

**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

Serotipificación del género *Salmonella* y cuantificación de
Escherichia coli aisladas de agua y suelo de uso agrícola
en el valle de Culiacán y su resistencia a los
antimicrobianos.

POR:

OSVALDO LÓPEZ CUEVAS

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS
AGRÍCOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Diciembre de 2005.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

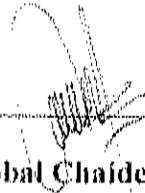
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de la tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Bejar

Director General.

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Osvaldo López Cuevas, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



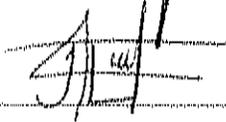
Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz

Director de Tesis.



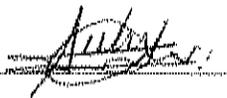
M.C. José Armando Carrillo Fasio

Asesor.



Dra. Josefina León Félix

Asesora.



M. C. Julio Henoc Monjardín Heráldez

Asesor.



Dr. José Benigno Valdez Torres

Asesor.

“Si anhelamos con seguridad y pasión la seguridad, el bienestar y el libre desarrollo del talento de todos los hombres no hemos de carecer de los medios necesarios para conquistarlos”.

Albert Einstein

DEDICATORIA

A mi esposa Paulina. Por el amor que siempre me has demostrado y por estar conmigo en los momentos de dificultades y tristezas y por supuesto, en los momentos de triunfos y alegrías...TE AMO.

A mis padres Aurora y Manuel. Por darme la vida, su amor y confianza; porque siempre estuvieron conmigo para darme una palabra de aliento cuando me miraban casi derrotado y hacían revivir las fuerzas en mí para seguir con mis anhelos de superación profesional, por darme su apoyo moral y económico de manera incondicional en todo momento.

A mis Hermanos Judith, María Inés, Manuel, Leobardo y Eduardo. Porque los amo con todo mi corazón, por ser mis mejores amigos y confesores, por todos sus consejos y por esos momentos de alegrías, tristezas y esperanzas que hemos compartido juntos.

A ustedes, porque son la base de mis pensamientos y el pilar de mi superación profesional y humana.

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por concederme la maravillosa experiencia de vivir, por darme la capacidad de ser competente, tomar decisiones y esta hermosa familia que me has dado.

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Porque depositaron en mí su confianza y me permitieron formar parte de su grupo de estudiantes para llevar a cabo mis estudios de maestría. Particularmente en la unidad Culiacán, además de encontrar personas con una gran calidad profesional, encontré personas con una gran calidad humana con los que compartí muchos momentos de tristeza, angustia y felicidad. En verdad a todos GRACIAS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por la confianza que depositaron en mí y el apoyo económico durante estos dos años que me permitieron solventar gastos durante este tiempo y que ayudaron en gran medida a concluir satisfactoriamente mis estudios de maestría.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz. Por aceptar ser director de mi tesis, por confiar en mí en cada momento, por la dedicación y paciencia que siempre tuvo conmigo, por transmitirme sus conocimientos de manera desinteresada en cada momento que lo necesité y sobre todo, por la gran calidad humana que le caracteriza...GRACIAS.

A la Dra. Josefina León Félix: Por su colaboración como asesora en mi trabajo de investigación, por transmitirme sus conocimientos en el área de biología molecular y por su gran sentido del humor...Gracias por todos esos momentos.

Al M.C. José Armando Carillo Fasio. Porque siempre tuvo un momento para atender mis inquietudes, por transmitirme sus conocimientos, por colaborar en mi tesis y por esa sencilla y particular forma de ser....Muchas gracias.

Al M.C. Julio Henoc Monjardín Heráldez. Por su valiosa participación en mi proyecto de tesis, por todos esos consejos y sugerencias durante mis estudios y sobre todo por su apoyo incondicional tanto en mis estudios como en mi vida cotidiana.

Al Dr. José Benigno Valdez Torres. Por el gran apoyo y paciencia que me brindó en el área de Estadística durante mis estudios....Gracias por su sencillez.

A todos los profesores de CIAD, Culiacán. Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, Dra. María Dolores Muy Rangel, M.C. Manuel Alonso Báez Sañudo, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Raymundo S. García Estrada, y al Dr. Jorge H. Siller Cepeda. Por su paciencia y por compartir conmigo su experiencia y conocimientos. También les agradezco por todos los consejos que me ayudaron a ser mejor cada día y forjar poco a poco mi formación....Muchas gracias.

A los técnicos de laboratorio de Microbiología. M.C. Johana Marcela Soto Beltrán y QFB. Célida Isabel Martínez Rodríguez, por todos los consejos y paciencia con la que me han tratado durante este tiempo de conocerlas, además, de ser personas con una gran calidad humana.....Muchas gracias.

A mis compañeros y amigos. Evangelina, Maribel, María Emilia, Laura Denisse, Armenia, Mirella, Gladys Patricia, Juan Ramón, Guillermo y Jorge. Por todos esos momentos que compartimos juntos en este tiempo. Ojala y nuestra amistad perdure por toda la vida, aunque yo no los vea, siempre estarán en mi corazón.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xx
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
Características generales de <i>Salmonella</i>	8
Clasificación.....	10
Epidemiología.....	15
Patogenia.....	18
Especies del género <i>Salmonella</i> en el ambiente.....	23
Resistencia a los antimicrobianos.....	29
Características generales de <i>Escherichia coli</i>	42
Clasificación.....	44
Epidemiología.....	44
Patogenia.....	45
Resistencia a los antimicrobianos.....	52

Resistencia a los antimicrobianos.....	52
OBJETIVOS.....	53
Objetivo general.....	53
Objetivos particulares.....	53
METAS.....	55
HIPÓTESIS.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Aislamiento de <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> de agua de uso agrícola.....	58
Toma de muestras.....	58
Análisis microbiológicos.....	59
Aislamiento de <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> de suelo de uso agrícola.....	61
Toma de muestras.....	61
Análisis microbiológicos.....	61
Confirmación del género <i>Salmonella</i> por PCR.....	62
Preparación de la muestra para PCR.....	63
Preparación de la mezcla de reacción para PCR.....	63
Procedimiento de amplificación del ADN bacteriano.....	64
Electroforesis de los productos de PCR.....	64
Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	66

Reactivos y equipos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	67
Procedimiento.....	68
Evaluación de la concentración mínima inhibitoria contra sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para el género <i>Salmonella</i>	70
Preparación de la concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	70
Preparación de las placas de dilución en agar.....	71
Preparación del inóculo.....	71
Inoculación de las placas de dilución en agar.....	72
Incubación de las placas de dilución en agar.....	72
Lectura de resultados para concentración mínima inhibitoria (CMI).....	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
Aislamiento de especies del género <i>Salmonella</i> de agua de uso agrícola.....	74
Susceptibilidad a los antimicrobianos del género <i>Salmonella</i> en agua de uso agrícola.....	80
Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos por serotipo y por antimicrobiano.....	82
Concentración mínima inhibitoria (CMI) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por serotipo.....	86
Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> de agua de uso agrícola.....	89
Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de <i>E. coli</i> aisladas de agua de uso agrícola por región de muestreo.....	94

Aislamiento de <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> de suelo de uso agrícola.....	98
CONCLUSIONES.....	100
RECOMENDACIONES.....	101
LITERATURA CONSULTADA.....	102

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Especies de <i>Salmonella</i> , subespecies, serotipos y sus principales hábitats.....	14
2. Límites y dosis de aplicación de bactericidas agrícolas, dependiendo de la enfermedad y del producto.....	38
3. Aislamientos y serotipos de acuerdo a la región de muestreo.....	74
4. Aislados de <i>Salmonella</i> de diferentes estados.....	75
5. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos por su origen.....	80
6. Susceptibilidad a ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y gentamicina por serotipos.....	82
7. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina por serotipos.....	83
8. Perfil de susceptibilidad a estreptomycin por serotipos.....	83
9. Concentración mínima inhibitoria de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por serotipo.....	86
10. Cuantificación de <i>E. coli</i> en la región de Culiacán.....	89
11. Cuantificación de <i>E. coli</i> en la región de Villa Juárez.....	90
12. Cuantificación de <i>E. coli</i> en la región de Navolato.....	91
13. Cuantificación de <i>E. coli</i> en la región de Eldorado.....	91
14. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomycin y gentamicina en la región de Culiacán.....	94

15. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Villa Juárez.....	95
16. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Navolato.....	96
17. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Eldorado.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. El género <i>Salmonella</i> permanece viable de manera cíclica a través del hospedero y el ambiente.....	25
2. Posibles rutas de transferencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el ambiente.....	35

RESUMEN

Las frutas y hortalizas se pueden contaminar con microorganismos patógenos en cualquier punto del proceso, desde el campo hasta la mesa. El agua y el suelo de uso agrícola son fuentes de contaminación durante el período de pre-cosecha. *Escherichia coli* es un organismo indicador de contaminación fecal y supone la presencia de bacterias patógenas; además, el aislamiento de *Salmonella* y su identificación serológica es importante, ya que algunos serotipos han estado implicados en infecciones por el consumo de frutas y hortalizas frescas. La presencia de bacterias fitopatógenas en los cultivos, hace necesaria la aplicación de antimicrobianos para su control; sin embargo, esta aplicación se hace de manera indiscriminada, por lo que se han desarrollado cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos. El objetivo del presente trabajo, fue cuantificar a *Escherichia coli* e identificar los serotipos de *Salmonella* presentes en agua y suelo de uso agrícola del valle de Culiacán; así como evaluar a *E. coli* y *Salmonella* con pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Durante el período de Enero a Mayo de 2005, se recolectaron y analizaron 50 y 30 muestras de agua superficial y de suelo de uso agrícola, respectivamente. Para el aislamiento de *Salmonella*, 400 mL de agua fueron centrifugados a 13,800 xg por 10 minutos y el sedimento fue recolectado para su análisis utilizando la metodología establecida en el compendium de métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales. *Escherichia coli* fue cuantificada mediante la técnica

de filtración por membrana y agar cromogénico. Para el aislamiento de *Salmonella* y *E. coli* de suelo, se analizaron 25 g de la muestra empleando la metodología establecida en el compendium de métodos para el análisis microbiológico de alimentos, adecuando la metodología para muestras sólidas. Veinticuatro cepas de *Salmonella* confirmadas por PCR, incluyendo 12 cepas anteriormente aisladas en diferentes regiones de Sinaloa; 3 de Sonora y 1 de Guerrero, y 50 de *Escherichia coli* fueron evaluadas con pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se incluyeron: trimetoprim-sulfametoxazol (1.25 y 23.75 µg, respectivamente); ampicilina (10 µg); ciprofloxacino (5 µg); tetraciclina (30 µg); estreptomina (10 µg); y gentamicina (10 µg) para *Salmonella* y los últimos tres para *Escherichia coli*. En Culiacán, fueron serotipificadas dos Typhimurium resistentes a tetraciclina y una Give; En Villa Juárez, tres Typhimurium resistentes a tetraciclina, una Anatum con susceptibilidad intermedia a estreptomina, una Agona y otra Infantis fueron identificadas; En Navolato, se identificaron cuatro Typhimurium, dos de ellas resistentes a tetraciclina y otra con susceptibilidad intermedia al mismo antimicrobiano, además, se aislaron una Oranienburg y una Minnesota; En Eldorado se encontraron dos Typhimurium resistentes a tetraciclina y una Infantis; De Costa Rica se aisló una Typhimurium resistente a tetraciclina, al igual que la Typhimurium de La Cruz de Elota; de Sonora, se aislaron una Clanvillian, una Rublislaw y una *Salmonella* grupo F con susceptibilidad intermedia a estreptomina al igual que la *Salmonella* grupo D monofásica de Guerrero. Todas las cepas de *Salmonella* fueron susceptibles a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacino. Una de las 13 cepas de *S. ser.* Typhimurium a las que se evaluó Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tuvo una CMI de 1350 mg/L; cinco de 1500 mg/L; tres de 1550 mg/L y cuatro de 1600 mg/L. Los serotipos Agona y Minnesota presentaron una CMI de 1600 mg/L; los serotipos Oranienburg, Rubíslaw, grupo D monofásica y Give presentaron una CMI de 1550 mg/L; la del ser. Anatum, tuvo una CMI de 1200mg/L; una de las dos cepas del ser. Infantís tuvo una CMI de 1400 mg/L y la otra tuvo una CMI de 1650 mg/L; los serotipos Clanvillian y *S.* grupo F presentaron una CMI de 1500 mg/L. En Culiacán, en 10 de las 11 muestras se encontró *E. coli*, con un promedio de 431 UFC/100 mL; En Villa Juárez, las 18 muestras presentaron *E. coli*, con un promedio de 18,702 UFC/100 mL; en Navolato, las 11 muestras estaban contaminadas con *E. coli* con un promedio de 1,272 UFC/100 mL y en Eldorado, en nueve de 10 se cuantificó un promedio de 41,202 UFC/100 mL de *E. coli*. En Culiacán, de ocho cepas evaluadas una fue resistente a tetraciclina, siete a estreptomycinina y una a gentamicina, dos tuvieron susceptibilidad intermedia a gentamicina y una a estreptomycinina; de las 16 cepas de Villa Juárez, cinco fueron resistentes a tetraciclina y 13 a estreptomycinina, 10 tuvieron susceptibilidad intermedia a gentamicina y tres a estreptomycinina; en Navolato, de las 11 cepas, tres fueron resistentes a tetraciclina y ocho a estreptomycinina, y cinco tuvieron susceptibilidad intermedia a gentamicina, una a estreptomycinina y una a tetraciclina. No se logró el aislamiento de *Salmonella* y *E. coli* en las muestras de suelo. De las 24 cepas de *Salmonella*, se identificaron 11 serotipos distintos y altos niveles de contaminación con *E. coli*. El 50% de las cepas de *Salmonella* fueron resistentes a tetraciclina, todas del serotipo Typhimurium; mientras que *E. coli* presentó niveles de resistencia de un 72 a un 90% para estreptomycinina. Los diversos serotipos de *Salmonella* y altas concentraciones

de *E. coli* en agua de uso agrícola son un factor de riesgo para la contaminación de frutas y hortalizas, aumentando los riesgos para los consumidores y la población que está en contacto constante con esta agua debido a la presencia de especies bacterianas resistentes a los antimicrobianos.

ABSTRACT

The fruits and vegetables can be contaminated by pathogenic microorganisms, from the field to the table. Water and soil for agricultural purpose are sources of contamination during the pre-harvest period. *Escherichia coli*, as fecal indicator suggest the presence of pathogenic bacteria; also, the isolation and serological identification of *Salmonella* is important, as some serotypes have been implicated on fresh produce borne outbreaks. Also some *Salmonella* strains have acquired resistance to commonly plant bacteria antimicrobial agents. The aim of this investigation, was to quantify *Escherichia coli* and to identify the presence of *Salmonella* serotypes on agricultural soil and water from the Culiacan valley; and to evaluate the susceptibility of *E. coli* and *Salmonella* strains against antimicrobial agents. From January to May of 2005, 50 and 30 agricultural soil and water samples were collected. For the isolation of *Salmonella*, 400 mL of water were centrifuged at 13,800 xg for 10 minutes and the pellet was collected for further analysis using the methodology established at the Compendium of Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater. *E. coli* was quantified using the membrane filtration technique. 25 g of soil samples were obtained from diverse locations at the Culiacan valley and analyzed for the presence of both *Salmonella* and *E. coli* as stated at the APHA (1998). Twenty-four PCR confirmed *Salmonella* strains, including 12 strains

previously isolated from different regions of Sinaloa; 3 from Sonora and 1 from Guerrero, and 50 strains of *E. coli* were included in the antimicrobial susceptibility test. Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 and 23.75 µg, respectively); ampicillin (10 µg); ciprofloxacin (5 µg); tetracycline (30 µg); streptomycin (10 µg); and gentamycin (10 µg) were tested against *Salmonella* and for *E. coli* last three. In Culiacan, one Give and two tetracycline resistant Typhimurium strains were found; in Villa Juarez, three Typhimurium resistant to tetracycline, one Anatum with intermediate susceptibility to streptomycin, one Agona and one Infantis were identified; in Navolato, four Typhimurium were identified, two having resistance and one with intermediate susceptibility to tetracycline, in addition, one Oranienburg and one Minnesota were isolated; in Eldorado, two Typhimurium showed resistance to tetracycline and one Infantis; from Costa Rica and La Cruz de Elota a tetracycline resistant Typhimurium strain was isolated, respectively; From Sonora, the serotypes Clanvillian, Rubislaw and *Salmonella* F group showed intermediate susceptibility to streptomycin, similar to the *Salmonella* monophasic D group from Guerrero. All the *Salmonella* isolates were susceptible to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and ciprofloxacin. One of the 13 isolates of *S. ser.* Typhimurium had a minimum inhibitory concentration (MIC) against $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ of 1350 mg/L; five of 1500 mg/L; three of 1550 mg/L; and four of 1600 mg/L. Agona and Minnesota serotypes presented a MIC of 1600 mg/L; Oranienburg, Rubislaw, *S. group* D monophasic and Give serotypes presented a MIC of 1550 mg/L, *S. ser.* Anatum, showed a MIC of 1200 mg/L; the two Infantis isolates had a MIC of 1400 and 1650 mg/L,

respectively; the serotypes Clanvillian and S. F group presented a MIC of 1500 mg/L. In Culiacan, 10 of 11 samples presented *E. coli*, with an average of 431 CFU/100 mL; in Villa Juarez, the 18 samples had *E. coli*, with an average of 18,702 CFU/100 mL; in Navolato, the 11 samples were contaminated with *E. coli* with an average of 1,272 CFU/100 mL and in Eldorado, in 9 of 10 the average was 41,202 CFU/100mL of *E.coli*. In Culiacan, 1 of 8 isolates evaluated was resistant to tetracycline, 7 to streptomycin and 1 to gentamicin, 2 had intermediate susceptibility to gentamicin and 1 to streptomycin; of the 16 strains from Villa Juarez, 5 were resistant to tetracycline and 13 to streptomycin, 10 had intermediate susceptibility to gentamicin and 3 to streptomycin; in Navolato, 3 of the 11 strains, were resistant to tetracycline and 8 to streptomycin, and 5 had intermediate susceptibility to gentamicin, 1 to streptomycin and 1 to tetracycline. *E. coli* and *Salmonella* were absent from soil samples. Eleven different serotypes were found from the 24 *Salmonella* isolates. 50% of the *Salmonella* isolates were resistant to tetracycline; whereas *E. coli* isolates were resistant from 72 to 90% to streptomycin. The diverse *Salmonella* serotypes and the high concentration of *E. coli* in agricultural water pose an important risk factor to fresh produce, workers and final consumers.

INTRODUCCIÓN

El agua, es uno de los recursos naturales mas preciados para el hombre debido a la vital importancia que representa para todos los seres vivos y el soporte de desarrollo económico y social en cualquier país del mundo. México, utiliza solo el 0.1 % del agua dulce disponible en el planeta (www.agua.org.mx); sus tres principales usos son el agropecuario con un 76%, seguido de abastecimiento público e industrial con el 14 y 10%, respectivamente (Comisión Nacional del Agua, 2005). De acuerdo con la CNA, Sinaloa se encuentra en la región Pacífico-Norte, en la que el 87% del agua disponible es de origen superficial y de esta, el 94% se utiliza con fines agropecuarios y el otro 6% se utiliza para el abastecimiento público y las industrias (Comisión Nacional del Agua, 2005).

El valle de Culiacán, es la región de Sinaloa con mayor producción de hortalizas (CIDH, 2005) y el agua superficial es utilizada principalmente para el riego de los cultivos y uso dentro de los empaques agrícolas; el agua disponible proviene de las presas Adolfo López Mateos y Sanalona, que por medio de ríos y canales llega hasta la región agrícola para su aprovechamiento; sin embargo, la exposición del agua a la superficie terrestre durante su trayecto presenta serios riesgos de contaminación con microorganismos patógenos para el hombre (Beuchat y Ryu, 1997; Santo Domingo *et*

al., 2000; Thong *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003). Las principales fuentes de contaminación obedecen a las descargas residuales de las ciudades, residuos domésticos, desechos de granjas, fecalismo al aire libre de animales silvestres y el hombre (Harris, 1997; Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000; Baudart *et al.*, 2000).

En el agua, se pueden encontrar más de 80 géneros de bacterias que no son patógenas para el hombre; sin embargo, bacterias oportunistas como *Pseudomonas*, *Serratia* y *Aeromonas* se encuentran naturalmente en el agua; otras bacterias oportunistas son acarreadas por el agua de su hábitat natural que es el suelo y materia vegetativa (APIA, 1998). El agua además puede acarrear otras bacterias de importancia en salud humana como variedades de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, algunos parásitos y virus (Castillo *et al.*, 1990; LeChevallier *et al.*, 1991; Beuchat, 1996; Johnson *et al.*, 2003).

El agua de irrigación es considerada la principal fuente de contaminación de los cultivos y el principal factor que ocasiona la pérdida de la calidad sanitaria de las frutas y hortalizas frescas, ya que al ser irrigadas con agua contaminada con residuos fecales pueden ser transmitidos a los frutos (Thurston *et al.*, 2002; Okafo *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2004). Dentro de los géneros bacterianos que se han aislado de manera constante de agua superficial son *Salmonella* y *Escherichia* (Johnson *et al.*, 2003; Cázarez, 2004); ambas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentran ubicuas en el ambiente y su principal fuente de disseminación son las heces de casi todo tipo de

animales, incluyendo una gran diversidad de aves y el hombre (Johnson *et al.*, 2003) y son considerados microorganismos de importancia en salud pública, ya que son transmitidas por la ruta fecal-oral y pueden causar brotes epidemiológicos por el consumo de agua o alimentos contaminados (Beuchat, 1996; Winfield y Groisman, 2003).

Existe una estrecha relación entre la contaminación del agua superficial y el suelo, ya que los desechos residuales de cualquier fuente tienen como destino final uno de estos dos ambientes (Ingham *et al.*, 2004). Existe una amplia variedad de microorganismos patógenos que se pueden encontrar de manera natural en el suelo, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Beuchat *et al.*, 1997) y se ha reportado la presencia de cepas de *Salmonella* y *E. coli* en suelos de cultivo y que son capaces de sobrevivir por tiempos relativamente largos (Palacios *et al.*, 1999; Baloda *et al.*, 2001; Ingham *et al.*, 2004), donde su presencia representa un riesgo a la salud de los consumidores, ya que se han reportado brotes de infección por el consumo de frutas y hortalizas frescas donde se han implicado cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 (Beuchat, 1996).

Todos los serotipos de *Salmonella* son potencialmente patógenos para el hombre y aproximadamente el 70% de los serotipos han sido aislados de personas infectadas (Brenner *et al.*, 2000; Beier *et al.*, 2004); sin embargo, existe una variabilidad en cuanto a la prevalencia de serotipos que ocasionan brotes por el consumo de alimentos de

origen animal y los que se ha involucrado con brotes por el consumo de frutas y hortalizas. Entre los principales serotipos que han ocasionado brotes por el consumo de alimentos de origen animal se encuentran los serotipos Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport y Hadar (Beier *et al.*, 2004); en cambio, los serotipos implicados en brotes por el consumo de frutas y hortalizas se encuentran los serotipos Poona, Javiana, Baildon, Oraniemburg, relacionados con el consumo de diversos productos frescos, dentro de los que se incluyen melones, tomates, sandía, entre otros (Beuchat, 1996; Cummings *et al.*, 2001; FDA, 2001; Anónimo, 2002).

Se dice que la contaminación de las frutas y hortalizas puede ocurrir en cualquier punto del proceso, desde el campo hasta la mesa (Beuchat, 1996); sin embargo, de manera general se asume que el producto se contamina desde el campo y los principales factores asociados a la contaminación en el período de pre-cosecha son el agua de irrigación y el suelo de cultivo (Beuchat, 1996; FDA, 2001).

La capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* en el ambiente, particularmente en el agua y el suelo, depende de diversos factores, entre ellos, poca disponibilidad de nutrientes, salinidad, variaciones drásticas de temperatura y pH, depredación y del serotipo, ya que no todos tienen la misma capacidad de sobrevivir en el ambiente, y estas capacidades se han atribuido a la transferencia de genes que les confieren esa resistencia a las condiciones adversas del ambiente (Winfield y Groisman, 2003), por lo que es de

vital importancia el conocimiento de la diversidad de serotipos presentes en estos ambientes que son potenciales fuentes de contaminación para frutas y hortalizas.

De mayor importancia resulta la presencia de cepas del género *Salmonella* y *E. coli* resistentes a los antimicrobianos, ya que las consecuencias de la resistencia se pueden medir como un incremento en la magnitud de morbilidad, altos índices de mortalidad y elevados costos de hospitalización de pacientes infectados, comparadas con aquellas que resultan infectadas con bacterias susceptibles a los antimicrobianos de elección (Lipstich *et al.*, 2002).

Diversos reportes han mostrado un aumento en la emergencia de cepas de *Salmonella* y *E. coli* resistentes a los antimicrobianos (Sayah *et al.*, 2005); y este aumento se atribuye en gran medida a la utilización excesiva en terapéutica y en veterinaria como promotores de crecimiento en animales de engorda (Khachatourians, 1998; Mandal *et al.*, 2003; Sayah *et al.*, 2005); sin embargo, también se ha atribuido al uso indiscriminado de antimicrobianos en la agricultura para el tratamiento de enfermedades bacterianas en los cultivos (Riesenfeld *et al.*, 2004).

Desde la década de 1950 se han utilizado compuestos antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades bacterianas en los cultivos y generalmente estos se utilizan en mezclas de uno o dos antimicrobianos combinados con sales de cobre (Graves, 2001); sin embargo, el uso irracional e indiscriminado de estos productos han generado la

emergencia de cepas bacterianas resistentes a estos productos (Manulis *et al.*, 1998, 2003; Graves, 2001; Lipstich *et al.*, 2002).

En Sinaloa, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), permite la utilización de bactericidas agrícolas que generalmente son mezclas de uno o dos antimicrobianos (clorhidrato de oxitetraciclina, sulfato de estreptomicina y sulfato de gentamicina), combinados con sales de cobre (sulfato de cobre) (SAGAR, 1999); pero su utilización ha sido indiscriminada ya que en períodos de producción se hacen aplicaciones de estos productos en programas calendarizados sin tomar en cuenta si el cultivo presenta la enfermedad o el grado del daño existente (Gaxiola, 2000).

En un estudio realizado por Gaxiola (2000) en diversas regiones de Sinaloa, incluyendo el valle de Culiacán, aisló 30 cepas de *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria, a las que realizó pruebas de susceptibilidad a los bactericidas agrícolas, encontrando una alta resistencia a estos productos; sin embargo, no se han desarrollado estudios que relacionen la resistencia de cepas bacterianas de importancia en salud pública con la aplicación de estos antimicrobianos en los cultivos.

En el valle de Culiacán, existen datos de la presencia de especies del género *Salmonella* y *Escherichia coli* en el agua de uso agrícola (Cázarez, 2004); sin embargo, se desconocen los serotipos de *Salmonella* a los que pertenecen. Además, no existe

información disponible acerca de la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán y su relación con el uso indiscriminado de antimicrobianos en los cultivos, por lo que se desarrolló este trabajo de investigación para determinar los serotipos de *Salmonella* y cepas de *Escherichia coli* presentes en el agua y el suelo de uso agrícola del valle de Culiacán y determinar cualitativamente la susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos y cuantitativamente su resistencia a sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en las cepas de *Salmonella* obtenidas en este estudio.

REVISIÓN DE LITERATURA

Características generales de *Salmonella*

El género *Salmonella* es una bacteria ubicua en el ambiente, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; son bacilos rectos, Gram-negativos que miden de 0.7 a 1.5 μm de diámetro y de 2 a 5 μm de longitud, la gran mayoría móviles mediante flagelos peritricos (Excepto los serotipos Pullorum y Gallinarum), son aerobios y anaerobios facultativos y presentan una estrecha relación con *Escherichia coli*. El género *Salmonella* fue primero descrita por Karl J. Eberth en el bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de una persona que falleció de tifoidea en el año de 1880; cuatro años más tarde Georg T. Graffky logró cultivar la bacteria, estudiar sus características biológicas y comprobar su constante presencia en enfermos de tifoidea (Jawetz *et al.*, 1979; Tay, 1994; Tay *et al.*, 1995; Bennasar *et al.*, 2000). Gaether descubrió a *Salmonella enteritidis* en 1888 y Theobald Smith y Daniel E. Salmon descubrieron a *S. choleraesuis* en 1894; de este último investigador, el género recibió el nombre de *Salmonella* (Tay *et al.*, 1995).

Mientras que algunos serotipos de *Salmonella* tienen un rango restringido de hospederos tales como *S. Typhi* (Humanos) y *S. Pullorum* (Aves), la mayoría infectan un

amplio rango de animales de sangre caliente y son causantes de enfermedades en el hombre (Galán *et al.*, 1992). Los serotipos que mayormente causan enfermedad en humanos pertenecen al subgrupo I (*enterica*). *Salmonella* es capaz de causar un amplio rango de síndromes de enfermedad: fiebre entérica (tifoidea), bacteremia, enterocolitis e infecciones focales y la enterocolitis es por mucho la manifestación más común de la infección por especies del género *Salmonella* (Tay *et al.*, 1995; Bennasar *et al.*, 2000).

La pared celular de *Salmonella*, está constituida por una delgada capa de peptidoglucano recubierta por una membrana externa compuesta de lípidos y proteínas en las que se insertan, por medio del lipido A, una molécula compleja de lipopolisacárido cuya porción externa está formada por sub-unidades repetidas de oligosacáridos que son los portadores de determinantes antigénicos llamados antígenos somáticos "O", que es el componente principal de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Además, poseen antígenos flagelares de naturaleza proteica o antígenos "H" que son parte estructural de los flagelos que les dan la movilidad (Tay, 1994; Fitzgerald *et al.*, 2003).

Según la clasificación por medio del esquema de Kauffmann-White para la serotipificación de *Salmonella*, se reconocen 46 grupos de antígenos somáticos "O", 11 antígenos adicionales y 119 antígenos flagelares "H", que juntos forman la base para la identificación del serotipo (serovar). La base en la variación de la estructura de los antígenos "O" está representada por diferencias en la composición de los azúcares, el

arreglo de estos en la unidad "O" y la adición de azúcares ramificados, modificando la posición espacial de los grupos y por lo tanto modificando las características de inmunogenicidad en el huésped (Fitzgerald *et al.*, 2003).

Clasificación

Edwards y Ewing dividieron a la familia *Enterobacteriaceae* en tribus, géneros y especies; *Salmonella* fue colocada en la tribu III, género I; en el género II se colocó a *Arizona*, misma que ahora forma parte del género *Salmonella*, y en el género III a *Citrobacter* (Tay *et al.*, 1995). La nomenclatura de *Salmonella* siempre ha sido un tema controversial; ha cambiado muchas veces y aún sigue inestable (Euzéby, 1999). Se han propuesto varios sistemas de clasificación basados en características bioquímicas y estructura antigénica. En 1982, Kauffmann describió 1500 "serotipos" en la sexta edición del manual Bergey, sin embargo, en 1952, se describieron solo tres especies (Ezaki *et al.*, 2000); en los que Edwards y Ewing la clasificaron de acuerdo a sus características bioquímicas en tres especies (*choleraesuis*, *typhi* y *enteritidis*). Bacterias con características morfológicas y bioquímicas fueron descubiertas en distintas partes del mundo y de fuentes diversas; cada descubridor nombraba arbitrariamente a cada bacteria aislada tomando el nombre del animal del que se aisló, del lugar o ciudad en la que se encontró o el nombre del descubridor. Esto ocasionó una gran confusión a medida que se acumulaban nuevos descubrimientos (Tay *et al.*, 1995). En 1980, la lista aprobada de nombres bacterianos citó cinco especies en el género *Salmonella*: *S. typhi*, *S.*

enteritidis, *S. choleraesuis*, *S. arizonae* y *S. typhimurium*, en más de 2000 serovares (Ezaki *et al.*, 2000).

Kauffman y White basados en las similitudes de los antígenos somáticos, clasificaron al género *Salmonella* en grupos, cada grupo representado por una letra; el número de grupos ha rebasado el abecedario y se complementan con números. Cada grupo está constituido por una variedad de serotipos que se distinguen entre sí por medio de sus antígenos flagelares; el antígeno somático de cada grupo tiene dos o más determinantes antigénicos que se reconocen por medio de números, uno de ellos es específico de grupo. Algunos determinantes pueden compartirse en grupos diferentes, lo que da origen a reacciones cruzadas entre ellos; por lo que, para obtener anticuerpos monoespecíficos es necesario absorber el o los antígenos compartidos. Cada miembro del grupo puede ser diferenciado en serotipo por medio de sus antígenos flagelares. Una cepa de un serotipo determinado puede elaborar en diferentes tiempos uno de los dos antígenos flagelares; uno de ellos de fase I, es relativamente específico, el otro, de fase II, es inespecífico y ambos son controlados genéticamente (Tay *et al.*, 1995).

Los miembros del género *Salmonella* al inicio se clasificaron de acuerdo a su epidemiología, variedad de hospederos, reacciones bioquímicas y estructura de sus antígenos O, H y Vi (cuando están presentes). En 1982, basados en los resultados de hibridación ADN-ADN en 88 cepas de referencia de *Salmonella* que pertenecían a los subgéneros I-IV descritos por Kauffmann, propusieron unir los cuatro subgéneros en una

única especie, llamada *Salmonella choleraesuis*, compartida en seis subespecies; *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* y *S. choleraesuis* subsp. *bongori*. La séptima subespecie, *S. choleraesuis* subsp. *indica* fue propuesta por Le Minor *et al*, en 1986 (Ezaki *et al.*, 2000). Así *S. choleraesuis* contenía siete subespecies. En 1989 *S. choleraesuis* subsp. *bongori* fue designada como una especie distinta (*Salmonella bongori*) (Ezaki *et al.*, 2000). Le Minor y Popoff en 1987, seguidos por Euzéby en 1999 trataron de cambiar el nombre de la especie *choleraesuis* a “*enterica*”, debido a la similitud entre la subespecie *choleraesuis* con el nombre del serotipo Choleraesuis, a lo que los expertos en nomenclatura bacteriana decían que era una violación al código de nomenclatura bacteriana; sin embargo, esta nomenclatura se difundió entre los bacteriólogos por todo el mundo; ocasionando según los expertos una confusión mayor en la nomenclatura del género *Salmonella* (Yabuuchi y Takayuki, 2000). A pesar de las discordancias en la nomenclatura del género *Salmonella*, en el ámbito científico actualmente es más aceptada la nomenclatura de la especie “*enterica*” (Euzéby, 1999).

Según Euzéby (1999), el género *Salmonella* consistía en una única especie (*enterica*), debido a que anteriormente esta denominación no había sido usada para nombrar a ningún serovar. Esta única especie abarcaba siete subespecies al igual que *S. choleraesuis*: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *bongori*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp.

indica y *S. enterica* subsp. *salamae*; y los nombres de *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. typhimurium* son sinónimos subjetivos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Euzéby, 1999). Sin embargo, los temas controversiales en la nomenclatura de *Salmonella* siguen en discusión.

Brenner *et al* (2000), reportaron la existencia de 2,463 serotipos distintos colocados en dos especies (*Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*), la primera de ellas con seis subespecies (*enterica* (1), *salamae* (2), *arizonae* (3a), *diarizonae* (3b), *indica* (4) y *houtenae* (6)) y cada subespecie con un variado número de serotipos, aunque el mayor número de serotipos se encuentra en la subespecie 1 (*enterica*) y son los de mayor importancia epidemiológica, debido a que son los que principalmente se asocian a infecciones humanas, mientras que los serotipos de las demás subespecies son raros (Brooks *et al.*, 2005).

Los serotipos (serovares) que pertenecen a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se nombran de acuerdo al lugar geográfico donde fueron aislados por primera vez. Este nombre se escribe en letras romanas (no itálicas), y la primera letra es capital. El nombre de los serovares pertenecientes a otras subespecies son designado por sus formulas antigénicas (Le Minor *et al.*, 1990; Popoff *et al.*, 1996; Brenner *et al.*, 2000). En la Tabla 1, se describe la nomenclatura de *Salmonella* en especies, subespecies, serotipos y sus principales hábitats, descrita por Brenner *et al* (2000), misma que es empleada por el

Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) en la actualidad.

Tabla 1. Especies de *Salmonella*, subespecies, serotipos y sus principales hábitats.

Especies y subespecies del género <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de las subespecies	Hábitat principal
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1,454	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
<i>S. bongori</i> (V)	20	Animales de sangre fría y el ambiente ^a
TOTAL	2,463	Animales de sangre fría y el ambiente ^a

^a Aislados de todas las especies y subespecies se han presentado en humanos.

(Brenner *et al.*, 2000).

Otra clasificación se basa en la adaptación a las especies de animales que les sirven de hospederos; es una clasificación ecológica:

I) Grupo A. Serotipos preferentemente adaptados al hombre, incluyen a *S. Typhi*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B*, *Hirschfeldi* y *Sendai*; estos no tienen reservorio

zoonótico y la infección de animales es rara y accidental, el hombre es el único reservorio y la fuente de infección son heces de personas infectadas.

2) Grupo B. Serotipos adaptados muy bien a hospederos no humanos: *S. Pullorum*, *Gallinarum*, *Dublin*, *Abortusequi*, *Abortusovis* y *Choleraesuis* que infectan a pollos, gallinas, bovinos, caballos, carneros y cerdos, respectivamente. *S. Dublin* y *Choleraesuis* esporádicamente causan infección en el hombre.

3) Grupo C. Es el grupo más numeroso y son serotipos que no tienen una adaptación específica en algún hospedero; estos comparten las siguientes características: producen gastroenteritis de corta duración, presentan un período de incubación corto, rara vez son capaces de llegar al torrente circulatorio, las fuentes de infección para el hombre son heces de animales, del hombre y principalmente alimentos como huevos, carne, leche y productos lácteos producidos a partir de animales infectados.

Epidemiología

El centro de control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en Inglés), estima que cada año se presentan alrededor de 1.3 millones de infecciones por especies del género *Salmonella* en todo el mundo, resultando en 16,000 hospitalizaciones y 600 muertes (Thong *et al.*, 2002); esto pone al género *Salmonella* como la segunda causa más común de enfermedades bacterianas transmitidas por

alimentos de etiología conocida en Estados Unidos y se estima que la morbilidad y mortalidad causada por serotipos de *Salmonella* son causa de pérdidas económicas, debido a cuidados médicos y pérdidas en productividad en un rango de 0.5 a 2.3 miles de millones de dólares (Beier *et al.*, 2004). Los índices de mortalidad por salmonelosis son bajos, probablemente el 1%, sin embargo, cuando estos resultados son extrapolados a grupos de edad, los más afectados resultan ser infantes y adultos mayores. Aunque todos los serotipos son potencialmente capaces de causar enfermedad, solo unos cuantos serotipos son más virulentos que otros y pocos se han asociado a brotes por el consumo de alimentos contaminados (Tortora *et al.*, 1985).

Aproximadamente el 70% de los serotipos de *Salmonella* se han asociado a infecciones por el consumo de alimentos contaminados en humanos, sin embargo, solo 5 serotipos han representado el 61% de los casos reportados por el CDC entre 1987 y 1997. Estos serotipos incluyen *Salmonella enterica* Serotipo Typhimurium (23% de aislamientos entre 1987 y 1997), *S. enterica* ser. Enteritidis (21%), *S. enterica* ser. Heidelberg (8%), *S. enterica* ser. Newport (5%) y *S. enterica* ser. Hadar (4%) (Beier *et al.*, 2004).

Dentro del género *Salmonella* el serotipo Typhimurium ha sido el más frecuentemente aislado de pacientes en Estados Unidos. Este serotipo se ha asociado a un gran número de reservorios animales, entre los cuales los pollos, bovinos y cerdos parecen ser los reservorios más importantes (Beier *et al.*, 2004).

En Estados Unidos, *Salmonella* Enteritidis ha tenido un importante aumento en su prevalencia, ya que en 1980 tenía una prevalencia de 6% del total de serotipos aislados, y para el año de 1995 aumentó a un 25% (Penteado y Leitao, 2004). En México, los principales serotipos presentes son: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Agona* y *Anatum*. El género *Salmonella*, afecta a todos los grupos de edad, sin embargo, la mayor incidencia se presenta en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 60, que son los grupos de edad más vulnerables (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Las infecciones causadas por el género *Salmonella*, presentan una incidencia estacional, ya que los casos de salmonelosis se aumentan en el mes de Mayo y tienen un máximo de incidencia en Julio y Agosto y comienzan a disminuir en el mes de Septiembre (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). En México, en los últimos años se ha visto un incremento en la incidencia de salmonelosis; en 1994 se presentaron poco más de 100 mil casos y en 1998 se duplicó con más de 200 mil casos afectando a todos los grupos de edad pero con mayor incidencia en personas de 25 a 44 años y los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Cabe señalar que los datos mostrados, son únicamente los reportados por los sistemas de salud de México en base al número de pacientes a los que se les ha detectado el organismo causal; sin embargo, se considera que estos datos están subestimados debido a que parte de la población con síntomas de enfermedad no acuden a los sistemas de salud para la identificación del agente causal y para un tratamiento adecuado.

Patogenia

El género *Salmonella* puede ocasionar una gran variedad de enfermedades incluyendo gastroenteritis, fiebre enterica, bacteremia, enterocolitis entre otras (Brooks *et al.*, 2005); pero sin duda, la que con mayor frecuencia se presenta es la gastroenteritis. El primer paso en el proceso de enfermedad es la transmisión de la bacteria a un hospedero susceptible en el que presenta un período de incubación de 12 a 36 horas. Primero invade la mucosa intestinal y ahí se multiplica; en ocasiones logra atravesar la mucosa intestinal y entra al sistema circulatorio y linfático por medio de los cuales se distribuye hacia otros órganos que eventualmente también afectan. Los principales síntomas que acompañan a esta infección son fiebre moderada acompañada de náuseas, dolor y calambres abdominales y diarrea profusa, con pocos leucocitos en las heces y por lo general los síntomas desaparecen en dos o tres días. Durante la fase aguda de la infección una persona enferma puede excretar hasta mil millones de células de *Salmonella* por gramo de heces (Tortora *et al.*, 1985; Darwin *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2005). Por lo general, se pueden observar lesiones inflamatorias en los intestinos delgado y grueso. La bacteremia es rara (de 2 a 4%) excepto en personas inmunodeficientes que es más común y los pacientes pueden seguir excretando la bacteria por medio de las heces fecales durante varias semanas después de la recuperación clínica (Brooks *et al.*, 2005).

La fiebre entérica mejor conocida como fiebre tifoidea es causada principalmente por el serotipo Typhi. Este serotipo, se disemina únicamente por heces de humanos y no de animales. El período de incubación es de aproximadamente de dos semanas. Primero, el paciente sufre de fiebre alta (40°C), constante dolor de cabeza y la diarrea solo se presenta durante la segunda o tercera semana mientras que la fiebre tiende a disminuir (Tortora *et al.*, 1985). Cuando la bacteria es ingerida y alcanza el intestino delgado en la porción distal del íleon y el ciego, provoca efectos citotóxicos moderados, posteriormente pasa a través de los tejidos hacia el torrente linfático y luego hasta la sangre, por la que son transportados a muchos órganos, incluso el intestino. A diferencia de la gastroenteritis, *Salmonella Typhi* no se multiplica en las células epiteliales del intestino, al llegar a la lamina propia, provoca una reacción inflamatoria con notorio predominio de macrófagos, estos fagocitos mononucleares engullen a la bacteria, pero carecen de capacidad bactericida contra *S. Typhi* y no presentan mecanismos que impidan la multiplicación de la bacteria dentro de su citoplasma y se diseminan por el cuerpo al ser transportados por los macrófagos infectados hacia los ganglios mesentéricos que reciben el flujo linfático desde la zona con la infección y se pueden aislar de sangre, orina y heces fecales. En casos muy severos puede haber perforación de la pared intestinal (Tortora *et al.*, 1985; Tay *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2005).

Las principales lesiones que ocasiona son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide intestinal (p. ej. Placas de Peyer), hepatitis, necrosis focal del hígado e inflamación de la vesícula biliar, pulmones y otros órganos (Brooks *et al.*, 2005).

Normalmente, los enfermos dejan de excretar células de *Salmonella* en sus heces después de un mes de convalecencia; sin embargo, algunos prolongan este período de eliminación hasta seis meses y, eventualmente, unos cuantos se convierten en portadores crónicos y excretan *Salmonella* durante toda su vida. Este evento es de particular importancia ya que son verdaderos reservorios que perpetúan la sobrevivencia de la bacteria y son fuentes de inóculo para individuos susceptibles (Tay *et al.*, 1995).

La concentración de la dosis infectiva mínima varía, dependiendo de las condiciones fisiológicas del hospedero, características del alimento ingerido con la bacteria y del serotipo (Darwin *et al.*, 1999). En condiciones experimentales se ha encontrado que son necesarias dosis altas, alrededor de 10^4 a 10^6 células por gramo de alimento y se cree que estas altas concentraciones son necesarias para atravesar la acidez estomacal y competir con la flora normal del tracto intestinal (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 1993; Darwin *et al.*, 1999). Se ha encontrado que la dosis infecciosa disminuye cuando la bacteria es consumida con alimentos que atraviesan rápidamente el estómago (por ejemplo, líquidos) o con alimentos que aumentan el pH gástrico (por ejemplo, queso ó leche), individuos con un pH alto, tal como ocurre en adultos mayores, que son más susceptibles a la infección; de esta manera se ha sugerido que basta una concentración de 3 a 10 células para ocasionar la enfermedad (Darwin *et al.*, 1999).

Aunque las fiebres entéricas y bacteremias con lesión focal requieren tratamiento antimicrobiano, la mayor parte de los casos de enterocolitis no lo necesitan y cuando es

necesario por lo general van dirigidos a neonatos. En la enterocolitis, el tratamiento puede prolongar los síntomas clínicos y la excreción de la bacteria. En las diarreas extremas es necesaria la reposición de los líquidos y electrolitos perdidos durante la enfermedad. El tratamiento antimicrobiano de las infecciones invasoras por *Salmonella* se lleva a cabo con Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, o una cefalosporina de tercera generación. En la mayoría de los portadores, el microorganismo persiste en la vesícula biliar (si hay cálculos biliares) y en los conductos biliares; algunos portadores crónicos solamente se curan con ampicilina, pero en la mayoría de los casos se debe combinar una colecistectomía con el tratamiento antimicrobiano (Tay *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2005).

La forma de identificación bacteriana, incluyendo el género *Salmonella* se basa en las reacciones bioquímicas que presenta frente a ciertos sustratos específicos. Algunas de las reacciones típicas para este género, son la fermentación de glucosa pero no de lactosa, producen gas en agar hierro y triple azúcar (TSI), descarboxilan la lisina con producción de ácido sulfhídrico (H₂S); (Jawetz *et al.*, 1979). Las reacciones bioquímicas frente a un variado número de aminoácidos, azúcares y otros sustratos han servido de base para la identificación de manera específica para la mayoría de los géneros bacterianos (Jawetz *et al.*, 1979; Tay *et al.*, 1995; Gutierrez-Cogco *et al.*, 1993); sin embargo, en los últimos años se han venido desarrollando técnicas moleculares para la identificación de una gran diversidad de géneros, especies, subespecies y serotipos de bacterias. Específicamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas

en inglés) ha sido una herramienta muy útil para este fin, ya que tiene un alto grado de especificidad y sensibilidad, rapidez y sus resultados son difícilmente refutados.

Uno de los pasos más rápidos en el ciclo de vida patogénico del género *Salmonella*, es la invasión de las células del epitelio intestinal. En la actualidad, se sabe que la mayoría de los patógenos han desarrollado diversas estrategias para entrar y sobrevivir dentro de las células del huésped; además, se sabe que estos patógenos han desarrollado mecanismos para penetrar a las células por más de una ruta de entrada.

Existe un gran número de serotipos de *Salmonella* que pueden causar una variedad de enfermedades en diferentes hospederos. Aunque algunos serotipos están adaptados a un solo reservorio animal, otros pueden causar enfermedad en una gran diversidad de hospederos. Sin embargo, todos estos organismos tienen una característica patógena esencial y es la capacidad de invadir las células del epitelio intestinal. Existen muchos estudios relacionados en la identificación de los diferentes determinantes genéticos envueltos en el proceso de invasión celular (Hsun y Ou, 1996).

Uno de los determinantes genéticos envueltos en la invasividad de *Salmonella* en las células intestinales fue caracterizado por Galán *et al* (1992). Ellos reportaron la caracterización molecular y funcional del gen *invA*, el primer gen en el operón *invABC*. Ellos determinaron la localización del locus *invA* en el cromosoma de *Salmonella* Typhimurium y determinaron la contribución individual del gen en la invasión y

determinaron la secuencia de nucleótidos del gen; ellos mencionan que este determinante genético puede estar presente en la mayoría de los serotipos (si no es que en todos) (Galán *et al.*, 1992).

La tecnología de PCR, que se basa en la amplificación específica de fragmentos de ácidos nucleicos ha sido utilizada para identificar la presencia de patógenos específicos directamente de muestras clínicas, ambientales o de casi cualquier origen. Además, este procedimiento ofrece rapidez, sensibilidad y bajos costos en cada ensayo (Hsun y Ou, 1996).

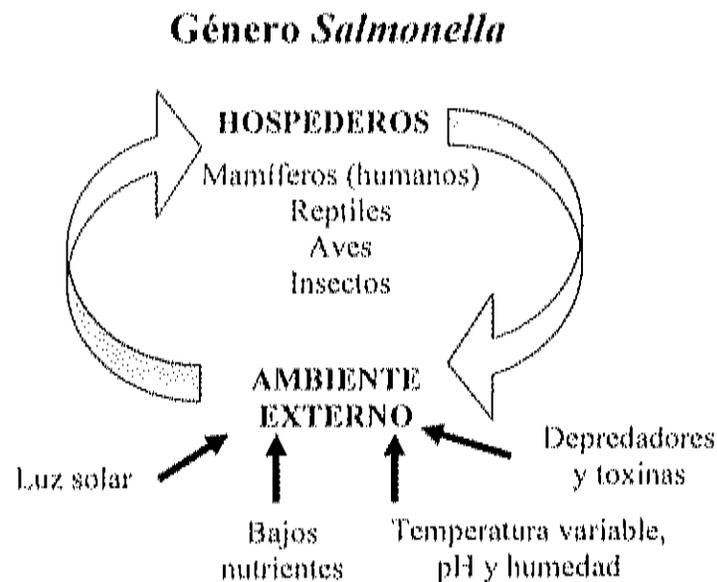
Hsun y Ou (1996), utilizaron iniciadores del gen *invA* y ellos en sus resultados mencionan que son específicos, ya que no encontraron producto de amplificación con 18 especies y 22 aislados de bacterias que no pertenecen al género *Salmonella*, por lo que sugieren que esta técnica es más específica, rápida y sensible que cualquier otro método anteriormente empleado.

Especies del género *Salmonella* en el ambiente

La presencia de bacterias en el agua ha recibido atención en los últimos años, ya que se ha reportado la sobrevivencia de bacterias en ambientes acuáticos, principalmente las del tracto gastrointestinal de animales y el hombre. Las de mayor importancia, son

las formas patógenas y las que sirven como indicadores biológicos de contaminación fecal (Santo Domingo *et al.*, 2000).

La presencia del género *Salmonella* en diferentes ambientes externos a su hospedero, se debe a la forma de vida de la misma, ya que por ser un microorganismo zoonótico y presentar un estilo de vida cíclico entre el ambiente y su hospedero, es común encontrarlo en aguas residuales, suelo, superficies inertes, en los alimentos y otros. A diferencia de otras Enterobacterias, el género *Salmonella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse por períodos de tiempo hasta de un año en ambientes externos como el suelo (Winfield y Groisman, 2003). Las especies del género *Salmonella* una vez excretadas del reservorio animal son capaces de permanecer viables por períodos de tiempo prolongados aprovechando su capacidad de resistencia a factores ambientales adversos como una poca disponibilidad de nutrientes, estrés osmótico (salinidad), grandes variaciones de temperatura, pH y depredación (Winfield y Groisman, 2003). En el esquema 1, se representa gráficamente el papel que juega el género *Salmonella* en el ambiente.



Esquema 1: El género *Salmonella* permanece viable de manera cíclica a través del hospedero y el ambiente.

(Winfield y Groisman, 2003).

Diversas especies del género *Salmonella*, se pueden encontrar de manera común en aguas residuales, mismas que pueden ser fuente de contaminación para otros tipos de agua (Polo *et al.*, 1998), aunque una amplia diversidad de serotipos de *Salmonella* son descargados en el agua en concentraciones variables provenientes de humanos infectados, animales domésticos, animales salvajes y de vida silvestre no todos se pueden encontrar en todos los ambientes acuáticos, de tal manera que algunos serotipos se encuentran en algún tipo de agua y esto depende de la habilidad de cada serotipo de *Salmonella* para resistir los efectos de los factores ambientales, los cuales controlan su

sobrevivencia y su capacidad para ser acarreados por el agua que es su principal forma de diseminación en el ambiente (Baudart *et al.*, 2000).

Otro problema que se presenta cuando el género *Salmonella* se encuentra en ambientes acuáticos con condiciones ambientales adversas, es la modificación de sus condiciones fisiológicas y entrando en ese estado poco entendido de ser viables pero no cultivables, dificultando su aislamiento por métodos convencionales (Caro *et al.*, 1999). También bajo condiciones ambientales adversas, el género *Salmonella* modifica su forma estructural dificultando su serotipificación ya que se vuelve "rugosa", que es una modificación de sus antígenos de superficie impidiendo su caracterización con antisueros; sin embargo, se ha podido demostrar que su virulencia no se ve afectada (Anriany *et al.*, 2001).

El género *Salmonella*, al ser acarreada por el agua en ambientes externos a su hospedero puede ser diseminada en el suelo y sedimentos, como resultado de corrientes de agua y lluvia que acarrea materiales contaminados y se ha encontrado frecuentemente en muestras ambientales de suelo de áreas de cultivo; además, se ha demostrado la capacidad del género *Salmonella* para sobrevivir y multiplicarse por más de un año en el suelo (Winfield y Groisman, 2003).

Existen varios factores que determinan la sobrevivencia de *Salmonella* en el suelo, dentro de los que se incluyen: el grado de desecación, el tipo de suelo, poblaciones de organismos depredadores y la cantidad de materia orgánica en el suelo (Paluszac *et al.*, 2003; Ingham *et al.*, 2004). Se cree que las partículas de suelo sirven como nichos microecológicos en las que especies del género *Salmonella* pueden sobrevivir y multiplicarse, ya que las partículas de suelo les proveen de nutrimentos por la materia orgánica presente y además, les proveen de protección contra la depredación y rayos ultravioleta (Winfield y Groisman, 2003).

Palacios *et al* (2000), desarrollaron un estudio controlado para determinar el periodo de sobrevivencia de especies de *Salmonella* en el suelo. Ellos encontraron la presencia de *Salmonella* hasta 15 días después de su inoculación; encontrando que la mayor población se encontraba en la superficie, sin embargo la bacteria se recuperaba a profundidades de 15 y 45 cm (aunque en menores proporciones), atribuyendo este fenómeno al efecto de filtración y ellos mencionan que el suelo puede jugar un papel muy importante en la contaminación bacteriana de los vegetales, debido al posible contacto directo entre la planta y el suelo. En este estudio se concluye que los suelos agrícolas presentan características fisicoquímicas que podrían ser adecuadas para la presencia de bacterias como especies del género *Salmonella* en estado viable por periodos de tiempo relativamente largos (Palacios *et al.*, 2000).

Se han desarrollado estudios de campo en busca del género *Salmonella* en el suelo de cultivo, en los que no se ha logrado el aislamiento por métodos convencionales (Duffy *et al.*, 2005); sin embargo, la ausencia del género *Salmonella* por métodos de cultivo no significa la ausencia de la misma; se ha demostrado que el género *Salmonella* puede entrar en estado viable pero no cultivable al estar en condiciones adversas para su prevalencia en estado cultivable modificando su fisiología para su adaptación a esas condiciones, lo que hace imposible su aislamiento por métodos de cultivo convencionales (Baloda *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de especies del género *Salmonella* en agua y suelo de uso agrícola representan un potencial riesgo de contaminación para las frutas y hortalizas que son sembradas en estos campos o que son irrigadas con agua contaminada. Este problema ha venido creciendo, debido a la presencia del género *Salmonella* en estos ambientes con resistencia a los antimicrobianos, lo que aumenta los riesgos de enfermedades de difícil tratamiento por evadir la acción de los agentes antimicrobianos de elección (Duffy *et al.*, 2005).

Resistencia a los antimicrobianos

La era de los antimicrobianos inició a principios del siglo XX con los experimentos del científico Paul Ehrlich, quien desarrolló una sustancia a la que llamó Salvarsán y esta tenía la propiedad de inhibir el crecimiento del microorganismo que ocasionaba la sífilis (*Treponema pallidum*). En el año de 1914 se desarrolló un nuevo compuesto más eficaz que el Salvarsán, el Neosalvarsán, y este presentaba actividad sobre microorganismos responsables de enfermedades como sífilis y algunas otras. A partir de estas fechas los antimicrobianos revolucionaron el tratamiento de enfermedades humanas y la investigación de los mismos (Romero, 1993; Tay *et al.*, 1995).

Existen diversos mecanismos por medio de los cuales los antimicrobianos inhiben o destruyen a las bacterias; algunos actúan sobre la membrana citoplasmática alterando su permeabilidad, otros actúan sobre los mecanismos de síntesis de la pared celular inhibiéndola, otros inhiben la síntesis de proteínas, o en la replicación celular, algunos sobre la transcripción y en la traducción del ADN y otros actúan como antagonistas metabólicos (Romero, 1993; Khachatourians, 1998; Braoudaki y Hilton, 2004). La palabra antimicrobiano se refiere de manera genérica a toda sustancia capaz de inhibir el crecimiento o de eliminar a los microorganismos. Por otro lado, antibiótico se refiere a las sustancias de origen natural aislados de microorganismos que tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de otros, principalmente bacterias (Tay *et al.*, 1995).

En la actualidad se han descrito al menos 10 mecanismos por medio de los cuales los antimicrobianos actúan sobre las células bacterianas, en estos se incluyen:

1.- Agentes que actúan sobre la pared celular bacteriana. La mayoría de las bacterias están provistas por una pared rígida que las protege de las condiciones osmóticas ambientales adversas. Los antimicrobianos de este grupo interfieren con la formación de la pared celular bacteriana, dando lugar a la formación de pared celular deficiente y dejando desprovista a la bacteria a condiciones osmóticas del ambiente, donde seguramente morirá y el principal ejemplo de este grupo son las penicilinas (Tay *et al.*, 1995). El mecanismo por el que actúan este tipo de compuestos es inhibiendo la formación de peptidoglucano que está constituido de polisacáridos y un polipéptido con múltiples enlaces cruzados. Los polisacáridos contienen aminoazúcares N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico. Este último solo se encuentra presente en bacterias y en conjunto son los responsables de conferir la rigidez a la pared. La capa de peptidoglucano de bacterias Gram-positivas es mucho más gruesa que en Gram-negativas. Como se mencionó anteriormente el prototipo de este grupo son los antimicrobianos β -lactámicos (penicilina) y en su acción, la etapa inicial consiste en la unión a receptores celulares (Proteínas de unión a penicilina; "PBP") y cuando la penicilina se une a uno o más de estos receptores se interrumpe la acción de transpeptidación, inhibiendo la síntesis de peptidoglucano. Posteriormente, se activan enzimas líticas de pared celular dejando desprovista a la bacteria de su protección ante los factores ambientales y seguramente ocurrirá la lisis bacteriana (Brooks *et al.*, 2005).

2.- Agentes que actúan sobre la membrana celular bacteriana. En todos los tipos celulares, incluyendo las bacterias se cuenta con una membrana citoplásmica, cuya función principal es la de regular el intercambio osmótico y a ella están vinculados la respiración y algunos procesos biosintéticos; por lo que los compuestos de este grupo pueden afectar también la membrana celular de mamíferos y algunos de estos no deben ser usados en terapéutica (Tay *et al.*, 1995). Algunos compuestos de este grupo actúan modificando la estructura de la membrana celular y alterando su función como barrera osmótica, permitiendo así el paso de sustancias en ambos sentidos que bajo condiciones normales no pasaría. El principal lugar de acción en la membrana son los esteroides que forman parte estructural de la misma. Algunos ejemplos que se incluyen en este grupo son la Anfotericina B y la Polimixina B (Tay *et al.*, 1995).

3.- Compuestos que inhiben la síntesis de proteínas. Para describir la acción de los antimicrobianos de este grupo se incluye uno de los principales ejemplos de antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos, y en particular la estreptomina que es el prototipo de este grupo de antimicrobianos. La primera etapa es la unión del compuesto a una proteína receptora específica (P12 para estreptomina) sobre la sub-unidad 30 S del ribosoma bacteriano. Segunda, el compuesto interrumpe la actividad normal del “complejo de inicio” de la formación del péptido (ARNm+n-formilmetionina+ARNt). Tercera, en la “región de reconocimiento” sobre el ribosoma el mensaje del ARNm se lee de manera errónea, insertando un aminoácido equivocado en el péptido y por lo tanto se produce una proteína no

funcional, provocando la muerte celular por incapacidad de formar proteínas vitales para la bacteria (Brooks *et al.*, 2005).

Otro ejemplo de inhibidores de la síntesis de proteínas son las tetraciclinas. Estas se unen a la sub-unidad 30 S de los ribosomas bacterianos, inhibiendo la síntesis proteica al impedir la adhesión del ARNt-aminoacilo cargado, evitando la introducción de aminoácidos nuevos a la nueva cadena del péptido; a diferencia de los aminoglucósidos la acción es generalmente inhibida y reversible al interrumpir la administración del antimicrobiano (Brooks *et al.*, 2005).

4.- Compuestos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos. El trimetoprim (3,4,5-trimetoxibencil pirimidina) inhibe a la enzima ácido dihidrofólico reductasa con una eficiencia 50,000 veces más potente que en células de mamíferos. Esta enzima reduce el ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico, una etapa en la secuencia que conduce a la síntesis de purinas y en último término del ADN; por lo tanto, al inhibirse la acción de la enzima no hay producción de ácidos nucleicos y se interrumpe la replicación bacteriana (Brooks *et al.*, 2005).

Actualmente existen más de 150 drogas antimicrobianas disponibles, estos se encuentran en unas 20 clases y presentan alrededor de 10 distintas formas de acción (Khachatourians, 1998). Los antimicrobianos han mejorado en gran medida las

expectativas de vida para los humanos, reduciendo la mortalidad y mejorando la calidad de vida (Nawaz *et al.*, 2001).

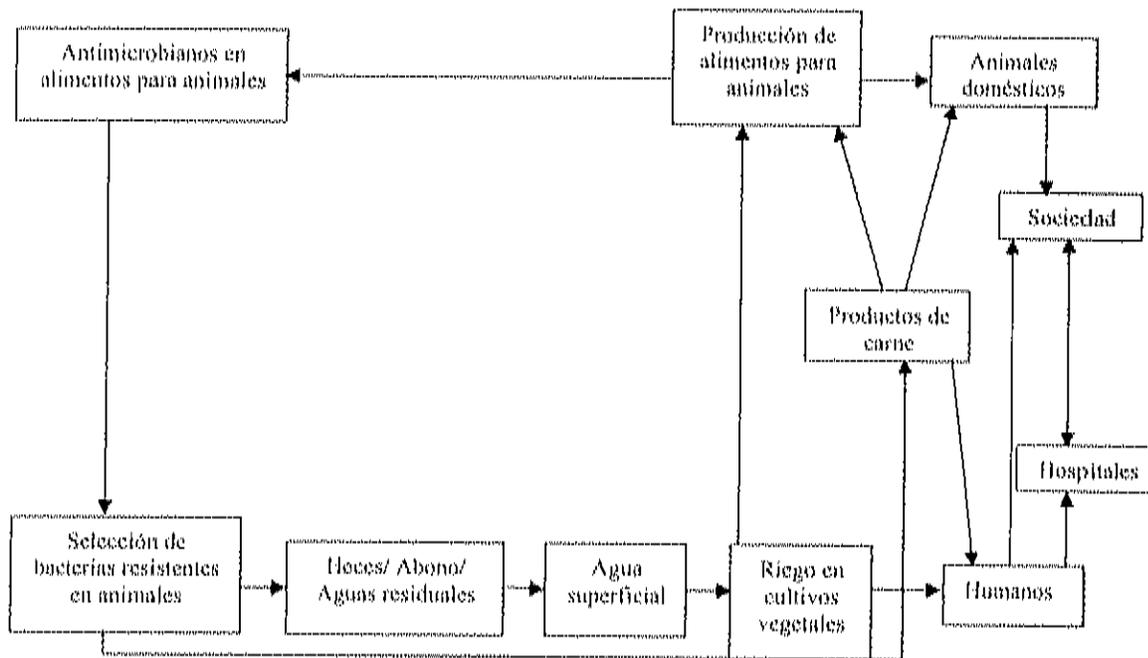
A partir de la segunda guerra mundial, se han venido desarrollando nuevos y mejores antimicrobianos y en la actualidad existen varios cientos de estos, sin embargo, solo un grupo de alrededor de 50 son utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos, por cumplir con las condiciones para uso terapéutico (Tay *et al.*, 1995). Todos los agentes antimicrobianos ejercen su acción sobre los microorganismos por ser bacteriostáticos ó bactericidas. Se denominan bacteriostáticos aquellos compuestos que inhiben o detienen los procesos metabólicos de los microorganismos impidiendo su reproducción, quedando predispuestos a la acción de los mecanismos de defensa del huésped y destruirlos; y bactericidas, son considerados los agentes que actúan directamente matando al microorganismo por destrucción de alguno de sus organelos (Tay *et al.*, 1995).

En la actualidad, los agentes antimicrobianos no solo se utilizan para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos, más del 80% también se utilizan como agentes profilácticos y en el tratamiento de infecciones en animales de engorda (Schroeder *et al.*, 2002; Shea, 2003); además, son empleados como promotores de crecimiento de animales de granja, dentro de los que se incluyen cerdos, pollos, bovinos, y otros. Aproximadamente el 90% de los antimicrobianos utilizados en la agricultura son administrados como promotores de crecimiento y como profilácticos, más que para el

tratamiento de una infección. Los niveles de antimicrobianos recomendados para alimentos de animales en la década de 1950 eran de 5 a 10 ppm pero desde entonces, las concentraciones se han incrementado en una magnitud de 10 a 20 veces (Khachatourians, 1998).

El uso de antimicrobianos en animales promueve la selección de resistencia en poblaciones bacterianas. Las bacterias en ambientes agrícolas pueden ser transmitidas a humanos, en los que pueden provocar enfermedades de difícil tratamiento con los tratamientos antimicrobianos de elección (Nawaz *et al.*, 2001). En el esquema 2 se presenta el mecanismo probable de transferencia de bacterias resistentes en el ambiente.

Esquema 2. Posibles rutas de transferencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el ambiente.



El uso de antimicrobianos en la agricultura de alimentos para animales puede resultar en la selección y transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Estas bacterias se mueven por el ambiente por una variedad de rutas, y su presencia al final de cuentas tiene consecuencias para la salud humana (Khachatourians, 1998).

Además del uso de los antimicrobianos en medicina humana y en la promoción de crecimiento en animales, los antimicrobianos también se utilizan en el tratamiento de infecciones bacterianas en los cultivos de plantas ornamentales, árboles frutales (Manzana, Pera) y en una diversidad de hortalizas. En la década de 1950, poco después de la introducción de los antimicrobianos en medicina humana se comenzó a utilizar una pequeña gama de estos, y particularmente la estreptomycin tuvo un uso significativo. Sin embargo, poco después del inicio en su utilización aparecieron las primeras cepas resistentes al antimicrobiano; a partir de estas fechas se han venido incrementando el uso

de otros antimicrobianos y la concentraciones de los mismos (McManus y Stockwell, 2001).

El principal factor que ha ocasionado la emergencia de cepas bacterianas de diversos géneros resistentes a los antimicrobianos se ha atribuido en gran medida al abuso en su utilización (Lipstich *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004). En la actualidad, en diversas partes del mundo se ha reportado la presencia de cepas de bacterias fitopatógenas resistentes a los bactericidas agrícolas que se rocían sobre los cultivos para su control (Manulis *et al.*, 1998; Manulis *et al.*, 2003).

En Israel, la bacteria responsable de la enfermedad "tizón de fuego", *Erwinia amylovora*, fue primero detectada en 1985 a partir de entonces ha sido observada constantemente en plantaciones de pera, manzana, membrillo y otros cultivos. A partir de 1986, el único bactericida registrado para el control de esta enfermedad fue la estreptomicina y en 1991 se observó la primera cepa de esta bacteria resistente al antimicrobiano; sin embargo, para 1998 el 57% de las cepas aisladas presentaban resistencia a estreptomicina, por lo que los productores se han visto en la necesidad de sustituirlo con otro antimicrobiano (Manulis *et al.*, 2003).

El cobre también ha sido utilizado como ingrediente activo de bactericidas y fungicidas en cultivos de frutas y hortalizas durante más de 100 años (Williams *et al.*, 1993); sin embargo, a partir de 1980 patógenos bacterianos resistentes a cobre han sido

detectados repetidamente. Diversos estudios han mostrado que diversos genes son los responsables de conferir esa resistencia a los antimicrobianos y a productos de cobre en diversas especies bacterianas (Lee *et al.*, 2002). El problema se ha visto en aumento, ya que se ha logrado detectar la capacidad de transferencia de estos genes de resistencia entre cepas de la misma especie, incluso, en cepas de distinta especie, lo que aumenta el nivel y la velocidad de la generación de cepas resistentes a los antimicrobianos. Graves, (2001) reportó la transferencia de dos genes por medio de plásmidos entre cepas de *Escherichia coli* a *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*.

Basados en los reportes de diversas partes del mundo, en un escenario hipotético, en una región de producción agrícola, en el que existe la presencia de cepas de los géneros *Xanthomonas* o *Erwinia* y especies bacterianas de importancia en salud pública como de los géneros *Salmonella* o *Escherichia*, y la aplicación de antimicrobianos, existe la posibilidad de que se lleve a cabo una selección de resistencia en alguna de ellas; y al estar en contacto con una gran diversidad de géneros bacterianos, es también probable la transferencia de los genes que confieren esa resistencia.

En México, y particularmente en Sinaloa, en donde la producción agrícola es la principal a nivel nacional, la aplicación de bactericidas agrícolas es una práctica común durante los periodos de siembra. Existen productos comerciales que están formulados a base de uno o dos antimicrobianos (oxitetraciclina, estreptomycin y gentamicina) mezclados con sales de cobre y son aplicados como único método de control. Para esto,

la SAGARPA, tiene límites y concentraciones de aplicación de estos productos y las enfermedades para las que están permitidas (Tabla 2).

Tabla 2. Límites y dosis de aplicación de bactericidas agrícolas, dependiendo de la enfermedad y del producto.

Plagas y patógenos	Plagucidas	Dosis	LMR* (ppm)	Producto
Cáncer bacteriano (<i>Corynebacterium michiganensis</i>)	Estreptomicina	0.25-0.4 kg/ha	0.250	Chile
Cáncer bacteriano (<i>Corynebacterium michiganensis</i>)	Estreptomicina	0.25-0.4 kg/ha	0.250	Jitomate
Mancha bacteriana (<i>Xanthomonas Vesicatoria</i>)	Estreptomicina	0.25-0.4 kg/ha	0.250	Jitomate
Marchitez bacteriana (<i>Pseudomonas solanacearum</i>)	Gentamicina + Oxitetraciclina	1600 g/ha	0.060+0.010	Papa
Podrición del tubérculo (<i>Corynebacterium spp.</i>) Podrición suave (<i>Erwinia spp.</i>)	Estreptomicina	0.25-0.4 kg/ha	0.250	Papa
Pierna negra (<i>Erwinia atroseptica</i>)	Gentamicina + Oxitetraciclina	1600 g/ha	0.060+0.010	Papa

* LMR: Límite máximo residual.

(SAGAR, 1999).

A pesar de los estatutos marcados por las leyes, la aplicación de estos productos se hace de manera masiva durante las temporadas de producción agrícola. Generalmente en periodos de lluvias, se aplican por aspersión sobre los cultivos en programas ya establecidos sin tomar en cuenta el nivel de daño al cultivo (Comunicación verbal). El uso excesivo e inadecuado de los bactericidas agrícolas ha traído como consecuencia un incremento en los costos de producción, residualidad en los productos, contaminación

ambiental y de mayor importancia la generación de cepas resistentes a estos compuestos antimicrobianos (Gaxiola, 2000).

Por otra parte, las primeras cepas del género *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos se detectaron en los años 50, pero hasta 1980 los distintos serotipos del género *Salmonella* eran considerados microorganismos relativamente susceptibles. Fue en la década de 1990 cuando la resistencia a los antimicrobianos emergió como un gran problema en salud pública, ya que se detectó un aumento en la resistencia a Ampicilina, Cloramfenicol y Cotrimoxazol y a veces llevaban resistencia a otros antimicrobianos como aminoglucósidos y tetraciclinas (Delgado *et al.*, 2004).

En el año de 1963 aparecieron las primeras cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a los antimicrobianos y a partir de esas fechas el aislamiento de este serotipo con características de resistencia ha venido en aumento (Khachatourians, 1998). *Salmonella* Typhimurium DT-104 con múltiple resistencia a drogas (S. Typhimurium DT-104 MDR) fue primero identificada en Reino Unido, aislada de pájaros exóticos en los años 80s y a partir de estas fechas, el problema se ha incrementado en gran magnitud (Meunier *et al.*, 2002; Doublet *et al.*, 2003).

Existen diversas formas por las que las bacterias generan resistencia a los agentes antimicrobianos. Estos mecanismos incluyen disminución en la acumulación de la droga, disminuyendo la permeabilidad, modificación del sitio blanco o la modificación

del propio antimicrobiano. Además, se está generando un incremento en los sistemas de flujo activo que están implicados en la resistencia a los antimicrobianos (Braoudaki y Hilton, 2004). Los mecanismos que una bacteria utiliza para esquivar la acción del agente antimicrobiano generalmente son producto de la actividad de genes específicos que modifican su fisiología (Solórzano y Miranda, 1998; Wain *et al.*, 2003).

Se sabe que la resistencia de bacterias patógenas a los agentes antimicrobianos es un problema global que va en aumento y que está ocasionando serios problemas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Wain *et al.*, 2003). Para determinar si un microorganismo es susceptible o resistente al antimicrobiano de elección, se han desarrollado técnicas para medir *in vitro* el comportamiento de las bacterias frente a concentraciones estándares del antimicrobiano. Desde el año de 1957, se desarrolló una metodología para determinar el efecto de los antimicrobianos sobre la bacteria en cuestión; el método de Bauer-Kirby (Barry *et al.*, 1979), se basa en la aplicación de un disco impregnado con una concentración estándar del antimicrobiano y colocado sobre la superficie del agar inoculado con una concentración establecida de la bacteria en estudio; después de la incubación se hacen mediciones de los halos de inhibición y se reportan de manera cualitativa como resistentes, intermedios o susceptibles de acuerdo a las tablas estándares publicadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Otra metodología para la determinación de la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo *in vitro*, es el método de dilución en agar; este se basa en poner de diferentes concentraciones del antimicrobiano

en un medio de cultivo específico para este fin (Agar Mueller Hinton); se inocula con una concentración estándar de la bacteria y se incuba. Transcurrido el tiempo, se detecta la concentración capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria; a diferencia del método anterior es que este proporciona resultados cuantitativos. Ambas metodologías se recomiendan para el estudio en bacterias habituales de rápido crecimiento (P. ej. Enterobacterias) y de algunas bacterias patógenas exigentes (NCCLS, 1997).

El Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS, por sus siglas en inglés) es una organización educativa dedicada a promover el desarrollo, y uso de Normas Nacionales e Internacionales. Fundada en 1968 y acreditado por *American National Standards Institute* (ANSI), el NCCLS promueve el uso de metodologías para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y se utiliza para medir los niveles de resistencia que en un determinado momento puede un microorganismo presentar frente a uno o mas antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la enfermedad causada por el organismo en cuestión. Un estudio de susceptibilidad está indicado para cualquier microorganismo implicado en un proceso infeccioso en el que se justifica el tratamiento antimicrobiano. Las pruebas de susceptibilidad están más indicadas cuando se cree que el agente etiológico puede pertenecer a una especie microbiana capaz de poseer resistencia a los agentes antimicrobianos habitualmente usados (NCCLS, 1997).

Características generales de *Escherichia coli*

El género *Escherichia*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Tortora, 1985; Brooks *et al.*, 2005), son bacilos Gram-negativos, no esporulados, móviles por poseer flagelos peritricos, son aerobios y anaerobios facultativos y es el organismo más conocido como comensal del intestino delgado de los mamíferos, aunque se ha demostrado que existen variedades patógenas. *E. coli* fue descrita por primera vez por el pediatra y bacteriólogo alemán Theodor Escherich quien observó una bacteria en forma de bacilo recto y que era el más abundante de la flora fecal de infantes, a la que denominó *Bacterium coli commune* (Tay *et al.*, 1995; Beier *et al.*, 2004). Anteriormente se consideraba a *Escherichia coli* como el único miembro de este género; sin embargo en la actualidad se reconocen 5 especies: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergussoni* (Tay *et al.*, 1995).

Escherichia coli es la especie mejor conocida y reside en el intestino delgado de animales de sangre caliente, ambiente que le provee de condiciones ideales y nutrientes para su crecimiento. Se dice que una mitad de la población total de *E. coli* reside en su hospedero animal como hábitat primario y la otra mitad reside en el ambiente externo (Winfield y Groisman, 2003).

E. coli en el ambiente tiene una tasa de crecimiento neta negativa con tiempos de vida media de aproximadamente 1 día en el agua, 1.5 días en sedimentos y 3 días en el

suelo, por lo que se considera que *E. coli* no es capaz de sobrevivir por periodos de tiempo prolongados en el ambiente externo al hospedero, pero su volumen constante en el ambiente se debe a las descargas continuas de fuentes humanas y de animales, manteniendo la población estable en el ambiente externo (Winfield y Groisman, 2003). La sobrevivencia de *E. coli* en el ambiente, requiere de la capacidad de adaptación a las condiciones del mismo; por ejemplo, poca disponibilidad de nutrimentos y una amplia fluctuación de temperatura (Winfield y Groisman, 2003).

Las poblaciones de *E. coli* en reservorios de agua dulce disminuyen rápidamente, sin embargo, la adición de fuentes de carbono rápidamente utilizables, así como la eliminación de la microflora competente le favorecen el crecimiento; esto sugiere la incapacidad de *E. coli* para competir por nutrimentos bajo condiciones de inanición (Winfield y Groisman, 2003; Ingham *et al.*, 2004).

La capacidad de sobrevivencia de *E. coli* en el ambiente varía ampliamente dependiendo de las características del mismo; por ejemplo, en climas tropicales donde los nutrimentos se mantienen en altas concentraciones, temperaturas del aire, agua y suelo cercanos a la temperatura del hospedero animal le proveen condiciones ideales que le permiten la sobrevivencia, crecimiento y proliferación (Winfield y Groisman, 2003).

Clasificación

Uno de los procedimientos para caracterizar a *E. coli* es por medio de la tipificación serológica. Esta se basa en la identificación de los antígenos somáticos "O", flagelares "H" y capsulares "K" con antisucros. Se conocen aproximadamente 160 variedades del antígeno "O" y más de 50 antígenos "H" (Tay *et al.*, 1995).

Epidemiología

Todas las enfermedades producidas por *E. coli* son transmitidas de persona a persona por la ruta fecal-oral. Esto pone de manifiesto problemas relacionados con la higiene del individuo o con trastornos con el sistema inmune. En el caso particular de las infecciones gastrointestinales, la contaminación de los alimentos con heces fecales tiene un papel primordial, debido al aumento de alimentos frescos o poco procesados, tales como frutas y hortalizas, donde el microorganismo puede permanecer viable y ocasionar infecciones en los consumidores (Tay *et al.*, 1995; Beuchat, 1996).

Los lipopolisacáridos (LPS), son el componente principal de la pared celular de la bacteria. No solo es uno de los antígenos dominantes de la bacteria, sino que además es mediador de la virulencia del microorganismo, ya que interviene en una gran variedad de actividades biológicas. Serológicamente, los LPS son considerados como el antígeno "O", mientras que farmacológicamente son considerados como endotoxinas (Tay *et al.*,

1995). Algunas cepas de *E. coli* poseen cápsula, una envoltura extracelular constituida por polisacáridos. Estos polisacáridos capsulares son llamados antígenos "K". Otros componentes de superficie de algunas cepas de *E. coli*, son las fimbrias; estas favorecen la adherencia a las células epiteliales y mucosas del huésped (Tay *et al.*, 1995).

Patogenia

Escherichia coli es considerado un comensal del intestino delgado de animales de sangre caliente y el hombre y forma parte de la flora normal de los mismos (Brooks *et al.*, 2005), sin embargo, se han identificado grupos patogénicos de esta bacteria. Es responsable de una gran diversidad de enfermedades en el hombre; dentro de las principales formas patogénicas se encuentran las que ocasiona infecciones intestinales y hasta el momento se tienen identificados seis patotipos de *Escherichia coli* relacionados a una gran variedad de síndromes; estos incluyen *Escherichia coli* Enteropatogénica (ECEP), *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA) y *Escherichia coli* Adherente difusa (ECAD) (Cortés *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2005).

Escherichia coli relacionada con diarreas es muy común en todo el mundo; estas cepas se clasifican de acuerdo a las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente de las demás (Tay *et al.*,

1995; Beier *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005). La colonización epitelial, es la etapa inicial de la mayoría de las infecciones producidas por *E. coli*. Para este evento, las células del hospedero han adquirido mecanismos de defensa para eliminar cualquier partícula que sea reconocida como extraña; sin embargo, una gran diversidad de patógenos incluyendo *E. coli* han desarrollado la capacidad de producir adhesinas que les permiten evadir estos mecanismos y colonizar diferentes tipos de células de su hospedero (Tay *et al.*, 1995). Las variedades patógenas de *Escherichia coli*, difieren de las no patógenas en que las primeras han adquirido genes de virulencia que se localizan a nivel cromosómico o fuera de este. Estos genes de virulencia, los cuales codifican para proteínas con actividad de toxina, adherencia celular e invasión, fueron probablemente transferidos de especies patógenas de enterobacterias relacionadas (Beier *et al.*, 2004). A continuación, se describen cada uno de los patotipos de *Escherichia coli* y los mecanismos que utilizan para su colonización.

***E. coli* Enteropatogénica (ECEP).** Es causa común de diarrea en lactantes, particularmente en países en vías de desarrollo. ECEP se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado, ocasionando pérdida de las microvellosidades y en ocasiones penetran a las células mucosas. La infección por ECEP provoca diarrea acuosa, generalmente autolimitante, pero puede progresar a crónica. La diarrea por ECEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de *E. coli*. Las cepas se identifican mediante la tipificación de los antígenos O y en ocasiones del antígeno H (Beier *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005).

***E. coli* Enterotoxigénica (ECET).** Es la causa de la “diarrea de los viajeros” y agente etiológico muy importante de diarrea en lactantes en países en vías de desarrollo. Los factores específicos de colonización de la ECET promueven en humanos la adherencia a las células epiteliales del intestino delgado. Algunas cepas de ECET producen una exotoxina termolábil (TL) con un peso molecular de 80,000 Da. controladas por medio de un plásmido. Una parte de la toxina (subunidad B) se une con el gangliósido GM1 del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado y facilita la entrada de la subunidad A (PM 26,000 Da.) a la célula, donde activa la adenililciclase. Esto incrementa la concentración local de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que a su vez produce hipersecreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhibe la reabsorción de sodio. La luz intestinal se distiende con el líquido, aumentando los movimientos peristálticos provocando diarrea que dura varios días. La TL, es antigénica y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el suero. Las personas residentes de regiones donde estos microorganismos son muy prevalentes (p. ej. Países en desarrollo) tal vez poseen anticuerpos y son menos susceptibles a sufrir diarrea con nuevas exposiciones a *E. coli* productora de exotoxina termolábil (TL) (Tay *et al.*, 1995; Solórzano y Miranda, 1998; Cortés *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2005).

Algunas cepas de ECET producen la enterotoxina termoestable (TE) con un peso molecular de 1,500 a 4,000 Da. bajo control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos. La TE activa la guanililciclase en las células epiteliales entéricas y estimula la secreción de líquidos. Muchas cepas de ECET productoras de TE también producen

TL. Las cepas con ambas toxinas producen diarrea más grave. Además, estas cepas presentan factores de colonización y se presentan con particular frecuencia en algunos serotipos (Cortés *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2005).

***E. coli* Enterohemorrágica (ECEH).** Este patotipo produce una toxina llamada verotoxina, así denominada por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales del mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina, una variedad grave de diarrea y con el síndrome urémico hemolítico, enfermedad capaz de producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. De los serotipos de *E. coli* que producen verotoxina, el más común es la bien conocida O157:H7 y el único que puede identificarse en muestras clínicas (Tay *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2005).

***E. coli* Enteroinvasiva (ECEI).** Este patotipo, produce una enfermedad muy parecida a la shigelosis, debido a su naturaleza invasiva y patogénesis en producir la enfermedad parecida a la disentería, la cual es en ocasiones fatal para niños. La enfermedad al igual que ECET y ECEP se presenta más comúnmente en niños de países en desarrollo y en personas que viajan a dichos países. La ECEI produce la enfermedad al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal particularmente las del colon. La habilidad de invasión de ECEI se ha asociado con la presencia de un plásmido de 140 MDa que posee un grupo de genes de virulencia en una región de 20 kb. Este plásmido (pINV) tiene una secuencia homóloga con plásmidos encontrados en ciertas cepas de *Shigella flexneri*,

Shigella boydii y *Shigella dysenteriae*; sin embargo, los mecanismos empleados por este patotipo para generar la patogénesis siguen en estudio (Beier *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005).

***E. coli* Enteroagregativa (ECEA).** Esta causa una diarrea aguda y crónica (más de 14 días de duración) en personas de países en desarrollo. Estos también utilizan como medio de infección los alimentos contaminados con el microorganismo en países industrializados. Se caracteriza por su patrón de adherencia agregativa a las células epiteliales con un ensamble en forma de pared de ladrillos. Esta unión, es acompañada de la presencia de un moco grueso en el epitelio, el cual puede jugar un papel importante en la persistencia de la infección. ECEA podría adherirse primero a las células epiteliales por medio de adhesinas como fimbrias de adherencia agregativa (FAA) I, II o III, las cuales son expresadas por algunos aislados y son codificadas por un grupo de genes plasmídicos de ECEA; además, produce una toxina parecida a la toxina termolábil de ECET y una hemolisina (Beier *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005).

***E. coli* Adherente Difusa (ECAD).** Este último patotipo reconocido hasta la actualidad, es la sexta clase de *E. coli* diarreagénica, y ha sido identificada por su patrón de adherencia de manera difusa en cultivos de células epiteliales *in vitro*. (Lopes *et al.*, 2005). Se han descrito dos supuestos patrones de adherencia para cepas de ECAD. Se han caracterizado fimbrias superficiales (F1845) que son responsables del fenotipo de adherencia difusa en cepas prototipo (C1845). El grupo de genes responsables de

codificar para estas fimbrias se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Otra supuesta adhesina asociada con el fenotipo adherente difuso es una proteína de membrana externa, designado AIDA-I (Scaletsky *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005).

En un gran número de estudios epidemiológicos, ECAD ha sido asociada con enfermedades diarreicas en diferentes áreas geográficas; no obstante, los marcadores de virulencia y los genes que están relacionados con este patrón de ECAD asociados a enfermedades diarreicas aún están en estudio (Lopes *et al.*, 2005).

Además de los problemas gastrointestinales que ocasiona *E. coli*, se incluyen infecciones del sistema urinario, y es considerada la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable de casi el 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes; aunque en este síndrome solo se han involucrado un pequeño grupo de serotipos (Tay *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2005). Los síntomas y signos incluyen poliuria, disuria, hematuria y piuria. Anteriormente se aseguraba que las infecciones del tracto urinario (ITU) eran causadas por cepas de *E. coli* que predominaban en las heces, actualmente se sabe que no solo hay diferencias entre las cepas de heces y las responsables de ITU, sino también entre las cepas responsables de diferentes tipos de ITU. Las infecciones de las vías urinarias pueden provocar bacteremia con signos clínicos de septicemia. Generalmente, *E. coli* es nefropatogénica; la mayor parte se debe a un pequeño número de tipos de antígenos "O" de *E. coli* y el antígeno "K" parece tener

relevancia en la patogenia de la infección de la parte superior del aparato urinario y un pequeño grupo de antígenos capsulares (K1, K2, K3, K12 y K13) se han encontrado con más frecuencia en ITU. La pielonefritis se asocia con un tipo específico de *pili*, los *pili* P, que se unen con la sustancia P del grupo sanguíneo (Tay *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2005).

Las septicemias ocasionadas por cepas de *E. coli* se presentan cuando la bacteria tiene la capacidad de atravesar barreras hasta entrar al torrente circulatorio y provocar una serie de manifestaciones clínicas. Para que pueda ser considerada septicemia, un gran número de bacterias deben alcanzar la circulación sanguínea en cierto periodo de tiempo. El origen de estos microorganismos pueden ser pequeñas heridas infectadas, lesiones en tejidos infectados y lo más común, infección del tracto urinario (Tay *et al.*, 1995). Cepas de *E. coli* también son capaces de provocar el síndrome urémico hemolítico (SUH) y este se caracteriza por lesiones en el endotelio de los vasos, principalmente de los riñones, provocando un síndrome caracterizado por destrucción de plaquetas, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y daño renal. A este síndrome se han relacionado varios grupos serológicos, principalmente el bien conocido O157:H7, aunque también se ha reportado el serotipo O111, O113 y otros con menor frecuencia (Tay *et al.*, 1995).

Resistencia a antimicrobianos

Escherichia coli es comúnmente encontrarla en el tracto intestinal de animales y el hombre, y también puede ser encontrada en los alimentos y el ambiente, principalmente en el agua y el suelo como resultado de la contaminación fecal por las descargas residuales y escurrimientos de regiones con producción de animales (Schroeder *et al.*, 2002).

En un estudio desarrollado por Lopes *et al* (2005), caracterizaron 112 cepas de *Escherichia coli* Adherente Difusa (ECAD) y las probaron para susceptibilidad a una batería de 11 antimicrobianos. En este estudio se encontró que la frecuencia de resistencia a ampicilina, cloramfenicol, cotrimoxazol, estreptomina, sulfonamida y tetraciclina fue mayor del 50% en cada uno de los antimicrobianos. La resistencia a ciprofloxacino fue menos frecuente (20%); y se encontró que todos los aislamientos fueron susceptibles a ceftazidima, gentamicina, lomefloxacina, ofloxacina y ácido nalidixico, y solo dos cepas fueron susceptibles a todos los antimicrobianos probados. En este estudio se menciona que el uso frecuente de antimicrobianos puede predisponer o seleccionar cepas de ECAD a resistencia a los antimicrobianos; lo que aumenta los riesgos de enfermedades graves incluso la muerte por la dificultad en su tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aíslar cepas del género *Escherichia coli* y *Salmonella* de agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán; determinar los serotipos de *Salmonella* aislados y determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de mayor uso en la agricultura en ambos géneros bacterianos.

Objetivos particulares

1. Aíslar cepas de *Escherichia coli* y del género *Salmonella* de agua de uso agrícola en el valle de Culiacán.
2. Aíslar cepas de *Escherichia coli* y del género *Salmonella* de suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
3. Determinar los serotipos de *Salmonella* aislados de agua y suelo de uso agrícola.
4. Evaluar el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos (tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina y ciprofloxacino) en cepas de *Escherichia coli* y del género *Salmonella* aisladas.

5. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en las cepas del género *Salmonella* aisladas.

METAS

1. Generar información acerca de la presencia de *Escherichia coli* y los serotipos de *Salmonella* que se encuentran presentes en agua y suelo de uso agrícola del valle de Culiacán.
2. Determinar el grado de resistencia a los antimicrobianos en las cepas del género *Salmonella* y *Escherichia coli* aisladas de agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
3. Generar información acerca de los niveles de resistencia a sulfato de cobre que presentan las cepas del género *Salmonella* aisladas de agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
4. Informar a los productores agrícolas de los riesgos que implica el utilizar de manera inadecuada compuestos antimicrobianos en el campo y sus consecuencias, tanto para el ambiente como para la salud pública.

HIPÓTESIS

1. Existe la presencia constante del género *Salmonella* y *Escherichia coli* en agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
2. Existen diversos serotipos de *Salmonella* en agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
3. Las cepas del género *Salmonella* y *Escherichia coli* aisladas presentan resistencia al menos a uno de los antimicrobianos evaluados.
4. Las cepas del género *Salmonella* aisladas presentan resistencia a concentraciones mayores de 100 ppm de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación, es una continuación de un proyecto desarrollado a finales de 2003 y principios de 2004, en el que Cázarez (2004), logró el aislamiento de 12 cepas del género *Salmonella* de agua de riego en el valle de Culiacán. A partir de estos resultados, las cepas aisladas por Cázarez (2004), sirvieron como base de esta investigación y se continuó con los muestreos en busca de un mayor número de cepas de *Salmonella* y *E. coli* en agua y suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán, con el objetivo de serotipificar las primeras y evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos más utilizados en la agricultura de ambos géneros bacterianos. Además, se incluyeron tres cepas de *Salmonella* aisladas de empaques de melón en Guaymas, Sonora y una cepa aislada de agua de riego en el estado de Guerrero, dando un total de 24 cepas de *Salmonella*.

Los antimicrobianos evaluados fueron tetraciclina, estreptomycinina y gentamicina para las cepas de *Escherichia coli* aisladas, mientras que para las cepas del género *Salmonella*, se evaluaron los antimicrobianos ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, estreptomycinina y gentamicina.

Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* de agua de uso agrícola

Los lugares de muestreo fueron elegidos de acuerdo a la producción de hortalizas (por ejemplo, tomates, pimientos y pepinos). Además, se tomó en cuenta la práctica de aplicación de antimicrobianos que se utilizan como bactericidas agrícolas para el control de bacterias fitopatógenas.

Toma de muestras.

Del 2 de Enero al 5 de Mayo de 2005 se recolectaron 50 muestras obtenidas de los canales del valle de Culiacán, mismos que sirven para el abastecimiento del riego en los campos de cultivo, así como para usos diversos dentro de los empaques de la región. Además, se analizaron 23 muestras de tierra de los campos de cultivo durante época de siembra y cosecha.

Las muestras de agua fueron recolectadas en frascos de polipropileno de un litro de capacidad, debidamente etiquetados y cerrados. A cada muestra recolectada se le agregó 0.2 mL de Tiosulfato de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 10 % (Faga Lab, México), con el fin de inactivar el cloro residual que pudiera estar presente. Las muestras se colocaron en hieleras con separadores de cartulina entre una muestra y otra para evitar el contacto entre ellas y se trasladaron al laboratorio de Microbiología de CIAD Culiacán a 4°C para ser procesadas entre las primeras 4-6 horas después de la toma de muestra.

Análisis microbiológicos.

Después de recibir las muestras en el laboratorio de microbiología, se analizaron para determinar la presencia de *Salmonella* y *Escherichia coli*. La determinación de *Salmonella*, se llevó a cabo empleando la metodología establecida en APHA (1998), con algunas modificaciones para alcanzar los objetivos planteados, misma que a continuación se describe.

Se tomaron 300 mL de agua de cada muestra y se repartieron uniformemente en 6 tubos (Nalgene) de 50 mL, posteriormente, se centrifugaron a $13,800 \times g$ durante 10 minutos a 4°C (IEC MultiRF). El sobrenadante se eliminó por succión con una pipeta automática de 10 mL (Thermo). El sedimento de cada tubo se colocó en un matraz estéril de 50 mL. Del sedimento, se tomó 0.1 mL y se agregó a 9.9 mL de caldo de enriquecimiento Rappaport Vassiliadis (BD Difco, Maryland U.S.A.), se incubó 20-24 horas a 37 °C (Shell Lab). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se sembraron por estría con un asa de platino en medios selectivos Agar enterico Hektoen (BD Bioxon, México) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (BD Bioxon, México), mismos que se incubaron de 20-24 horas a 37 °C. Dos o tres colonias típicas (colonias transparentes con el centro negro) del género *Salmonella* en los medios selectivos se aislaron en agar de soya y tripticaselna (BD Bioxon, México) para posterior confirmación por PCR.

Para el aislamiento de *Escherichia coli*, se utilizó la metodología estándar de filtración por membrana para el análisis de agua (APHA, 1998) con una pequeña modificación en el medio de cultivo, ya que se utilizó el medio de cultivo agar ECC (*Escherichia coli*, Coliformes), que permite la cuantificación de *Escherichia coli* y coliformes fecales simultáneamente, y ha sido utilizado como un medio de cultivo alternativo para la cuantificación de *Escherichia coli* y coliformes fecales, misma que a continuación se describe.

Para el aislamiento de *E. coli* se utilizaron los siguientes materiales: tren de filtración (Gelman Sciences), con capacidad para tres embudos de 150 mL (Gelman Sciences), membranas de nitrocelulosa (Pall, USA) con un tamaño de poro de 0.45 μm de diámetro, trampa para humedad y bomba de vacío (E-1500 Felisa, México) a una presión de 1 kg/cm². Se filtraron volúmenes de 10, 1 y 0.1 mL de cada muestra; una vez filtrada la muestra, la membrana fue colocada sobre la superficie de agar ECC (CHROMagar, Paris, Francia); se incubó a 45°C durante 20 a 24 horas para posteriormente seleccionar de dos a tres colonias aisladas con las características que se describen en el emblema del frasco del medio para *Escherichia coli*, que corresponden a colonias de tamaño mediano y de color azul.

Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* de suelo de uso agrícola

Toma de muestras.

Las muestras de tierra fueron recolectadas con cucharas metálicas estériles. Para el muestreo se determinaron 5 puntos de la parcela en consideración de manera aleatoria, tomando aproximadamente 100 g de cada punto a una profundidad no mayor de 5 cm, se colocó en una bolsa estéril (Ziploc), se selló y se agitó vigorosamente de 20 a 25 veces, se colocaron en hieleras y fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología de CIAD Culiacán a 4°C.

Análisis microbiológicos.

Para el análisis de las muestras de tierra se utilizó la metodología estándar de (APHA, 2001) para el análisis de muestras sólidas, que a continuación se detalla.

Se pesaron 25 g de tierra en una balanza (Sartorius, USA) y se agregaron a 225 mL de caldo de preenriquecimiento agua peptonada al 1% (BD Difco, Maryland, U.S.A.) tal como se recomienda en el emblema del frasco del medio de cultivo, este se incubó de 20-24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se tomó 0.1 mL y se agregó a 9.9 mL de caldo de enriquecimiento Rappaport Vassiliadis (BD Difco, Maryland, U.S.A.) y se incubó a 37 °C durante 20-24 h (Shell Lab). Una vez transcurrido el tiempo

de incubación, las muestras se sembraron por estría con un asa de platino en medios selectivos agar enterico Hektoen (BD Bioxon, México) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (BD Bioxon, México), mismos que se incubaron de 20-24 horas a 37 °C.

Para el análisis de la presencia de *Escherichia coli*, se procedió de la siguiente manera: después de la incubación en agua peptonada al 1%, se tomaron alícuotas de 1, 0.1, y diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, para el aislamiento de *Escherichia coli* por medio del método de filtración por membrana (APHA, 1998) anteriormente detallada.

Dos o tres colonias aisladas de cada muestra se sembraron por estría en agar de soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés) para realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos con estas cepas aisladas.

Confirmación del género *Salmonella* por PCR

En esta investigación se utilizaron los iniciadores *invA*-1 e *invA*-2, que son genes codificadores de proteínas de invasividad, con la secuencia de nucleótidos que a continuación se detalla:

invA-1 (Sentido): 5' ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT 3'

invA-2 (Antisentido): 3' AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT 5'

(Hsun y Ou, 1996).

Preparación de la muestra para PCR.

1. Una colonia de la bacteria fue colocada en 5 mL de caldo de soya y tripticaseína (Bioxon, México), se incubó de 35-37°C por 20 a 24 h, obteniendo un cultivo a saturación (10^9 células/mL).
2. Del cultivo bacteriano, se tomaron 1.5 mL (2.5×10^{10} células/1.5 mL) y se centrifugó a 14,000 xg por 5 minutos.
3. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 mL de agua nanopura esterilizada y se agitó en Vórtex (este paso se repitió dos veces).
4. Una vez eliminado el sobrenadante del paso anterior se agregaron 200 µL de agua nanopura esterilizada y se agitó.
5. La suspensión bacteriana fue puesta en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos para ocasionar la lisis celular y liberar el ADN bacteriano para la reacción de PCR.

Preparación de la mezcla de reacción para PCR.

En un microtubo (Eppendorf) de 500 µL se agregaron los siguientes reactivos para cada muestra analizada (con un volumen total de 25 µL).

- 2.5 µL de Buffer 10X de amplificación para PCR (Libre de $MgCl_2$) (Promega, USA).

- 1.5 μL de MgCl_2 25 mM (Promega, USA).
- 1 μL de la mezcla de DNTP's 10 mM (Promega, USA).
- 2.5 μL de cada uno de los primers 10 μM (Sigma, USA).
- 0.125 μL de la enzima *Taq* polimerasa (Promega, USA).
- 13.875 μL de agua nanopura estéril.
- 1 μL de la suspensión de lisis bacteriana (ADN molde), para obtener un volumen final de 25 μL para cada muestra.

Procedimiento de amplificación del ADN bacteriano.

Se llevaron a cabo 30 ciclos de reacción bajo las siguientes condiciones en un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf).

- 1 ciclo por 10 min. a 94°C (Requerido para activar la enzima).
 - Desnaturalización por 30 seg. a 94°C.
 - Alineamiento de los primers por 30 seg. a 56°C.
 - Extensión de los primers por 2 min. a 72°C.
 - 1 ciclo por 10 min. a 72°C. Estabilización a 4°C.
- } 30 ciclos

Electroforesis de los productos de PCR

Para visualizar los productos de PCR, se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para desarrollar esta técnica se procedió de la siguiente manera:

1. Se pesaron 0.3 g de agarosa (Promega, USA) y se agregaron a 30 mL de Tris Acetato EDTA (TAE) 1 X (Eppendorf, USA), para una concentración final de agarosa al 1%.
2. Se disolvió en un horno de microondas (LG) durante 35 segundos.
3. Se agregó 1 μ L de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL (Research Organics Inc., USA).
4. Se depositó sobre el molde para la cámara de electroforesis con su respectivo peine para formar los pocillos donde se depositó la muestra (EC 230, Thermo EC).
5. Una vez solidificado el gel, se agregó TAE 1 X (Eppendorf, USA) hasta el límite indicado para la cámara de electroforesis.
6. A 10 μ L del producto de PCR se agregaron 2 μ L de buffer de carga (Blue/Orange 6X Loading Dye) y los 12 μ L de la mezcla fueron depositados en los pocillos del gel con una micropipeta (Eppendorf, USA).

NOTA: En un pocillo del gel se depositó un marcador de peso molecular de 100 pb Ladder (Promega, USA) como patrón de referencia para las bandas generadas.

7. Se procedió a separar la muestra en una cámara de electroforesis (EC 230, Thermo EC) con una fuente de poder (EC 105, Thermo EC) a un voltaje de 80 mV, durante 30 a 45 min.
8. Una vez efectuada la electroforesis, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline), observando las bandas características del fragmento amplificado (244 pb).

NOTA: Controles positivo y negativo fueron empleados en cada amplificación, tanto de PCR como de electroforesis.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos fue desarrollada por el método de difusión en disco, también conocido como el método de Kirby-Bauer de acuerdo al *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

Esta técnica consiste en utilizar un inóculo estandarizado del microorganismo a evaluar, el cual es estriado sobre la superficie de una placa con agar Mueller Hinton. Posteriormente, se colocan discos de papel filtro impregnados con los diferentes antimicrobianos a evaluar que después de un período de incubación determinado, producirán un halo de inhibición en el crecimiento del microorganismo. El tamaño del diámetro en el halo de inhibición, es inversamente proporcional a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el microorganismo y permite reportar un resultado cualitativo de susceptibilidad o resistencia, basado en las tablas publicadas por el NCCLS.

Reactivos y Equipos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

- 1) Placas de Petri de 150 X 20 mm, con agar Mueller Hinton (Bioxon, México) a pH de 7.2 a 7.4, asegurando un grosor mínimo de 4 mm del agar en la placa.
- 2) Tubos de 13 X 100 mm con 3 mL de solución salina estéril 0.85%.
- 3) Cartuchos con discos de antimicrobiano. Los antimicrobianos en estudio fueron:
 - Tetraciclina 30 µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).
 - Estreptomina 10 µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).
 - Gentamicina 10 µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).
 - Trimetoprim-Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg respectivamente (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).
 - Ampicilina 10 µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).
 - Ciprofloxacino 5 µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson).

NOTA: Las cepas del género *Salmonella* fueron evaluadas con todos los antimicrobianos anteriormente descritos, y las cepas de *Escherichia coli* fueron probadas con los antimicrobianos tetraciclina, estreptomina y gentamicina.

- 4) Hisopos de algodón estériles.
- 5) Estándar 0.5 de la escala nefelométrica de McFarland (concentración de 1 a 2 X10⁸ UFC/mL).
- 6) Asa bacteriológica.
- 7) Pinzas.
- 8) Vernier (Scala, México).

- 9) Mezclador Vortex (Thermolyne).
- 10) Incubadora a 35°C (Shell Lab).
- 11) Cepa control para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de Enterobacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Procedimiento.

- 1) Las placas de agar Mueller Hinton y los antimicrobianos fueron llevados a temperatura ambiente antes de su utilización.
- 2) Preparación de una suspensión bacteriana.
 - De un cultivo puro en TSA (BD Bioxon, México) con incubación de 18–24 horas se tomaron 2 o 3 colonias aisladas y se pusieron en un tubo de 13 X 100 con 3 mL de solución salina estéril 0.85%.
 - Se agitó perfectamente y se ajustó visualmente a la escala de McFarland (supone una concentración de 1 a 2×10^8 UFC/mL).
- 3) En un plazo no mayor de 15 minutos después de la preparación de la suspensión bacteriana, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana y se rotó contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo y se estrió sobre la placa de agar Mueller Hinton.
- 4) La placa de agar se estrió tres veces haciendo una rotación de 60° entre una estria y otra para asegurar una adecuada distribución del inóculo.

- 5) El hisopo se estrió dos o tres veces por toda la circunferencia de la placa para asegurar la inoculación sobre las orillas.
- 6) Se dejó reposar unos minutos (entre 5 y 15) para que secase el inóculo y los discos fueron colocados sobre la superficie del agar con unas pinzas estériles.
- 7) Se aplicó una pequeña presión sobre el disco con las pinzas para asegurar que el disco estuviera completamente en contacto con la superficie del agar. NOTA: los discos fueron colocados a una distancia considerable entre uno y otro para poder visualizar bien el halo que se produciría.
- 8) Las placas se invirtieron y se incubaron durante 16 a 18 horas a 35°C en una incubadora de uso general (Shell Lab) cuidando de no apilar más de 5 placas juntas.
- 9) Para la lectura de resultados se utilizó un vernier (Scala, México) para medir el halo de inhibición de cada antimicrobiano. Para esto, la placa se colocó de manera invertida sobre una superficie oscura (tela negra) y se midió la circunferencia del halo generado en milímetros.
- 10) Los resultados fueron reportados como Resistente, Intermedio ó Susceptible, basados en las tablas estándares del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.

Evaluación de Concentración Mínima Inhibitoria contra Sulfato de Cobre

(CuSO₄·5H₂O) para el género *Salmonella*

Es el principal método utilizado para medir cuantitativamente la concentración mínima de producto; en este caso CuSO₄·5H₂O, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano utilizando el método de dilución en agar. Para encontrar la concentración mínima inhibitoria de CuSO₄·5H₂O, capaz de impedir el crecimiento de cepas del género *Salmonella*, se realizó basado en el método estándar publicado por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997), sobre Concentración Mínima Inhibitoria en dilución en agar.

Preparación de la concentración de CuSO₄·5H₂O.

Para conocer la concentración a la que se prepararía la solución madre, se determinó primeramente la concentración de Sulfato de Cobre en el producto comercial. Este se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica (AA220, Varian). Una vez conociendo la concentración real del producto comercial se procedió a preparar la solución madre y a partir de ésta se tomaron alícuotas para preparar las placas de dilución en agar.

Preparación de las placas de dilución en agar.

1. Las diluciones de la solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron agregadas sobre agar Mueller Hinton fundido, que se dejó equilibrar a temperatura ambiente hasta tener una temperatura de 45-50°C y un pH de 7.2-7.4.
2. El agar Mueller Hinton y la solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se mezclaron perfectamente por agitación manual y se agregó en placas de petri de 150 X 20 mm, en condiciones estériles sobre una campana de flujo laminar (Enviroco, USA) obteniendo un grosor en cada placa de 3 a 4 mm, asegurando que el agar no solidifique antes del vaciado y previniendo la formación de burbujas en el agar.
3. El agar se dejó solidificar a temperatura ambiente y las placas fueron utilizadas en un tiempo no mayor de 48 h a partir de su preparación.

Preparación del inóculo.

1. A partir de un crecimiento puro de *Salmonella* con incubación de 18 a 24 h a 35°C en agar de soya y tripticasefina (Bioxon, México) se seleccionaron una o dos colonias y se preparó una suspensión bacteriana similar al tubo nefelométrico de 0.5 en la escala de McFarland, el cual supone una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL, en 3 mL de una solución salina estéril (0.85 % de NaCl).

2. De la suspensión bacteriana preparada anteriormente, se hicieron diluciones 1:10 en la misma solución salina para obtener una concentración final de $1-2 \times 10^7$ UFC/mL para ser aplicadas sobre el agar con las concentraciones definidas de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Inoculación de las placas de dilución en agar.

1. Los tubos que contenían la suspensión bacteriana estandarizada a $1-2 \times 10^7$ UFC/mL fueron puestos en orden en una gradilla.
2. Una alícuota de 2 μ L de la suspensión anterior fue depositada con una micropipeta (Eppendorf, USA) sobre la superficie del agar con las diferentes concentraciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
3. Una placa de control de crecimiento (sin $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) fue también inoculada, como control negativo del ensayo.

Incubación de las placas de dilución en agar.

Las placas inoculadas con la suspensión bacteriana, fueron colocadas a temperatura ambiente para dejar secar los puntos de inoculación. Las placas fueron invertidas e incubadas a 35°C durante 16 a 20 horas.

Lectura de resultados para concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para determinar la CMI, las placas fueron colocadas sobre una superficie oscura no refractante (tela negra). Las CMI fueron registradas como la mínima concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ que inhibió por completo el crecimiento bacteriano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la investigación. Cabe señalar que este fue un estudio descriptivo, por lo que no se presenta ningún diseño estadístico para los resultados.

Aislamiento de especies de género *Salmonella* de agua de uso agrícola

En la Tabla 3, se presentan el número de aislados y los serotipos correspondientes de *Salmonella* de acuerdo a las regiones de muestreo.

Tabla 3. Aislamientos y serotipos de acuerdo a la región de muestreo.

Región de muestreo	No. de aislados	Serotipos correspondientes
Culiacán	CA ^a , RCSP ^a , PLP	Typhimurium, Typhimurium, GIVE
Villa Juarez	CE ^a , CSC ^a , CETO ^a , DT-12, Podesta, Hortitec.	Typhimurium, Typhimurium, Typhimurium, Anatum, Agona, Infantis.
Navolato	COR ^a , Sta. Fe 1 ^a , Sata fe 2 ^a , La Sinaloa, Fresno, EPSAnav.	Typhimurium, Typhimurium, Typhimurium, Typhimurium, Oranienburg, Minnesota.
Eldorado	CESP 1 ^a , CESP 2 ^a , El grande.	Typhimurium, Typhimurium, Infantis.
Fuera de la región de muestreo	CR ^b , CC ^c .	Typhimurium, Typhimurium.

^a Cepas aisladas en el periodo 2003-2004.

^b Cepa aislada en Costa Rica.

^c Cepa aislada en La Cruz de Elota.

Las cepas del género *Salmonella* aisladas de otros estados y que se incluyeron en esta investigación, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Aislados de *Salmonella* de diferentes Estados.

Origen	Serotipos	No. de aislados
Guaymas, Sonora	Clanvillian	1
Guaymas, Sonora	Rubislaw	1
Guaymas, Sonora	Grupo F	1
Guerrero	Grupo D monofásica	1

En las Tablas 3 y 4, se presentan las cepas del género *Salmonella* aisladas de agua de uso agrícola en el valle de Culiacán, incluyendo las que se aislaron en el período 2003-2004. Además, se presentan los aislados obtenidos de diferentes lugares, obteniendo así un total de 24 cepas del género *Salmonella*, las cuales fueron objeto de serotipificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe una variabilidad en la presencia de cepas del género *Salmonella* en las diferentes áreas de muestreo, siendo la región de Culiacán con menor presencia de *Salmonella*. Del total de lugares evaluados en la región de Culiacán, 4 de 6 (66.6%) de los canales, son de concreto, por lo que no existe contacto directo entre el agua y el suelo. Duffy *et al* (2005), estudiaron la prevalencia de *Salmonella* en diversos ambientes agrícolas; muestrearon agua de irrigación, superficies de empaque y frutos de melones, logrando aislar 25 cepas del género *Salmonella*, de las cuales 16 fueron de agua de irrigación. En ese trabajo se muestrearon canales de tierra,

canales de concreto, pozos y otras fuentes de agua. De todos los reservorios de agua de irrigación muestreados, los pozos presentaban la mayor prevalencia de *Salmonella*, seguidos de los canales de tierra. Ellos mencionan que la interfase que se forma entre el agua y el suelo puede ser un reservorio de microorganismos fecales, aumentando así los riesgos de contaminación para los frutos irrigados con esta agua.

Existen diversas fuentes de contaminación para agua de uso agrícola, entre estas, la introducción de aguas residuales a los canales que aún se presenta en los canales del valle de Culiacán (Información verbal) o por las descargas de fuentes no puntuales al ser acarreadas por las lluvias. Además, las lluvias pueden acarrear contaminación fecal doméstica, del suelo y animales silvestres (incluyendo aves y reptiles) en los canales (Thurston *et al.*, 2002).

Diversos estudios han mostrado la capacidad que presenta el género *Salmonella* para sobrevivir en ambientes externos a su huésped, incluyendo ambientes acuáticos; sin embargo, se dice que existen diversos factores que determinan esta sobrevivencia, entre ellos, la capacidad de soportar una escasa disponibilidad de nutrimentos, fluctuaciones drásticas de temperatura y pH, así como del serotipo (Baudart *et al.*, 2000; Winfield y Groisman, 2003), ya que no todos tienen la capacidad de sobrevivir en el ambiente por períodos prolongados, esto se debe a la presencia de determinantes genéticos y modificación de sus características fisiológicas que les dan la capacidad de adaptación a ambientes adversos (Winfield y Groisman, 2003).

La mayoría de los estudios encaminados al aislamiento de cepas del género *Salmonella* de ambientes acuáticos, van orientados a determinarlos solo a nivel de género (Johnson *et al.*, 2003), y pocos estudios se han desarrollado para determinar los serotipos presentes en estos ambientes.

Baudart *et al.* (2000), aislaron 574 cepas de *Salmonella* de agua de diferentes orígenes, entre ellos, agua de mar, aguas residuales y agua de ríos. En este estudio se presentó una mayor prevalencia en agua de río y aguas residuales con 41 serotipos distintos, destacando los serotipos Typhimurium con un 27.17% (156/574), Newport con un 14.76% (84/574) y el serotipo Indiana con un 7.49% (43/574). Además, en este estudio se logró el aislamiento de los serotipos Infantis, Give y Anatum, concordando con los resultados obtenidos en nuestra investigación. Existen diversos reportes que mencionan al serotipo Typhimurium como el de mayor prevalencia en cualquier ambiente y el que ocasiona más brotes epidemiológicos por el consumo de agua y alimentos contaminados, ocasionando del 40 al 70% de los casos de salmonelosis reportados (Bennasar *et al.*, 2000; Leon-Velarde *et al.*, 2004; Beier *et al.*, 2004). Esto puede deberse a la versatilidad que presenta este serotipo en cuanto a sus hospederos, ya que la mayoría de los serotipos presentan un rango restringido de hospederos; sin embargo, el serotipo Typhimurium se puede encontrar en casi cualquier tipo de animales, incluyendo bovinos, cerdos, una gran diversidad de aves silvestres y de corral, caballos, humanos y el ambiente (Refsum *et al.*, 2002). Además, de la capacidad de sobrevivencia en ambientes hostiles, como una severa limitación de nutrientes y en

presencia de sustancias que inducen daño oxidativo (Child *et al.*, 2002). Estos fenómenos pueden tener gran impacto en la diversidad de serotipos en ambientes acuáticos en el valle de Culiacán y por lo tanto en la salud pública, debido a la posible contaminación de las hortalizas producidas en los campos del valle de Culiacán. Normalmente, el agua de irrigación no se pone en contacto directo con los frutos durante su crecimiento, ya que los sistemas de irrigación en la región agrícola de Culiacán son por medio de cintas de irrigación, sin embargo, el uso del agua de estos canales para mezclar plaguicidas que se rocían directamente sobre los cultivos, incrementa el riesgo de contaminación superficial de los frutos por microorganismos patógenos, como es el caso de cepas del género *Salmonella*, variedades patógenas de *Escherichia coli* o cualquier otro patógeno, incluyendo parásitos y virus (Thurston *et al.*, 2002).

El agua de los canales del valle de Culiacán, no solo se utiliza con fines agrícolas, sino que además es empleada en diversas labores del hogar en los pueblos aledaños a los canales, entre estas actividades, se incluyen lavado de ropa, lavado de utensilios de cocina, aseo personal (bañarse o lavado de manos), riego de plantas de ornato, entre otras, por lo que el riesgo a la salud pública va mas allá de la contaminación de vegetales en el campo.

La gastroenteritis, es todavía un problema muy fuerte en países en vías de desarrollo, ya que sigue siendo una de las principales causas de muerte en la población. La contaminación del agua de los ríos y canales con microorganismos patógenos como

bacterias, virus y parásitos, juegan un papel muy importante en la transmisión de gastroenteritis en la población (Naranjo *et al.*, 1990), por lo que es de vital importancia del conocimiento de los niveles de contaminación de los cuerpos de agua que se utiliza en labores del campo y que además, tiene usos fuera de esta práctica.

Más del 60% de los serotipos de *Salmonella* tienen su hábitat natural en el tracto intestinal de animales de sangre caliente (Brenner *et al.*, 2000), por lo que la defecación al aire libre de animales silvestres, animales de corral y el hombre pueden jugar un papel muy importante en la contaminación de los cuerpos de agua superficial con diversos serotipos de *Salmonella*; debido a la imposibilidad de erradicar esta práctica, es importante que se tenga conocimiento de los niveles de contaminación con microorganismos patógenos específicos, como es el caso de *Salmonella*, para que los productores hortícolas del valle de Culiacán pongan mucha atención en los métodos de desinfección del agua utilizada para el riego de cultivos y uso dentro de los empaques agrícolas. Estudios epidemiológicos de brotes de salmonelosis y enfermedad de los viajeros en humanos, se han relacionado al consumo de hortalizas frescas y algunas frutas; entre estas, tomates contaminados, melones, sandías y otros, han sido involucrados en estos brotes y de manera general, se asume que el microorganismo viene desde el campo y logra sobrevivir a los procesos de desinfección (Beuchat, 1996; FIDA, 2001).

Susceptibilidad a los antimicrobianos del género *Salmonella* en agua de uso agrícola

En la Tabla 5, se presentan los resultados del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos por su origen.

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos por su origen.

Origen	Amp. ^a			Cip. ^b			Tm/Sx.			Tet. ^d			Est. ^e			Gen. ^f		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Culiacán	3	0	0	3	0	0	3	0	0	1	0	2	3	0	0	3	0	0
Villa Juárez	6	0	0	6	0	0	6	0	0	3	0	3	5	1	0	6	0	0
Navolato	6	0	0	6	0	0	6	0	0	3	1	2	6	0	0	6	0	0
Eldorado	3	0	0	3	0	0	3	0	0	1	0	2	3	0	0	3	0	0
Fuera de la región*	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0
Sonora	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0	3	0	3	0	0
Guerrero	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0

^a Ampicilina, ^b Ciprofloxacino, ^c Trimetoprim/Sulfametoxazol, ^d Tetraciclina, ^e Estreptomina, ^f Gentamicina.

* Aislados fuera de las regiones de muestreo contempladas en esta investigación.

Del total de las cepas analizadas, independientemente de su origen, el 100% presentaron susceptibilidad a ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y gentamicina. De las cepas aisladas en la región de Culiacán, 2 de 3, presentaron resistencia a tetraciclina; 3 de 6 de las cepas aisladas de la región de Villa Juárez fueron resistentes a tetraciclina y 1 presentó susceptibilidad intermedia a estreptomina. De las 6 cepas aisladas de la región de Navolato, 2 fueron resistentes a tetraciclina y 1 presentó susceptibilidad intermedia a estreptomina. 2 de 3 cepas aisladas de la región de Eldorado fueron resistentes a tetraciclina; 2 de 2 aislados obtenidos fuera de las regiones contempladas para este estudio, presentaron resistencia a tetraciclina. Por otro lado, 3 de

3 aislados de Sonora presentaron susceptibilidad intermedia a estreptomicina y el único aislado de Guerrero presentó susceptibilidad intermedia a estreptomicina. Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias que hay entre el origen de las cepas y su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos evaluados. Mientras que en las cepas aisladas del valle agrícola de Culiacán y zonas aledañas 11 de 17 (64.70%), presentaron resistencia a tetraciclina y una presentó susceptibilidad intermedia al mismo antimicrobiano y solo un aislado tuvo susceptibilidad intermedia a estreptomicina. De los 3 aislados de Sonora y el que se obtuvo de Guerrero, tuvieron una susceptibilidad intermedia a estreptomicina.

Los resultados obtenidos en esta investigación, nos dan una idea de la exposición a los antimicrobianos de las cepas del género *Salmonella* aisladas. Por un lado, podemos inferir que las cepas aisladas son salvajes, debido a que no presentan ningún nivel de resistencia a los antimicrobianos comúnmente empleados en la clínica, como los son ampicilina, ciprofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol; y por otro lado, sugiere una alta exposición a los antimicrobianos que se emplean en la agricultura, principalmente tetraciclina y estreptomicina. Aunque en esta investigación no se estudió el origen de la resistencia a los antimicrobianos, nuestros resultados sugieren que la aplicación de antimicrobianos en la agricultura para el tratamiento de infecciones bacterianas en los cultivos juega un papel importante como factor de predisposición en la generación de cepas bacterianas con resistencia a los antimicrobianos mayormente utilizados en la agricultura.

En la Tabla 7 se muestra el perfil de susceptibilidad a tetraciclina por serotipo.

Tabla 7. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina por serotipo.

	Typhimurium	Agona	Oranienburg	Anatum	Infantis	Minnesota	Clayville	Rubislaw	Grupo F	Grupo D monofásica	Give
Susceptible	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Intermedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistente	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	13	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1

En la Tabla 8, se muestra el perfil de susceptibilidad a estreptomocina por serotipo.

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad a estreptomocina por serotipo.

	Typhimurium	Agona	Oranienburg	Anatum	Infantis	Minnesota	Clayville	Rubislaw	Grupo F	Grupo D monofásica	Give
Susceptible	13	1	1	0	2	1	0	0	0	0	1
Intermedio	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
Resistente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	13	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1

Como se mostró en las Tablas 6, 7 y 8, los niveles de susceptibilidad a los antimicrobianos ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim/Sulfametoxazol y gentamicina, fueron del 100%, ya que ninguna de las cepas del género *Salmonella* evaluadas presentó algún nivel de resistencia. A diferencia de tetraciclina, en el que se presentó resistencia

en un 50% (12/24), todos los aislados correspondieron al serotipo Typhimurium; con estreptomina, se presentó una susceptibilidad intermedia en 5 de 24 (20.83%), correspondiendo a los serotipos Anatum, Clanvillian, Rubislaw, *Salmonella* grupo F y *Salmonella* grupo D monofásica. Estos niveles de susceptibilidad "intermedia" son un factor importante que se debe poner en consideración, ya que estos bajos niveles de resistencia son el primer paso hacia la resistencia clínica (Phillips *et al.*, 2004).

La emergencia de resistencia a los antimicrobianos fue primero documentada en el año de 1963, cuando se observó un incremento en los niveles de resistencia, particularmente en una cepa de *Salmonella* Typhimurium (Khachatourians, 1998) y en los últimos años, la emergencia de cepas del género *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos ha venido en aumento y el serotipo Typhimurium ha sido el de mayor revuelo en la generación de cepas multiresistentes a los antimicrobianos, particularmente el fagotipo DT-104 (*Salmonella* Typhimurium DT-104), que presenta resistencia a ampicilina, cloramfenicol, estreptomina, espectinomicina, sulfonamidas y tetraciclinas. Entre el 80 y el 90% de los aislados de DT-104 muestran este patrón de resistencia (Carattoli *et al.*, 2002; Meunier *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las principales formas de transferencia de factores de resistencia entre cepas bacterianas, son la transferencia vertical, esto quiere decir que en la replicación celular, la célula madre le va a transferir los genes de resistencia a las células hijas, perdurando de esta manera la característica de resistencia en una estirpe microbiana; sin embargo, también se ha demostrado la capacidad de transferencia de factores de resistencia por medio de

elementos genéticos como plásmidos, transposones y grupos de ADN llamados integrones, que pueden ser transferidos entre cepas del mismo género e incluso entre géneros distintos (Frana *et al.*, 2001).

Las tetraciclinas y la estreptomícina son antimicrobianos ampliamente utilizados no solo en la terapéutica en humanos, sino también como profilácticos y promotores de crecimiento en animales de engorda; sin embargo, estos antimicrobianos también son ampliamente utilizadas para prevenir y tratar enfermedades bacterianas en plantas, sin embargo, no existen estudios epidemiológicos rigurosos del potencial de generación de resistencia por esta práctica, suponiendo que esta actividad tiene una contribución insignificante en la generación de cepas entéricas resistentes a los antimicrobianos (Phillips *et al.*, 2004).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por serotipo

En la Tabla 9, se muestra la concentración mínima inhibitoria (CMI) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por serotipos.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por serotipo.

Serotipo	CMI a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ppm)
Typhimurium	1600 ^a (4 ^b /13 ^c)
	1550 (3/13)
	1500 (5/13)
	1350 (1/13)
Agona	1600 (1/1)
Oranienburg	1550 (1/1)
Anatum	1200 (1/1)
Infantis	1650 (1/2)
	1400 (1/2)
Minnesota	1600 (1/1)
Clayvillian	1500 (1/1)
Rubislaw	1550 (1/1)
Grupo F	1500 (1/1)
Grupo D monofásica	1550 (1/1)
Give	1550 (1/1)

^a CMI de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

^b Número de cepas del mismo serotipo que fueron inhibidas a esa concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

^c Número total de cepas del mismo serotipo.

Del total de cepas del género *Salmonella* evaluadas para CMI de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, presentaron altos niveles de resistencia, fluctuando entre 1200 ppm, y 1600 ppm, aunque no se presentó un patrón en común para los diversos serotipos ni para regiones de muestreo. Martin, *et al* (2004), mencionan que cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Barbados, fueron evaluadas para CMI a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por el mismo

método que se utilizó en esta investigación, y consideraban resistentes a aquellas cepas bacterianas que crecían a una concentración de 200 µg/mL (200 ppm), por lo que, si comparamos esos resultados con los obtenidos en nuestra investigación, podemos decir que las cepas de *Salmonella* evaluadas en nuestra investigación, presentan un rango de resistencia a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de 6 a 8 veces más alto que las cepas de *Xanthomonas* evaluadas en esa investigación.

El cobre, ha sido utilizado como ingrediente activo de productos bactericidas y fungicidas en cultivos de frutas y hortalizas por más de 100 años (Williams *et al.*, 1993); sin embargo, desde la década de 1980s, la frecuencia en la tolerancia de bacterias fitopatógenas a cobre ha venido en aumento. En particular, cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* con resistencia a cobre han sido asociadas con brotes de enfermedad y graves pérdidas en los cultivos en muchos países, incluyendo Estados Unidos, Taiwán, Korea, Barbados y México (Martín *et al.*, 2004), y en Sinaloa, no ha sido la excepción, ya que debido a la intensa producción agrícola, temperaturas y humedades que fluctúan en la región, favorecen el crecimiento de bacterias fitopatógenas, por lo que la aplicación de productos a base de cobre y antimicrobianos son constantemente utilizados como único método de control para estas enfermedades (Gaxiola, 2000). En base a los resultados obtenidos y los antecedentes que se tienen, podemos inferir que los altos niveles de resistencia que las cepas del género *Salmonella* presentan a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, se deben al uso indiscriminado de estos productos en el valle agrícola de Culiacán.

Existen diversas formas por las que las bacterias pueden adquirir resistencia a sales de cobre. Uno de ellos, es por medio de la constante exposición a estos productos en el ambiente, generando sistemas de resistencia al modificar sus genes y por lo tanto su fisiología, por lo que al existir una cepa resistente y multiplicarse, se genera una transferencia vertical, esto significa que la célula madre le “hereda” esos genes de resistencia a las células hijas, formando una estirpe bacteriana con genes de resistencia a estos productos; otro mecanismo de resistencia, es por medio de la transferencia de genes de resistencia entre cepas de la misma especie, y aún todavía, entre cepas de distintas especies (Mandal *et al.*, 2003), conocida como transferencia horizontal. La transferencia horizontal, se puede dar por medio de diversos mecanismos, dentro de los principales, se encuentran: la transferencia de plásmidos, que son fragmentos de ADN circular que son autoreplicables dentro de la bacteria, y tienen la capacidad de ser transferidos de una célula a otra (Frana *et al.*, 2001; Randall *et al.*, 2004), también, estos genes pueden ser adquiridos por las células bacterianas al ponerse en contacto con fragmentos cortos de ADN que se encuentran en el ambiente, provenientes de células lisadas, conocidos como integrones y también se puede dar por medio de la entrada de bacteriófagos a las células, que son portadores de los genes de resistencia. Los principales mecanismos por los que los genes de resistencia a cobre ejercen su acción, es por medio del “secuestro” y acumulación del cobre (gen *cop*), y por medio de flujo dependiente de energía y poca acumulación del mismo (gen *pco*). Este último gen, se ha encontrado en cepas de *Citrobacter freundii* y del género *Salmonella* (Williams *et al.*, 1993).

En esta investigación no se tuvo el alcance de analizar las cepas de *Salmonella* a nivel genético en busca de genes de resistencia, sin embargo, los resultados fenotípicos obtenidos sugieren que la resistencia de estas cepas generaron su resistencia por la excesiva exposición a compuestos a base de cobre utilizados en la agricultura.

Aislamiento de *Escherichia coli* de agua de uso agrícola

En las Tablas 10, 11, 12 y 13, se muestran los resultados de la cuantificación de *E. coli* por región de muestreo.

Tabla 10. Cuantificación de *E. coli* en la región de Culiacán.

Punto de muestreo	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)
El 10	500
Canal 7	800
El 10 (2)	900
Canal 7 (2)	300
El limón	100
Canal 7 (3)	700
El 10 (3)	20
Catrin	1,400
Bronco	4
El limón (2)	00
La presita	20

Del total de muestras analizadas en la región de Culiacán, se obtuvieron 10 de 11 (90.90%) muestras positivas para la presencia de *E. coli*, teniendo un promedio de 431.27 UFC/100 mL.

Tabla II. Cuantificación de *E. coli* en la región de Villa Juárez.

Punto de muestreo	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)
San Isidro	1,100
Campo Estrella	600
Paredes	500
Sta. Marta	100
Canan	40
Podesta	182,000
Guajira	600
Gotsis	400
Bataoto	1,200
Pénjamo	3,500
Canan (2)	100
Sta. Marta (2)	1,100
Gotsis (2)	200
Podesta (2)	68,000
Hortitec	900
Guajira (2)	100
Gotsis (3)	200
Podesta (3)	76,000

De las muestras analizadas en la región de Villa Juárez, el 100% (18/18) fueron positivas para la presencia de *E. coli*, con un promedio de 18,702 UFC/100 mL.

Tabla 12. Cuantificación de *E. coli* en la región de Navolato.

Punto de muestreo	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)
EPSA nav.	600
Cofradía	1,500
EPSA nav. (2)	1,100
Fresno	4000
El Memo	3,000
La Sinaloa	1,200
EPSA nav. (3)	1,200
Fresno (2)	400
La Sinaloa (2)	200
Cofradía (2)	200
El Memo (2)	600

En la región de Navolato se analizaron un total de 11 muestras, de las cuales el 100% (11/11) fueron positivas para la presencia de *E. coli*, con un promedio de 1,272.72 UFC/100 mL.

Tabla 13. Cuantificación de *E. coli* en la región de Eldorado.

Punto de muestreo	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)
Campo 44	300
Eureka	100
Exportalizas	450,000
AUPA el grande	300
ExporMex	500
Campo 44 (2)	200
Eureka (2)	1,100
Campo 44 (3)	400
ExporMex (2)	100
Exportalizas (2)	200
El grande	28

En la región de Eldorado, se analizaron un total de 11 muestras y de estas 10 (90.90%) fueron positivas para la presencia de *E. coli* y teniendo un promedio de 41,202.54 UFC/100 mL.

En este estudio, la mayor prevalencia de *Escherichia coli* se presentó en la región de Eldorado, con un promedio de 41,202.54 UFC/100 mL, seguida de la región de Villa Juárez con un promedio de *E. coli* de 18,702 UFC/100 mL, enseguida Navolato, con un promedio de 1,272.72 UFC/100 mL de *Escherichia coli* y por último, la región de Culiacán con 431.27 UFC/100 mL. Estos resultados coinciden con los encontrados por Cázarez (2004), en el que encontró niveles de hasta 41,493.3 UFC/100 mL de contaminación fecal en muestras tomadas del valle de Culiacán.

Los resultados obtenidos en esta investigación, ponen de manifiesto los posibles riesgos de contaminación para las hortalizas que son irrigadas con esta agua, pero también la variabilidad de contaminación de los canales de los diferentes puntos de muestreo, ya que la región de Culiacán presentó niveles 96 veces más bajos que la región de Eldorado. Por una parte, la presencia de canales de concreto tiene un papel importante en impedir el acarreo de microorganismos fecales por el contacto con el suelo, ya que es un reservorio de contaminación fecal (Duffy *et al.*, 2005). Y por otra parte, durante el estudio se hicieron observaciones de la presencia de puntos de contaminación constantes para los canales de riego, encontrando una mayor presencia de fuentes de contaminación para los canales de la región de Eldorado y Villa Juárez, ya

que se pudieron observar desechos del hogar sobre el agua. En una investigación de campo (entrevista), con personal del departamento de Desarrollo de la Comisión Nacional del Agua (CNA), mencionan que aún existen algunos drenajes clandestinos de baños y letrinas de las pequeñas poblaciones aledañas a los canales de riego, por lo que se realizan monitoreos periódicos para tratar de erradicar estas fuentes de contaminación fecal y de esta manera los productores hortícolas tengan una mayor certidumbre en cuanto a la calidad microbiológica del agua de los canales del valle de Culiacán.

Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de *E. coli* aisladas de agua de uso agrícola por región de muestreo

En las tablas 14, 15, 16 y 17, se muestran los resultados del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos tetraciclina, estreptomicina y gentamicina.

Tabla 14. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Culiacán.

A n t i m i c r o b i a n o s

Punto de	Tetraciclina	Estreptomicina	Gentamicina
El 10	S	R	I
Canal 7	S	R	I
El 10 (2)	S	R	S
Canal 7 (2)			
El limón	R	R	R
Canal 7 (3)			
El 10 (3)	S	R	S
Castrín	S	R	S
Bronco	S	I	S
El limón (2)			
La presita	S	R	S

Tabla 15. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomina y gentamicina en la región de Villa Juárez.

A n t i m i c r o b i a n o s

Punto de muestreo	Tetraciclina	Estreptomina	Gentamicina
San Isidro	S	R	I
Campo Estrella	S	R	I
Paredes	S	R	S
Sta. Marta	R	R	I
Canan	R	I	S
Podesta	S	R	S
Guajira	R	R	S
Gotsis	S	R	S
Bataoto	----	----	----
Penjamo	----	----	----
Canan (2)	S	R	I
Sta. Marta (2)	S	I	I
Gotsis (2)	S	I	S
Podesta (2)	S	R	I
Hortitec	S	R	I
Guajira (2)	S	R	I
Gotsis (3)	R	R	I
Podesta (3)	R	R	I

Tabla 16. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Navolato.

A n t i m i c r o b i a n o s

Punto de	Tetraciclina	Estreptomicina	Gentamicina
EPSA nav.	R	R	I
Cofradía	R	R	I
EPSA nav. (2)	S	I	S
Fresno	S	R	I
El Memo	S	R	S
La Sinaloa	R	R	I
EPSA nav. (3)	S	R	S
Fresno (2)	S	I	S
La Sinaloa (2)	S	I	S
Cofradía (2)	S	R	I
El Memo (2)	S	R	I

Tabla 17. Perfil de susceptibilidad a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina en la región de Eldorado.

A n t i m i c r o b i a n o s

Punto de	Tetraciclina	Estreptomicina	Gentamicina
Campo 44	S	R	S
Eureka	S	R	I
Exportalizas	S	R	I
AUPA el grande	S	R	S
Expormex	S	R	I
Campo 44 (2)	S	R	S
Eureka (2)	I	R	S
Campo 44 (3)	S	I	S
Expormex (2)	S	R	I
Exportalizas (2)	S	R	S
El grande	S	R	I

Los resultados presentados en las tablas 15, 16, 17 y 18, muestran un patrón similar en cuanto al perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, no mayor al 31% independientemente de la región de muestreo para el caso de tetraciclina. Para estreptomicina, se presentó una elevada resistencia, con una prevalencia de 87.5% en Culiacán, 81.2% en Villa Juárez, 72.72% en Navolato y con un 90.9% en Eldorado. Para el caso de gentamicina, los niveles de resistencia permanecieron bajos, generalmente con susceptibilidad intermedia con un rango de 28.57 a 62.5% en las regiones de Culiacán y Villa Juárez, respectivamente.

La presencia de cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antimicrobianos en el ambiente, particularmente en los cuerpos de agua superficial, debe ser considerado un problema real de salud pública en el valle de Culiacán, debido a su constante presencia y más aún por sus concentraciones, ya que puede ser un constante vector de transferencia de genes de resistencia para cepas de importancia en salud pública, incluyendo los propios patotipos de *Escherichia coli*.

Si hacemos comparaciones en cuanto a la prevalencia de resistencia de las cepas de *Escherichia coli* y de los diversos serotipos de *Salmonella* aislados de agua de uso agrícola, resultaría obvio, si se hacen consideraciones de las concentraciones de ambos géneros bacterianos en el agua. Por un lado, la presencia del género *Salmonella* en los cuerpos de agua superficial es baja e intermitente (Waage *et al.*, 1999); mientras que por cada célula de *Salmonella* se pueden encontrar más de mil células de *Escherichia coli*,

con las mismas posibilidades de generación de resistencia por presión selectiva o bien, por transferencia de genes, colocándose como el vehículo predominante para la distribución de genes de resistencia (O'Brien, 2002).

La diferencia en la resistencia a gentamicina en los aislados de *Salmonella* y *Escherichia coli*, puede deberse a que desde los años de 1950, la aplicación de antimicrobianos en los campos de cultivo para el control de infecciones bacterianas ha sido una práctica común; sin embargo, mientras que la agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos (U.S.EPA), tiene registrados solo dos antimicrobianos para uso en la agricultura (Estreptomina y Tetraciclina), como agentes profilácticos en infecciones de los cultivos, en América latina, incluyendo México, actualmente se ha permitido el uso de otro antimicrobiano en la agricultura, la gentamicina (Vidaver, 2002), por lo que la generación de resistencia a gentamicina aún no se presenta, o los niveles de resistencia son bajos.

Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* de suelo de uso agrícola.

Se analizaron 35 muestras en el período de muestreo entre el 2 de Enero al 5 de Mayo de 2005. En ninguno de los casos se logró el aislamiento de ambos géneros bacterianos. Duffy *et al* (2005) analizaron 12 muestras de suelo sin lograr el aislamiento en ninguna de las muestras. Esto no significa la ausencia de la misma, ya que diversos factores contribuyen a ese fenómeno, entre ellos que las bacterias presentes de manera

natural en el suelo pueden inhibir o enmascarar la presencia de *Salmonella* y otras bacterias de interés como ocurrió en nuestro caso con *Escherichia coli*, ya sea por competencia por nutrientes debido a las altas concentraciones de microorganismos de la microflora del suelo, o bien por la presencia de *Salmonella* en el ambiente en su forma de ser viable pero no cultivable al estar enfrentando ambientes hostiles para su desarrollo (Caro *et al.*, 1999; Santo Domingo *et al.*, 2000). En nuestra investigación, sugerimos que posiblemente las metodologías empleadas en nuestro estudio no fueron adecuadas para conseguir los objetivos.

CONCLUSIONES

1. Se encontró la presencia del género *Salmonella* y altos niveles de *Escherichia coli* en agua de uso agrícola en el valle de Culiacán; sin embargo, existen diferencias en los niveles de contaminación con estos microorganismos en esta región agrícola.
2. No se logró el aislamiento del género *Salmonella* y *Escherichia coli* de suelo de uso agrícola en el valle de Culiacán.
3. Existen diversos serotipos del género *Salmonella* presentes en agua de uso agrícola en el valle de Culiacán, siendo el serotipo Typhimurium el de mayor prevalencia con un 50%.
4. El 100% de las cepas de *Salmonella* fueron susceptibles a ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y gentamicina.
5. El 57.89% de las cepas de *Salmonella* fueron resistentes a tetraciclina.
6. Las cepas de *Escherichia coli* presentaron altos niveles de resistencia a estreptomycin, con valores desde 72.72 a un 90.9%.

RECOMENDACIONES

1. El agua de uso agrícola en el valle de Culiacán, debe cumplir con lineamientos de seguridad en cuanto a la calidad microbiológica, por lo que se recomienda hacer monitoreos constantes de la calidad en este aspecto; ya que a medida que se mejoren los sistemas de calidad, habrá una mayor certidumbre de la inocuidad de las frutas y hortalizas producidas en el valle de Culiacán.
2. El uso excesivo de antimicrobianos en los campos de cultivo, puede jugar un papel importante en la generación de especies bacterianas con resistencia a los antimicrobianos, por lo que se recomienda hacer un uso adecuado de estos insumos en la agricultura sinaloense, debido a que la presencia de cepas bacterianas resistentes generan mayores riesgos de salud pública.

LITERATURA CONSULTADA

American Public Health Association (APHA). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. Washington DC.

American Public Health Association (APHA). 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th Edition. Washington DC.

Anónimo. 2002. Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 2000-2002. CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).

Anriany Y. A, Weiner R. M, Johnson J. A, De Rezende C. E. and Joseph S. W. 2001. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Displays a Rugose Phenotype. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No. 9, pp. 4048-4056.

Baloda S. B, Christensen L, and Trajcevska S. 2001. Persistence of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT12 Clone in a Piggery and in Agricultural Soil Amended with *Salmonella*-Contaminated Slurry. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No. 6, pp. 2859-2862.

- Barry A. L, Coyle M. B, Thornsberry C, Geralch E. H, and Hawkinson R. W. 1979. Methods of Measuring Zones of Inhibition with the Bauer-Kirby Disk Susceptibility Test, *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 10, No. 6, pp. 885-889.
- Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, and Lebaron P. 2000. Diversity of *Salmonella* Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 66, No 4. pp. 1544-1552.
- Beier R. C, Pillai S. D, Phillips T. D and Ziprin R. L. 2004. Preharvest and Postharvest Food Safety. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists. pp. 3-42.
- Bennasar A, De Luna G, Cabrer B, Lalucat J. 2000. Rapid Identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* Isolates by Polymerase Chain Reaction Based Fingerprinting Methods. *International Microbiology*. Vol. 3. pp. 31-38.
- Beuchat L. R, 1996. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*, Vol. 59, No. 2. pp. 204-216.
- Beuchat L. R and Ryu J. H. 1997. Produce Handling and Processing Practices. (Special Issue), *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 3, No. 4. pp. 459-465.

- Braoudaki M. and Hilton A. C. C. 2004. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-resistance to Antimicrobials Agents. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42, No. 1. pp. 73-78.
- Brenner F. W, Villar R. G, Angulo F. J, Tauxe R, and Swaminathan B. 2000. Guest Commentary. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 38, No 7. pp. 2465-2467.
- Brooks G. F, Butel J. S, Morse S. A. 2005. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 18ª edición, traducida de la 23ª edición En inglés. El manual moderno. pp. 159-188, 247-248, 252-254.
- Carattoli A, Filetici E, Villa L, Dionisi A. M, Ricci A, and Luzzi I. 2002. Antibiotic Resistance Genes and *Salmonella* Typhimurium Isolated in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 46, No. 9. pp. 2821-2828.
- Caro A, Got P, Lesne J, Binard S, and Baleux B. 1999. Viability and Virulence of Experimentally Stressed Nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, No. 7. pp. 3229-3232.

- Castillo A, Mercado I, Lucia L. M, Martínez R. Y, Ponce de León J, Murano E. A, and Acuff G. R. 2004. *Salmonella* Contamination during Production of Cantaloupe: A Binational Study. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 4. pp. 713-720.
- Cázarez D. G. 2004. Presencia y Sobrevivencia de *Listeria* sp., *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* en Agua de uso Agrícola en el Valle de Culiacán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC.
- Child M, Strike P, Pickup R, Edwards C. 2002. *Salmonella* Typhimurium Displays Cyclical Patterns of Sensitivity to UV-C Killing during Prolonged Incubation in the Stationary Phase of Growth. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS)*. Vol. 213. pp. 81-85.
- CIDH (Comisión para la Defensa de las Hortalizas). 2005. Citado en: <http://www.cidh.org.mx/accidh.php> (05-Oct-05).
- Comisión Nacional del Agua (CNA). 2005. Capítulo 4, Usos del agua. Estadísticas del agua en México. Citado en <http://www.cna.gob.mx> (26-Sep-05).
- Cortés O. L. A, Rodríguez A. G, Moreno E. E. A, Tenorio L. J. M, Torres M. B. P, Montiel V. E. 2002. Brote Causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. Vol. 44, No. 4. pp. 297-302.

- Cummings K, Barret E, Mohle B. J. C, Brooks J. T, Farras J, Hunt T, Fiore A, Komatsu K, Werren S. B, and Slutsker L. 2001. A Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Baildon Associated with Domestic Raw Tomatoes. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 7, No. 6, pp. 1046-1048.
- Darwin K. H and Miller V. L. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. Vol. 12, No 6. *Clinical Microbiology Reviews*. pp. 405-428.
- Delgado R. N, Muñoz B. J. L, Ibáñez P. R, García G. M. I, Serrano H. R, Muñoz C. S, García R. J. A. 2004. Resistencia a Antimicrobianos en *Salmonella* no Typhi en Castilla y León. *Rev. Esp. Quimioterap*. Vol. 17, No. 1, pp. 29-36.
- Duffy E. A, Lucia L. M, Kells J. M, Castillo A, Pillai S. D, and Acuff G. R. 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Profiling of *Salmonella* Isolated from Irrigation Water, Packing Shed Equipment, and Fresh Produce in Texas. *Journal of Food Protection*. Vol 68, No. 1, pp. 70-79.
- Euzéby J. P. 1999. Revised *Salmonella* Nomenclature: Designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Poppoff 1987 sp. Nov., nom. Rev. as the Neotype Species of the Genus *Salmonella* Ligneries 1900 (Approved Lists 1980), Rejection of Name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and Conservation of the Name *Salmonella typhi* (Schroeter

1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 49. pp. 927-930.

Ezaki T, Kawamura Y, and Yabuuchi E. 2000. Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Request for an Opinion. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 50. pp. 945-947.

Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling L. L, Brenner F. W, and Fields P. I. 2003. Molecular Analysis of the *rfb* O Antigen Gene Cluster of *Salmonella enterica* Serogroup O:6,14 and Development of a Serogroup-Specific PCR Assay. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69, No. 10. pp. 6099-6105.

Food and Drug Administration (U.S. FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2001. Outbreaks associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence Growth, and survival of pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Chapter IV, Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce.

(<http://www.vn.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4a.html>).

Frana T. S, Carlson S. A, and Griffith R. W. 2001. Relative Distribution and Conservation of Gene Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phage Type DT104. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, No. 1. pp. 445-448.

Galán J. E, Ginocchio C, and Costeas P. 1992. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of *invA* to Members of a New Protein Family. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174, No. 13. pp. 4338-4349.

Gaxiola E. G, 2000. Distribución de la Mancha Bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Doyge) Dye y su Detección de Resistencia a los Bactericidas. Tesis, Licenciatura en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía. Culiacán, Sinaloa.

Graves A. S. 2001. Reducing Copper and Chlorothalonil in Staked Tomato Production on Virginia's Eastern Shore. Thesis submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University Masters of Science in Plant Pathology.

Gutiérrez Cogco L. 1993. Cap. III-3 *Salmonella*, en: Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaría de Salud, México. pp. 219-239.

Gutiérrez-Cogco L, Montiel V. E, Aguilera P. P, González A. M. C. 2000. Serotipos de *Salmonella* Identificados en los Servicios de Salud de México. Salud pública de México, vol. 42, No. 6, pp. 490-495.

Harris L. 1997. Microbial Pathogens Associated with Produce. Perishables Handling Quarterly Issue No. 91, pp. 2-3.

Hsun C. C. and Ou J. T. 1996. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 34, No. 10, pp. 2619-2622.

Ingham S.C, Losinski J. A, Andrews M. P, Breuer J. E, Breuer J. R, Wood T. M, and Wright T. H. 2004. *Escherichia coli* Contamination of Vegetable Grown in Soil Fertilized with Noncomposted Bovine Manure: Garden Scale Studies. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70, No. 11, pp. 6420-6427.

Jawetz E, Melnick J. L, Adelberg E. A. 1979. Manual de Microbiología Médica. 8va edición. Editorial El manual moderno S. A. México D.F. pp. 249-252.

Johnson J. Y. M, Thomas J. E, Graham T. A, Townshend I, Byrne J, Selinger L. B, and Gannon V. P. G. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in

Surface Waters of Southern Alberta and Its Relation to Manure Sources. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 49. pp. 326-335.

Khachatourians G.G. 1998. Agricultural Use of Antibiotics and the Evolution and Transfer of Antibiotic-resistant Bacteria. *Canadian Medical Association (CMAJ)*, Vol. 3. pp. 1129-1136.

Kümmerer K. 2004. Resistance in the Environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 54. pp. 311-320.

LeChevallier M. W, Norton W. D, and Lee G. R. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In Surface water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, No. 9. pp. 2610-2616.

Lee S. M, Grass G, Rensing C, Barret S. R, Yates C. J. D, Stoyanov J. V, and Brown N. L. 2002. The Pco Proteins are Involved in Periplasmic Copper Handling in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 295. pp. 616-620.

Le Minor L, Popoff M. Y, and Bockwüthl J. 1990. Supplement 1989 (n° 33) to the kauffmann-White scheme. *Research Microbiology*. Vol. 141. pp. 1173-1177.

Leon-Velarde C. G, Cai H. Y, Larkin C, Bell-Rogers P, Stevens R. W. C, Odumeru J. A. 2004. Evaluation of Methods for the Identification of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 from Poultry Environmental Samples. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 58. pp. 79-86.

Lipsitch M, Singer R. S, and Levin B. R. 2002. Cometary, Antibiotics in Agriculture: When is it time to close the barn door?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 99, No. 9. pp. 5752-5754.

Lopes L. M, Fabbriotti S. H, Ferreira A. J. P, Kato M. A. M. F, Michalski J, and Scaletsky I. C. A. 2005. Heterogeneity among Strains Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43, No. 4. pp 1968-1972.

Mandal S, Mandal M. D. and Pal K. N. 2003. Short communication, R-Factor in *Salmonella enterica* Serovar Typhi: Transfer to and Acquisition from *Escherichia coli*. *Jpn. Journal of Infectious Diseases*. Vol. 56. pp. 65-67.

Manulis S, Zutra D, Kleitman F, Dror O, David I, Zilbestaine M, and Shabi E. 1998. Distribution of Streptomycin-Resistant Strains of *Erwinia amylovora* in Israel and Occurrence of Blossom Blight in the Autumn. *Phytoparasitica*. Vol. 26. pp. 223-230.

Manulis S, Kleitman F, Shtienberg D, Shwartz H, Oppenheim D and Zilberstaine M. 2003. Changes in the Selectivity of *Erwinia amylovora* Populations to Streptomycin and Oxolinic Acid in Israel. *Plant Disease*. Vol. 87, No. 6. pp. 650-654.

Martin H. L., Hamilton V. A, Kopittke R. A. 2004. Copper Tolerance in Australian Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Contributes to Poor Field Control of Bacterial Spot of Pepper. *Plant Disease*. Vol. 88, No. 9. pp. 921-924.

McManus P. S. and Stockwell V. O. 2001. Antibiotic Use for Plant Disease Management in the United States. *Plant Health Progress*.

Citado en: <http://www.apsnet.org/education/feature/antibiotic/top.htm>.

Meunier D, Boyd D, Mulvey M. R, Baucheron S, Mammìna C, Nastasi A, Chaslus-Dancla E, and Cloeckaert A. 2002. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT 104 Antibiotic Resistance Genomic Island I in Serotype Paratyphi B. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 8, No. 4. pp. 430-433.

Naranjo J. E, Toranzos G. A, Rose J. B, and Gerba C. P. 1990. Occurrence of Enteric Viruses and Protozoan Parasites in water in Panama. *Proceedings Second Biennial, Water Quality Symposium: Microbiological Aspects*. pp. 15-19.

Nawaz M. S, Erickson B. D, Khan A. A, Khan S. A, Pothuluri J. V, Rafii F, Sutherland J. B, Wagner R. D, and Cerniglia C. E. 2001. Human Health Impact and Regulatory Issues Involving Antimicrobial Resistance in the Food Animal Production Environment. Regulatory Research Perspectives, Impact on Public Health. Vol. 1, Issue 1. pp. 1-10.

National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). 1997. Métodos de Dilución para en Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para Bacterias de Crecimiento Aeróbico – Cuarta Edición; Norma Aprobada, M7-A4. Vol. 17, No. 2.

National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). January, 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard. 8th Edition. M2-A8; Vol. 23, No. 1.

O'Brien T. F. 2002. Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. Clinical Infectious Diseases. Vol. 34 (Suppl. 3). pp. 578-584.

Okafó C. N, Humo V. J, Galadima M. 2002. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. The Science of the Total Environment vol. 311. pp. 49-56.

Palacios M. P, Lupiola P, Del Nero E, Pardo A, Rodríguez F, Pita M. L. y Tejedor M. T. 1999. Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. Estudios de la zona no saturada del suelo. pp. 127-130.

Paluszac Z, Ligocka A, Breza B. B, Olszewska H. 2003. The Survival of Selected Fecal Bacteria in Peat Soil Amended with Slurry. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Vol. 6, Issue 2.

Penteado A. L, Leitao M. F. 2004. Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. Food Control. Vol. 15. pp. 369-373.

Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R and Waddell J. 2004. Does the Use of Antibiotics in Food Animals Pose a Risk to Human Health? A Critical Review of Published data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 53, No. 5. pp. 28-52.

Polo F, Figueras M. J, Inza I, Sala J, Fleisher J. M, Guarro J. 1998. Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. FEMS Microbiology Letters. Vol. 160. pp. 253-256.

Popoff M. Y, Bockemuhl J, and Hickman-Brener F. W. 1996, Supplement 1995 (no. 39) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. Vol 147. pp. 765-769.

Randall L. P, Cooles M. K, Osborn M. K, Piddock L. V. J, and Woodward M. J. 2004. Antibiotic Resistance genes, Integrons and Multiple Antibiotic Resistance in Thirty-five Serotypes of *Salmonella enterica* Isolated from Humans and Animals in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 53. pp. 208-216.

Refsum T, Heir E, Kapperud G, Vardund T, and Holstad G. 2002. Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Comparison of Isolates from Avian Wildlife, Domestic Animals, and the Environment in Norway. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68, No. 11. pp. 5600-5606.

Riesenfeld C. S, Goodman R. M, and Handelsman J. 2004. Uncultured Soil Bacteria are Reservoir of New Antibiotic Resistance Genes. Environmental Microbiology. Vol. 6, No. 9. pp. 981-989.

Romero C. R. Microbiología y parasitología humanas. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. Primera edición, 1993. Editorial Médica panamericana. México. pp. 40-49, 259-264.

Santo Domingo J. W, Harmon S, Bennett J. 2000. Survival of *Salmonella* Species in River Water. *Current Microbiology*. Vol. 40. pp. 409-417.

Sayah R. S, Kaneene J. B, Johnson Y, and Miller R. 2005. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, No. 3. pp. 1394-1404.

Scaletsky I. C. A, Fabbriotti S. H, Silva S. O. C, Morais M. B, and Fagundes N. O. 2002. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 8, No. 8. pp. 855-858.

Schroeder C. M, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White D. G, Wagner D. D, McDermott P. F, Walker R. D, and Meng J. 2002. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, No. 2. pp. 576-581.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1999. Guía de Plaguicidas Autorizados de Uso Agrícola. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Sanidad Vegetal.

Shea K. M. 2003. Antibiotic Resistance: What is the Impact of Agricultural Use of Antibiotics on Children's Health. *Pediatrics*. Vol. 112, No. 1. pp. 253- 258.

Solórzano S. F, Miranda N. M C. 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud pública de México*, Vol. 40, No. 6, pp. 510-516.

Tay Z. J. 1994. *Microbiología y parasitología médicas*. 2da edición. Méndez Editores, México. (Cap. 22, coeditor: Pablo Mendoza Hernández).

Tay Z. J, Gutiérrez Q. M, Rodríguez Q. M, López M. R, Romero C. R. 1995. *Microbiología y parasitología médicas*. Méndez Editores, segunda edición. Reimpresión, pp. 1.62-1.66, 1.74-1.80.

Thong K. L, Goh Y. L, Radu S, Noorzaleha S, Yasin R, Koh Y. T, Lim V. K E, Rusul G, and Puthucheary S. D. 2002. Genetic Diversity of Clinical and Environmental Strains of *Salmonella enterica* Serotype Weltevreden Isolated in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40, No. 7, pp. 2498-2503.

Thurston E. J. A, Watt P, Down S. E, Enriquez R, Pepper I. L, and Gerba C. P. 2002. Detection of Protozoan Parasites and Microsporidia in Irrigation Waters Used for Crop Production. *Journal of food Protection*, Vol. 65, No. 2, pp. 378-382.

Tortora G. J, Funke B. R, Case C. L. 1985(6). *Microbiology an introduction*. Fifth Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp. 618-619.

- Vidaver K. A. 2002. Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture. *Clinical Infectious Disease*. Vol. 34 (Suppl. 3):S, pp. 107-110.
- Waage A. S, Vardund T, Lund V. and Kapperud G. 1999. Detection of Low Numbers of *Salmonella* in Environmental Water, Sewage and Food Samples by a Nested Polymerase Chain Reaction Assay. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 87, pp. 418-428.
- Wain J, Diem N. L. T, Kidgell C, James K, Fortune S, Song D. T, Ali T, Gaora P, Parry C, Parkhill J, Farrar J, White N. J, and Dougan G. 2003. Molecular analysis of *incH11* Antimicrobial Resistance Plasmids from *Salmonella* Serovar Typhi Strains Associated with Typhoid Fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 47, No. 9, pp 2737-2739.
- Williams H. R, Morgan A. G, Rouch D. A, Brown N. L, and Lee B. T. O. 1993. Copper-Resistant Enteric Bacteria from United Kingdom and Australian Piggeries. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, No. 8, pp. 2531-2537.
- Winfield M. D, and Groisman E. A. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, No. 7, pp. 3687-3694.
- www.agua.org.mx. (Citado en: <http://www.imacmexico.org>). 12-Sep-2005.

Yabuuchi E. and Takayuki E. 2000. Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *Salmonella choleraesuis* to "*Salmonella enterica*" and the creation of the term "neotype species", and for conservation of *Salmonella choleraesuis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 50, pp. 1693-1694.