la replicación y distribución de las réplicas (Falkow, 1975).

La replicación para la transferencia y la replicación vegetativa son procesos separados bajo el control de genes distintos. En ambos casos la replicación es semiconservativa. No ha podido hasta ahora, ser formulado un único modelo de replicación que explique los distintos tipos de intermediarios replicativos observados. Una conclusión de este hecho sería que algunos factores R son ensamblajes de más de un replicón y cada uno de ellos puede tener distintos modos y controles de replicación.

El control de la replicación puede caracterizarse al menos por cuatro parámetros (Novick y cols., 1976):

1. Capacidad o incapacidad de replicación en ausencia de replicación cromosómica.
2. Multiplicidad plasmídica y su variabilidad.
3. Continuidad de la replicación plasmídica con respecto al ciclo de división celular.
4. Regularidad o aleatoriedad del reparto de los replicones en las células hijas.

Los términos control de replicación relajado o restringido, hacen referencia a los plásmidos cuya replicación no está acoplada obligatoriamente a la del cromosoma o sí lo está, respectivamente.

En general se admite que los plásmidos de pequeño tamaño , por debajo de 10 MDalton, tienen un control relajado de replicación y se encuentran varias copias por genoma. La

adquisición de nuevos genes, con el consiguiente aumento de tamaño, haría necesario un cambio en la maquinaria replicativa para reducir el número de copias con el fin de limitar la cantidad de ADN en la célula. Este proceso implicaría la creación de otro que asegure una repartición adecuada en las células hijas.

Normalmente los plásmidos "grandes" son autotransmisibles ya que llevan genes para codificar la conjugación bacteriana y los "pequeños" no lo son por carecer de los genes necesarios, aunque pueden ser movilizados por un plásmido autotransmisible (Falkow. 1975).

Cuando un plásmido actúa como factor de transferencia en la movilización de otro no transmisible, puede o no formar una unidad estable y en la célula receptora se pueden encontrar los dos plásmidos como entidades independientes. En este sentido fueron importantes los trabajos de Anderson y Lewis (1965) y Anderson (1968), que estudiaron una cepa de Salmonella typhimurium resistente a ampicilina, estreptomycin, sulfamidas y tetraciclina, observando las distintas frecuencias de transmisión de las resistencias a un E.coli receptor y de los transconjugantes de éste como cepas donadoras. Para explicar las diferentes frecuencias encontradas para cada resistencia, postularon la existencia de un plásmido conjugativo (\$\$), capaz de movilizar separadamente los distintos factores de resistencia, excepto estreptomycin-sulfamida que se transmitían siempre juntos. Llegaron a la conclusión de que podían ocurrir dos tipos de transferencia, llamados Clase 1 y Clase 2 por Anderson y

Natkin (1972) y cointegrado y agregado por Clowes (1972).

En la Clase 1, o cointegrado, los determinantes de resistencia y el factor de transferencia forman un complejo, unido covalentemente, que es mantenido y transferido como una unidad estable. En la Clase 2, o agregado, los determinantes de resistencia y el factor de transferencia son unidades independientes en la célula transconjugante, que se transfieren juntos ocasionalmente por un mecanismo que no incluye uniones covalentes (Falkow, 1975).

La formación de cointegrados es una vía para la evolución de los plásmidos que daría lugar a moléculas cada vez más complejas que acumularían muchos determinantes de resistencia, transmitiéndose con mayor efectividad (Mitsuhashi y cols., 1977).

4. LA CONJUGACION BACTERIANA

La conjugación bacteriana es un proceso específico, por el cual el ADN es transferido de un donador a un receptor, mediante un mecanismo que implica un contacto célula-célula. Todos los sistemas de conjugación en bacterias están determinados por plásmidos. El estudio de la conjugación es importante por varias razones: en primer lugar la conjugación es una de las principales vías para el intercambio genético en bacterias, en segundo lugar la conjugación es importante para comprender las bases de la transmisibilidad plasmídica y en tercer lugar, la conjugación es en sí misma un buen ejemplo de

una función compleja definida (Broda, 1979).

El proceso conjugacional puede dividirse en tres etapas:

1. Contacto efectivo de las células donadora y receptora.
2. Transferencia del ADN.
3. Establecimiento y mantenimiento del ADN en la célula receptora.

La conjugación requiere un contacto físico entre las células, sin embargo no siempre se ha demostrado en la caracterización de plásmidos conjugativos. Como cabría esperarse de un proceso dependiente de una colisión, en E.coli, los apareamientos que producen mayores rendimientos de progenie se obtienen con altas concentraciones celulares de células F- y con células móviles, frente a inmóviles. Sin embargo puede ser que las células F+ sean atraídas por las F- por algún gradiente quimiotáctico (Collins y Broda, 1975). A altas concentraciones celulares los apareamientos pueden estar compuestos por más de dos células, pero los agragados observados microscópicamente pueden ser el resultado de crecimiento y división celular con fallos en la disociación, debidos a la agregación de nuevas células (Broda, 1979).

Las células que contienen plásmidos conjugativos poseen unas estructuras llamadas pelos sexuales. Las características de estos pelos permiten diferenciar distintos sistemas de conjugación y están relacionados con los grupos de incompatibilidad. Su papel exacto en la conjugación no ha sido

del todo discernido, hay tanto sugerencias de que actúa como conducción del material genético (Brinton, 1971), como de que sirve tan solo para acercar las células pared con pared, presumiblemente se forma un canal entre las envueltas celulares que tendría un hueco axial suficientemente ancho como para que pasara una cadena de ADN (Folkhard y cols., 1979). Se ha visto, que añadiendo dodecil sulfato sódico, a concentraciones que despolimerizarían el pili F, no se inhibe la transferencia del ADN, una vez formados los agregados (Achtman y cols., 1978).

El contacto entre las células probablemente genera una señal para la síntesis o activación de enzimas implicados en la transferencia del ADN. Ha sido caracterizado el sistema conjugativo del factor F, identificándose los genes responsables del mismo. El factor F presenta 4 regiones definidas:

- región de transferencia
- región de integración
- región de replicación e incompatibilidad
- región de resistencia a fagos específicos de células F-

El operón tra (transferencia), codifica para 13 genes estructurales y dos reguladores : tra O y tra J . Los genes estructurales dan lugar a la formación del pelo sexual y a la transferencia del ADN. La transcripción comienza por tra O , lo primero que se transcribe es tra J que codifica una proteína que tiene un control positivo sobre la transcripción del operón. No existe represor.

La región de integración lleva secuencias de inserción

que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano por recombinación con secuencias homólogas del mismo, con intervención del gen rec A, o por inserción tipo transposón. Esta región es la responsable de que una cepa sea Hfr o F+.

En la región de replicación e incompatibilidad, se encuentra el origen de la replicación vegetativa del plásmido (oriV), que en el factor F está sincronizada con la del cromosoma. El origen de transferencia se sitúa en el gen oriT.

La conjugación en plásmidos no conjugativos mediante un sistema Clase 2, requiere la presencia en estos plásmidos de genes similares a los que codifican para la replicación y transmisión en plásmidos conjugativos, así como un origen en el que se inicie el proceso. El sistema de apareamiento del plásmido conjugativo debe reconocer una secuencia determinada del plásmido no conjugativo para que tenga lugar la movilización. Los plásmidos de un grupo de incompatibilidad no complementan la transferencia de plásmidos no conjugativos de otro grupo (Willets y Wilkins, 1984).

En el proceso de transferencia conjugacional, el ADN plasmídico sufre un corte, con posterior separación de las dos cadenas, en el origen de transferencia (oriT). Una de las dos hebras se transfiere a la célula receptora, produciéndose en ambas, donadora y receptora, la síntesis de las cadenas complementarias del ADN y la recircularización de las moléculas plasmídicas (Willets y Wilkins, 1984).

En bacterias no entéricas se han observado transmisiones de plásmidos de resistencia, en las que no se ha

podido detectar la formación de pelos sexuales.

Algunos ejemplos de estos tipos de conjugación, se dan en Streptococcus , Bacteroides , Haemophilus y Neisseria .

En Streptococcus faecalis , se han visto dos tipos de plásmidos conjugativos (Clewell, 1981a, 1981b). Unos se transmiten principalmente en medio líquido y otros en medio sólido. Los plásmidos del primer grupo se transmiten con la ayuda de un sistema de feromonas sexuales, producidas por la célula receptora, que favorecen la formación de agregados celulares. Cada feromona es específica de un plásmido conjugativo.

En Haemophilus , la aparición de resistencias de carácter plasmídico ha aumentado en los últimos años (Van y cols., 1975; Elwell y cols., 1977; VanKlinegren y cols., 1977). En este género han sido descritas cepas resistentes a antibióticos, en las que no han podido detectarse plásmidos (Saunders y Sykes, 1977; Shaw y cols., 1978; Stuy, 1979), siendo observada, sin embargo, la transmisión de dichas resistencias. Estos hechos han llevado a suponer que se trataba de resistencias bien situadas en el cromosoma bacteriano, bien situadas en un plásmido insertado en el cromosoma (Stuy, 1980). Otros autores (Roberts y Smith , 1980), empleando distintas técnicas de extracción, han podido observar algunos de estos plásmidos.

5. MECANISMOS DE RECOMBINACION ILEGITIMA. SIGNIFICADO EVOLUTIVO.

La diferencia más evidente entre recombinación y

recombinación ilegítima es que ésta última no depende de la homología entre secuencias de nucleótidos ni de los genes rec bacterianos. Los mecanismos de recombinación ilegítima están mediados por elementos genéticos transponibles o transposones.

Los transposones (Tn), son segmentos específicos de ADN capaces de insertarse repetidamente en uno o varios sitios del genoma (Campbell ; 1981).

Los transposones más sencillos son las llamadas secuencias de inserción (IS), éstas carecen de expresión fenotípica conocida. Las secuencias de inserción son fragmentos relativamente pequeños de ADN, entre 768 y 1400 pares de bases, con extremos portadores de secuencias invertidas, repetidas de 20 a 40 pares de bases. Se han encontrado formando parte de cromosomas y plásmidos bacterianos en E.coli , Salmonella typhimurium , Citrobacter freundii , Proteus , Pseudomonas , factor F, Rhizobium , Staphylococcus , Streptococcus y Streptomyces (Kopecko, 1980).

En función de su organización genética, características del mecanismo de transposición y homología entre las secuencias del ADN , los transposones se pueden clasificar en 4 grupos (Kleckner, 1981):

La Clase I agrupa a las secuencias de inserción y los transposones que contienen estos elementos. Un transposón de este grupo, el Tn10, lleva un determinante de resistencia a tetraciclina encuadrado entre dos secuencias de inserción, llamadas IS10. Las funciones de transposición radican en la secuencia de inserción de la derecha, mientras que la izquierda

parece servir solamente como lugar de reconicimiento (Kleckner y cols., 1981).

La Clase II contiene una serie de transposones, con determinantes de resistencia a distintos productos, que están flanqueados por secuencias de inserción de 35 a 40 pares de bases. El Tn3, con resistencia a ampicilina, es el mejor conocido del grupo. En éste se han identificado tres genes responsables del mecanismo de transposición y un cuarto (bla) que codifica una β -lactamasa , todos ellos encuadrados entre dos secuencias invertidas repetidas de 38 pares de bases.

La Clase III engloba a los bacteriófagos Mu y D108 y la Clase IV comprende los elementos transponibles no clasificados en las anteriores.

Aparte de promover fenómenos de transposición, los transposones y las secuencias de inserción, pueden producir reordenaciones de genes por movilización de porciones de ADN adyacentes a dichos elementos. Pueden producir delecciones, inversiones y amplificación de genes (Calos y Miller, 1980; Kopecko, 1980; Muster y cols., 1981).

El papel de los transposones en la adquisición de resistencias a antibióticos resulta evidente. La recombinación ilegítima presenta una serie de ventajas sobre la legítima, ya que esta última se ve limitada por varios aspectos. Por una parte el intercambio entre regiones homólogas difícilmente posibilita la adquisición de caracteres nuevos, es bastante improbable que secuencias con suficiente homología como para que se de una recombinación contengan genes muy distintos. Por otra parte, los

plásmidos que presentan mayor homología son precisamente los que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, que no pueden coexistir, sin fuertes presiones selectivas, en la misma célula.

La adquisición de resistencias por medio de transposones facilita la formación de plásmidos multirresistentes, haciendo innecesaria la homología entre los diversos factores de resistencia implicados. Los mecanismos de recombinación ilegítima pueden explicar muchos aspectos de la evolución y expansión de los plásmidos de resistencia. Nuevas reordenaciones de resistencias pueden conducir a la diseminación, por plásmidos conjugativos, de resistencias de plásmidos no conjugativos, o a su incorporación en plásmidos de especies carentes de resistencias plasmídicas (Davies, 1981).

6. APARICION DE PLASMIDOS DE RESISTENCIA. EVOLUCION.

No hay duda de que existe una relación entre el predominio de los plásmidos de resistencia en el hombre y animales y el uso de antibióticos. La cuestión es si la existencia de estos plásmidos es previa a la época del empleo masivo de antibióticos.

Hay algunas evidencias de la temprana aparición de plásmidos de resistencia. Una de ellas es la existencia de un plásmido resistente a tetraciclina y estreptomina, encontrado en una cepa de E.coli liofilizada en 1946, antes de que estos antibióticos fueran empleados (Smith, 1967). Otras han sido aportadas por investigadores que han trabajado con

poblaciones humanas primitivas, a las que no había llegado la era de la quimioterapia, examinando la flora intestinal de estas poblaciones. Estos estudios revelaron la presencia de plásmidos de resistencia, aunque en bajos porcentajes (Davis y Anderson, 1970; Maré, 1968).

Se han aislado gérmenes portadores de plásmidos de resistencia del suelo. El suelo es el principal nicho ecológico de los organismos productores de antibióticos; las pequeñas cantidades de los mismos, producidas naturalmente, existentes en el suelo pueden tener un papel en la evolución de los factores de resistencia en la selección de bacterias resistentes.

Algunos Streptomyces producen enzimas que inactivan los antibióticos que sintetiza el mismo microorganismo, se ha visto que estos enzimas actúan de modo similar a los de ciertos plásmidos de resistencia (Beneviste y Davis, 1973). Estos actinomicetos podrían haber transferido genes por transducción, conjugación o transformación a organismos relacionados con ellos, estableciéndose una cadena de transferencias en la que podría darse que el primer y último eslabón, no tuvieran mucho que ver entre sí (Falkow, 1975).

Que ventaja selectiva es para la bacteria y el plásmido el mantenimiento en estado autónomo?. Una bacteria bajo condiciones selectivas, puede beneficiarse individualmente al poseer plásmidos especificando fenotipos particulares. Asimismo los plásmidos proporcionan ventajas selectivas a la población por un incremento de variabilidad en general y por la probabilidad de transferencia y de recombinación de genes cromosómicos. Si

bacterias con cromosomas similares llevan una serie de plásmidos, que pueden transmitirse, el número total de funciones en la población aumenta. Desde un punto de vista evolutivo la bacteria y el plásmido son simbiosis (Broda, 1979).

La resistencia a antibióticos basada en plásmidos transmisibles proporciona una ventaja significativa en la flexibilidad del microorganismo:

.Puede llevarse la resistencia a varios antibióticos en un solo plásmido.

. Los genes de resistencia pueden ser amplificados según las necesidades.

. Los plásmidos pueden ser "almacenados" en una porción mínima de la población microbiana y recuperados cuando sea necesario.

. Los plásmidos pueden servir como vectores de transferencia de genes.

. Los plásmidos juegan un papel evolutivo en el reordenamiento genético entre y en los microorganismos (Koch, 1981).

7. PRESENCIA DE BACTERIAS CONTENIENDO PLASMIDOS EN LA NATURALEZA. IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA.

A causa de sus implicaciones sanitarias, muchos datos relativos al predominio y ecología de los plásmidos de resistencia son útiles en relación con enfermedades causadas por microorganismos, principalmente gram negativos. El patrón de

enfermedades entéricas en las sociedades avanzadas, ha comenzado a cambiar con la introducción de los agentes antimicrobianos.

En los últimos años se han publicado numerosos estudios tanto sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en ambientes muy diversos, como sobre la capacidad de transmisión de los determinantes de resistencia (Bell y cols., 1980, 1983; Mach y cols, 1982; Niemi y cols, 1983).

El aislamiento de bacterias conteniendo plásmidos de resistencia a partir de ambientes naturales, ha llevado a especular sobre la posibilidad de transferencia in situ, la frecuencia de las mismas y su efecto en la salud pública. Mientras que existe bastante información concerniente a la transferencia de plásmidos entre cultivos puros de bacterias in vitro, se desconocen por el momento los factores que gobiernan la transferencia de plásmidos en ecosistemas naturales como suelo, agua, tracto intestinal, etc. (Freter y cols., 1983).

Se ha demostrado que existe una transferencia de determinantes de resistencia in vivo, a frecuencias moderadas, en heridas (Hummel y cols., 1977; Kayser y cols., 1978) y en los tractos intestinal, respiratorio y urinario del hombre y los animales (Anderson y cols., 1973; Smith, 1972; Gardner y Smith, 1969).

Generalmente, las bacterias con mayores niveles de resistencia han sido aisladas de ambientes con elevados niveles de "contaminación" por agentes antimicrobianos, como hospitales y las aguas residuales procedentes de ellos, mataderos, etc. (Datta, 1969; Fontaine y Hoadley, 1976; Grabow y cols., 1973;

Goyal y Hoadley, 1979; Sato y cols., 1975). Sin embargo también han sido detectados microorganismos resistentes en ambientes aparentemente no selectivos: plantas (Talbot y cols., 1980), estuarios (McNicol y cols., 1980), aguas marinas y sedimentos (Sizemore y Colwell, 1971; Hada y Sizemore, 1981; Goyal y Adams, 1984). aguas destinadas a bebida (Armstrong y cols., 1981; Calomiris y cols., 1984) e incluso en ambientes tan extremos como las aguas heladas del Antártico (Kobori y cols., 1984).

El descubrimiento de plásmidos R en coliformes y coliformes fecales en aguas residuales, aguas superficiales y sedimentos y el hecho de que puedan transferir sus resistencias durante el procesamiento de las aguas, ha llevado a pensar en una reevaluación de los standards de calidad de aguas (Grabow y cols., 1976).

Como se ha podido ver, se han encontrado plásmidos de resistencia en una amplia gama de huéspedes y ambientes, pero el principal grupo de microorganismos donde se han observado y estudiado han sido las enterobacterias.

Las bacterias enteropatógenas son las principales causantes de gastroenteritis. Incluso en países desarrollados, las enfermedades de este tipo tienen una gran incidencia en la población. Los microorganismos causantes de estas enfermedades son sobre todo Salmonella y Shigella , aunque pueden darse casos producidos por E.coli enterotoxigénicos.

Precisamente la capacidad enterotóxica de estas cepas de E.coli , está localizada en plásmidos. Se han reconocido

una serie de plásmidos responsables de la producción de enterotoxinas, llamados plásmidos Ent . Para que la cepa conteniendo un plásmido Ent sea patógena, se precisa la presencia de otro plásmido que produce un antígeno capsular específico (K88 en cerdos, K99 en terneras), que da lugar a un aumento de la proliferación y adhesión bacteriana en el intestino delgado (Falkow, 1975).

Se han dado casos en que cepas de Salmonella , causantes de brotes epidémicos, fueran portadoras de plásmidos de resistencia a antibióticos, lo que implica considerables problemas de orden sanitario.

Uno de estos casos se produjo en Inglaterra, en los años 60, tratándose de una epidemia en terneras, causada por Salmonella typhimurium tipo 29. En principio (1963) estos microorganismos eran resistentes a estreptomycin y sulfonamidas, en 1964 apareció la resistencia a tetraciclina, seguida sucesivamente por resistencia a ampicilina, furazolidina y kanamicina-neomicina, que se detectaron a lo largo de 18 meses de seguimiento de la epidemia. La mayoría de estas resistencias residían en plásmidos. Se detectaron algunos casos de infecciones humanas, que eran debidas a estas mismas cepas.

Se pensó que la causa de la aparición de estos microorganismos fue el incremento en la cría de ganado bovino que comenzó hacia 1962, para el cual se suministraban ampliamente antibióticos a toda la población, en el tratamiento de cualquier infección que surgiera, incluso en un solo animal. Los granjeros solían dar antibióticos a los animales, porque pensaban que así

prevenían posibles infecciones.

En este contexto, la aparición de una cepa de Salmonella typhimurium que llevara factores de resistencia o pudiera adquirirlos por transferencia de otro microorganismo, llevó a que se extendiera ampliamente por toda la población (Broda, 1979).

Otro caso, igualmente dramático, se produjo en México en 1972 y 1973. Se trató de un brote epidémico de fiebre tifoidea, con alrededor de 10.000 afectados, causado por una cepa de Salmonella typhi portadora de resistencia, entre otros antibióticos, al cloramfenicol, que es el más empleado en el tratamiento de esta enfermedad. Por la misma época, se dieron casos similares, aunque producidos por diferentes clones de S.typhi , en la India, Vietnam y Thailandia. En todos ellos, se descubrió un plásmido de resistencia perteneciente al mismo grupo de incompatibilidad (H). Anderson (1975), propuso que las cepas patógenas probablemente, habían adquirido las resistencias por transferencia a partir de cepas intestinales no patógenas, como E.coli . En los países afectados los antibióticos podían comprarse directamente en farmacias.

Establecida la existencia de plásmidos de resistencia antes del empleo de antibióticos, se puede suponer que anteriormente una bacteria patógena, podía no tener una ventaja selectiva por la adquisición de estos plásmidos. En estos momentos, cuando por alguna circunstancia como un brote epidémico, se convierte en miembro predominante de la población microbiana, la presencia de plásmidos R en la bacteria, o en

otras pudiendo ser adquiridos por la patógena, hace que se incremente enormemente su supervivencia.

OBJETO DEL TRABAJO Y PLANIFICACION

El objeto del presente trabajo ha sido realizar un estudio comparativo de los diversos factores que afectan al aislamiento de Salmonella a partir de aguas con mayor o menor grado de contaminación fecal.

Una vez conocidos estos factores, se realizará un estudio cuantitativo evaluando la efectividad de distintos procesos de enriquecimiento.

Se procederá a la determinación de la resistencia a agentes antibacterianos, de todas las cepas aisladas a lo largo del estudio, evaluando su Concentración Mínima Inhibitoria, la capacidad de transferencia de estas resistencias, así como la naturaleza de las mismas.

Para la realización del estudio propuesto se han seleccionado dos tipos de aguas:

- 1.- Aguas residuales antes de su tratamiento
- 2.- Aguas naturales superficiales con distinto nivel de contaminación fecal, pertenecientes al lago de la Albufera de Valencia.

PLAN DE TRABAJO

I. Estudio comparativo de los diversos factores que afectan a la recuperación de Salmonella a partir de los dos tipos de aguas seleccionados, a lo largo de dos años.

Se evaluarán los siguientes factores:

- Tipo de enriquecimiento
- Caldo de enriquecimiento selectivo

- Medio sólido selectivo
- Temperatura del agua
- Características del punto de muestreo

II. Estudio cuantitativo comparando la efectividad de distintos procesos de enriquecimiento: se estudiarán dos temperaturas de incubación, con y sin enriquecimiento previo en caldo no selectivo.

III. Identificación serológica de todas las cepas aisladas en la primera parte del trabajo, así como de una selección de las obtenidas en el estudio cuantitativo.

IV. Determinación de la resistencia a antibióticos de todas las cepas aisladas, calculando su Concentración Mínima Inhibitoria.

a) Estudio de la capacidad de transferencia de estas resistencias.

b) Caracterización de dos plásmidos de resistencia previamente seleccionados.

El estudio propuesto se considera de la mayor importancia, dada la escasez de trabajos similares realizados en España, ya que el aislamiento directo de patógenos a partir de ambientes naturales rara vez se lleva a cabo por los organismos públicos. La falta de este tipo de estudios no permite establecer relaciones epidemiológicas válidas entre los microorganismos aislados de muestras clínicas y los que consiguen sobrevivir, o incluso adaptarse a ambientes naturales. Son precisamente estos últimos

los que tienen mayores posibilidades de volver a infectar al hombre o animales, a través de los múltiples usos a los que se destinan las aguas. La escasez de plantas eficaces de depuración de aguas residuales agrava aún más el problema, ya que estas son las principales receptoras de estos microorganismos patógenos excretados por los individuos enfermos o portadores sanos.

MATERIAL Y METODOS

I. PUNTOS DE MUESTREO.DESCRIPCION

1. ALBUFERA.

Se han seleccionado cuatro puntos que son representativos de distintos niveles de contaminación global. Tres de ellos se sitúan dentro del lago, en la desembocadura de sendas acequias y el cuarto se encuentra en el interior de una de dichas acequias.

Punto 1.- Corresponde a la desembocadura de la acequia de Overa que recoge vertidos, principalmente de tipo agrícola, de la población de Sollana, teniendo un recorrido aproximado de 6 kilómetros.

Punto 2.- Corresponde a la desembocadura de la acequia del Saler que recoge vertidos de esta población. Es de características similares al anterior.

Punto 3.- Corresponde a la desembocadura de la acequia de Silla, recoge vertidos urbanos, agrícolas e industriales de Silla y poblaciones cercanas. Se trata del punto con mayor índice de contaminación global de los escogidos en el lago.

Punto 4.- Se encuentra en el inicio de la acequia del Saler, cerca de la zona donde se recogen los vertidos de las aguas residuales de esta población.

2. ESTACION DEPURADORA.

Punto 5.- Se escogió una pequeña estación depuradora de aguas residuales, situada en Burjasot, tomándose las muestras directamente de la tubería que recoge los vertidos de la población antes de su procesamiento.

La situación de los distintos puntos queda reflejada en el mapa adjunto (Figura 2).

Figura 2. Mapa de la Albufera con la situación de los puntos de
toma de muestras.

MAR MEDITERRANEO

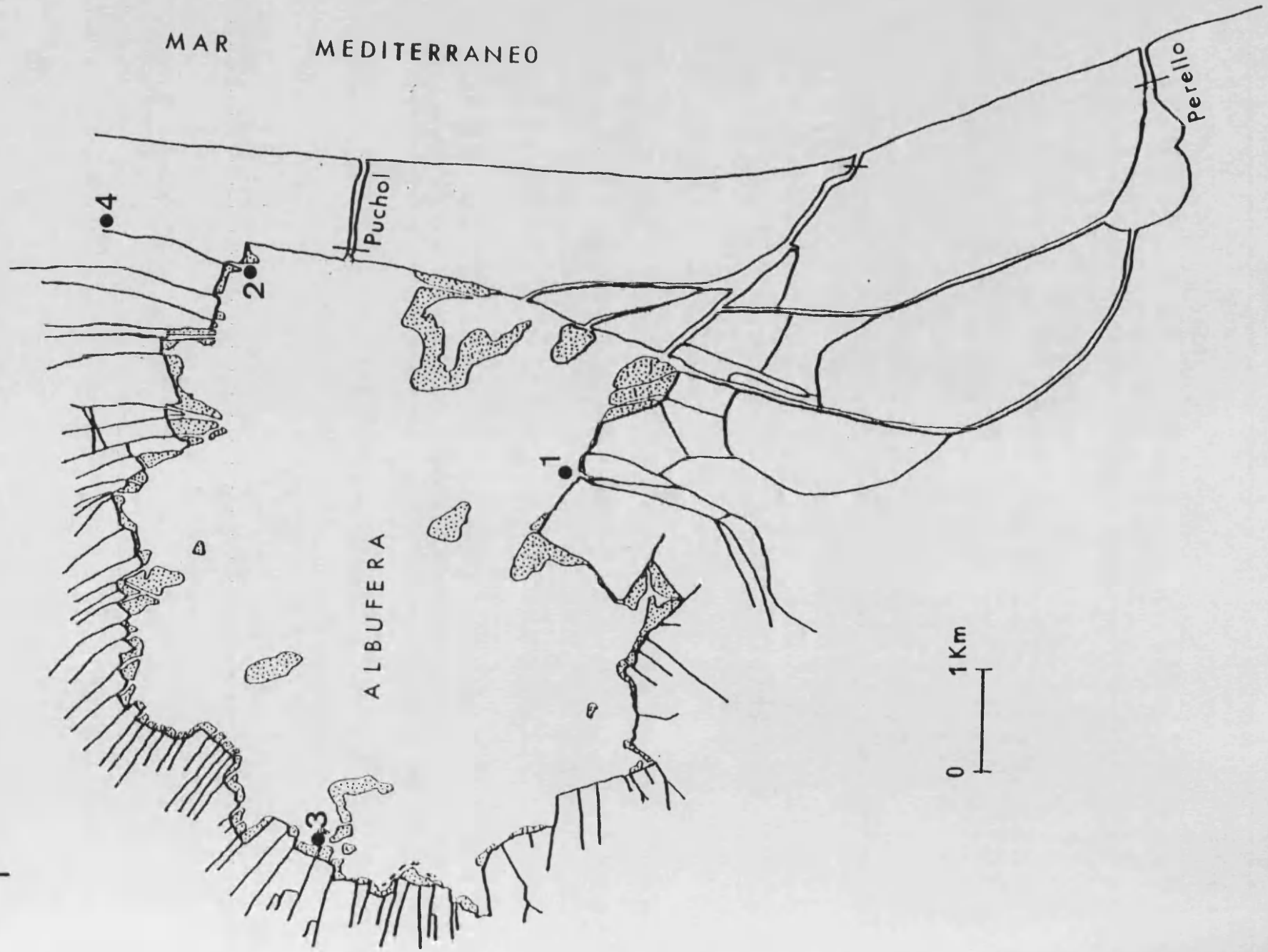
Perello

Puchol

ALBUFERA

0 1 Km

N ↑



II. MATERIAL

1. MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE SALMONELLA

1.1. Medios de preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo .

a) Preenriquecimiento

-Agua de peptona

Peptona (Oxoid)	10 g
Cloruro sódico (Panreac)	5 g
Fosfato bipotásico (Panreac)	5 g
Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se emplea para el preenriquecimiento de las muestras de agua.

b) Enriquecimiento selectivo.

-Caldo NR10

Solución A:

Bactotripton (Difco)	5 g
Cloruro sódico (Panreac)	8 g
Fosfato monopotásico (Panreac)	1.6 g

	Agua destilada	1000 ml
Solución B:		
	Cloruro magnésico (Panreac)	400 g
	Agua destilada	1000 ml

Solución C:

	Oxalato de verde malaquita (Merck)	0.4 g
	Agua destilada	100 ml

El medio se prepara según la siguiente proporción:

100 ml de solución A + 10 ml de solución B + 1 ml de solución C

Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza 15 minutos a 121°C. Se utiliza como medio de enriquecimiento selectivo.

-Caldo MNR10

Su composición es idéntica al anterior sustituyendo en la solución B el Cloruro magnésico por Sulfato magnésico. Se emplea como medio de enriquecimiento selectivo.

1.2. Solución de novobiocina sódica

Se prepara una solución patrón de novobiocina sódica (Sigma) en agua destilada, a la concentración de 4 mg/ml. Dicha solución se esteriliza por filtración y se añade a los caldos de enriquecimiento, en el momento de su uso, en la proporción 1:100

1.3. Medios sólidos selectivos de aislamiento

-Agar Bismuto Sulfito (Difco)

-Agar Hektoen Entérico (Difco)

-Agar Verde Brillante (Difco)

Se esterilizan calentando hasta ebullición durante unos minutos, tras lo cual se reparten en placas Petri estériles.

1.4. Medios para la identificación de Salmonella

-Agar con Hierro de Kligler (Difco)

-Agar Fenilalanina (Difco)

-Medio para la descarboxilación de aminoácidos. Se prepara añadiendo al medio basal , caldo base descarboxilasa (Difco) , una cantidad adecuada del aminoácido a investigar siguiendo las instrucciones del fabricante. En el presente trabajo se emplearon arginina, lisina y ornitina (Sigma).

-Caldo Urea (Oxoid)

-Medio S.I.M.(Difco)

-Tiras API 20E (Système API 20 Enterobacteriaceae, Analytab Products, Inc)

1.5. Otros medios

-Medio T.S.A.(Agar Triptona Soja)

Se utiliza para las pruebas de aglutinación en portaobjetos, con la siguiente composición:

Triptona (Difco)	17 g
Soytona (Difco)	3 g

Glucosa (Doesder)	2.5 g
Fosfato bipotásico (Panreac)	2.5 g
Cloruro sódico (Panreac)	10 g
Agar Bacteriológico (Oxoid)	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza 30 minutos a 115°C.

-Medio de conservación:

Se prepara añadiendo agar bacteriológico (Oxoid) al 0.4 % al caldo nutritivo n°2 (Oxoid). Se reparte en tubos de hemólisis y se esteriliza a 121°C 15 minutos. Los microorganismos crecidos en este medio se conservan en nevera a 4°C, varios meses.

1.6. Reactivos

-Reactivo de la fenilalanina:

Sulfato amónico (Panreac)	2 g
Solución semisaturada de sulfato férico-amónico (Panreac)	5 ml
Acido sulfurico (Panreac) 1%	1 ml

-Reactivo de Kovac's (Indol):

p-dimetilaminobenzaldehido (Doesder)	5 g
Alcohol amilico (Panreac)	75 ml
Acido clorhidrico (Panreac)	25 ml

-Reactivo de Kovac's (Oxidasa):

N N N'N'-tetrametilfenilendiamoniodicloruro (Merck)	0.1g
Agua destilada	10 ml

1.7. Antisueros

Se emplearon antisueros polivalentes (Instituto Pasteur) y monovalentes (Instituto Pasteur, Difco, Instituto Behring).

2. MEDIOS PARA PRUEBAS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA

2.1. Medio de Mueller-Hinton. (Oxoid)

Se emplea para las pruebas de sensibilidad a antibióticos y la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Se utiliza bien como medio líquido o bien como medio sólido añadiéndole agar bacteriológico (Oxoid) al 1.5%.

2.2. Medio LB

Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
Cloruro sódico (Panreac)	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza 15 minutos a 121°C.

Se utiliza para el crecimiento de cepas de E.coli y Salmonella en ensayos de conjugación.

2.3. Medio BTB-Lactosa agar

Peptona (Oxoid)	10 g
Extracto de carne (Merck)	3 g
Cloruro sódico (Panreac)	5 g
Lactosa	10 g
Azul de bromotimol (Panreac)	0.0045%
Agar bacteriológico (Oxoid)	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

Se usa, suplementado con antibióticos, para seleccionar los transconjugantes en ensayos de conjugación.

3. PRODUCTOS

3.1. Implicados en la obtención del ADN plasmídico

Se han empleado: lisozima, RNasa pancreática, Proteinasa K y agarosa tipo II, preparados por Sigma Chemicals Co.(USA)

3.2. Colorantes

Para las electroforesis en gel de agarosa se emplearon:

- Azul de bromofenol (Panreac)
- Xylene-Cyanol FF (ICN Pharmaceutical Inc.)
- Bromuro de etidio (Sigma)

3.3. Otros productos

-Dimetil dicloro xilano (Sigma), utilizado para la siliconización del material usado en las extracciones de DNA plasmídico

-Ficoll 400 (Sigma), empleado en la preparación de muestras de DNA para electroforesis

-8-hidroxiquinoleina, utilizado en la preparación del Fenol:Cloroformo:Isoamílico

3.4. Soluciones de antibióticos

Se hacen constar en la siguiente tabla:

Tabla IV

Antibiótico	Distribuidor	Solución patrón
Ampicilina	Bristol	25mg/ml en agua destilada
Cloramfenicol	Sigma	25mg/ml en etanol
Tetraciclina	Antib.Leon	15mg/ml en etanol/agua dest.
Amoxicilina	Beechman	25mg/ml en agua destilada
Kanamicina	Bristol	25mg/ml en agua destilada
Estreptomina	C.E.P.A.	25mg/ml en agua destilada
Ac.Nalidíxico	Acofarma	30mg/ml en NaOH 1N
Polimixina B	Antib.Leon	300 U
Penicilina G	Antib.Leon	10 U
Ac.Fusídico	Acofarma	10mg/ml en etanol
Cefalexina	Biomérieux	30mg/ml en agua destilada

4. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS

En las experiencias de transmisión de los determinantes de resistencia, se empleó como cepa receptora E.coli K12 Na^r, cedido por la Dra. A.E.Toranzo.

Como plásmidos de referencia para la determinación de pesos moleculares, se emplearon los siguientes:

Rts1 (122 MDalton), RP4-35 (57,5 MDalton), pIP113 (32 MDalton), RSF1010 (5,5 MDalton), cedidos por el Dr. C. Nombela, Dpto.Microbiología, Fac. Farmacia, Universidad Complutense, Madrid y pBR322 (2,6 MDalton),cedido por el Dr.E.Domingo, Centro de Biol.Molecular, Madrid.

III . METODOS

1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras se recogieron en botellas de vidrio Pyrex con tapón de rosca, previamente esterilizadas, según las normas de la A.P.H.A.(1980).

La toma se efectuó colocando la botella, a contracorriente, a unos 15 cm de profundidad. Las muestras se transportaron en nevera y fueron analizadas antes de transcurridas 2 horas desde su recogida.

Los muestreos se realizaron con periodicidad semanal desde marzo de 1980 hasta marzo de 1982.

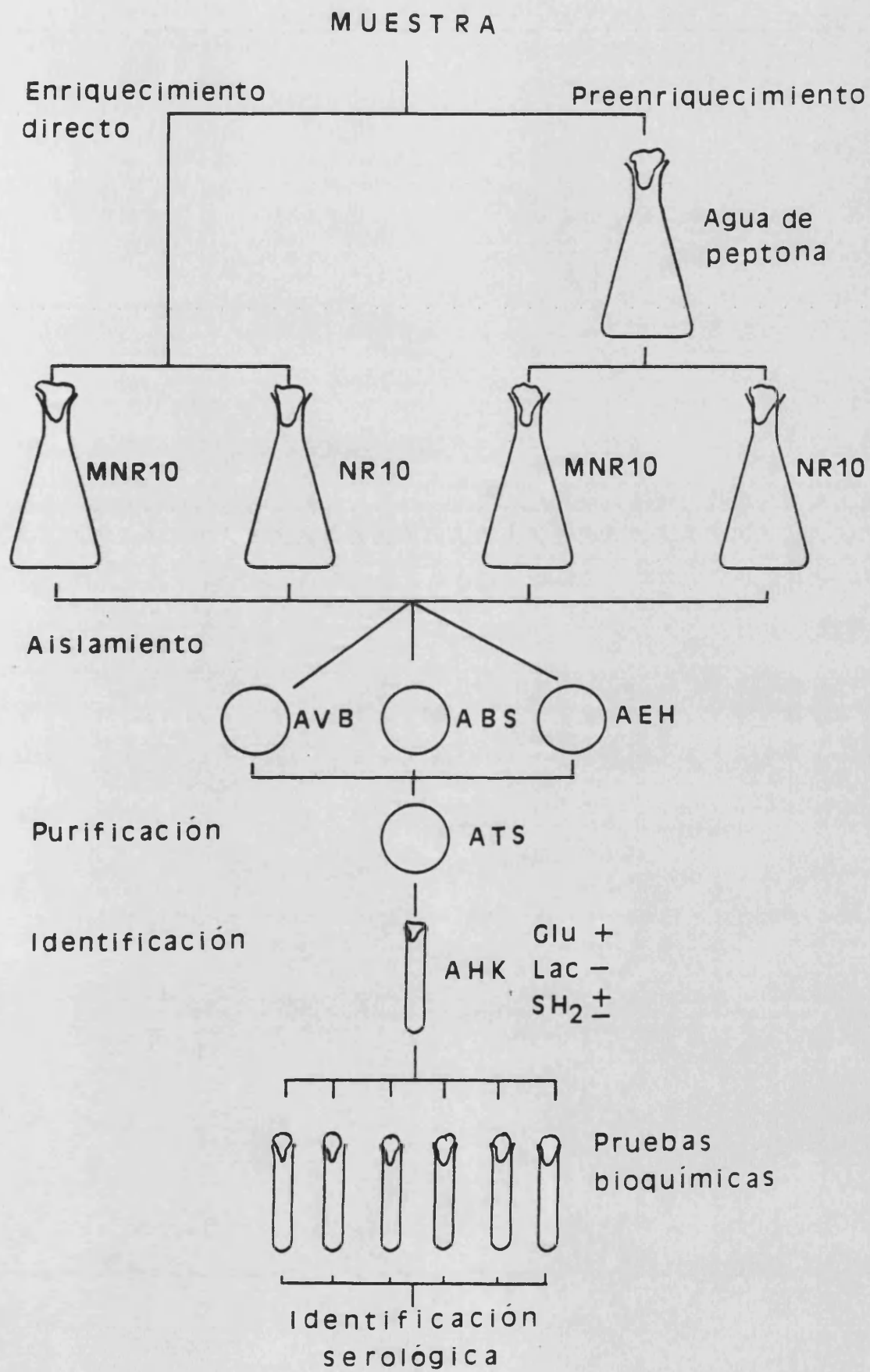
2. PREENRIQUECIMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Con cada una de las 240 muestras de agua examinadas, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se sembraron 10 ml en matraces conteniendo 90 ml de agua de peptona (Edel y Kampelmacher, 1973) como medio de preenriquecimiento, que se incubaron a 43°C de 5 a 18 horas. De estos matraces se inocularon alícuotas de 10 ml en 90 ml de NR10 y MNR10 (Alcaide y cols., 1984), incubándose a 43°C 24 horas.

- Para el enriquecimiento directo, se sembraron 10 ml de muestra en 90 ml de los medios NR10 y MNR10, que fueron incubados a 43°C, durante 24 horas.

Figura 3. Esquema del proceso seguido para el aislamiento e identificación de Salmonella en el estudio comparativo de los factores que afectan dicho aislamiento.



En la Figura 3 se puede observar un esquema del proceso seguido en el aislamiento e identificación de salmonellas.

3. PREENRIQUECIMIENTO Y TEMPERATURA DE INCUBACION

Con el fin de estudiar en detalle la acción de la temperatura de incubación de los medios de preenriquecimiento y enriquecimiento directo, se realizaron 9 muestreos adicionales en un punto del lago y en la estación depuradora, realizando recuentos de Salmonella mediante el método del NMP (A.P.H.A.,1980) combinando las técnicas de preenriquecimiento y enriquecimiento directo con temperaturas de incubación de 37°C y 43°C.

Cada muestra de agua se sometió a 4 métodos de recuento por el sistema del NMP utilizando en cada uno de ellos tres series de tres matraces. Del agua del lago se sembraron inóculos de 100, 10 y 1 ml y del agua de la depuradora se inocularon 10, 1 y 0.1 ml. Para inocular la muestra de 100 ml, se filtró este volumen a través de una membrana Millipore de 0.45 μ de diámetro, que se introdujo en matraces conteniendo el medio correspondiente.

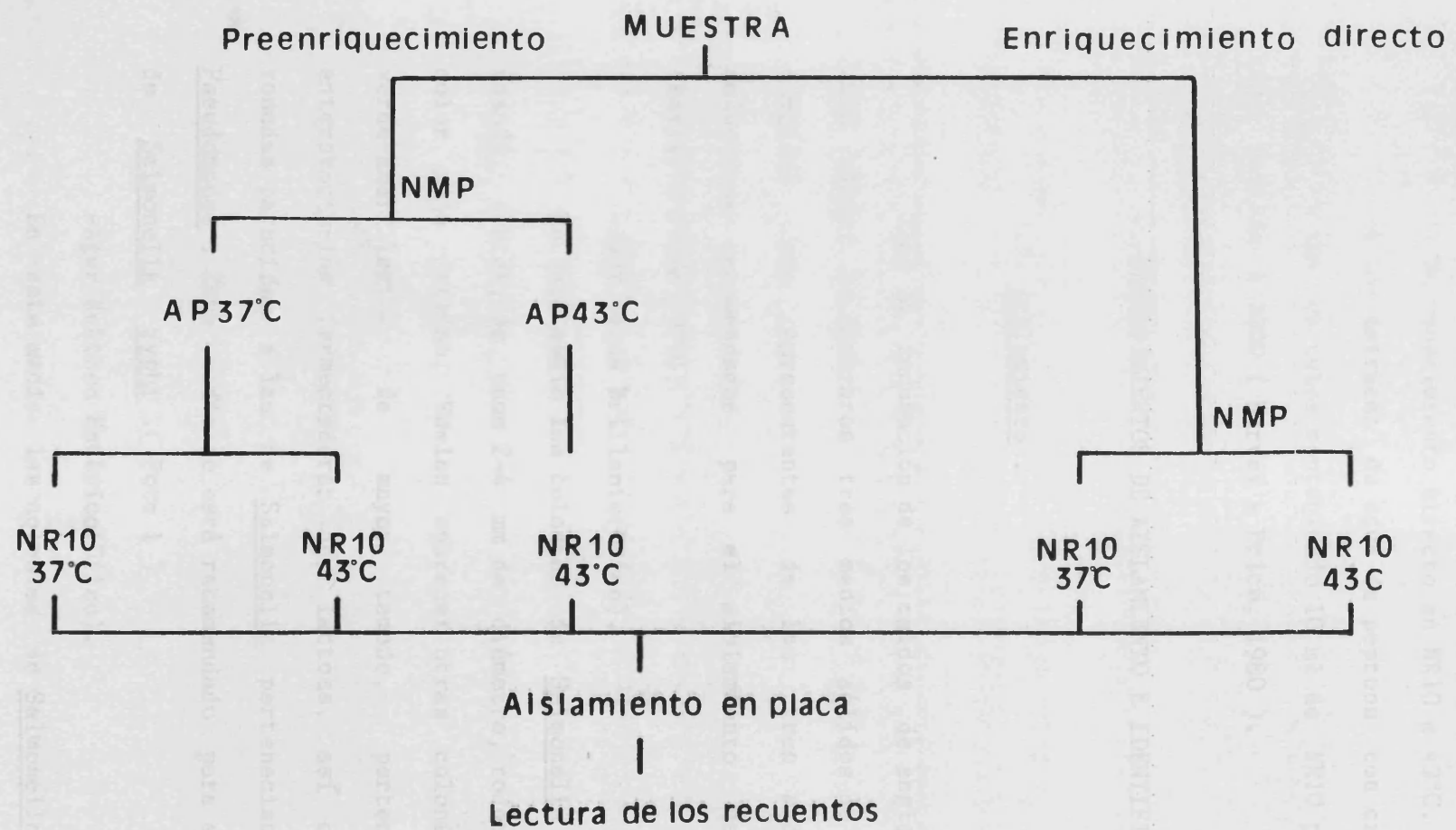
Los procedimientos fueron los siguientes(Figura 4):

a) Preenriquecimiento a 37°C, en agua de peptona, seguido de enriquecimiento en NR10 a 37°C y 43°C.

b) Preenriquecimiento a 43°C, en agua de peptona, seguido de enriquecimiento en NR10 a 43°C.

c) Enriquecimiento directo en NR10 a 37°C.

Figura 4. Esquema del proceso seguido en la determinación de los NMPs de Salmonella, empleando distintos procedimientos.



enterobacterias fermentadoras de lactosa.(Foto 2)

-Agar Bismuto Sulfito (Difco). Las colonias de Salmonella son negras, planas, de 3-4 mm de diámetro, rodeadas de un halo oscuro, presentando brillo metálico por reflexión. En ocasiones pueden aparecer colonias verde oscuro o pardas pertenecientes generalmente a microorganismos del género Proteus (Foto.3).

4.2. Identificación

De cada placa se tomaron 4 colonias con la morfología típica de Salmonella que, tras su purificación, se sembraron en agar con hierro de Kligler, lo cual permite una primera aproximación a las características propias del género ya que en dicho medio se pueden observar la fermentación de glucosa y lactosa y la producción de sulfhídrico.

Las cepas que fermentaron la glucosa y no la lactosa, con o sin producción de sulfhídrico, se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas para diferenciarlas de otros géneros de enterobacterias estrechamente relacionados (Garay y cols,1978). Para ello se sembraron los siguientes medios : agar fenilalanina, caldo urea , medio S.I.M. y caldos para la descarboxilación de arginina, lisina y ornitina.

Las presuntas salmonellas, identificadas según las pruebas anteriores, se confirmaron bioquímicamente mediante su siembra en el sistema multitest API 20 Enterobacteriaceae.(Fig.1)

Las salmonellas confirmadas bioquímicamente se

identificaron serológicamente mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos (Le Minor, 1972), utilizando antisueros específicos poli y monovalentes. Para esta identificación se siguió el esquema de Edwards y Ewing (1962).

5. ANALISIS ESTADISTICO.

A lo largo del estudio se han realizado 2 análisis de varianza de los resultados obtenidos. Previamente se ha verificado si los datos cumplían las condiciones de normalidad y homogeneidad de la varianza, utilizando las transformaciones necesarias si no se cumplían ambas (Snedecor, 1982).

A. Análisis de varianza multifactorial de los resultados obtenidos en la primera fase de aislamiento de Salmonella a partir de aguas (Marzo 1980-Marzo 1982), expresando los datos como fracciones de cepas confirmadas frente a cepas examinadas. Una vez realizados el test de normalidad y el de Barlett, se procedió a la transformación arcsen de la raíz cuadrada de los datos originales. Se estudiaron los siguientes efectos:

1. Preenriquecimiento
2. Caldo selectivo de enriquecimiento
3. Medio sólido selectivo
4. Características del punto de muestreo
5. Temperatura del agua

Una vez conocidos los efectos e interacciones significativos, los niveles de significación fueron establecidos

mediante el test secuencial de Student-Newman-Keuls.

B. En una fase posterior del trabajo, se ha procedido a la cuantificación de las salmonellas aisladas mediante el método del Número Más Probable. Se ha comparado el efecto combinado del preenriquecimiento en agua de peptona, con la incubación a 37°C ó 43°C, tanto del medio de preenriquecimiento como del medio selectivo de enriquecimiento.

Los resultados de este estudio, que ha abarcado 9 muestreos en dos tipos de agua con distinto nivel de contaminación fecal, desde Septiembre hasta Diciembre de 1984, han sido sometidos a un análisis de varianza, empleando la transformación $\ln+1$.

Se ha realizado un ANOVA para cada tipo de agua, ya que los recuentos obtenidos eran de diferente magnitud en ambas.

Los efectos estudiados para cada agua, han sido los siguientes:

1. Preenriquecimiento
2. Temperatura de incubación de los caldos de pre y enriquecimiento.

El tratamiento estadístico se realizó utilizando un ordenador IBM PC, con programas cedidos por D. Manuel Serra y un ordenador CASIO FX-9000 P, con programas facilitados por el Dr. R. Martinez Pardo.

6. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

Se empleó la técnica de réplica en agar (Armstrong y cols 1982). Los antibióticos empleados fueron los siguientes: ampicilina, cloramfenicol, estreptomina, kanamicina, tetraciclina y amoxicilina (25 µg/ml) , polimixina B (300 U), penicilina G (10 U), cefalexima (30 µg/ml) y ac.fusídico (10 µg/ml).

Las cepas de Salmonella se cultivaron en caldo Mueller-Hinton, tras 24 horas de incubación a 37°C , los cultivos se diluyeron a 10^5 - 10^6 u.f.c./ml en medio fresco. De esta suspensión se sembraron, mediante un asa calibrada de 3 mm de diámetro, placas de agar Mueller-Hinton suplementado con los antibióticos estudiados, a las concentraciones anteriormente indicadas, así como placas control sin antibióticos.

La presencia o ausencia de crecimiento se observó tras 18 horas de incubación a 37 °C, de acuerdo con procedimientos standarizados para comprobar las resistencias a antibióticos (Washington y Barry, 1974).

7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron mediante la técnica de dilución en placa (Chabbert, 1977).

Se preparó agar Mueller-Hinton, repartiéndolo en tubos a razón de 22.5 ml por tubo, que tras su esterilización se mantuvieron a 48°-50°C en baño.

A partir de una solución concentrada de cada antibiótico, se realizaron las diluciones adecuadas para añadir

finalmente 2.5 ml de dichas diluciones a los tubos conteniendo el agar fundido. Después de homogeneizar cada tubo, se vertió en placas Petri estériles. Una vez solidificado el medio puede inocularse inmediatamente o conservarse a 4°C alrededor de 7 días.

Las cepas a titular se cultivan en caldo Mueller-Hinton durante una noche a 37°C y seguidamente se diluyen hasta 10^5 - 10^6 u.f.c./ml, para sembrar las placas realizando una estría de unos 20 mm de longitud. Para la siembra se utilizó una pipeta Pasteur con el extremo ligeramente redondeado. Mediante este procedimiento se pueden sembrar varias cepas por placa.

Tras incubar 18-24 horas a 37°C, se realiza la lectura considerando concentración mínima inhibitoria la concentración más baja que impide el crecimiento de los microorganismos.

8. TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA.

Se utilizó como cepa receptora E.coli K12 185 NaI^r.

Las cepas donadora y receptora se sembraron en matraces de 100 ml conteniendo caldo LB, cultivándose a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, entonces se dejaron 30 minutos más a 37°C sin agitación. A continuación se mezclaron 1 ml del cultivo de la cepa donadora con 2 ml de la receptora en medio LB fresco, incubándose la mezcla a 37°C, sin agitación, de 4 a 18 horas (Curtiss, 1981).

La selección de transconjugantes se realizó sembrando las diluciones adecuadas de la mezcla de conjugación en agar

BTB-lactosa (Aoki et al., 1977), conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nalidíxico y los antibióticos adecuados en cada caso. Las colonias crecidas tras la incubación a 37°C durante 48 horas, se consideraron presuntos transconjugantes siendo comprobadas sus características bioquímicas y su resistencia a antibióticos.

La frecuencia de conjugación se determinó como el número de transconjugantes por número inicial de donadores (Shaw y Cabelli, 1980).

9. AISLAMIENTO DEL ADN PLASMIDICO

A lo largo de este trabajo se han ensayado varias técnicas para el aislamiento de plásmidos, con el fin de hallar alguna adecuada a las especies de Salmonella estudiadas y para obtener el grado de pureza necesario del ADN.

El material empleado en estos aislamientos fue siliconizado previamente (Maniatis y cols, 1982).

9.1. Método de Godson y Vapnek (1973) .

De un cultivo de 18 horas en 500 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos adecuados, se recogen las células centrifugando en botellas de 250 ml, a 12.000 x g y 4°C durante 15 minutos, en una centrífuga Beckman J2 21M, con rotor JA-14.

El precipitado obtenido se resuspende en 10 ml de una solución de sacarosa al 10% en Tris.ClH 50 mM (pH 8), mantenida a

0°C en baño de hielo. La suspensión se transfiere a un tubo corex de 30 ml.

A continuación se añaden 2 ml de solución de lisozima (10 mg/ml en Tris 0.25 M, pH 8), preparada diariamente y 8 ml de EDTA 0.25 M, pH 8). El tubo se invierte varias veces y se deja 10 minutos en baño de hielo.

Transcurrido este tiempo, se añaden 4 ml de SDS al 10%, agitando con una varilla de vidrio para dispersar el SDS a través de la suspensión. La agitación debe ser suave para no romper el ADN bacteriano liberado. Inmediatamente se adicionan 6 ml de NaCl 5M, se agita suavemente y se deja 1 hora en baño de hielo.

Seguidamente se centrifuga (rotor JA-20), a 50.000 x g y 4°C durante 45 minutos, para eliminar el ADN de alto peso molecular y los restos celulares.

El sobrenadante se transfiere a otro tubo y se extrae dos veces con fenol:cloroformo y una vez con cloroformo. Tras cada extracción se recoge la fase acuosa a un nuevo tubo. Después de las extracciones, se añaden 2 volúmenes de etanol de 96°, a -20°C, manteniéndose la mezcla en congelador, a -20°C, de 1 a 2 horas.

El ADN plasmídico se recoge por centrifugación a 1.500 x g y 4°C, durante 15 minutos. Tras lavar el precipitado con etanol de 70% y secar brevemente al vacío, se resuspende en un volumen adecuado de tampón TE (Tris.ClH 10 mM, EDTA 1mM, pH 8).

Las muestras así obtenidas se sometieron directamente a electroforesis en gel de agarosa.

9.2. Método de Birnboim y Doly (1979), modificado por Silhavy y cols. (1984)

Las cepas portadoras de las resistencias a antibióticos se crecen en 500 ml de medio LB, durante toda la noche.

Las células se recogen por centrifugación a 12.000 x g y 4°C, durante 15 minutos. El sedimento se resuspende en 10 ml de GETL a 0°C, cuya composición es:

Glucosa	50mM	
EDTA	10mM	
Tris.ClH	25mM	pH 8
Lisozima	5mg/ml	

La suspensión se transfiere a tubo de polipropileno y se deja 5 minutos a temperatura ambiente, con el fin de que actúe la lisozima degradando la pared bacteriana y facilitando la lisis suave de la célula.

A continuación se añaden 20 ml de NS a 0°C (NaOH 0.2N, SDS 1%). El tubo se invierte rápidamente 2 ó 3 veces y se deja 5 minutos a 0°C en baño de hielo. El SDS provoca la lisis celular liberando al medio el contenido citoplasmático. Entonces se añaden 15 ml de solución de acetato potásico a 0°C :

Acetato potásico 5M	60 ml	pH 4,8
Ac. acético	11.5 ml	
Agua destilada	28.5 ml	

Se cierra el tubo y se agita suavemente. En este paso se produce la precipitación del ADN cromosómico. Seguidamente se centrifuga a 50.000 x g y 4°C, 15 minutos, recogiendo el

sobrenadante que se pasa a tubo corex de vidrio. A este sobrenadante se le añade 1 volumen de fenol:cloroformo (preparado segun Maniatis y cols., 1982), se homogeniza y se centrifuga 10 minutos a 12.000 x g. Se extrae el sobrenadante, cuidando de no coger parte de la interfase y se añaden 2 volúmenes de etanol de 96° a -20°C, dejándose al menos 2 horas en nevera a 4°C, para que precipite el ADN. A continuación se centrifuga a 12.000 x g y 4°C, 30 minutos, recogiendo el precipitado que, tras lavar con etanol de 70% y secar al vacío, se resuspende en 5 ml de TE suplementado con 20 µg/ml de RNasa pancreática, libre de DNasas, incubándose 30 minutos a 37°C en baño. Transcurrido este tiempo se añaden otros 5 ml de TE con 1% de SDS y 100 µg/ml de Proteínasa K, dejando la mezcla otros 30 minutos a 37°C.

Para extraer la proteínasa se efectúa un nuevo tratamiento con fenol:cloroformo/etanol de 96° y de 70%. El sedimento, secado al vacío se resuspende finalmente en un volumen adecuado de TE.

Este método se empleó igualmente, disminuyendo adecuadamente los volúmenes de los tampones empleados, para pequeñas cantidades de cultivo, utilizando en las centrifugaciones una Microcentrifuga Beckman Microfuge 11.

9.3. Metodo de Kado y Liu (1981) modificado por Toranzo y cols. (1983)

Se trata de una técnica rápida, basada en la

desnaturalización del ADN cromosómico por la acción del SDS alcalino a elevadas temperaturas.

De un cultivo, crecido toda la noche en caldo LB, se transfieren 1,5 ml a un tubo Eppendorf centrifugándose a 12.000 x g, 5 minutos (Bekman Microfuge 11), para recoger las células, éstas se resuspenden en 70 μ l de solución lítica (Lauril sulfato sódico al 3% en Tris-acetato 50mM pH 12,4).

Tras homogenizar se coloca el tubo en baño a 60°C durante 60 minutos. A continuación se añaden 70 μ l de fenol:cloroformo (1:1 v/v), se agita brevemente y se centrifuga a 12.000 x g, 10 minutos.

La capa superior contiene el ADN plasmídico y se puede emplear directamente para la electroforesis utilizando también Tris-Acetato-EDTA (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,9)

Asimismo se empleó el método según la descripción original de Kado y Liu (1981).

10. ESTIMACION DE LA PUREZA Y CONCENTRACION DEL ADN AISLADO .

La concentración de ADN plasmídico en las preparaciones obtenidas se determinó leyendo la absorción a 260 nm, en un espectrofotómetro Beckman modelo 35, considerando que 1 unidad de absorción equivale a 50 μ g/ml de ADN.

Para comprobar la pureza de las muestras se determinó el cociente entre los valores de absorción a 260, 230 y 260 ,280

A_{260} / A_{230} y A_{260} / A_{280} , que deben aproximarse a 2.

11. EXTRACCION DEL ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .

Se empleó la técnica de elución por congelación, descrita por Tautz y Renz (1983).

Las bandas de ADN, observadas en el gel de electroforesis, teñido con bromuro de etidio , se cortaron con un bisturí y se transfirieron a un tubo estéril, al que se añadió, aproximadamente 10 veces el volumen del fragmento de gel, de una solución de acetato sódico 0.3M en EDTA 1mM (pH 7), con el fin de eliminar el bromuro de etidio. Para ello se mantuvieron de 15 a 45 minutos en oscuridad, con agitación continua.

Los fragmentos del gel se transfirieron entonces a un tubo Eppendorf, de 0.6 ml de volumen, que había sido perforado previamente y en el que se había colocado una pequeña cantidad de lana de vidrio siliconizada. Los tubos así preparados se llevaron a congelar a -70°C , en nitrógeno líquido.

A continuación se introdujeron los tubos, en tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 minutos (Beckman Microfuge 11). De esta manera se obtuvieron aproximadamente 0.5 ml de suspensión de ADN, a la que se añadieron 1/100 de su volumen de MgCl_2 1M en ac. acético al 10% y 2.5 volúmenes de etanol de 96° a -20°C , congelándose en nitrógeno líquido durante 10 minutos.

Tras centrifugar en las condiciones anteriores, se lavó el precipitado con acetato sódico 100 mM (pH 6), etanol del 70% y con etanol. El sedimento obtenido se secó brevemente al vacío y

se resuspendió en 50 μ l de TE.

Finalmente se centrifugó la muestra 1 minuto, para eliminar los posibles restos de agarosa o lana de vidrio.

Mediante este procedimiento se puede recuperar de un 60 a un 70% del ADN existente en el gel de agarosa.

Las muestras obtenidas se utilizaron para el tratamiento con endonucleasas de restricción.

12. TRATAMIENTO DEL ADN PLASMIDICO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN .

Los enzimas utilizados fueron EcoRI y Sall, suministrados por Amersham International plc.

La mezcla de reacción se preparó en tubos Eppendorf de 0.6 ml, con un volumen total de 20 μ l.

En primer lugar se añadieron 5 μ l de suspensión de ADN, aproximadamente 1 μ g, a continuación 2 μ l del tampón de digestión adecuado, concentrado 10 veces, con la siguiente composición (Maniatis y cols., 1982):

NaCl	100mM	
Tris.ClH	50mM	pH 7.5
MgCl 2	10mM	
Dithiothreitol	1mM	

Seguidamente se añadieron 10 unidades de enzima y se completó en volumen hasta 20 μ l con agua estéril.

La reacción tuvo lugar a 37°C, en baño, durante dos horas y se paró colocando las muestras a 80°C durante 10 minutos

y otros 10 minutos en baño de hielo.

Los tratamientos con doble digestión se realizaron añadiendo los dos enzimas a la vez, ya que utilizan el mismo tampón de digestión.

13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL ADN PLASMIDICO

Las electroforesis se realizaron en un aparato horizontal. El gel se preparó disolviendo agarosa (tipo II, Sigma) al 0.6 y al 0.8 %, en TBE, con la siguiente composición (Maniatis y cols., 1982): Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM (pH 8), excepto en el caso de las muestras obtenidas por el método de Kado y Liu donde se empleó Tris-Acetato-EDTA (TAE).

De cada muestra de ADN, se tomaron 20 μ l, a los que se añadieron 10 μ l de Ficoll al 20% y 10 μ l de una solución de Azul de Bromofenol / Xylene Cyanol FF al 0.2% respectivamente, como marcadores a seguir durante la electroforesis (Maniatis y cols., 1982).

Las condiciones de electroforesis fueron 150 mA y 110 v, suministrados por una fuente Pharmacia ECPS 3000/150.

La tinción de los geles se realizó sumergiéndolos en tampón TBE adicionado con 1 μ g/ml de bromuro de etidio, durante 30 minutos.

Las bandas de ADN se visualizaron con un transiluminador C-62 (Ultraviolet Products), realizandose las fotos con una película Polaroid 665, utilizando un filtro naranja

neutro YA 2 y filtro de ultravioleta Kenko UV.

En algunos casos se utilizaron minigeles, empleando agarosa al 0.7% en tampón TBE . Las condiciones de electroforesis fueron tensión constante de 15 v/cm, utilizando la misma fuente. Las electroforesis transcurrieron normalmente en 1 hora.

14. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS PLÁSMIDOS .

El peso molecular de los plásmidos estudiados se determinó calculando los factores de migración en el gel de agarosa, de los plásmidos tomados como patrones. Estos fueron: pBR322 (2,6 MDalton), RSF1010 (5,5 MDalton), pIP113 (32 MDalton), RP4-35 (57,5 MDalton) y Rts1 (122 MDalton).

Para el análisis de restricción se utilizó el bacteriófago λ , tratado con la endonucleasa de restricción EcoRI.

Determinados los factores de migración en cada caso, se obtuvo la recta de regresión definida por estos valores y los logaritmos de los pesos moleculares correspondientes (Snedecor, y Cochran, 1982). A partir de esta recta se calcularon, gráfica y matemáticamente, los pesos moleculares de los plásmidos estudiados.

15. CURACION CON BROMURO DE ETIDIO .

La curación consiste en la eliminación de un plásmido de su célula hospedadora mediante la acción de un agente que

interfiera específicamente, o al menos más considerablemente que sobre el cromosoma, sobre la replicación y/o mantenimiento de dicho plásmido .

Existen varios productos capaces de eliminar mediante este procedimiento, un plásmido de su bacteria hospedadora: rifampicina, actinomicina D, naranja de acridina, bromuro de etidio , etc.

En el presenta trabajo se empleó bromuro de etidio.

Las células se hacen crecer en medio LB, conteniendo 0.4 y 0.04 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio (Toranzo y cols., 1983). A las 24 horas y a las 48 horas se plaquean diluciones apropiadas de estos cultivos en LB agar. Las colonias crecidas se replican, mediante palillos estériles, en placas conteniendo los antibióticos adecuados en cada caso. Paralelamente, el cultivo de 48 horas se reinocula en medio fresco con las mismas cantidades de bromuro de etidio y se incuba otras 48 horas, plaqueando a las 24 y 48 horas como se describe anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS FACTORES QUE AFECTAN EL AISLAMIENTO DE SALMONELLA.

1. PREENRIQUECIMIENTO

El uso del preenriquecimiento ha sido recomendado por numerosos autores (Thatcher y Clark, 1968; Edel y Kampelmacher, 1973; Harvey y Price, 1977), sobre todo para la recuperación de Salmonella a partir de muestras sometidas a algún tipo de daño subletal. Este preenriquecimiento emplea medios de cultivo no selectivos como por ejemplo agua de peptona, caldo nutritivo, caldo lactosado o solución Ringer concentrada 4 veces (Harvey y Price, 1979), durante un período que oscila entre 2 y 18 horas y generalmente, incubados a 37°C.

Sin embargo esta técnica permite el desarrollo de gran número de microorganismos competidores de Salmonella, menos exigentes nutricionalmente y generalmente mejor adaptados a ambientes extraentéricos. Estos gérmenes pueden llegar a enmascarar, o simplemente dificultar, el crecimiento de las colonias de salmonellas en los medios sólidos.

Algunos estudios han demostrado que se puede evitar el uso de preenriquecimiento en determinados casos, acortando así considerablemente el proceso de aislamiento de Salmonella (Edgar y Soar, 1979; Alcaide y cols., 1984).

En el presente trabajo se han estudiado fundamentalmente dos tipos de aguas:

1. Aguas residuales , antes de ser sometidas al proceso de depuración.

2. Aguas naturales con distinto grado de contaminación fecal, tomadas en diversos puntos del lago de la Albufera de Valencia.

Se ha comprobado que en ambos casos, la utilización de enriquecimiento directo, en caldo NR10, ha proporcionado mayor número de aislamientos positivos de Salmonella (Tablas V y VI). De un total de 353 cepas aisladas en el agua residual, 156 se aislaron empleando la técnica del preenriquecimiento y 197 utilizando el enriquecimiento directo. En las aguas superficiales naturales de un total de 759 salmonellas, 437 se aislaron con enriquecimiento directo y 322 con preenriquecimiento. Por lo tanto de 1.112 aislamientos totales, 478 se han obtenido usando preenriquecimiento y 634 sin él.

Estas diferencias han sido más acusadas en el caso de las aguas de la Albufera, con menor número de flora competitiva, mientras que en el caso del agua residual, aunque los microorganismos competidores están en número muy superior, las salmonellas se encuentran también en mayores cantidades y además en un medio más favorable lo que facilita su recuperación.

Las aguas de la Albufera son típicas de un ecosistema hipereutrófico donde, probablemente, las salmonellas no se encuentran en condiciones tan desfavorables como cabría esperar en un agua superficial natural. De hecho, en el mismo ecosistema y utilizando la metodología tradicional (enriquecimiento en caldo tetracionato), se obtuvieron muchos menos aislamientos positivos

Tabla V. Número de cepas de Salmonella aisladas con los diferentes procedimientos de enriquecimiento y medios sólidos empleados en el agua residual

	<u>Cepas aisladas</u>			Nº DE
	AHE	AVB	ABS	SEROTIPOS
Enriquecimiento directo:				
NR10	69	27	60	18
MNR10	16	5	20	15
Preenriquecimiento:				
NR10	52	22	36	17
MNR 10	22	2	22	15

AHE: agar Hektoen Entérico

AVB: agar Verde Brillante

ABS: agar Bismutó Sulfito

NR10: caldo R10 adicionado de novobiocina sódica

MNR10: caldo NR10 modificado

Tabla VI. Número de cepas de Salmonella aisladas con los distintos procedimientos de enriquecimiento y medios sólidos empleados en las aguas superficiales naturales

	Cepas aisladas			Nº DE SEROTIPOS
	AHE	AVB	ABS	
Enriquecimiento directo:				
NR10	99	65	105	28
MNR10	71	24	73	23
Preenriquecimiento:				
NR10	88	50	86	25
MNR10	41	13	44	16

en un estudio de 3 años de duración (Garay y cols., 1978).

La principal ventaja de poder prescindir del preenriquecimiento es la de acortar el proceso de aislamiento de Salmonella, así como obtener un menor crecimiento de organismos competitivos sobre las placas de medios sólidos.

2. CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Tradicionalmente, se han empleado los caldos Selenito y Tetracionato como medios de enriquecimiento selectivo en el aislamiento de salmonellas. Puede encontrarse una revisión de los métodos de aislamiento de Salmonella en Harvey y Price, 1979.

Rappaport y cols.(1956), utilizaron como agente selectivo para las salmonellas, una solución hipertónica de cloruro de magnesio. Bajo condiciones de deshidratación, algunos coliformes mueren mientras que las salmonellas y shigellas permanecen viables. El medio fué aceptado por diversos autores (Collard y Unwin, 1958; Hooper y Jenkins, 1965), comprobándose su eficacia con distintos tipos de muestras, como se ha citado en el apartado 5.2 de la introducción.

El medio original ha sufrido diferentes modificaciones, consistentes básicamente en la reducción del contenido en oxalato de verde malaquita (Vassiliadis y cols., 1976a). Actualmente es denominado R10 ó RV (Papadakis y Efstratiou, 1980; Vassiliadis y cols., 1981b), habiéndose comprobado la mayor eficacia de este caldo frente al Selenito y Tetracionato en el aislamiento de Salmonella a partir de aguas residuales y de otros tipos de

muestras (Vassiliadis y cols., 1983).

En un estudio anterior (Alcaide y cols., 1982), se comprobó que la adición de novobiocina sódica a los caldos selectivos R10 y Selenito, mejoraba significativamente la recuperación de Salmonella de aguas con distintos niveles de contaminación fecal, resultando superior el caldo NR10 al caldo NSelenito. En un reciente trabajo se ha comparado la adición de novobiocina al medio Tetracionato de Muller-Kauffmann, habiéndose llegado a conclusiones similares (Amorós, 1985), igualmente el medio NR10 fué más eficaz que el Tetracionato sin adición de novobiocina (Moriñigo y cols., 1983).

Un posible inconveniente de los caldos selectivos, radica en que podrían suponer una excesiva presión sobre salmonellas subletalmente dañadas, en ecosistemas acuáticos. En vista de que, como se ha explicado previamente, diversos autores ya habían modificado la concentración de oxalato de verde malaquita, uno de los factores de selectividad del medio, se ha modificado el otro factor, que es la solución hipertónica de cloruro de magnesio. La modificación empleada consistió en sustituir el cloruro de magnesio por sulfato de magnesio (caldo MNR10), pensando en el menor efecto inhibitorio del ión sulfato frente al ión cloruro. El nuevo medio no consigue mayor número de aislamientos positivos; el medio original NR10, mantuvo, en todo momento, una clara superioridad en el aislamiento de Salmonella, sobre todo en los puntos con elevados niveles de contaminación fecal (Tabla VII).

Tabla VII. Número de salmonellas aisladas en los diferentes puntos de muestreo con los intervalos de temperatura considerados

Intervalo de temperatura (°C)	Puntos de muestreo					Total
	1	2	3	4	5	
3 - 10	36	2	62	3	70	173
10 - 15	37	9	87	144	102	379
15 - 20	21	15	96	30	69	231
20	25	2	109	81	112	329
Total	119	28	354	258	353	

3. MEDIOS SOLIDOS SELECTIVOS

No existe acuerdo general respecto a la elección de medio sólido selectivo, ya que está admitido que el aislamiento de salmonellas constituye un proceso complejo multifactorial, no existiendo técnicas de aceptación universal, solamente recomendaciones (A.P.H.A., 1980).

En general, se pueden agrupar los medios selectivos en tres tipos: agares con verde brillante, agares con sales biliares y agares con Bismuto Sulfito (Harvey y Price, 1979). Dentro de cada uno de estos grupos existen diversas modalidades, quedando a criterio del investigador la elección de la misma. En todo caso es recomendable, puesto que algunos son más selectivos que otros para determinados serotipos, el empleo conjunto de varios de ellos con el fin de cubrir el mayor espectro posible en cuanto a recuperación de distintos serotipos. Asimismo se ha comprobado que existen diferentes combinaciones medio líquido-medio sólido, que dan lugar a mayor efectividad en los aislamientos (Harvey y Price, 1979).

En el presente trabajo, se han utilizado los medios agar Verde Brillante, agar Hektoen Entérico y agar Bismuto Sulfito, representantes de los tres grupos arriba mencionados. Los medios Bismuto Sulfito y Hektoen Entérico, dieron mejores resultados tanto en el número de aislamientos como en la diferenciación de las colonias de Salmonella. El medio agar Verde Brillante, permite el crecimiento de gérmenes no fermentadores, pertenecientes al género Pseudomonas, muy abundantes en aguas

superficiales, que dan colonias similares a las de Salmonella. Con los otros medios, en determinadas ocasiones, se llegaron a obtener cultivos puros de salmonellas. En las Tablas V y VI, quedan reflejados el número de aislamientos positivos para cada combinación caldo y medio.

En un trabajo previo (Alcaide y cols., 1982), se utilizó un medio general para el crecimiento de enterobacterias, agar CLED, no obteniéndose ningún aislamiento positivo de Salmonella.

El medio agar Bismuto Sulfito, se recomienda para el aislamiento de S.typhi, siendo el más selectivo de los tres empleados.

4. TEMPERATURA DEL AGUA

La supervivencia de las bacterias entéricas en ambientes naturales está influenciada por numerosos factores, unos de naturaleza físico-química y otros referentes a la interacción directa entre organismos (lisis, parasitismo, predación, etc.). Entre los primeros, la temperatura ha sido uno de los más estudiados en relación a la supervivencia de los indicadores de contaminación fecal en aguas (Burman, 1967; Van Donsel y cols., 1967; McFeters y Stuart, 1972;). Sin embargo, los resultados no son homogéneos; mientras algunos investigadores observan un descenso en el número de coliformes al aumentar la temperatura (McFeters y Stuart, 1972; Garay y cols., 1983), hecho generalmente aceptado ,

otros encuentran resultados opuestos (Nuhi y Malekzadeh , 1978) . En general se admite que temperaturas muy elevadas son perjudiciales para la supervivencia de estos microorganismos ajenos al agua, pero el hecho de que su aporte a las aguas (y por tanto de los posibles patógenos que les acompañen en mayor o menor número), sea intermitente e incontrolado, dificulta extraordinariamente el establecimiento de conclusiones válidas al respecto.

Nuestros resultados indican que la máxima recuperación de Salmonella se dá a temperaturas intermedias, entre 10°C y 20°C, siendo las inferiores a 10°C las más desfavorables, aunque se han llegado a aislar salmonellas a 3°C de temperatura. No siempre la supervivencia de los indicadores es relacionable con la de los patógenos, como se ha demostrado en relación con la temperatura y la radiación solar (Gosselin y cols., 1980; McCambridge y McMeekin, 1981), habiéndose encontrado una mayor supervivencia de Salmonella que de E.coli y coliformes fecales.

5. CARACTERISTICAS DEL PUNTO DE MUESTREO

Generalmente se acepta que las aguas con mayores índices de coliformes son las que presentan una mayor probabilidad de aislamiento de patógenos, especialmente Salmonella. De hecho las salmonellas se encuentran corrientemente asociadas con alimentos contaminados y ambientes con elevados recuentos de coliformes y estreptococos fecales (Spino, 1966; Claudon y cols., 1971; McFeters y cols., 1974; Cook y cols.,

1974; Sayler y cols., 1976; Fuks y Devescovi, 1984). Sin embargo otros estudios han demostrado que las salmonellas están ampliamente distribuidas en el medio natural, habiéndose aislado en lagos y aguas superficiales con un bajo número de indicadores (Cherry y cols., 1972; Thomason y cols., 1975; Dondero y cols., 1977) e incluso en ausencia de éstos (Fair y Morrison, 1967; Evison y Tosti, 1980). En estudios realizados en medios marinos, se demuestra una mayor supervivencia de salmonellas que de coliformes y estreptococos (Yoshpe-Purer y Shuval, 1972; McCambridge y McMeekin, 1981). Esta mayor supervivencia se ha intentado explicar en algunos casos por una mejor resistencia de las salmonellas a la radiación solar (McCambridge y McMeekin, 1981), cuyo efecto parece que no está en relación directa con la mortalidad como creían algunos autores (Gameson y Gould, 1975), sino que probablemente produce un daño en las bacterias que las hace más sensibles a los depredadores (Chamberlin y Mitchell, 1978).

Los resultados obtenidos indican que, efectivamente , el mayor número de aislamientos positivos se ha dado siempre en aguas con elevados niveles de coliformes fecales (Garay y cols., 1983). En la Tabla VII , se pueden observar los aislamientos en cada uno de los diferentes puntos muestreados. Los porcentajes de aislamientos positivos, respecto del número de muestreos realizados en cada punto, fueron los siguientes: en el punto 1 el 39,4%, en el punto 2 el 21,8%, en el punto 3 el 74,2 %, en el punto 4 el 57,5% y en el punto 5 (agua residual) el 91,6%.

Es de destacar que en el punto 3, correspondiente a la

desembocadura de la acequia de Silla, el número de cepas aisladas es prácticamente idéntico al obtenido en las aguas residuales no tratadas. Este canal recoge aguas residuales urbanas e industriales, de la población de Silla y adyacentes, zona muy densamente poblada y con alto grado de industrialización.

El punto 4, aunque también recoge directamente vertidos urbanos de la población del Saler, el volumen de los mismos es mucho más reducido que en el caso anterior. Estas aguas, tras su recorrido a lo largo del canal, desembocan en el lago por el punto 2, que muestra el menor número de aislamientos positivos, lo que indica el efecto de dilución y autodepuración experimentado.

Finalmente, el punto 1, aunque se encuentra al final de una acequia de 6 km de recorrido y gran caudal (acequia de Overa), muestra unos niveles moderadamente altos y muy uniformes a lo largo de todo el período de estudio. El efecto de dilución y autodepuración en este caso, puede quedar compensado por el aporte continuo de residuos de un matadero situado en la población de Sollana.

6. TRATAMIENTO ESTADISTICO

El análisis de varianza realizado con los resultados obtenidos en los aislamientos de Salmonella, considerando los efectos anteriormente descritos, ha dado los resultados que figuran en la Tabla VIII.

Todos los efectos estudiados han resultado

significativos ($p < 0.01$), así como numerosas interacciones dobles y triples, cuyos niveles de significación han sido evaluados mediante el test secuencial de Student-Newman-Keuls (ver apéndice estadístico).

El uso de enriquecimiento directo en el caldo selectivo, ha mostrado ser significativamente más eficaz que el empleo de preenriquecimiento en caldo no selectivo. Este resultado indica que, en las aguas estudiadas, se puede prescindir de la inoculación previa en un medio no selectivo, con el consiguiente acortamiento del proceso.

La sustitución del cloruro de magnesio por sulfato de magnesio, en el caldo de enriquecimiento, no ha mejorado la efectividad del medio. El caldo NR10 mantiene una superioridad para todas las aguas analizadas en el presente estudio.

Como ya se había mencionado, los medios agar Bismuto Sulfito y agar Hektoen Entérico, han resultado significativamente más eficaces que el agar Verde Brillante, en el aislamiento de Salmonella.

De los 4 intervalos de temperatura considerados, el correspondiente a 10°C - 15°C , fué significativamente superior a los demás, seguido por temperaturas superiores a 20°C y por último por los otros dos intervalos estudiados, como se desprende de los resultados obtenidos en el test de Keuls.

Tal como cabía esperar, el punto correspondiente al agua residual, de la planta depuradora, ha dado diferencias significativas, respecto al resto de los analizados, seguido por los puntos 3, 4, 1 y 2 respectivamente. Aunque se ha

intentado unificar el número de muestreos en todos los puntos analizados, en algunas ocasiones ha resultado imposible. Así dentro del agua del lago, en los puntos 1 y 4 se han realizado 33 tomas de muestra, en el punto 2, 32 y en el punto 3, 31; en el agua residual, se pudieron realizar un total de 24 muestreos. El hecho de que en esta última se obtuviera prácticamente el mismo número de aislamientos positivos que en el punto 3, con 7 muestreos de diferencia, explica que aquél haya resultado significativo frente a éste y consiguientemente frente al resto, en el test de Keuls. Ocasionalmente, se aislaron salmonellas en puntos con ausencia de coliformes fecales (Garay y cols., 1982). En el mismo lago, en estudios simultáneos, se han aislado salmonellas en puntos muy alejados de las desembocaduras de vertidos, coincidiendo con circunstancias ambientales anormales (fuertes vientos).

Tal como aparece en la Tabla VIII, han resultado significativas las siguientes interacciones:

- .Tipo de enriquecimiento-temperatura del agua
- .Tipo de enriquecimiento-punto de muestreo
- .Caldo de enriquecimiento-punto de muestreo
- .Medio sólido selectivo-temperatura del agua
- .Medio sólido selectivo-punto de muestreo
- .Temperatura del agua-punto de muestreo
- .Tipo de enriquecimiento-caldo de enriquecimiento-punto de muestreo
- .Tipo de enriquecimiento-temperatura del agua- punto de muestreo

.Caldo de enriquecimiento-medio sólido selectivo-punto de muestreo

.Caldo de enriquecimiento-temperatura del agua-punto de muestreo

.Medio sólido selectivo-temperatura del agua-punto de muestreo

Al ser el preenriquecimiento una técnica especialmente diseñada para la recuperación de Salmonella en estado subletal, su empleo aparece como significativo, cuando se utiliza en aguas con bajos niveles de contaminación o a temperaturas extremas.

En los puntos con mayores niveles de contaminación, se han obtenido en bastantes ocasiones, cuando se sembraban placas de agar Bismuto Sulfito o Hektoen Entérico como medios sólidos selectivos (frecuentemente empleando agar Bismuto Sulfito), cultivos puros de salmonellas en las primeras placas de aislamiento, inoculadas a partir de la siembra directa en caldo NR10.

El uso de medios sólidos más selectivos ha resultado más eficaz en los intervalos de temperaturas más favorables, agar Bismuto Sulfito o Hektoen Entérico y agua a 10°-15°C. Por el contrario, cuando se realizan los aislamientos a temperaturas extremas, esta combinación resulta probablemente demasiado selectiva.

Ante la imposibilidad de evaluar uno por uno todos los múltiples factores que afectan la recuperación de Salmonella, se ha optado por escoger una serie de puntos de muestreo de diferentes características, que reflejen variaciones tanto

físico-químicas como biológicas, que influyen la supervivencia de las bacterias alóctonas del ecosistema en cuestión. Las características físico-químicas y biológicas de las aguas influyen sobre la supervivencia de las salmonellas en las mismas, por lo cual el efecto punto de muestreo, que engloba las múltiples particularidades de cada tipo de agua, combinado con la temperatura y factores relativos a la metodología empleada, ha aparecido como efecto casi constante en las interacciones significativas del análisis de varianza. Cada tipo de agua, aunque sea del mismo lago, presenta unas características peculiares que lo hacen sumamente diferente de los otros.

El aislamiento de Salmonella es un proceso complejo multifactorial. Es difícil describir un método óptimo, para todo tipo de muestra, sin embargo puede desarrollarse una técnica más o menos estandarizada, que permita obtener resultados lo suficientemente objetivos como para poder ser comparados en distintas áreas estudiadas.

Tabla VIII. Efectos considerados en el análisis de varianza:

A: tipo de enriquecimiento (con o sin preenriquecimiento)

B: caldo de enriquecimiento (NR10 ó MNR10)

C: medio sólido selectivo

D: temperatura del agua

E: punto de muestreo

Tabla VIII. Tabla de ANOVA obtenida a partir de los resultados del estudio comparativo de los factores que afectan el aislamiento de Salmonella.

FUENTE	GL	SC	CM	F
A	1	607,72	607,72	36,463*
B	1	3981,9	3981,9	238,91*
C	2	2675,3	1337,6	80,259*
D	3	1383,6	461,22	27,673*
E	4	11746	2936,6	176,19*
AB	1	82,004	82,004	4,9202
AC	2	57,148	28,574	1,7144
AD	3	762,70	254,23	15,253*
AE	4	366,65	91,663	54,997*
BC	2	156,91	78,455	4,7073
BD	3	110,95	36,985	2,2191
BE	4	3597,9	899,48	53,968*
CD	6	675,63	112,60	6,7563*
CE	8	2101,1	262,64	15,758*
DE	12	3006,6	250,55	15,032*
ABC	2	12,816	6,4084	0,3845
ABD	3	39,907	13,302	0,7981
ABE	4	644,72	161,18	9,6708*
ACD	6	138,07	23,012	1,3807
ACE	8	157,15	19,644	1,1786
ADE	12	775,67	64,639	3,8783*
BCD	6	218,28	36,382	2,1828
BCE	8	665,24	83,155	4,9893*
BDE	12	1003	83,583	5,0419*
CDE	24	1258,2	52,425	3,1455*
ABCD	6	111,12	18,521	1,1112
ABCE	8	212,39	26,549	1,5929
ABDE	12	528,74	44,062	2,6437
ACDE	24	654,07	27,252	1,6351
BCDE	24	559,49	23,312	1,3987
ERROR	24	400,00	16,666	

II. ESTUDIO CUANTITATIVO DE SALMONELLA, COMPARANDO DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO

En las Tablas IX y X, se hacen constar los resultados de los recuentos obtenidos con los distintos procedimientos de aislamiento empleados.

En las Tablas XI y XII, se pueden observar los diferentes grados de inhibición de la flora competitiva de Salmonella, crecida sobre los medios sólidos selectivos.

Tal como cabía esperar, los recuentos obtenidos a partir del agua residual son muy superiores a los obtenidos en las aguas superficiales. Frecuentemente se alcanzan valores de 10^4 salmonellas/ 100 ml de agua.

En ambos tipos de aguas, la siembra directa en NR10, dió lugar a recuentos más elevados de Salmonella que el uso de preenriquecimiento.

Las temperaturas de incubación, ejercieron un efecto distinto en ambos tipos de aguas; mientras que en el agua superficial, se obtuvieron recuentos más elevados a 37°C, en el agua residual la temperatura de 43°C, resultó más eficaz.

Una alternativa al uso de preenriquecimiento seguido de enriquecimiento selectivo a la misma temperatura bien sea 37°C ó 43°C, consiste en realizar el preenriquecimiento a 37°C, seguido del enriquecimiento selectivo a 43°C, técnica ésta ampliamente utilizada (Vassiliadis y cols., 1976a; Harvey y cols., 1979; Fricker, 1984).

En el presente estudio, los resultados obtenidos

Tabla IX. Recuentos de Salmonella en las aguas naturales (NMP de salmonellas / 100 ml de agua)

Enriquecimiento directo		Preenriquecimiento		
		AP 37°C		AP 43°C
NR10 37°C	NR10 43°C	NR10 37°C	NR10 43°C	NR10 43°C
21	1,4	21	0,9	0,7
1.100	23	150	4	4
240	4	4	9	4
4	0,4	0	0	0
28	0	15	0,9	0,9
11	0	11	0,7	9
2,2	0	0	0,8	0
0	0	0	0	0
3	0	4	0	0

Tabla X. Recuentos de Salmonella en las aguas residuales (NMP de salmonellas / 100 ml de agua)

<u>Enriquecimiento directo</u>		<u>Preenriquecimiento</u>		
		<u>AP 37°C</u>		<u>AP 43°C</u>
NR10 37°C	NR10 43°C	NR10 37°C	NR10 43°C	NR10 43°C
2.400	2.400	1.100	1.100	2.400
11.000	2.400	280	40	11.000
9.600	9.600	9.600	96.000	18.400
11.000	2.400	110	4.600	11.100
11.000	2.400	150	4.600	11.000
11.000	430	200	4.600	1.500
70	1.500	430	930	2.400
90	930	0	4.600	930
150	4.600	70	11.000	11.000

mediante esta modalidad han resultado ser equivalentes (mediante una prueba T de Student, $p > 0,05$), a los obtenidos utilizando en ambos casos la temperatura de 43°C. Parece lógico que en las aguas estudiadas se compense el efecto del preenriquecimiento con una temperatura más restrictiva, con el fin de inhibir en lo posible el crecimiento de las bacterias competitivas de Salmonella. Esto se ha observado para los dos tipos de agua analizados.

El uso de temperaturas de incubación superiores a 37°C, para los medios líquidos se remonta a fechas muy antiguas. En 1889, Rodet en un estudio sobre los intervalos de temperatura a los que podía crecer S.typhi, encontró que 44,5°C era el límite superior al que podía crecer este microorganismo y empleó esta temperatura para aislar S.typhi de agua contaminada. Vincent en 1890, obtuvo mejores resultados bajando la temperatura de incubación de los medios líquidos, a 42°C. Harvey y Thomson (1953) demostraron que 43°C era la temperatura óptima de incubación, para el caldo Selenito F, en el aislamiento de Salmonella spp. Temperaturas superiores a ésta resultaron inhibitorias para el crecimiento y consiguientemente para la recuperación, de la mayoría de serotipos de Salmonella. Varios investigadores han confirmado las ventajas de las elevadas temperaturas de incubación de los medios de enriquecimiento de Salmonella (Georgala y Boothroyd, 1964; Spino, 1966; Burman, 1967; Banfer, 1971).

Con muestras como efluentes de aguas residuales, que contienen elevados números de organismos competitivos, la

Tabla XI. Crecimiento de bacterias competitivas de Salmonella en las placas de aislamiento con los distintos métodos de enriquecimiento empleados, en las aguas naturales.

Grado de crecimiento de bacterias competitivas	<u>Enriquecimiento directo</u>		<u>Preenriquecimiento</u>		
	NR1037°C	NR1043°C	<u>AP37°C</u>		<u>AP43°C</u>
			NR1037°C	NR1043°C	NR1043°C
-		8 ^a		2	4
+		6		16	15
++	4				
+++	50	2	40	6	
++++	108	18	122	68	26
Sin crecimiento		128		70	117

^a: los resultados indican número de placas.

Tabla XII. Crecimiento de bacterias competitivas de Salmonella en las placas de aislamiento con los distintos métodos de enriquecimiento empleados, en las aguas residuales.

Grado de crecimiento de bacterias competitivas	<u>Enriquecimiento directo</u>		<u>Preenriquecimiento</u>		
	NR1037°C	NR1043°C	<u>AP37°C</u>		<u>AP43°C</u>
			NR1037°C	NR1043°C	NR1043°C
-		8		2	19
+		83		100	107
++	2	15			6
+++	111	8	81		2
++++	49	22	81	36	13
Sin crecimiento		26		24	15

incubación a 43°C, dá mejores resultados en la recuperación de salmonellas que a 37°C. Por el contrario, con muestras menos contaminadas, como aguas superficiales naturales, la temperatura de 37°C resulta más eficaz (Harvey y Price, 1979). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Patéraki y cols.(1975), emplearon la temperatura de 43°C en el preenriquecimiento y de 37°C para el enriquecimiento en caldo Rappaport, ya que encontraron que este medio no resultaba eficaz a temperaturas superiores. Las posteriores modificaciones del caldo Rappaport (caldo R10 ó RV y NR10) han demostrado su eficacia cuando se incuban a 43°C (Harvey y Price, 1979).

Una de las principales ventajas del uso de elevadas temperaturas de incubación, es la mayor pureza de salmonellas obtenida en las placas de aislamiento (Harvey y Price, 1979). De igual modo, en este estudio hemos observado que las temperaturas de incubación influyen decisivamente sobre el crecimiento de los gérmenes competitivos de Salmonella. En las Tablas XI y XII, puede apreciarse que las temperaturas de 43°C, dan lugar a un menor número de organismos competitivos, obteniéndose en algunos casos cultivos puros sobre las primeras placas de aislamiento. Por el contrario, las temperaturas de 37°C, favorecen considerablemente el crecimiento de la flora competitiva, dificultándose el reconocimiento de Salmonella, hasta el punto de obtener en ocasiones sólo 1 ó 2 colonias por placa. En los recuentos efectuados, se consideraron positivos para Salmonella, los tubos o matraces cuyas placas, sembradas a partir de ellos, presentaban colonias típicas de salmonellas,

posteriormente confirmadas. Tanto si en estas placas había unas pocas colonias (incluso en algunas ocasiones esas pocas colonias no se confirmaron como pertenecientes al Género Salmonella), como si presentaban cultivos puros, el tubo , o matraz, en cuestión se dió como positivo, de manera que números más probables iguales, podían dar resultados muy diferentes en cuanto a pureza de los cultivos. Ello explicaría que en el caso de considerar aislamientos positivos, el uso de enriquecimiento directo fuese un efecto significativo, pero que al cuantificar las salmonellas presentes en el agua, este efecto perdiera su significación en el análisis de varianza.

Las placas con elevado número de colonias de gérmenes competitivos, requieren más de una purificación hasta conseguir cultivos puros de Salmonella, que puedan ser confirmados con las posteriores pruebas bioquímicas. Estos resultados se han observado para los dos tipos de agua.

En ningún caso el preenriquecimiento restringió el crecimiento de las bacterias competitivas sobre los medios sólidos, en contra de la afirmación de Fricker (1984).

La flora competitiva, observada sobre los medios sólidos, estuvo constituida mayoritariamente por microorganismos fermentadores de lactosa y sacarosa, correspondientes a coliformes y Proteus spp. Sólo en muy pocas ocasiones se observó crecimiento de no fermentadores (Pseudomonas).

El análisis de varianza, de los resultados obtenidos (Tablas XIII y XIV) ha confirmado lo expuesto anteriormente. El uso de preenriquecimiento no sólo no ha resultado

Tabla XIII. Resultados del análisis de varianza obtenidos en el estudio cuantitativo de Salmonella con diferentes técnicas Aguas superficiales naturales

FUENTE	GL	SC	CM	F
A	1	1,0057	1,0057	0,5038
B	1	20,532	20,532	10,291*
AB	1	1,5236	1,5236	0,7633
ERROR	32	63,869	1,9959	

A: Tipo de enriquecimiento

B: Temperatura de incubación

*: Efecto significativo ($p < 0.01$)

Tabla XIV. Resultados del análisis de varianza obtenidos en el estudio cuantitativo de Salmonela con diferentes técnicas
Agua residual

FUENTE	GL	SC	CM	F
A	1	6,4959	6,4959	1,7653
B	1	30,029	30,029	8,1607*
AB	1	26,530	26,530	7,2098
ERROR	32	117,75	3,6797	

A: Tipo de enriquecimiento

B: Temperatura de incubación

*: Efecto significativo ($p < 0,01$)

significativamente superior al empleo de enriquecimiento directo, sino que se han obtenido mayores recuentos prescindiendo del preenriquecimiento. Otros autores (Harvey y cols., 1979), encuentran una mayor eficacia, para recuentos de salmonellas, utilizando el caldo R10, que con los caldos Selenito y Tetracionato aunque utilizaron la técnica de preenriquecimiento.

La temperatura de 43°C de ambos caldos, en el caso de las aguas residuales, sí ha resultado significativamente superior a la incubación a 37°C, mientras que en las aguas superficiales, moderadamente contaminadas, se ha observado el efecto opuesto.

De todos los datos expuestos anteriormente, se deduce que , en las aguas estudiadas, la siembra directa en medio NR10 incubado a 43°C, da lugar a aislamientos positivos con recuentos más elevados de Salmonella y en algunos casos cultivos puros, sobre la primera placa de aislamiento, a las 48 horas de incubada la muestra. Esto supone una simplificación y acortamiento considerable del proceso de aislamiento de salmonellas a partir de aguas.

III. CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS AISLADAS

En el estudio comparativo de los factores que afectan al aislamiento de Salmonella se han sometido las 1.112 cepas identificadas bioquímicamente a la caracterización serológica, habiéndose obtenido un total de 49 serotipos diferentes (Tabla XV). En el estudio cuantitativo de Salmonella , comparando diferentes procedimientos de aislamiento, se ha realizado una selección de cepas de Salmonella para su estudio serológico, cuyos resultados aparecen reflejados en la Tabla XVI.

Existen muy pocas referencias sobre serología de salmonellas aisladas de aguas, especialmente en la zona objeto de estudio, siendo la mayoría de los datos disponibles de origen clínico. En general se admite que en países con importante déficit de saneamiento ambiental, especialmente en los tratamientos de depuración de aguas residuales, predominan S.typhi y S.paratyphiA, de reservorio humano. Por el contrario en los países más avanzados sanitariamente se aíslan con mayor frecuencia S.typhimurium, S. enteritidis y S.choleraesuis (Sanchez- Buenaventura y Cortina, 1977). Esta predominancia de S.typhimurium se suele observar en coprocultivos y ha sido constatada por diversos autores en la última década (Le Minor, 1973; Fox, 1974; Koenly y Rolli, 1975; Legencre, 1976; Peyramond y cols., 1978; López-Brea y cols., 1980).

En el presente trabajo han predominado los serotipos infantis, panama y typhimurium en la primera parte del trabajo,

apareciendo también con frecuencia S.thompson y S.blockley en la segunda parte, aunque en este caso el número de cepas sometidas a estudio serológico completo ha sido muy inferior. En ningún caso se ha aislado S.typhi, aunque sí S.paratyphi B y C. Todas las cepas aisladas pertenecen al Subgénero I, coincidiendo con estudios similares (Le Minor, 1982; Vassiliadis y cols, 1978; Sanchez- Buenaventura y Cortina, 1977).

Como era de esperar se detecta mayor variedad de serotipos en el agua que ha dado lugar a mayor número de aislamientos (puntos 3, 4 y 5).

Ante la escasez de datos sobre estudios similares en España, no se pueden establecer apenas comparaciones con otros resultados. El único dato comparable (Sanchez-Buenaventura y Cortina, 1977), que consistió en una investigación de Salmonella, tanto en aguas residuales como en muestras de origen humano, en la provincia de Valencia, coincide a grandes rasgos con los resultados obtenidos por nosotros, ya que S.typhi no se detectó en aguas residuales, solamente se aisló de muestras clínicas (coprocultivos). Así mismo, S.typhimurium no constituyó el serotipo mayoritario , predominando otros (S.paratyphi B, S.enteritidis y S.paratyphi C). Otros estudios realizados sobre muestras clínicas también detectan S.typhi en coprocultivos, aunque en muy baja proporción (López-Brea y cols., 1980, 1983). Generalmente se obtienen los aislamientos de S.typhi a partir de hemocultivos. La ausencia de este serotipo en aguas es un hecho generalmente reconocido (Harvey y Price, 1976; Yoshpe-Purer y Shuval, 1972; Vassiliadis y cols., 1978; Harvey

Tabla XV. Número y porcentaje () de serotipos de Salmonella aislados en los puntos muestreados

SEROTIPO	Puntos de muestreo					TOTAL
	1	2	3	4	5	
<u>S.infantis</u>	42 (35,3)	6 (21,4)	58 (16,4)	82 (31,8)	34 (9,6)	222 (20)
<u>S.panama</u>	19 (15,9)	4 (14,3)	46 (13)	28 (10,8)	35 (9,9)	132 (11,8)
<u>S.typhimurium</u>	9 (7,6)	8 (28,6)	40 (11,3)	8 (3,1)	2 (0,6)	67 (6)
<u>S.agona</u>	14 (11,8)		40 (11,3)	9 (3,5)	55 (15,6)	118 (10,6)
<u>S.kentucky</u>	6 (5)		10 (2,8)	4 (1,5)	33 (9,3)	53 (4,8)
<u>S.hindmarsh</u>	6 (5)		6 (1,7)	8 (3,1)	19 (5,4)	39 (3,5)
<u>S.blockley</u>	2 (1,7)		2 (0,6)	11 (4,3)	9 (2,5)	24 (2,1)
<u>S.enteritidis</u>		8 (28,6)	6 (1,7)	12 (4,7)	4 (1,1)	30 (2,7)
<u>S.clackamas</u>	1 (0,8)	1 (3,6)	1 (0,3)			3 (0,27)
<u>Salmonella</u> 3,19:eh:1,6	2 (1,7)		5 (1,4)		10 (2,8)	17 (1,5)
<u>S.edinburg</u>	8 (6,7)		21 (6)		6 (1,7)	35 (3,1)
<u>S.senftenberg</u>	1 (0,8)		20 (5,6)	2 (0,8)		23 (2)
<u>S.montevideo</u>		1 (3,6)	16 (4,5)		4 (1,1)	21 (1,9)
<u>S.anatum</u>			42 (11,9)	38 (14,7)	56 (15,8)	136 (12,2)

Tabla XV. (continuación)

SEROTIPO	1	2	3	4	5	TOTAL
<u>S.bredenev</u>			4 (1,1)	14 (5,4)	7 (2)	25 (2,2)
<u>Salmonella</u> III 6,14:k:z			4 (1,1)	4 (1,5)		8 (0,72)
<u>S.newport</u>			10 (2,8)		5 (1,4)	15 (1,3)
<u>S.brandenburg</u>			5 (1,4)		4 (1,1)	9 (0,8)
<u>Salmonella</u> 3,10:i:1,6			1 (0,3)		2 (0,6)	3 (0,27)
<u>S.emek</u>			1 (0,3)		2 (0,6)	3 (0,27)
<u>S.harburg</u>				12 (4,6)	3 (0,8)	15 (1,3)
<u>S.agama</u>				4 (1,5)	1 (0,3)	5 (0,45)
<u>S.thompson</u>				1 (0,4)	1 (0,3)	2 (0,18)
<u>S.llandof</u>	8 (6,7)					8 (0,72)
<u>S.rissen</u>	1 (0,8)					1 (0,09)
<u>S.magumeri</u>			6 (1,7)			6 (0,54)
<u>S.herston</u>			4 (1,1)			4 (0,36)
<u>Salmonella</u> III 6,14:z ₁₀ :z			3 (0,8)			3 (0,27)
<u>S.eko</u>			2 (0,6)			2 (0,18)
<u>S.fyris</u>			1 (0,3)			1 (0,09)
<u>S.haardt</u>				9 (3,5)		9 (0,8)

Tabla XV. (continuación)

SEROTIPO	1	2	3	4	5	TOTAL
<u>S.lagos</u>				5 (1,9)		5 (0,45)
<u>S.miami</u>				3 (1,2)		3 (0,27)
<u>Salmonella II</u>				2 (0,8)		2 (0,18)
<u>S.san diego</u>				2 (0,8)		2 (0,18)
<u>S.london</u>					12 (3,4)	12 (1,08)
<u>S.othmarschen</u>					9 (2,5)	9 (0,8)
<u>Salmonella 4,12,27:1,v:1,5</u>					7 (2)	7 (0,63)
<u>S.heidelberg</u>					6 (1,7)	6 (0,54)
<u>S.fayed</u>					6 (1,7)	6 (1,7)
<u>Salmonella 3,19:1,v:1,6</u>					4 (1,1)	4 (0,36)
<u>S.stratford</u>					4 (1,1)	4 (0,36)
<u>S.schwarin</u>					3 (0,8)	3 (0,27)
<u>S.paratyphi B</u>					3 (0,8)	3 (0,27)
<u>S.bochum</u>					3 (0,8)	3 (0,27)
<u>S.pakistan</u>					2 (0,6)	2 (0,18)
<u>S.derby</u>					1 (0,3)	1 (0,09)
<u>S.newlands</u>					1 (0,3)	1 (0,09)

y Price, 1981b; Fricker, 1984).

Un factor importante a considerar en la recuperación de los diversos serotipos de Salmonella lo constituye la metodología empleada. Ya se ha comentado la importancia del uso de varios medios sólidos de diferente selectividad, como los utilizados en el presente estudio. Otro factor decisivo podría ser el caldo de enriquecimiento escogido. El medio original de Rappaport (Rappaport y cols., 1956) no pareció adecuado para la recuperación de S. typhi (Harvey y cols., 1979). El caldo Selenito es quizá el más empleado y el que da lugar a una menor inhibición de S. typhi (Hobbs y Allison, 1945; Harvey y Price, 1979; Moriñigo y cols., 1983), siendo el más citado en los estudios clínicos reseñados. Por el contrario, no resulta adecuado para la recuperación de S. choleraesuis, al igual que el caldo Tetracionato (Harvey y Price, 1979). Dependiendo del enfoque del trabajo resulta pues más adecuado el uso de uno u otro medio.

En un estudio anterior sobre el mismo ecosistema (Alcaide y cols., 1982) y empleando caldo Selenito con y sin novobiocina, no se consiguió ningún aislamiento de S. typhi, siendo la eficacia del caldo NR10/43°C muy superior a la del Selenito con novobiocina. Empleando este último medio sin novobiocina no se consiguió un sólo aislamiento de Salmonella.

En la única referencia disponible para comparar con estudios similares, tampoco se consiguió aislar S. typhi a partir de aguas residuales de la provincia de Valencia, en un estudio de 2 años de duración, empleando caldo Selenito y caldo

Tabla XVI. Serotipos de Salmonella obtenidos en el estudio cuantitativo comparando diferentes procedimientos de aislamiento.

Agua residual	Agua superficial natural
<u>S.typhimurium</u>	<u>S.thompson</u>
<u>S.thompson</u>	
<u>S.blockley</u>	
<u>S.senftenberg</u>	
<u>S.enteritidis</u>	
<u>S.weltvreden</u>	
<u>S.worthington</u>	
<u>S.paratyphi C</u>	

Tetracionato de Muller-Kauffmann (Sanchez-Buenaventura y Cortina, 1977).

En las Tablas XV y XVI se puede observar el aislamiento de numerosos serotipos, citados como poco frecuentes por Sanchez-Buenaventura (1977): S.agona, S.thompson, S.weltvreden, S.brandenburg, etc. Muchos de los serotipos encontrados coinciden con los citados en trabajos similares en otros países (Vassiliadis y cols., 1978). estos mismos autores, en un estudio comparativo de diversos medios de enriquecimiento, obtuvieron mayor cantidad de serotipos usando precisamente el medio R10/43°C. Es de destacar, finalmente, el aislamiento en este estudio, de serotipos no recogidos en el esquema de Kauffmann y White(Samonella 3,19:eh:1,6; Salmonella 3,10:i:1,6 y Salmonella 3,19:1,v:1,6).

La falta de datos epidemiológicos sobre la zona estudiada no permite establecer conclusiones acerca de la selección ambiental realizada sobre las cepas excretadas por los portadores de las mismas, aparte, claro está, de la ausencia de las ya conocidas como exigentes nutricionalmente, como es el caso de S.typhi. Si se realizaran más estudios sobre la incidencia de Salmonella en aguas residuales, se podría conocer la distribución de serotipos en la colectividad y relacionarla con las salmonellas obtenidas de muestras clínicas. De este modo se podrían conocer aquellos serotipos más resistentes o ubicuos, que tienen por tanto más posibilidad de llegar nuevamente al hombre, pudiéndose establecer el ciclo entero-hidro-entérico. Este conocimiento sería de gran utilidad para el establecimiento de la

profilaxis de estas infecciones, sin olvidar la otra vía, importantísima, de transmisión de Salmonella: los alimentos. Es de conocimiento general que las salmonelosis gastroentéricas se deben fundamentalmente a incumplimiento de la normativa establecida para la fabricación, manipulación, almacenamiento y procesado de los alimentos. (Edel y Kampelmacher, 1973; Baird-Parker, 1974). El agua no debidamente tratada, en sus múltiples usos, es uno de los vehículos más frecuentemente relacionados con la contaminación de los alimentos. Si a esto se une la muy sencilla diseminación mundial, debida al fácil comercio internacional, se deduce inmediatamente la necesidad imperiosa del seguimiento de las salmonellas desde el hombre y animales al medio ambiente y desde éste nuevamente hasta aquellos.

La importancia de llegar a establecer normas válidas de aplicación general en cuanto a los aspectos metodológicos es fundamental para poder abordar este tipo de estudios.

IV. DETERMINACION DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS Y SU TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS AISLADAS

1. DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Las aguas superficiales naturales, como es el caso del lago estudiado, se destinan a múltiples usos, entre ellos cabe destacar la inundación de arrozales vecinos con fines de regadío, la pesca, así como diversos usos recreacionales. La simple presencia de elevados números de salmonellas en las mismas ya constituye de por sí un riesgo permanente para la salud pública.

En la actualidad se está asistiendo a un aumento en la incidencia de cepas ambientales, principalmente enterobacterias, portadoras de resistencias a uno o más antibióticos (Gangarosa y cols., 1972; Tanaka y cols., 1976; Aoki y cols., 1977; Trust y Barlett, 1979; Bell y cols., 1980, 1983; Al-Sowaygh y Shibl, 1981; Armstrong y cols., 1982; Mach y Grimes, 1982; Toranzo y cols., 1983; Niemi y cols., 1983). La capacidad de dichas cepas de transmitir las resistencias a otras, ha sido objeto de numerosos estudios (Anderson y Lewis, 1965; Cooke, 1976; Shaw y Cebelli, 1980; Altherr y Kasweck, 1982; Alcaide y Garay, 1984). El aumento del nivel general de contaminación fecal detectado en muchas aguas superficiales, unido a la relativa facilidad de adquirir resistencias por diversos mecanismos de transmisión, hace pensar en la necesidad de replantear los standards microbiológicos de

calidad de las aguas sometidas a tratamientos de depuración.

Dado el elevado número de aislamientos obtenido a lo largo del presente estudio, se ha considerado interesante investigar la incidencia de cepas de Salmonella resistentes a antibióticos en las aguas analizadas.

Para ello se sometieron 865 cepas a las pruebas de sensibilidad a antibióticos, descritas en el correspondiente apartado de material y métodos.

En la Tabla XVII, se refleja el número de cepas que presentaron resistencia en relación a los puntos de muestreo.

Del total de 865 cepas, 110 (12,7%) fueron resistentes a uno o más antibióticos; de éstas 39 (35,45 %) fueron resistentes únicamente a uno y 71 (64,55 %) a dos o más. Estos resultados coinciden con trabajos recientes sobre cepas ambientales portadoras de resistencias (Trust y Barlett, 1979; Bell y cols., 1980; Altherr y Kasweck, 1982; Mach y Grimes, 1982; Niemi y cols., 1983). 755 cepas (87,3%) no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos utilizados, con la metodología empleada. Se puede observar que la resistencia a estreptomicina fué la más frecuente, seguida de la resistencia a ampicilina, una sola cepa mostró resistencia a la penicilina G, ácido fusídico y cefalexina. Todas las salmonellas estudiadas resultaron sensibles a la polimixina B. La mayor incidencia de resistencias corresponde a los serotipos mayoritarios (S.infantis, S.panama y S.typhimurium).

Se han llegado a aislar 3 cepas de Salmonella con resistencias a 6 de los antibióticos utilizados, todas ellas se

Tabla XVII. Distribución de las cepas resistentes en los puntos de muestreo

	Puntos de muestreo				
	1	2	3	4	5
Nº de cepas aisladas	119	28	354	258	353
Nº de cepas resistentes	14	8	32	21	35
Porcentaje de resistentes	11,76	28,57	9,03	8,1	9,9
Am	1			1	1
Km			1	4	1
Cm			2		1
Tc	1	1	8		4
Sm	3		5	3	3
Am, Tc	1		1	1	
Am, Sm	3		6	4	6
Am, Ax		4			
Km, Sm			1		2
Tc, Sm			3		3
Cm, Sm	1		1		2
Am, Tc, Cm				1	
Am, Km, Cm				1	
Am, Cm, Sm	1		1	1	
Am, Km, Sm			1	2	
Am, Sm, Ax					1
Cm, Tc, Sm	1				
Sm, Km, Tc					4
Am, Km, Cm, Sm	1		2	2	
Km, Cm, Tc, Sm	1				1
Km, Fa, Cx, PG				1	
Km, Cm, Tc, Sm, Ax					1
Am, Cm, Tc, Sm, Ax		3			3
Am, Km, Cm, Tc, Sm, Ax					3

Am: ampicilina; Km: kanamicina; Cm: cloramfenicol; Tc: tetraciclina

Sm: estreptomicina; Ax: amoxicilina; Fa: ácido fusídico

Cx: cefalexina; PG: penicilina G

aislaron de los puntos con mayores índices de contaminación fecal: 2 del agua residual y 1 del punto 3 (acequia de Silla).

Los porcentajes más elevados de cepas resistentes han aparecido precisamente en los dos puntos con menores índices de contaminación fecal (Tabla XVII), es decir más alejados del origen de los vertidos. Cooke (1976), sugirió que los ecosistemas acuáticos constituyen ambientes favorables para la selección de bacterias con factores de resistencia, suponiendo que esta resistencia se debía a la transferencia de dichos factores a lo largo del recorrido, este hecho se ha observado en el presente estudio, ya que los 3 puntos correspondientes a aguas residuales en origen (3,4 y 5) han presentado los porcentajes más bajos de salmonellas resistentes. Un hecho similar fué observado por Bell y cols. (1980) en agua de río en Red River (Canadá).

2. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

La concentración mínima ensayada para comprobar la resistencia de las salmonellas estudiadas fue de 25 $\mu\text{g/ml}$ para tetraciclina, ampicilina, cloramfenicol, kanamicina, amoxicilina y estreptomycin, 300 U para la polimixina B, 10 U para la penicilina G, 10 $\mu\text{g/ml}$ para el ácido fusídico y 30 $\mu\text{g/ml}$ para la cefalexina.

Las cepas que resultaron resistentes se sometieron a la determinación de la dosis mínima inhibitoria, para cada antibiótico, mediante la técnica de dilución en agar. Los

resultados se hacen constar en la Tabla XVIII.

Se puede observar que, generalmente, las mayores CMI's corresponden a las cepas con mayor número de resistencias.

En los estudios sobre resistencias a antibióticos en cepas ambientales, normalmente no se suele realizar la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias. Comparando nuestros resultados con la escasa información encontrada (Trust y Barlett, 1979; Match y Kasweck, 1982), se observan amplias divergencias, encontrándose tanto valores muy por encima como muy por debajo de los hallados en este trabajo.

3. TRANSFERENCIA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA

El descubrimiento por investigadores japoneses en 1959, de que la resistencia múltiple en Shigella podía ser transferida a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae por conjugación, marcó un hito en la historia de las resistencias a antibióticos. Posteriormente se han encontrado factores de resistencia en muy diferentes ambientes y organismos, aunque principalmente en enterobacterias (Bell y cols., 1980).

Han sido detectados brotes epidémicos causados por bacterias enteropatógenas portadoras de resistencias en distintas zonas geográficas y han dado lugar a gran número de muertes, debidas a problemas derivados del reconocimiento de la enfermedad y al subsecuente fallo en la respuesta de los pacientes al tratamiento con antibióticos. Ejemplos recientes se dieron en Guatemala por Shigella dysenteriae (Gangarosa y cols, 1972) y

Tabla XVIII. Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$)

Cepa	Am	Km	Cm	Tc	Sm	Ax	Fa	PG	Cx
<u>S.infantis</u>	1300	1500	300	200	400	1700			
<u>S.infantis</u>	400	300	300	100	250	500			
<u>S.panama</u>	200	25	150	100	200	1000			
<u>S.panama</u>	200		90	100	150	1400			
<u>S.panama</u>	200		70	100	150	1400			
<u>S.panama</u>	200		70	100	250	1400			
<u>S.panama</u>	200		70	100	130	1400			
<u>S.hindmarsh</u>	200		90	100	300	1000			
<u>S.hindmarsh</u>	200		150	50	200	1000			
<u>S.infantis</u>		1000	300	100	250	500			
<u>S.infantis</u>		1000	300	100	400				
<u>S.infantis</u>		1000	300	25	400				
<u>S.bredeney</u>	25	25	25		50				
<u>S.brandenburg</u>									
<u>S.infantis(2)</u>	25	25	25		25				
<u>S.miami</u>									
<u>S.panama</u>		150					20	10	50

<u>S.agona</u> (3)						
<u>S.panama</u>		50		25	25	
<u>S.agona</u>			25	50	25	
<u>S.panama</u>	400				100	600
<u>S.infantis</u> (3)	25	25			25	
<u>S.typhimurium</u>	25		100		25	
<u>S.infantis</u>	25		25		25	
<u>S.montevideo</u>						
<u>S.typhimurium</u>	25	25	100			
<u>S.hindmarsh</u>	25		25	25		
<u>S.infantis</u>						
<u>S.agona</u>			25		25	
<u>Salmonella</u> 3,19:eh:1,6(2)			25		25	
<u>S.agona</u> (2)						
<u>S.infantis</u>						
<u>S.edinburg</u>				25	25	
<u>S.typhimurium</u> (2)						
<u>S.heidelberg</u>		150			100	
<u>S.hindmarsh</u> (2)		25			25	
<u>S.enteritidis</u> (4)	400					1700

<u>S.hindmarsh</u>	25		250
<u>S.infantis</u>	25		100
<u>S.hindmarsh</u> (3)			
<u>Salmonella</u> 3,19:eh:1,6			
<u>S.anatum</u> (3)			
<u>S.newport</u>			
<u>S.infantis</u> (2)			
<u>S.agona</u>	25		25
<u>S.montevideo</u>			
<u>S.panama</u> (2)			
<u>S.blockley</u>			
<u>Salmonella</u> 4,12:lv:1,5			
<u>S.kentucky</u>			
<u>S.infantis</u> (2)			
<u>Salmonella</u> 3,19:eh:1,6	25	25	
<u>S.senftenberg</u>			100
<u>Salmonella</u> 3,19:eh:1,6			
<u>S.anatum</u>			50
<u>S.typhimurium</u>			
<u>S.infantis</u> (3)			
<u>S.llandof</u>			25

<u>S. agona</u>	}		
<u>S. panama</u>			25
<u>S. blockley</u> (2)			
<u>S. typhimurium</u> (9)	}		50
<u>S. bredeney</u> (2)			
<u>S. agona</u>	}		
<u>S. anatum</u>			25
<u>S. infantis</u>			
<u>S. panama</u>	}		
<u>S. enteritidis</u>		25	
<u>S. edinburg</u>			
<u>S. panama</u> (2)	}	200	
<u>S. bredeney</u>			
<u>S. anatum</u>	}	25	
<u>S. blockley</u>			
<u>S. agona</u> (2)	}		25
<u>S. infantis</u>			

en México por Salmonella typhi (Bayne y cols., 1977).

No se tienen noticias de casos similares en España, aunque las estadísticas recogidas en los Boletines Epidemiológicos no registran todos los casos ocurridos, por falta de información adecuada.

El problema sanitario se hace más patente si se considera que las cepas patógenas pueden adquirir la resistencia a través de otras bacterias saprofitas, más comunes en los ambientes naturales, capaces de transferirla mediante distintos mecanismos.

En el presente trabajo se ha estudiado la capacidad de transferencia de las citadas resistencias a una cepa de E.coli K12 185 NaI^r, utilizada generalmente en este tipo de estudios.

Para ello se comprobó en primer lugar que ninguna de las cepas de Salmonella era resistente al ácido nalidíxico. Una vez comprobado se realizaron conjugaciones en medio líquido (medio LB), manteniendo la mezcla de conjugación durante dos intervalos de tiempo, 4 y 18 horas. Las cepas transconjugantes se seleccionaron en agar BTB-lactosa (Aoki y cols., 1977) suplementado con 100 µg/ml de ac.nalidíxico y los antibióticos adecuados en cada caso, los presuntos transconjugantes se confirmaron mediante pruebas bioquímicas para comprobar que se trataba de E.coli y posterior antibiograma para constatar el mantenimiento de las resistencias transferidas. Los resultados obtenidos se hacen constar en la Tabla XIX, en la que se observan las diferentes frecuencias de transmisión mostradas por las distintas cepas.

Tabla XIX. Transferencia de los determinantes de resistencia a E.coli K12 185 Na1^r

Resistencia de la cepa donadora	Resistencia de la cepa receptora	Nº de cepas donadoras	Nº de trans-conjugantes	Frecuencia de transferencia
Am, Km, Cm, Tc, Sm, Ax	Am, Cm, Tc, Ax	3	1	6×10^{-5}
Am, Cm, Tc, Sm, Ax	Am, Cm, Tc, Ax	6	$\left[\begin{array}{l} 5 \\ 1 \end{array} \right.$	10^{-6}
				10^{-3}
Km, Cm, Tc, Sm, Ax	Cm, Tc, Ax	1	1	2×10^{-7}
Km, Cm, Tc, Sm	Km, Cm, Tc	2	1	7×10^{-5}
Am, Km, Cm, Sm	Am, Cm	5	3	2×10^{-7}
Km, Fa, Cx, PG	Km, Fa, Cx, PG	1	1	$3,7 \times 10^{-6}$
Km, Tc, Sm	Km, Tc	4	4	$2,5 \times 10^{-5}$
Am, Sm, Ax	Am, Ax	1	1	2×10^{-4}
Am, Sm	Am	18	1	10^{-7}
Tc, Sm	Tc	6	5	10^{-6}
Cm, Sm	Cm	4	2	4×10^{-7}
Am, Ax	Am, Ax	4	$\left[\begin{array}{l} 3 \\ 1 \end{array} \right.$	3×10^{-5}
				3×10^{-3}
Km	Km	6	$\left[\begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	5×10^{-5}
				10^{-4}
Tc	Tc	14	$\left[\begin{array}{l} 3 \\ 1 \end{array} \right.$	10^{-6}
				$2,5 \times 10^{-3}$

No se apreciaron diferencias importantes entre los dos tiempos de conjugación.

Las resistencias fueron transferidas en un 30% de los casos. Es de destacar que la resistencia a estreptomycin no fue transmisible, por conjugación, en ningún caso, lo que probablemente indica que se trata de una resistencia cromosómica. Las frecuencias de transmisión oscilaron entre 10^{-3} y 10^{-7} . Únicamente 7 cepas, independientemente de su patrón de resistencias, las transfirieron con frecuencias relativamente altas, por encima de 10^{-5} . Estas cepas pertenecen a los siguientes serotipos: S.panamá, S.enteritidis, S.hindmarsh y S.bredeney. De éstas, 3 solo fueron resistentes a un antibiótico (kanamicina o tetraciclina), 1 mostró doble resistencia (ampicilina - amoxicilina) 2 fueron resistentes a cinco (ampicilina, estreptomycin, cloramfenicol, tetraciclina y amoxicilina) y 1 a seis (ampicilina, kanamicina, estreptomycin, tetraciclina, cloramfenicol y amoxicilina). De estas 7 cepas, 3 proceden del agua residual y 4 del agua del lago, habiéndose aislado estas últimas de puntos situados lejos del origen de los vertidos, lo que coincide nuevamente con la hipótesis de Cooke (1976), según la cual, las salmonellas podían haber obtenido, tanto la resistencia, como la elevada eficiencia de transferencia, a lo largo del recorrido desde el punto de vertido hasta el de muestreo. Las 3 salmonellas procedentes del agua residual mostraron además resistencia múltiple.

V . AISLAMIENTO DE PLASMIDOS DE RESISTENCIA

1. CURACION CON BROMURO DE ETIDIO

Para asegurar que los determinantes de resistencia observados correspondían efectivamente a plásmidos, se procedió a la curación de dichas resistencias.

La curación es un proceso por el cual se elimina un plásmido de la célula hospedadora mediante un agente que actúa específicamente o al menos en mayor medida sobre la replicación y/o mantenimiento de dicho plásmido, que sobre el cromosoma.

Se utilizan para ello varios agentes como bromuro de etidio, naranja de acridina, SDS, mitomicina C, rifampicina, actinomicina D, (Match y Grimes, 1982; Toranzo y cols., 1983). Estos actúan selectivamente sobre el ADN plasmídico y no sobre el cromosoma, debido a las diferencias de tamaño y configuración. La eliminación (curación) del plásmido de la célula hospedadora es observable en el caso de los plásmidos de resistencia, por la pérdida de ésta resistencia.

La concentración del agente empleado no se puede elevar indefinidamente, pues existe el riesgo de que llegue a afectar al propio cromosoma bacteriano. Cada agente presenta un intervalo de concentraciones bastante amplio, que debe ser establecido en cada caso concreto comprobando que no cause daños irreversibles en el genoma bacteriano.

En el presente trabajo, se empleó bromuro de etidio a

concentraciones desde 0,04 mg/ml hasta 0,4 mg/ml (Toranzo y cols. 1983), comprobándose que ninguna de ellas afectaba al crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla XX.

Las experiencias de curación se llevaron a cabo incubando en medio líquido con bromuro de etidio, en dos etapas sucesivas de 48 h. cada una, realizando controles a las 24 y 48 horas. Se incorporaron en la experiencia dos plásmidos de referencia (RP4-35 y pBR322).

Se puede observar que a las 24 horas de incubación de la primera fase, sobre todo con la dosis más baja, prácticamente no se obtienen curaciones. Al prolongar el periodo de incubación o pasar a la segunda fase, el porcentaje de curaciones obtenido oscila entre 60 y 96 %.

La cepa que presentó el mayor número de resistencias de todas las analizadas, necesitó el mayor tiempo de incubación, no dándose la curación hasta la segunda fase, y presentando el porcentaje más bajo. Este efecto se observó en las distintas cepas estudiadas de tal modo que las cepas con menores resistencias fueron las más rápidamente curables.

La cepa de E.coli portadora del plásmido RP4-35, presentó un comportamiento contrario al observado para las cepas salvajes, puesto que perdió el plásmido más rápidamente que éstas y que la otra cepa de referencia.

Los elevados niveles de resistencia, la capacidad de transferencia de los mismos y la eliminación de las resistencias por agentes curativos, evidenciaron la naturaleza plasmídica de los factores de resistencia.

Tabla XX. Resultados de la curación con bromuro de etidio

Resistencias	0,04mg/ml				0,4mg/ml			
	1ªetapa		2ªetapa		1ªetapa		2ªetapa	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Am,Km,Cm,Tc,Sm,Ax	+	+	-(10%)	-(60%)	+	+	-(20%)	-(65%)
Am,Cm,Tc,Sm,Ax	+	+	-(20%)	-(60%)	+	+	-(22%)	-(70%)
Km,Cm,Tc,Sm,Ax	+	-	-	-	-	-	-	-
Km,Cm,Tc,Sm	+	+	-(20%)	-(65%)	+	+	-(25%)	-(70%)
Am,Km,Cm,Sm	+	+	-(40%)	-(80%)	+	-(55%)	-	-
Km,Fa,Cx,PG	+	-	-	-	+	-	-	-
Km,Tc,Sm	-	-	-	-	-	-	-	-
Am,Sm,Ax	+	-(70%)	-(90%)	-	+	-(80%)	-	-
Am,Sm	-	-	-	-	-	-	-	-
Tc,Sm	+	-	-	-	+	-	-	-
Cm,Sm	+	-	-	-	+	-	-	-
Am,Ax	+	-(20%)	-(50%)	-	+	-	-	-
Km	-	-	-	-	-	-	-	-
Tc	+	-	-	-	-	-	-	-
pBR322	+	-(34%)	-	-	+	-(36%)	-	-
RP4-35	-(80%)	-(86%)	-	-	-(90%)	-	-	-

+: Crecimiento de las colonias replicadas en placas con antibióticos ; -: ausencia de crecimiento

Los porcentajes indican pérdida de las resistencias respecto al total de colonias replicadas.

2. DETECCION DE PLASMIDOS

Con el fin de relacionar la posible existencia de plásmidos con las diferentes resistencias observadas, se seleccionaron dos representantes de las 12 combinaciones de resistencias transferidas. Uno de ellos transfería la resistencia a tetraciclina, con frecuencia de $2,5 \times 10^{-3}$, y el otro se escogió como representante de resistencia múltiple (kanamicina, ácido fusídico, cefalexina, penicilina G), transfiriendo su resistencia con una frecuencia $3,7 \times 10^{-6}$ (Ver Tabla XIX). Para ello se realizaron electroforesis en geles de agarosa, a distintas concentraciones (0.6% y 0.8%), utilizando varios métodos de extracción.

Existe una tendencia en la actualidad a simplificar los métodos de extracción de ADN plasmídico. En los últimos años, se han descrito técnicas cada vez más rápidas y sencillas para estos procedimientos (Eckardt, 1978; Kado y Liu, 1981; Takahashi y Nagano, 1983). Una de las ventajas de estas técnicas consiste en la posibilidad de incorporarlas a análisis rutinarios, en los que se puedan investigar gran número de cepas de distinta procedencia. Un factor importante al principio de todos los métodos lo constituye la lisis suave de la célula, con objeto de liberar el ADN plasmídico. Una lisis defectuosa ya supone, de entrada un menor rendimiento en todo el proceso.

Toranzo y cols. (1983), Freter y cols. (1983), Match y Grimes (1982), utilizaron el método de Kado y Liu (1981) en la detección de plásmidos de diferentes

microorganismos, con resultados satisfactorios. Palomares y Perea (1982) emplearon otra técnica aún más sencilla (Eckardt, 1978) , consistente en la emulsión, con un palillo estéril, de una colonia de la cepa a investigar, en una cantidad de solución lítica colocada en el mismo pocillo del gel de agarosa.

Dada la amplia aceptación de este tipo de técnicas, se comenzó la detección de los plásmidos en las cepas seleccionadas, empleando el método de Kado y Liu (1981) modificado por Toranzo y cols. (1983), así como el método original. Esta técnica utiliza la propiedad del ADN circular covalentemente cerrado, que es eliminado de la célula bajo condiciones que desnaturalizan el ADN cromosómico, como son el empleo de solución alcalina (pH 12.6) de SDS a elevada temperatura.

Kado y Liu (1981) observaron que, para enterobacterias, se obtiene un buen rendimiento, lisando las células por adición de la mezcla lítica y calentando a 55°C durante 60 minutos. En nuestro caso para conseguir la lisis, fué necesario calentar a 65°C durante 70 minutos. A pesar de ello no se obtuvieron resultados satisfactorios. Se escogieron entonces dos métodos recomendados por Maniatis y cols. (1982), para aislamiento de plásmidos de elevado peso molecular (método de Godson y Vapnek, 1973) y para plásmidos menores de 10 kilobases (método de Birnboim y Doly, 1979), utilizándose este último de acuerdo con la modificación realizada por Silhavy y cols. (1984).

El método de Birnboim y Doly modificado, emplea la lisis alcalina de la célula, precipitando el ADN cromosómico por adición de una solución de acetato potásico 5 Molar. Al ser una

técnica que incorpora tratamiento con RNasa y Proteínasa K, se obtiene un mayor grado de pureza del ADN plasmídico respecto de otros métodos.

En el método de Godson y Vapnek, las células son lisadas por la acción de SDS a pH 8, y la precipitación del ADN cromosómico se consigue por adición de cloruro sódico 5M. Se trata de un método bastante sencillo que no incluye tratamiento con RNasa ni Proteínasa.

En la cepa resistente a tetraciclina se detectaron dos plásmidos con los métodos de Birnboim y Doly y de Godson y Vapnek. En la cepa multirresistente se detectó un plásmido por esta última técnica.

Los pesos moleculares de estos plásmidos se determinaron utilizando como referencia los descritos en el correspondiente apartado de Material y Métodos. En el caso de la resistencia a tetraciclina se encontraron dos plásmidos de $1,27 \pm 0,15$ (Foto 4) y $2,61 \pm 0,21$ MDalton (media de cinco medidas). En la cepa multirresistente se detectó un plásmido de $47,78 \pm 3,33$ MDalton (media de cinco medidas) (Foto 5).

El elevado peso molecular de este último explicaría por qué no pudo detectarse con el método de Birnboim y Doly. Maniatis y cols. recomiendan éste para plásmidos menores de 10 kilobases (unos 6,6 MDalton); probablemente en la adición de acetato potásico para precipitar el cromosoma, se precipitaría también un plásmido de elevado peso molecular.

Se admite que los plásmidos de mayor peso molecular se encuentran en la célula hospedadora en bajo número de copias, incluso una sola. Este tipo de plásmidos tiene un control

restringido de replicación, que regula el número de moléculas plasmídicas por célula (Broda, 1979). Además no pueden ser amplificados mediante el uso de sustancias que inhiben la síntesis proteica. Este podría ser el caso del plásmido de 47.78 MDalton, al existir en bajo número de copias. También en este caso los métodos simplificados de volúmenes pequeños, el rendimiento de los mismos fué muy bajo, no llegándose a detectar. Para ello fué necesario partir de un volumen de 500 ml. de cultivo, como se utilizó en la técnica de Godson y Vapnek.

Los métodos descritos, han sido usados con éxito en una variedad de plásmidos presentes en diferentes microorganismos. Cuando aumenta el peso molecular, las propiedades del ADN plasmídico se van asemejando a las del ADN cromosómico, por tanto para plásmidos mayores de 25 kilobases (16.6 MDalton), el aislamiento se hace más difícil y los rendimientos más pobres (Maniatis y cols., 1982). Finalmente un protocolo de extracción determinado, puede no ser eficiente para demostrar la presencia de plásmidos en todas las especies bacterianas.

Siguiendo las indicaciones de Novick y cols. (1976), los plásmidos se nombraron anteponiendo las siglas pSA a las cifras que indican la cepa de la que procedían.

3. TRATAMIENTO DEL PLASMIDO DE RESISTENCIA A TETRACICLINA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Como se ha dicho anteriormente, la cepa portadora de resistencia a tetraciclina daba lugar en los geles de agarosa, a

dos bandas, una de ellas de tamaño aproximadamente el doble que la otra. Con el fin de determinar si se trataba de dos plásmidos distintos y, en caso afirmativo, cuál de ellos era responsable de la resistencia, se procedió a la purificación de ambas bandas y posterior tratamiento con endonucleasas de restricción.

En primer lugar se extrajo el ADN de la banda del gel, mediante un tratamiento de elución por congelación descrito por Tautz y Rentz (1983), de esta manera se obtuvo el ADN de cada banda por separado. Cada una de ellas se sometió a tratamiento con las endonucleasas de restricción EcoRI y Sall (Amersham International plc) y digestión doble con ambas.

En la foto 6 se puede observar el resultado de la digestión efectuada. La banda correspondiente al plásmido de doble peso molecular no fué recuperable del gel con el método empleado. Sin embargo la otra sí lo fué y, una vez purificada, regeneraba en todos los casos ambas bandas, lo que lleva a suponer que las bandas del gel original corresponden al mismo plásmido tratándose, en el caso de la superior, de un dímero.

Este plásmido no presentó ningún punto de corte para las enzimas empleadas. Dado su pequeño tamaño es muy probable que no contuviera la combinación de bases que reconocen estas endonucleasas.

Así pues, los plásmidos detectados tienen las siguientes características:

Cepa	Plásmido	Resistencias	P.M.(MDalton)
<u>S.bredeney</u>	pSA1161	Tc	1,27 \pm 0,15
<u>S.panama</u>	pSA1231	Km,Fa,Cx,PG	47,78 \pm 3,33

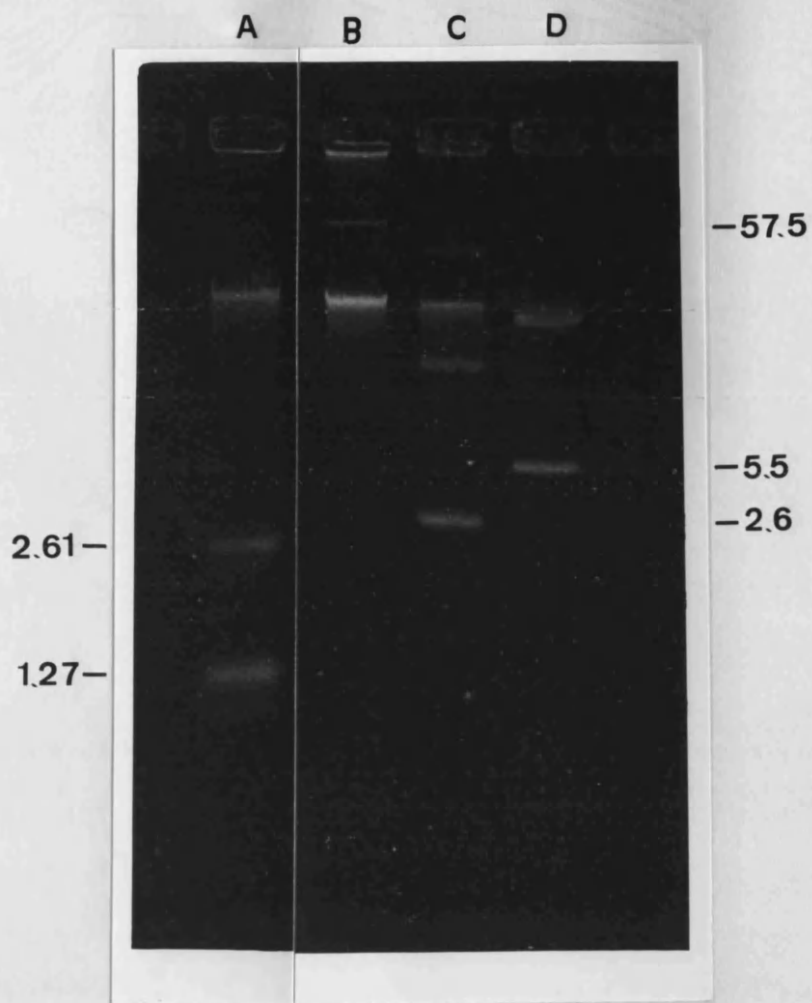


Foto 4. Electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0,8%, de ADN procedente de las siguientes cepas:

- A) S.bredeney / pSA1161-1162 B) E.coli W3110TT/RP4-35
 C) E.coli HB101/pBR322 D) E.coli C600/RSF1010

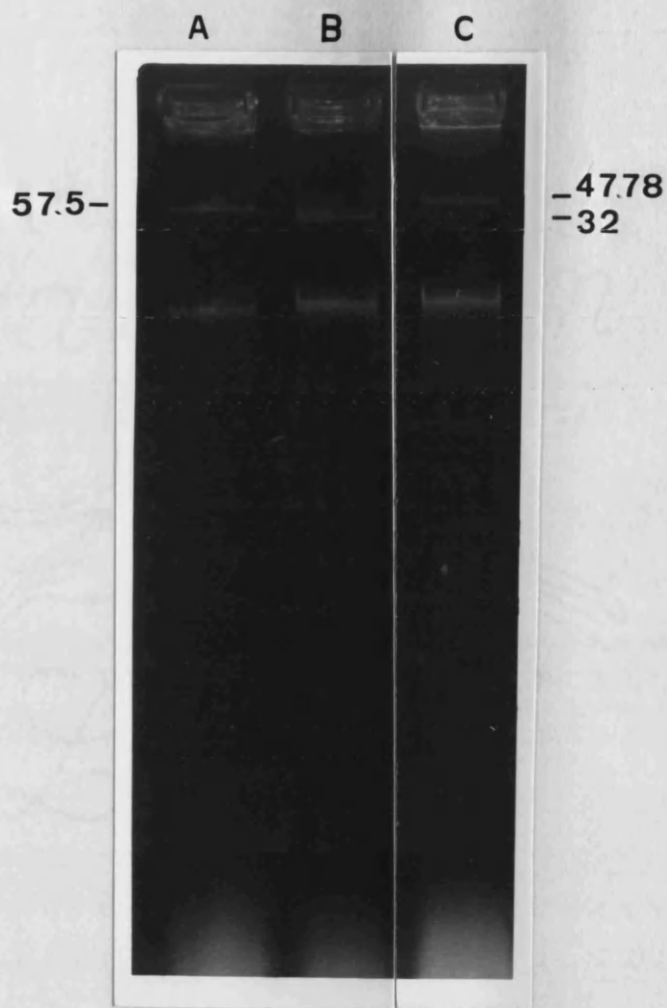


Foto 5. Resultados de la electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0,6%, de ADN procedente de las siguientes cepas:

A) E.coli W3110TT/RP4-35

C) S.panama /pSA1231

B) E.coli C600/pIP113

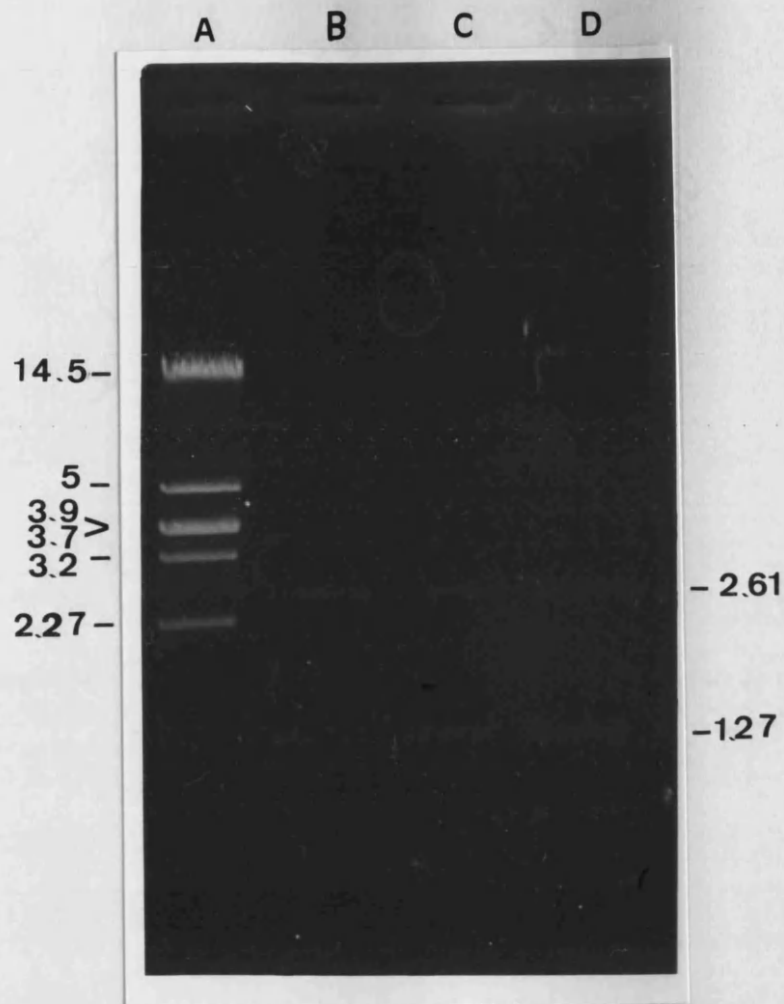


Foto 6. Electroforesis en minigel de agarosa al 0,8%, de los resultados obtenidos en el tratamiento de restricción del fago λ y el plásmido pSA1161.

A) λ /EcoRI

C) pSA1161/SaII

B) pSA1161/EcoRI

D) pSA1161/EcoRI+SaII

Posteriores estudios se dedicarán a la investigación completa de todos los plásmidos que puedan ser detectados en las cepas resistentes encontradas en el presente trabajo, así como a la determinación de su capacidad de transferencia a cepas ambientales próximas taxonómicamente.

CONCLUSIONES

1. Con la metodología empleada, en el estudio comparativo de diversos factores que afectan al aislamiento de Salmonella, se han obtenido 1.112 cepas, correspondientes a 49 serotipos, de las cuales 478 se aislaron empleando preenriquecimiento y 634 sin él.

2. Los resultados del análisis de varianza de los datos obtenidos, demuestran que todos los efectos estudiados: tipo de enriquecimiento, caldo de enriquecimiento selectivo, medio sólido selectivo, temperatura del agua y características del punto de muestreo; son significativos.

3. El preenriquecimiento en caldo no selectivo, ha dado lugar siempre a menor número de aislamientos de Salmonella, así como al desarrollo de numerosos microorganismos competidores sobre las placas de medios sólidos, dificultando notablemente la recuperación de salmonellas. Este efecto es especialmente acusado cuando la incubación se realiza a 37°C.

4. La modificación realizada en el medio NR10, sustituyendo el cloruro de magnesio por sulfato de magnesio, muestra menor eficacia en la recuperación de salmonellas, que la composición original.

5. Los dos medios sólidos más eficaces en el aislamiento de Salmonella, empleando enriquecimiento directo en medio NR10, han sido agar Bismuto Sulfito y agar Hektoen entérico.

6. Las temperatura más adecuadas para la recuperación de Salmonella se encuentran comprendidas en el intervalo de 10 a

15°C, resultando las temperaturas extremas, tanto por encima como por debajo de éstas, más desfavorables.

7. Las características del punto de muestreo son decisivas para la obtención de Salmonella, ya que incluso en el mismo lago de la Albufera, cada uno de los puntos ha resultado significativamente diferente del resto. Ante la imposibilidad de estudiar uno por uno los múltiples factores físico-químicos y biológicos implicados, los diferentes puntos de muestreo reflejan precisamente esta gran diversidad de factores.

8. El estudio cuantitativo de salmonella, ha confirmado la posibilidad de proceder al aislamiento directo de estos microorganismos, sin utilizar preenriquecimiento en caldo no selectivo, al menos en las aguas estudiadas. Además esta técnica, de siembra directa en NR10, da lugar a mayor inhibición de la flora competitiva.

9. La temperatura de incubación de los medios líquidos ha resultado significativa en función de las características del agua analizada. Así en las aguas residuales, la siembra directa en NR10 a 43°C, ha dado lugar a los mejores resultados, obteniéndose frecuentemente cultivos puros de Salmonella a las 48 horas, mientras que en el agua superficial natural resultó excesivamente selectiva, recomendándose la incubación a 37°C.

10. De los 52 serotipos obtenidos en el estudio serológico de las 1.162 cepas seleccionadas, destaca la ausencia de S.typhi, así como la predominancia de los serotipos infantis, panama y typhimurium, todos ellos considerados ubicuos. La escasez de estudios similares en la zona, no permite el

establecimiento de conclusiones acerca de la supervivencia de unos serotipos frente a otros.

11. El 12,7% de las cepas seleccionadas para comprobar su resistencia a antibióticos, lo fué a uno o más. De ellas el 35,35% presentó resistencia a un solo agente antimicrobiano y el 64,55% a dos o más. La mayor incidencia de resistencias se corresponde con los serotipos más abundantes, siendo las más frecuentemente encontradas las resistencias a estreptomicina, ampicilina y tetraciclina. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a la polimixina B.

12. Las concentraciones mínimas inhibitorias a los antibióticos empleados, han oscilado entre 10 y 1,700 $\mu\text{g/ml}$. La máxima corresponde a amoxicilina y la mínima a penicilina G.

13. El 30% de las cepas resistentes fueron capaces de transferir sus resistencias a un E.coli receptor, con frecuencias de transmisión que variaron de 10^{-3} a 10^{-7} . La resistencia a estreptomicina no fué transferida en ningún caso.

14. Todas las cepas resistentes, tras tratamiento más o menos prolongado con bromuro de etidio, perdieron dichas resistencias, lo que demuestra la naturaleza plasmídica de las mismas.

15. Se han detectado dos plásmidos, uno de ellos pSA1161, portador de resistencia a tetraciclina, con un peso molecular de 1,27 MDalton y otro con resistencia múltiple de 47,78 MDalton de peso molecular. (pSA1231)

16. Las técnicas simplificadas para el aislamiento de ADN plasmídico, no han dado buenos resultados en el caso de cepas

salvajes de Salmonella, por lo que se ha hecho necesario el empleo de varias hasta encontrar la más adecuada (Método de Godson y Vapnek).

17. La existencia de un elevado número de salmonellas, no sólo en aguas residuales sino también en aguas naturales superficiales, unida a la presencia de resistencias a antibióticos transferibles a otros microorganismos, hace necesaria la investigación continua de estos gérmenes, para su adecuado control sanitario. Esta investigación requiere métodos sencillos, rápidos y a ser posible estandarizados con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en diferentes zonas geográficas.

BIBLIOGRAFIA

- ACHARD,C. y R.BENSAUDE. 1896. Citado por: L.Le Minor, 1981, en M.P.Starr, H.Stolp, H.G.Trüper, A.Balows y H.G.Schlegel (eds) *The Prokaryotes*, vol.II, p.1148. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg New York.
- ANDREWES,F.W. 1922. Studies on group-agglutination I. The Salmonella group and its antigenic structure. *J. Pathol. Bacteriol.* 25: 505-521.
- ANDREWES,F.W. 1925. Studies on group-agglutination II. The absorption of agglutinins in the diphasic salmonelas. *J. Pathol Bacteriol.* 28: 345-349.
- ACHTMAN,M., G.MORELLI y S.SCHWUCHOW. 1978. Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: role of F pili and fate of mating aggregates. *J. Bacteriol.* 135: 1053-1061.
- ALCAIDE,E., J.P.MARTINEZ, P.MARTINEZ GERMES y E.GARAY. 1982. Improved Salmonella recovery from moderate to highly polluted waters. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 143-146.
- ALCAIDE,E., J.P. MARTINEZ y E.GARAY. 1984. Comparative study on Salmonella isolation from sewage-contaminated natural waters *J. Appl. Bacteriol.* 56: 365-371.
- ALCAIDE,E. y E.GARAY. 1984. R-plasmid transfer in Salmonella isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 435-438.
- AL-SOWAYGH,I.A. y A.M.SHIBL. 1983. Incidence of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae isolated in Riyadh. *Curr. Microbiol.* 5: 143-146.

- ALTHERR, M.R. y K.L.KASWECK. 1982. In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in E.coli Appl. Environ. Microbiol. 44: 838-843.
- AMOROS, I. 1985. Niveles de contaminación fecal y aislamiento de Salmonella en aguas del litoral Valenciano. Tesis de Licenciatura.
- ANDERSON, E.S. 1968. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 22: 131-180.
- ANDERSON, E.S. y M.J.LEWIS. 1965. Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in S.typhimurium. Nature 208: 843-849.
- AOKI, T., T.KITAO y T.ARAI. 1977. R-plasmids in fish pathogens p.39-45. In S.Mitsuhasi, L.Rosvital y V.Kicmèry (eds). Plasmid medical and theoretical aspects. Avicenum Czechoslovak Medical Pres, Praga.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15^a ed. Washington.
- ARMSTRONG, J.L., J.J.CALOMIRS y R.J.SEIDLER. 1982. Selection of antibiotic-resistant Standard Plate Count bacteria during water treatment. Appl. Environ. Microbiol. 44: 308-316.
- BAILEY, J.S., N.A.COX y J.E.THOMSON. 1981. Efficiency of Selenite-Cistine and TT enrichment broths for the detection of Salmonella. J. Appl. Bacteriol. 51: 409-414.
- BAINE, W.B., J.J.FARMER, E.J.GANGAROSA, G.T.HERMANN, C.THORNSBERRY y P.A.RICE. 1977. Typhoid fever in the United States associated with the 1972-1973 epidemic in Mexico. J.Infect.Dis. 135: 649-653.

- BANFER, J.R.J. 1971. Comparison of the isolation of Salmonella from human faeces at 37°C and 43°C. Zentralbl. Bakteriolog. Parasit. Infect. Hyg. I. 217: 35-40.
- BAYLET, R., F.SINEGRE y S.KRIM. 1981. Etude de la résistance au chlore des Salmonella isolées des eaux d'alimentation. T.S.M.-L'EAU 76^e année n^o 3: 163-165.
- BELL, J.B., W.R.MACRAE y G.E.ELLIOT. 1980. Incidence of R factor in coliform, fecal coliform and Salmonella populations of the Red River in Canada. Appl. Environ. Microbiol. 40: 486-491.
- BELL, J.B., G.E.ELLIOT y D.W.SMITH. 1983. Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliforms populations. Appl. Environ. Microbiol. 46: 227-232.
- BENEVISTE, R. y J.DAVIES. 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes, similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. US 70: 2276.
- BIRNBOIM, H.C. y J.DOLY. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.
- BORREGO, J.J., F.ARRABAL, A.de VICENTE, L.F.GOMEZ y P.ROMERO 1983. Study of microbial inactivation in the marine environment J. Water Poll. Contr. Fed. 3: 297-302.
- BRENNER, D.J. 1978. Characterization and clinical identification of Enterobacteriaceae by DNA hybridization. Prog. Clin. Pathol. 7: 71-47.

- BRENNER, D.J. 1984. Family Enterobacteriaceae en: N.R.Kieg, J.G.Holt (eds) Bregey's Manual of Sistematic Bactèriology 1ª ed. vol. I, p. 408-420. Williams & Wilkins. Baltimore London
- BRINTON, C.C. 1971. The properties of sex pili, the viral nature of conjugal genetic transfer systems and some possible aproaches to the control of bacterial drug resistance. Critical Rev. Microbiol. 1: 105-160.
- BRODA, P. 1979. Plasmids. W.H.Freeman and Company Ltd. Oxford San Francisco.
- BOOTHROYD, M. y BAIRD-PARKER, A.C. 1973. The use of enrichment serology for Salmonella detection in human foods and animal feeds. J. Appl. Bacteriol. 36: 155-172.
- BURMAN, N.P. 1967. In Progress in Microbiological Techniques ed. C.H.Collins p.185. London:Butterworths.
- CALLAGHAN, P. y J.BRODIE. 1968. Laboratory investigation of sewe swabs following the Aberdeen typhoid outbreak of 1964. J. Hyg. Cambridge 66: 489-497.
- CALOS, M.P. y S.H.MILLER. 1980. Transposable elementes. Cell 20: 579-595.
- CAMPBELL, A. 1981. Evolutionary significance of accesory DNA elements in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 35: 55-84.
- CARNEY, J.F., C.E.CARTY y R.R.COLWELL. 1975. Seasonal-occurrence and distribution of microbial indicators in the Rhode River of Chesapeake Bay. Appl. Microbiol. 30: 771-780.
- CHABBERT, Y.A. 1977. Antibióticos en bacteriología médica. en: G.L.Daguet y Y.A.Chabbert Técnicas en Bacteriología 1ªed. vol.3, p. 131-223. Ed. JIMS Barcelona.

- CHAMBERLIN, C.E. y R. MITCHELL. 1978. A decay model for enteric bacteria in natural waters, en: R. Mitchell (ed) Water Pollution Microbiology vol.2 p.325-348. John Wiley and sons New York.
- CHERRY, W.B., J.B. HANKS, B.M. THOMASON, A.M. MURLIN, J.W. BIDDLE & J.M. CROOM. 1972. Salmonellae as an index of pollution of surface waters. Appl. Microbiol. 24: 334-340.
- CLAUDON, D.G., D.J. THOMSON, C.H. CHRISTENSON, G.W. LAWTON & E.C. DICK. 1971. Prolonged Salmonella contamination of a recreational lake by runoff waters. Appl. Microbiol. 21: 875-877.
- CLEWELL, D.B. 1981a. Plasmids, drug resistance and gene transfer in the genus Streptococcus. Microbiol. Rev. 45: 409-436.
- CLEWELL, D.B. 1981b. Conjugation and resistance transfer in Streptococci and another gram-positive species: Plasmids sex feromones and conjugative transposons (A review) en: S.B. Levy R.C. Clowes y E.L. Koenig (eds) Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids. p. 191-206. Plenum Press New York.
- CLOWES, R.C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. Bact. Rev. 36: 361-404.
- COLLINS, J.F. y P. BRODA. 1975. Motility, diffusion and cell concentration affect pair formation in Escherichia coli. Nature 258: 722-723.
- COLLARD, P. y M. UNWIN. 1958. A trial of Rappaport's medium J. Clin. Pathol. 11: 426
- CONRADI, H. 1908. Citado por: R.W.S. Harvey y T.H. Price, 1979 Principles of Salmonella isolation. J. Appl. Bacteriol. 46: 27-57

- COOK, W.L., R.A. CHAMPION y D.G. AHEARN. 1974. Isolation of Salmonella enteritidis serotype agona from eutrophic regions of a fresh-water lake. *Appl. Microbiol.* 28: 723-725.
- COOKE, M.D. 1976. Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater and marine shellfish. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 9: 879-884.
- CORRY, J.E.L., A.G. KITCHELL y T.A. ROBERTS. 1969. Interactions in the recovery of Salmonella typhimurium damaged by heat or gamma radiation. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 415-428.
- CROSA, J.H., D.J. BRENNER, W.H. EWING y S. FALKOW. 1973. Molecular relationships among the Salmonellae. *J. Bacteriol* 115: 307-315.
- CURTISS, R. 1969. Bacterial conjugation. *Ann. Rev. Microbiol.* 23: 69-136.
- CURTISS III, R. 1981. Gene transfer. en: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg y G.B. Phillips (eds) *Manual of Methods for General Bacteriology*. p. 243-259. American Society for Microbiology, Washington
- DATTA, N. 1962. Transmissible drug resistance in a epidemic strain of Salmonella typhimurium. *J. Hyg.* 60: 301.
- DAVIES, J.E. 1981. Antibiotic resistance: a survey en: S.B. Levy R.C. Clowes y E.L. Koenig (eds) *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids*. p. 145-155. Plenum Press New York.
- DAVIS, C.E. y J. ANANDAN. 1970. The evaluation of R-factor: a study of a preantibiotic community in Borneo. *New Engl. J. Med.* 282: 117.

- DONDERO, N.C., C.T. THOMAS, M. KHARE, J.F. TMONEY y G.M. FUKUI. 1977. Salmonella in surface waters of central New York state Appl. Environ. Microbiol. 33: 791-801.
- DUTKA, B.J. y K.K. KWAN. 1980. Bacterial die-off and stream transport studies. Water Res. 14: 909-915.
- ECKHARDT, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid I: 584-588.
- EDEL, W. y E.H. KAMPELMACHER. 1973. Comparative studies on isolation methods of "sub-lethally" injured Salmonellae in nine european laboratories. Bull. World Health Org. 48: 167-174
- EDGAR, D. y M.D. SOAR. 1979. Evaluation of culture media for the isolation of Salmonella from sewage sludge. J. Appl. Bacter 47: 237-241.
- EDWARDS, P.R. y W.H. EWING. 1962. Identification of Enterobacteriaceae 2ª ed. Minneapolis Burgess.
- EDWARDS, P.R. y M.M. GALTON. 1967. Salmonellosis. en: C.A. Bradley C. Cornelius (eds), Advances in veterinary medicine vol. 11. p. 1-64. Academic Press. New York London.
- ELWELL, L.P., J.R. SAUNDERS, M.H. RICHMOND y S. FALKOW. 1977. Relationships among some R plasmids found in Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 131: 156-362.
- EVISON, L.M. y E. TOSTI. 1980. An appraisal of bacterial indicators of pollution in the sea water. Prog. Water Tech. 12: 591-599.
- EWING, W.H. 1966. Enterobacteriaceae: taxonomy and nomenclature Monograph Communicable Disease Center. Atlanta, Georgia.
- FALKOW, S. 1975. Infectious multiple drug resistance. Pion Ltd. London.

- FAIR, J.F. y S.M.MORRISON. 1967. Recovery of bacterial pathogens from high quality surface waters. *Water Resources Res.* 3: 799-803.
- FAWCUS, H.B. 1909. Citado en: R.W.S.Harvey y T.H.PRICE. 1979. Principles on Salmonella isolation. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 27-57.
- FELIX, A. y R.M.PITT. 1934. A new antigen of B.typhosus. Its relation to virulence and to active and passive immunisation. *Lancet* ii: 186-191.
- FOLKHARD, W., K.R.LEONARD, S.MALSEY, D.A.MARVIN, J.DUBOCHET, A.ENGEL, M.ACHTMAN y R.HEIMUTH. 1979. X-ray diffraction and electron microscope studies on the structure of bacterial F pili. *J. Mol. Biol.* 130: 145-160.
- FOOTE, S.C. y E.W.HOOK. 1979. Salmonella spp (including typhoid fever) en: G.L.Mandell, R.G.Douglas, J.E.Bennet (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. p. 1730-1750. John Wiley & sons, New York.
- FRETER, R., R.R.FRETER y H.BRICKNER. 1983. Experimental and mathematical models of E.coli plasmid transfer in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 39: 60-84.
- FRICKER, C.R. 1984. A comparison of isolation procedures for salmonellas from polluted water using two forms of Rappaport's medium. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 305-309.
- FUKS, D. y M.DEVEESCOVI. 1984. Survival of Salmonella strains and E.coli in the marine environment. VII Workshop on Marine Pollution. Lucerna, octubre 1984.
- GAFFKY, C. y C.PAAK. 1885. Citado en: L.Le Minor, 1981, en M.P.Starr, H.Stolp, H.G.Trüper, A.Balows y H.G.Schlegel (eds)

- The Prokaryotes, vol.II,p.1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg New York.
- GAMESON,A.L.H. y D.J.GOULD. 1975. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in sea water. En: A.C.H.Gameson (ed), Discharge of sewage from sea outfalls, p. 209-219. Pergamon Press, London.
 - GANGAROSA,E.J., J.V.BENNET, C.WYATT, P.E.PIERCE, J.OLARTE, P.M.HERNANDES, P.VAZQUEZ y P.BESSUDO. 1972. An epidemic associated episode. J. Infect. Dis. 126: 215-218.
 - GARAY,E. 1975. Indices microbiológicos de contaminación fecal en la Albufera de Valencia. Tesis Doctoral.
 - GARAY,E., J.P.MARTINEZ y E.HERNANDEZ. 1978. Aislamiento e identificación de salmonellas en la Albufera de Valencia. Rev. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 18: 119-124.
 - GARAY,E., M.J.PUJALTE, A.ARNAU y E.ALCAIDE. 1982. Estudio preliminar de la flora bacteriana heterótrofa autóctona y contaminante en la Albufera de Valencia. Memoria para el Ecmo. Ayuntamiento de Valencia.
 - GARAY,E., A.ARNAU y M.J.PUJALTE. 1983. Relative frequencies and significance of faecal coliforms as indicators related to water temperature. Zentralbl. Microbiol. 1/138: 329-336.
 - GÄRTNER,A. 1888. Citado en: Kauffmann,F. 1978. Das Fundament. Copenhagen: Munkgaard.
 - GEORGALA,D.L. y M.BOOTHROYD. 1964. A rapid immuno-fluorescence technique for detecting Salmonella in raw meat. J. Hyg. Cambridge 74: 319-327.
 - GODSON,G.N. y D.VAPNEK. 1973. A simple method of preparing large amounts of $\times 174$ supercoiled DNA. Biochim. Biophys. Acta. 299: 516

- GRUNBAUM, A.S. 1896. Citado en: L. Le Minor, 1981, en: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds), *The Prokaryotes*, vol. II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg New York.
- GRUNNET, K. 1975. Salmonella in sewage and receiving waters. Copenhagen: Fadl's Forlag.
- GWYN, N.B. 1898. Citado en: L. Le Minor, 1981, en: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds), *The Prokaryotes*, vol. II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg. New York.
- HAINES, R.B. y E.M.L. ELLIOT, 1944. Some bacteriological aspects of dehydrated foods. *J. Hyg.* 43: 470
- HARGROVE, R.E., F.E. McDONOUGH y R.J. REAMER. 1971. A selective medium and presumptive procedure for detection of Salmonella in dairy products. *J. of Milk and Food Technol.* 34: 6-11.
- HARVEY, R.W.S. y S. THOMSON. 1953. Optimum temperature of incubation for isolation of Salmonellae. *Mont. Bull. of the Ministry of Health and the Public Health Lab. Service.* 12: 149-150.
- HARVEY, R.W.S. y T.H. PRICE. 1964. The isolation of Salmonella typhi from Selenite enrichment media. *Mont. Bull. of the Ministry of Health and the Public Health Lab. Service.* 23: 233-235.
- HARVEY, R.W.S. y T.H. PRICE. 1974. Isolation of salmonellas. *Public Health Lab. Services Monograph, Series 8*, London: HMSO.
- HARVEY, R.W.S., T.H. PRICE y P.B. CRONE. 1975. Quality control tests of two Salmonella enrichment media using different inocula. *J. Hyg. Cambridge.* 74: 375-384.
- HARVEY, R.W.S. y T.H. PRICE. 1976. Isolation of salmonellas

- from sewage-polluted river water using Selenite F and Muller-Kauffmann tetrathionate. J. Hyg. Cambridge 77: 333-339.
- HARVEY, R.W.S. y T.H.PRICE. 1977. Observations on pre-enrichment for isolating salmonellas from sewage polluted natural waters using Muller-Kauffmann tetrathionate broth prepared with fresh and dessicated oxbile. J. Appl. Bacteriol. 43: 143-148.
 - HARVEY, R.W.S. y T.H.PRICE. 1979. Principles of Salmonella isolation. J. Appl. Bacteriol. 46: 27-57.
 - HARVEY, R.W.S., T.H.PRICE y E.XIROUCHAHI. 1979. Comparison of Selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for the isolation of salmonellas from sewage-polluted natural water using a pre-enrichment technique. J. Hyg. Cambridge 83: 451-460.
 - HARVEY, R.W.S. y T.H.PRICE. 1980. Salmonella isolation with Rappaport's medium after pre-enrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. J. Hyg. Cambridge 85: 125-128.
 - HARVEY, R.W.S. y T.H.PRICE. 1981a. Observations on infections associated with South Wales natural waters. J. Appl. Bacteriol. 51: 369-374.
 - HARVEY, R.W.S. y T.H.PRICE. 1981b. Comparison of Selenite F Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for Salmonella isolation from chicken giblets after pre-enrichment in buffered peptone water. J. Hyg. Cambridge. 87: 219
 - HOBEN, D.A., D.H.ASHTON y A.C.PETERSON. 1973. Some observations on the incorporation of novobiocin into Hektoen Enteric agar for improved Salmonella isolation. Appl. Microbiol. 26: 126-127.

- HOOD, M.A., G.E. NESS y N.J. BLAKE. 1983. Relationship among fecal coliforms, Escherichia coli and Salmonella spp in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 122-126.
- HOOPER, W.L. y H.R. JENKINS. 1965. An evaluation of Rappaport's magnesium chloride malachite green medium in the routine examination of faeces. *J. Hyg.* 63: 491
- HOYLE, L. 1943. A brilliant green acid fuchsin medium for the isolation of Salmonella. *Mont. Bull. of the Ministry of Health and the Public Health Lab. Service.* 2: 26-28.
- ISENBERG, H.D., S. KOMINOS y M. SIEGEL. 1969. Isolation of Salmone-llae and Shigellae from an artificial mixture of fecal bacteria. *Appl. Bacteriol.* 18: 656-659.
- IVESON, J.B. y N. KOVACS. 1967. A comparative trial of Rappaport enrichment medium for the isolation of Salmonellae from faeces. *J. Clin. Pathol.* 20: 290-293.
- IVESON, J.B. y E.M. MACKAY-SCOLLAY. 1969. Strontium chloride and strontium selenite enrichment media in the isolation of Salmonella. *J. Hyg. Cambridge.* 67: 457-464.
- JAMESON, J.F. 1961. A study of tetrathionate enrichment techniques, with particular reference to two new tetrathionate modifications used in isolating Salmonellae from sewer swabs. *J. Hyg. Cambridge.* 59: 1-13.
- JEFFRIES, L. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of Salmonellae. *J. Clin. Pathol.* 12: 568-571.
- KADO, C.I. y S. LIU. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.

- KAUFFMANN, F. 1930. Ein kombiniertes anreicherungs verfahren für typhus und paratyphusbazillen. Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. I 119: 148-152.
- KAUFFMANN, F. 1935. Weitere erfahrungen mit dem kombinierten anreicherungsuerfhren für Salmonella bazillen. Zeitsch. Hyg. Infekt. 117: 26-32.
- KAUFFMANN, F. 1941. Die bakteriologie der Salmonella-gruppe Copenhagen: Munksgaard.
- KAUFFMANN, F. 1956. Zür biochemischen und serologischen gruppen und typen- einteilung der Enterobacteriaceae. Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg. I 165: 344-354.
- KAUFFMANN, F. 1957. On the T antigen of Salmonella bareilly Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica 40: 343-344.
- KAUFFMANN, F. 1960. Two biochemical subdivisions of the genus Salmonella. Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica. 49: 393-396.
- KAUFFMANN, F. 1963. Zür differential diagnose der Salmonella sub-genera I, II und III. Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica 58: 109-113.
- KAUFFMANN, F. 1964. Vereinfachtes antigen-schema der Salmonella Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica. 62: 68-72.
- KAUFFMANN, F. 1966a. Zür klassifizierung und nomenklatur der Salmonella sub-genera I-IV. Zentral. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. 1:2, 202: 482-483.
- KAUFFMANN, F. 1966b. The bacteriology of Enterobacteriaceae Baltimore: Williams & Wilkins.
- KAUFFMANN, F. 1971. On the classification and nomenclature

- of the genus Salmonella. Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica 79: 421-422.
- KAUFFMANN, F. 1973. Zur klassifikation und nomenklatur der Salmonella species. Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg. 223: 508-512.
 - KAUFFMANN, F. 1978. Das Fundament. Copenhagen: Munksgaard.
 - KAUFFMANN, F. y P.R. EDWARDS. 1952. Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 2: 2-8.
 - KENNER, B.A. y H.P. CLARK. 1974. Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa and Salmonella. J. Water Pollut. Control Fed. 46(9): 2163-2171.
 - KING, S. y W.I. METZGER. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. Appl. Microbiol. 16: 577-578.
 - KLECKNER, N. 1981. Transposable elements in prokaryotes. Ann. Rev. Genet. 15: 341-404.
 - KLECKNER, N., T.J. FOSTER, M.A. DAVIS, S. HANLEY-WAY, S.M. HAIING, V. LUNDBLAB y K. TAKESHITA. 1981. Genetic organization of Tn10 and analysis of Tn10 associated excision events. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 225-238.
 - van KLINEGREN, B., J.D.A. van EMBDEN y M. DESSENS-KROON. 1977. Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in Haemophilus influenzae. Antimicrob. Agents Chemoter. 11: 510-516.
 - KNOX, R., P.G.H. GELL y M.R. POLLOCK. 1943. The selective action of tetrathionate in bacteriological media. J. Hyg. Cambridge 43: 147-158.
 - KOBORI, H., C.W. SULLIVAN y H. SHIZUYA. 1984. Bacterial plasmids

- in Antarctic natural microbial assemblages. Appl. Environ. Microbiol. 48: 515-518.
- KOCH, A.L. 1981. Evolution of antibiotic resistance gene function Microbiol. Rev. 45: 355-378.
 - KOPECKO, D.J. 1980. Involvement of specialized recombination in the evolution and expression of bacterial genes, en: C. Stutter y K.R. Rozer (eds), Plasmids and transposons. Environmental effects and maintenance mechanisms, p. 165-205, Academic Press, London.
 - KRISTENSEN, M., V. LESTER y A. JÜRGENS. 1925. On the use of trypticized casein, bromthymol-blue, brom-cresol-purple, phenol-red and brilliant green for bacteriological nutrient media. British J. Experim. Pathol. 6: 291-299.
 - LEBEK, G. 1969. Die infektiöse bakterielle Antibiotikaresistenz Hans Huber, Berna.
 - LEBEK, G. 1972. Epidemiological investigations of R-factors in man and animals in Switzerland, en: V. Krcmery, L. Rosvital y T. Watanabe (eds), Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance p. 47-61, Springer-Verlag. Berlín.
 - LE MINOR, L. 1968. Conversions antigéniques chez les Salmonella Ann. Inst. Pasteur 109: 505-515.
 - LE MINOR, L. 1971. Connaissances actuelles sur les déterminants génétiques des antigènes des Salmonella, en: A. Perez-Miravete, D. Peláez (eds), Recent Advances in Microbiology 10th International Congress of Microbiology, p. 341-348. Mexico: Asociación Mexicana de Microbiología.
 - LE MINOR, L. 1972. Apparition en France d'une épidémie á Salmonella wein. Med. Mal. Infec. 12: 441

- LE MINOR, L. 1981. The Genus Salmonella, en: M.P.Starr, H.Stolp H.G.Trüper, A.Balows y H.G.Schlegel (eds), The Prokaryotes, vol,II,p. 1148-1159. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg New York.
- LE MINOR, L. 1984. Genus Salmonella, en: N.R.Krieg y J.G.Holt (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1ª ed. vol.I p. 427-458. Williams & Wilkins. Baltimore, London.
- LE MINOR, L., M.CHIPPAUX, F.PICHINOTY, C.COYNAULT y M.PIECHAUD. 1970. Méthodes simples permettant de rechercher la tétrathio-nate-reductase en cultures liquides on sur colonies isolées. Ann. Inst. Pasteur 119: 733-737.
- LE MINOR, L., M.VERON y M.POPOFF. 1982. Taxonomie des Salmonella Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 133B: 223-243.
- LE MINOR, L. y M.VERON. 1982. Salmonella, en: L. Le Minor y M.Véron (eds), Bactériologie Médicale, p. 259-274. Flammarion Médecine-Sciences.
- LOEFFLER, F. 1892. Citado en: F.Kauffmann, 1978, Das Fundament Copenhagen: Munkgaard.
- LOUIS, P.C.A. 1829. Citado en: L.Le Minor, 1981, en M.P.Starr H.Stolp, H.G.Trüper, A.Balows y H.G.Schlegel (eds), The Proka-ryotes, vol.II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg. New York.
- LO VERDE, P.T., C.AMENTO y G.I.HIGASHI. 1980. Parasite-parasite interaction of Salmonella typhimurium and Schistosoma. J. Infect. Dis. 141: 177-185.
- LÜDERITZ, O., O.WESTPHAL, A.M.STAUB y H.NIKAIDO. 1971. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolisaccharides. En: Weinbaum, Kadis y Ajl (eds), Microbial Toxins, vol. IV, p. 145-233, Academic Press, New York.

- MACH, P.A. y D.J. GRIMES. 1982. R-Plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1395-1403.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- MARE, I.J. 1968. Incidence of R-factors among gram-negative bacteria in drug-free human and animal communities. *Nature*: 220: 1046
- MARMUR, J., S. FALKOW y M. MANDEL. 1963. New approaches to bacterial taxonomy. *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 329-372.
- McCAMBRIDGE, J. y T.A. McMEEKIN. 1981. Effect on solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1083-1087.
- McFETERS, G.A. y D.G. STUART. 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane-filter chambers. *Appl. Microbiol.* 24: 805-811.
- McFETERS, G.A., G.K. BISONETTE, J.J. JEZESKI, C. THOMSON y D.G. STUART 1974. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* 27: 823-829.
- MEYNELL, E. y N. DATTA. 1965. Functional homology of the sex factor and resistance transfer factors. *Nature* 207: 884.
- MITCHELL, D.O. y M.J. STARZYK. 1975. Survival of Salmonella and other indicator microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 21: 1420-1421.
- MITSUHASHI, S., K. INOUE y M. INOUE. 1977. Nonconjugative plasmids encoding sulfanilamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 12: 418-422.
- MITTERMEYER, F.C., D. CRAMER y R. RANSFORD. 1980. Dispersal of

- Salmonella from a polluted stream to neighboring terrestrial habitats. J. Environ. Sci. Health A15(3): 269-281.
- MOATS, W.A. 1978. Comparison of four agar plating media with and without added novobiocin for isolation of Salmonellae from beef and deboned poultry meat. Appl. Environ. Microbiol. 36: 747-751.
 - MORIÑIGO, M.A., J.J. BORREGO y P. ROMERO. 1983. Técnica semicuantitativa para recuento de Salmonella a partir de agua de río. IX Congreso Nac. de Microbiología. Valladolid.
 - MUSER, D.M. y A.D. RUBENSTEIN. 1973. Permanent carriers of non-typhosa Salmonellae. Arch. Intern. Med. 132: 869-872.
 - MUSTER, C.J., L.A. MACHATTIE y J.A. SHAPIRO. 1981. Transposition and rearrangements in plasmid evolution. En: S.B. Levy, R.C. Clowes y E.L. Koenig (eds), Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids, p. 349-358. Plenum Press. New York.
 - NIEMI, M., M. SIBAKOV y S. NIEMELA. 1983. Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. Appl. Environ. Microbiol. 45: 79-83.
 - NORTH, W.R. y M.T. BARTRAM. 1953. The efficiency of Selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella. Appl. Microbiol. 1: 130-134.
 - NOVICK, R.P., R.C. CLOWES, S.N. COHEN, R. CURTISS III, N. DATTA y S. FALKOW. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. Bacteriol. Rev. 40: 168-189.
 - NOVICK, R.R. y F.C. HOPPENSTEADT. 1978. On plasmid incompatibility. Plasmid 1: 421-425.

- NUHI, A. y F. MALEKZADEH. 1978. Microbial investigation in the water of the Amir Kolayeh Lagoon. Iran. Zentralbl. Microbiol. 113: 313
- OGER, C., M. CATTEAU y H. LECLERC. 1976. Etude au laboratoire de la survie de Salmonella dans une eau polluée. Microbia 2(1): 3-9.
- PALOMARES, J.C. y E.J. PEREA. 1982. Comparison between plasmids of Salmonella and other Enterobacteriaceae isolated from the same patients. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A: 301-310.
- PAPADAKIS, J., D. TRICHOPOULOS, E. PATERAKI, N. PAPAICONOMOU y P. VASSILIADIS. 1972. Inhibition du Proteus sur gélose au vert brillant sulfadiazine-désoxycholate, utilisée dans l'isolement de Salmonella. Arch. Inst. Pasteur Hellénique 18: 31-39.
- PAPADAKIS, J.A. y M.A. EFSTRATIOU. 1980. Isolation of Salmonellae from vegetables with the use of Rappaport-Vassiliadis magnesium chloride-malachite green enrichment medium. Hippocrates 5: 1-5.
- PETIT, A. y E.R.A. SERRES. 1813. Citado en: L. Le Minor, 1981 en: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds), The Prokaryotes, vol. II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg. New York.
- PETTENKOFER, M. 1868. Citado en: L. Le Minor, 1981, en: M.P. Starr H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds), The Prokaryotes, vol. II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg New York.
- PRITCHARD, R.H. y N.B. GROVER. 1981. Control of plasmid replication and its relationship to incompatibility. En: L.B. Levy,

- R.C.Clowes y E.L.Koenig (eds), Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids, p. 271-278. Plenum Press. New York.
- PUMAROLA, B.F. 1971. Importancia del agua en la transmisión de las enfermedades infecciosas. Agua 69: 2-12.
 - RAPPAPORT, F., N.KONFORTI Y B.NEVON. 1956. a new enrichment medium for certain Salmonelae. J. Clin. Pathol. 9: 261-266.
 - RESTAINO, L., G.S.GRAUMAN, W.A.McCALL y W.M.HILL. 1977. Effects of varying concentrations of novobiocin incorporated into two Salmonella plating media on the recovery of four Enterobacteriaceae. Appl. Environ. Microbiol. 33: 585-589.
 - RESTAINO, L., K.K.KOMATSU y M.J.SYRACUSE. 1982. A note on novobiocin in XLD and HE agars: the optimum levels required in two commercial sources of media to improve isolation of salmonellas. J. Appl. Bacteriol. 53: 285-288.
 - RISCHÉ, H. 1973. Lysotypie. Infektionskrankheiten und ihre eneger. Eine sammlung von monographien, vol.14. Jena: Gustav Fischer Verlag.
 - ROBERTS, M. y A.L.SMITH. 1980. Molecular characterization of "plasmid free" antibiotic resistant Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 144: 476-479.
 - ROCHA, H., J.W.KIRK y C.D.HEAREY Jr. 1971. Prolonged Salmonela bacteremia in patients with Schistosoma mansoni infection. Arch. Intern. Med. 128: 254-257.
 - ROLFE, V. 1946. A note on the preparation of tetrathionate broth. Mont. Bull. of the Ministry of Health and the Public Health Lab. Service. 5: 158-159.

- SALMONELLA SUBCOMITTEE OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 1934. The Genus Salmonella Lignières 1900.
- SANDERSON, K.E. 1972. Linkage map of Salmonella typhimurium Bacteriol. Rev. 36: 555-586.
- SAUNDERS, J.R. y R.B.SYKES. 1977. Transfer of a plasmid-specified β -lactamase gene from Haemophilus influenzae. Antimicrob. Agents Chemoter. 11: 339-344.
- SAYLER, G.S., J.D.NELSON, J.R.A.JUSTICE y R.R.COLWELL. 1976. Incidence of Salmonella spp, Clostridium botulinum and Vibrio parahaemolyticus in an estuary. Appl. Environ. Microbiol. 31: 723-730.
- SCHOTMÜLLER, H. 1901. Citado en: L. Le Minor, 1981, en: M.P. Starr H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds), The Prokaryotes, vol. II, p. 1148. Springer-Verlag. Berlín-Heidelberg. New York,
- SHAW, W.V., D.H. BOUANCHAUD y F.W. GOLDSTEIN. 1978. Mechanism of transferable resistance to chloramphenicol in Haemophilus influenzae. Antimicrob. Agents Chemoter. 13: 326-330.
- SHAW, D.R. y V.J. CABELLI. 1980. Conjugal transfer of R-plasmid R1-drd-19 in Escherichia coli below 22°C. Appl. Environ. Microbiol. 42: 789-791.
- SILHAVY, T.J., M.L. BERMAN y L.W. ENQUIST. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory.
- SINELL, H.J. 1980. Introducción a la higiene de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- SMITH, D.H. 1967. R-factor infection of Escherichia coli lyophilized in 1946. J. Bacteriol. 94: 2071

- SNEDECOR, G.W. y W.G. COCHRAN. 198 . Métodos estadísticos. 9ª ed
CECSA. México.
- SPINO, D. 1966. Elevated-temperature technique for the isolation
of Salmonella from streams. Appl. Microbiol. 14: 591-596.
- STOCKER, B.A.D. y P.A. MÄKELÄ. 1971. Genetic aspect of biosynthe-
sis and structure of Salmonella lipopolysaccharide. En: Wein-
baum, Kadis y Ajl (eds), Microbial Toxins, p. 369-438. Academic
Press. New York.
- STOCKER, B.A.D. y P.A. MÄKELÄ. 1978. Genetics of the (gram
negative) bacterial surface. Proc. Soc. London B. 202: 5-30.
- STOKES, J.L. y W.W. OSBORNE. 1955. A Selenite brilliant green
medium for the isolation of Salmonella. Appl. Microbiol. 3: 217-
220.
- STUY, J.H. 1979. Plasmid transfer in Haemophilus influenzae.
J. Bacteriol. 139: 520-529.
- STUY, J.H. 1980. Chromosomally integrated conjugative plasmids
are common in antibiotic-resistant Haemophilus influenzae.
J. Bacteriol. 142: 925-930.
- TANAKA, T., K. IKEMURA, M. TSNUDA, I. SASAGAWA y S. MITSUHASHI.
1976. Drug resistance and distribution of R factors in Salmo-
nella strains. Antimicrob. Agents Chemoter. 9: 61-64.
- TAKAHASHI, S. y Y. NAGANO. 1984. Rapid procedure for isolation
of plasmid DNA and application to epidemiological analysis
J. Clin. Microbiol. 20: 608-613.
- TAUTZ, D. y M. RENZ. 1983. An optimized freeze-squeeze method
for the recovery of DNA fragments from agarose gels. Analyt.
Biochem. 132: 14-19.

- THATCHER, F.S. y D.S. CLARK. 1968. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. p. 91. Toronto: University of Toronto Press.
- THOMASON, B.M., J.W. BIDDLE y W.B. CHERRY. 1975. Detection of Salmonellae in the environment. Appl. Microbiol. 30: 764-767.
- THOMASON, B., D.J. DOOD y W.B. CHERRY. 1977. Increased recovery of Salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. Appl. Environ. Microbiol. 34: 270-273.
- THOMSON, S. 1953. Paratyphoid fever and bakers' confectionery; analysis of epidemic in South Wales 1952. Mont. Bull. of the Ministry of Health and the Public Health Lab. Service 12: 187-199.
- THOMSON, S. 1955. The numbers of pathogenic bacilli in faeces in intestinal diseases. J. Hyg. Cambridge 53: 217-224.
- TORANZO, A., J.L. BARJA, R.R. COLWELL y F.M. HETRICK. 1983. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. Infect. Immun. 39: 184-192.
- TRICHOPOULOS, D., J.A. PAPADAKIS, D. KARALIS y P. VASSILIADIS. 1975. Incubation of raised temperature of enrichment media, combined with secondary enrichment in Rappaport's medium, for the isolation of salmonellas from sewage. J. Appl. Bacteriol. 42: 157-163.
- TRUST, T.J. y K.H. BARTLETT. 1979. Aquarium pets as a source of antibiotic-resistant Salmonellae. Can. J. Microbiol. 25: 535-541.
- VAN, H.D., F. GOLDSTEIN, J.F. ACAR y D.H. BOUANCHAUD. 1975. A transferable kanamycin resistance plasmid isolated from Haemo-

- philus influenzae. Ann.Microbiol. 126: 397-399.
- Van DONSEL,D.J., E.E.GELDREICH y N.A.CLARKE. 1967. Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to strom-water polution. Appl. Microbiol. 15: 1362-1370.
 - VARNESS,K.J., R.E.PACHA y R.L.LAPEN. 1978. Effects of dispersed recreational activities on the microbiological quality of forest surface water. Appl. Environ. Microbiol. 36: 95-104.
 - VASSILIADIS,P., J.PAPADAKIS, E.PATERAKI, D.TRICHOPOULOS, B. KARABATOS y G.PAPOUSTAKIS. 1972. Isolement de salmonelles a partir de carcasses de poulets par enrichissement secondaire en milieu de Rappaport. Arch. Inst. Pasteur Hellenique 18: 19-29.
 - VASSILIADIS,P., J. PATERAKI, J. PAPAICONOMOU, N. PAPADAKIS , y D. TRICHOPOULOS. 1976a.
Nouveau procèdè d'enrichissement de Salmonella. Ann. Microb. (Inst. Pasteur) 127B: 195-200.
 - VASSILIADIS,P., J.A. PAPADAKIS, D. KARALIS y D. TRICHOPOULOS. 1976b.
Enrichment in Muller-Kauffmann's broth and Rappaport's broth from buffered peptone water in the isolation of Salmonellae from minced meat. J. Appl. Bacteriol. 40: 349-354.
 - VASSILIADIS,P., A.KALANDIDI, E.XIROUCHAKI, J.PAPADAKIS y D. TRICHOPOULOS. 1977. Isolement de salmonelles à partir de saucisses de porc en utilisant un nouveau procédé d'enrichissement (R10/43°C). Recueil Med. Vet. Alfort, 153: 489-494.
 - VASSILIADIS,P., D. TRICHOPOULOS, A. KALANDIDI y E. XIROUCHAKI. 1978

- Isolation of Salmonellae from sewage with a new procedure of enrichment. J. Appl. Bacteriol. 44: 233-239.
- VASSILIADIS,P., D. TRICHOPOULOS, D. PAPOUSTAKIS y E. PALLAN-DIOU. 1979.
- A note on the comparison of two modifications of Rappaport's medium with Selenite broth in yhe isolation of Salmonella. J. Appl. Bacteriol. 46: 553-557.
- VASSILIADIS,P., D.TRICHOPOULOS, V.KALAPOTHAKI y C.A.SERIE. 1981a. Isolation of Salmonella with the use of the RB10 modification of Rappaport's medium. J.Hyg.Cambridge. 87: 35-41.
 - VASSILIADIS,P., V.KALAPOTHAKI, D.TRICHOPOULOS, C.MAVROMMATI y C.A.SERIE. 1981b. Improved isolation of Salmonellae from naturally contaminated meat products by using Rappaport-Vassiliadis enrichment broth. Appl. Environ, Microbiol. 42:615-618
 - VASSILIADIS,P. 1983. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas. An overview. J. Appl. Bacteriol. 54: 69-76.
 - VIEU,J.F., O.CROISSANT y C.DAGUET. 1965. Structure des bacteriophages responsables des phénomenes de conversion chez les Salmonella . Ann. Inst. Pasteur. 109: 160-166.
 - VOOGD,C.E., P.A.M.GUINEE, A.MANTEN y E.H.KAMPELMACHER. 1968. Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1965 and 1966. Antoine van Leeuwenhoek 34:357-364.
 - VOOGD,C.E., P.A.M.GUINEE, A.MANTEN y J.J.VALKENBURG. 1973

- Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1969, 1970 and 1971. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 321-329.
- VOOGD, C.E., J. van LEEUWEN, P.A.M. GUINEE, A. MANTEN y J.J. VALKENBURG. 1977. Incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and tetracycline among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1972, 1973 and 1974. *Antonie van Leeuwenhoek* 43: 269-281.
 - WALTER, W.G. y R.P. BOTTMAN. 1967. Microbiological and chemical studies of an open and closed watershed. *J. Environ. Health*. 30: 159-163.
 - WASHINGTON, J.A. y A.L. BARRY. 1974. Dilution test procedures. En: E.H. Lenette, E.H. Spaulding y J.P. Truant (eds), *Manual of Chemical Microbiology*, 2^a ed. p. 410-417. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 - WILLETS, N. y B. WILKINS. 1984. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* 48: 24-41.
 - WILSON, W.J. 1923. Reduction of sulphites by certain bacteria in media containing a fermentable carbohydrate and metallic salts. *J. Hyg. Cambridge* 21: 392-398.
 - WILSON, W.J. y E. BLAIR. 1926. Combination of bismuth and sodium sulphite affording enrichment and selective medium for typhoid paratyphoid groups of bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 310-311.
 - WILSON, W.J. y E. BLAIR. 1927. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of B.typhosus and B.proteus. *J. Hyg. Cambridge* 26: 374-391.

- WISON,W.J. y E.M.McV.BLAIR. 1931. Further experience of the bismuth sulphite media in the isolation of Bacillus typhosus and Bacillus paratyphosus B from faeces, sewage and water. J. Hyg. 31: 138
- YOSHIKAWA,T., P.HERBERT y P.OILL. 1980. Salmonellosis. The Western Journal of Medicine. 133: 408-417.
- YOSHPE-PURER, Y. y H.I.SHUVAL. 1972. Salmonellae and bacterial indicator organism in polluted coastal water and their hygienic significance. En: M.Rairo (ed), Marine Pollution and Sea Life. Fishing neios Ltd.
- YOSHPE-PURER,Y y S.GOLDERMAN. 1984. The occurrence of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in coastal water of Israel. VII Workshop on Marine Pollution of the Mediterranean. Lucerna.

ADDENDUM

- ANDERSON, E.S. y E. NATKIN. 1968. Transduction of resistance determinants and R factors of the transfer systems by phage Plkc. Mol. Gen. Genet. 114: 261
- FOX, M.D. 1974. Recent trends in salmonellosis epidemiology. J. Amer. Vet. Med. Ass. 165: 990-993
- KONENLY, A.W. y R. ROLLI. 1975. Epidemiologia delle gastroenteriti nel adulto. Giorn. Mal. Infet. Paras. 27: 861-867.
- LE MINOR, L. 1973. Bilan de l'origine et de la repartition des Salmonella recues au Centre National des Salmonella pendant les années 1970 a 1972. Rev. Epidem. Med. Soc. et Santé publ. 21: 665-722.
- LEGENDRE, P. y cols. 1976. Repartition actuelle des salmonelloses en Gironde. Bordeaux Med. 9: 1649-1652.
- LOPEZ-BREA, M., M.A. MESEGUER y M. BAQUERO. 1980. Frecuencia de aislamiento en coprocultivo y hemocultivo de las distintas especies del género Salmonella. Rev. San. Hig. Pub. 54: 709-717
- LOPEZ-BREA, M., L. COLLADO y M. BAQUERO. 1983. Salmonella typhi: incidencia en coprocultivo y aspectos microbiológicos. 57: 1153-1159.
- SANCHEZ-BUENAVENTURA, J. y P. CORTINA-GREUS. 1977. Estudio ecológico y epidemiológico del género Salmonella, en Valencia. Rev. San. Hig. Pub. 51: 1093-1108.

APENDICE ESTADISTICO

RESULTADOS DE LOS TESTS DE KEULS

MED1. Medias respecto al efecto tipo de enriquecimiento (1: enriquecimiento directo; 2: preenriquecimiento)

MED2. Medias para el efecto caldo de enriquecimiento (1:NR10; 2:MNR10).

MED3. Medias respecto al efecto medio sólido selectivo (1:AHE, 2:AVB; 3:ABS)

MED4. Medias para el efecto temperatura del agua (1:3°C-10°C ; 2: 10°C-15°C; 3: 15°C-20°C ; 4: 20°C).

MED5. Medias para el efecto punto de muestreo (los índices coinciden con la numeración de los puntos ya descrita).

MED6. Medias para la interacción tipo de enriquecimiento-temperatura del agua.

MED7. Medias para la interacción tipo de enriquecimiento-punto de muestreo.

MED8. Medias para la interacción caldo de enriquecimiento-punto de muestreo.

MED9. Medias para la interacción medio sólido selectivo-temperatura del agua

MED10. Medias para la interacción medio sólido selectivo-punto de muestreo.

MED11. Medias para la interacción punto de muestreo-temperatura del agua.

MED12. Medias para la interacción tipo de enriquecimiento-caldo de enriquecimiento-punto de muestreo.

MED14. Medias para la interacción caldo de enriquecimiento-medio sólido selectivo-punto de muestreo.

Los 1 indican diferencias significativas.

MED1←11.620 8.484
16.66 120 KEULS MED1

VECTOR Q, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION

MED4←9.237 13.777 10.252 8.812 7.275 9.209 8.313 9.141 9.511 9.772

1 16.66 30 KEULS 11.62
2 OR Q, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION
0 2 1
1 1 0
2 0 0

MED2←14.102 5.952
16.66 120 KEULS MED2

VECTOR Q, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION

1 14.102
2 5.952
0 2 1
1 1 0
2 0 0

MED3←12.648 5.314 12.119
16.66 80 KEULS MED3

VECTOR W, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION

11 12.648
12 12.119
2 MED7←5.334 1.7 5.314 4.61 12.27 34.26 3.392 0.477 13.965 7.01 17.1
0 2 3 1
1 1 0 0
3 1 0 0
2 0 0 0

MED5←4.364 1.126 14.212 9.64 20.794
16.66 80 KEULS MED5

VECTOR Q, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION

5 20.794
3 14.212
4 9.64
1 4.364
2 1.126
0 2 1 4 3 5
5 1 1 1 1 0
3 1 1 1 0 0
4 1 1 0 0 0
1 1 0 0 0 0
2 0 0 0 0 0

MED4

7.275 13.77 10.252 8.812
16.66 60 KEULS MED4

VECTOR Q, CON 0 EN LA PRIMERA POSICION

2 13.77
3 10.252
4 8.812
1 7.275
0 1 4 3 2
2 1 1 1 0
3 1 0 0 0
4 0 0 0 0
1 0 0 0 0

Reunido el Tribunal que suscribo, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D.^a Elena Alcalde Moreno la calificación de Apto "Cum Laude"

Valencia, a 17 de junio de 1985

El Secretario,

El Presidente

[Signature]


[Signature]

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
VALENCIA