



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

TESINA DE LICENCIATURA

Departamento de Patología Animal, Producción Animal,
Bromatología y Tecnología de los Alimentos

CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO
PLASMÍDICO DE *HAEMIA ALVEYI* Y SU APLICACIÓN
EN VETEROPATOLOGÍA

Daniel Párraga Castillo

2008

R. 2089

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
N.º Documento _____
N.º Copia 659292



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

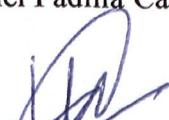
TESINA DE LICENCIATURA

**Departamento de Patología Animal, Producción Animal,
Bromatología y Tecnología de los Alimentos**

**CARACTERIZACION DEL CONTENIDO
PLASMIDICO DE *HAFNIA ALVEI* Y SU APLICACIÓN
EN ICTIOPATOLOGÍA**

Tesina de Licenciatura presentada por:

D. Daniel Padilla Castillo


El Tesinante,
(firma)

Dirigida por:

D. Fernando Real Valcárcel


El Director,
(firma)

**Las Palmas de Gran Canaria
2001**

A mis padres y hermanos

**A Elizabeth, que aportó a
mi vida algo que no sabía
que existía**

Indice

I.- INTRODUCCION	1
II.- REVISION BIBLIOGRAFICA	4
II.1.-MICROBIOLOGIA DE HAFNIA ALVEI	4
II.1.1.-TINCION, MORFOLOGIA Y MEDIOS DE CULTIVO	4
II.1.2.-PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE HAFNIA ALVEI	5
II.1.3.-DIFERENCIACION DE OTRAS ESPECIES BACTERIANAS Y/O GENEROS CERCANOS	6
II.2.-INTERES DE H.ALVEI EN ALGUNAS ESPECIES ANIMALES	8
II.3.-H.ALVEI COMO PATOGENO EN ACUICULTURA	12
II.4.-AGENTES ANTIMICROBIANOS Y FENOMENOS DE RESISTENCIA	14
II.4.1.-MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA	15
II.5.-GRUPOS ANTIBIOTICOS Y SU RELACION CON LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA	17
II.5.1.-ANTIBIOTICOS β-LACTAMICOS	17
II.5.2.-AMINOGLUCOSIDOS	20
II.5.3.-TETRACICLINAS	22
II.5.4.-FENICOLES	22
II.5.5.-MACROLIDOS	23
II.5.6.-TRIMETOPRIM	24
II.5.7.-QUINOLONAS	24
II.6.-INTERACCION DE H.ALVEI CON LOS ANTIBIOTICOS	26
II.7.-LOS PLASMIDOS EN LAS BACTERIAS: FUNCIONES	27
II.7.1.-PLASMIDOS DE RESISTENCIA	28
II.7.2.-PLASMIDOS DE PATOGENICIDAD	29
III.- MATERIAL Y METODOS	32
III.1.- MATERIAL Y METODOS GENERALES	32
III.1.1.- CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO	32
III.1.2.- MANTENIMIENTO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS	32
III.1.3.- METODOS DE LABORATORIO	32
III.1.3.1.- METODOS MICROBIOLOGICOS	32
III.1.3.2.- IDENTIFICACION MEDIANTE SISTEMA API-20E	45
III.1.3.3.- LISIS DE LA BACTERIA POR EL FAGO 1672	48
III.2.- METODOS ESPECIFICOS	50
III.2.1.- ANALISIS DEL CONTENIDO PLASMIDICO DE HAFNIA ALVEI	50
III.2.1.1.- EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO DE HAFNIA ALVEI	50
III.2.1.2.- ELECTROFORESIS DEL ADN PLASMIDICO EN GELES DE AGAROSA	54
III.2.2.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIOTICA	56
III.2.2.1.- ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO Y METODO	58
III.2.3.- MEDIDA DE PATOGENICIDAD	59

III.2.3.1.- ANIMALES SOMETIDOS A ESTUDIO	59
III.2.3.2.- INOCULACION EXPERIMENTAL	59
III.2.3.3.- CALCULO DE LA DOSIS LETAL-50	61
IV.-RESULTADOS	62
IV.1.-CARACTERES MICROBIOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE H.ALVEI UTILIZADAS	62
IV.2.-RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE HAFNIA ALVEI	64
IV.2.1.-ANTIBIÓTICOS DE USO EN ACUICULTURA	64
IV.2.2.-OTROS ANTIBIÓTICOS	66
IV.2.3.-RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE HAFNIA ALVEI PARA ESPECIES POIQUILOTERMAS	67
IV.3.-CONTENIDO PLASMIDICO DE H.ALVEI: PERFILES	69
IV.4.-RELACION DEL PERFIL PLASMIDICO CON:	71
IV.4.1.-ORIGEN DE LA CEPA	71
IV.4.2.-RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	72
IV.4.3.-PATOGENICIDAD	72
V.- DISCUSION	74
V.1.- COMPORTAMIENTO BIOQUÍMICO Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE HAFNIA ALVEI	74
V.2.- PERFIL PLASMIDICO Y SU RELACION CON RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y/O PATOGENICIDAD	76
VI.-CONCLUSIONES	80
VII.-RESUMEN	81
VIII.-SUMMARY	82
IX.-TABLAS Y FIGURAS	83
X.- BIBLIOGRAFIA	117
XI.-AGRADECIMIENTOS	125

Introducción

Introducción

En sanidad animal, y más concretamente en referencia con la ictiopatología, se conoce bastante poco sobre los mecanismos de virulencia y el desarrollo de la infección y/o enfermedad en especies continentales y marítimas en relación con *Hafnia alvei*.

Formando parte del medio ambiente, esta bacteria ha sido descrita en algunas ocasiones en el suelo y el agua (ALLEN, DA., 1985; SAKAZAKI y TAMURA, 1992). Igualmente, es de notar su presencia en los alimentos afectando a su calidad microbiológica, como la leche (TEXFORD y cols., 1975; KLEEBERGER y cols., 1980), la miel de las abejas (SALIMOV, RM., 1978), la carne enlatada de vacuno (REFAIE y cols., 1993), o la carne de porcino empaquetada (BORAH y cols., 1992).

Desde un punto de vista clínico, existen distintos cuadros asociados a esta especie bacteriana en varias especies animales como mastitis en ganado vacuno (BINDE y cols., 1982), abortos equinos (XIMENA y cols., 1983; MUKHERJEE y cols., 1986), neumonía caprina (SHARMA y cols., 1991), y septicemia en gallinas ponedoras (REAL y cols., 1997).

En cuanto al área de la acuicultura, también existen algunas descripciones relacionando su presencia en aguas de empresas de acuicultura continental (ALLEN y cols., 1983; ALLEN, DA., 1985), asociada a septicemia hemorrágica en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (GELEV y cols., 1990), y también provocando patología renal en salmón dorado (*Oncorhynchus masou*) infectados experimentalmente (TESHIMA y cols., 1992).

Igualmente, hay que destacar su papel clínico-patológico en Medicina Humana asociada a cuadros de enteritis, septicemias e infecciones urinarias (SAKAZAKI y TAMURA, 1992; KRIEG y SNEATH, 1994). Además, el curso natural de la infección se solapa clínicamente con los que pueden producir bacterias taxonómicamente cercanas como *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* y *Enterobacter spp.* (KELLY, 1993; RIDELL, 1987).

Por otro lado, es cada vez más evidente el problema que representa para la salud pública la resistencia bacteriana a los agentes quimioterápicos. La amplia utilización de ellos, tanto en terapéutica antibacteriana como en nutrición animal, ha favorecido la selección de cepas bacterianas resistentes a tales agentes, por lo que cada vez es más difícil la quimioterapia de las enfermedades infecciosas. Las bacterias sensibles a los quimioterápicos pueden llegar a ser resistentes por cualquiera de dos mecanismos básicos, las mutaciones y la transferencia de información genética entre bacterias mediada por plásmidos (GARCÍA RODRÍGUEZ, JA. 1987).

De los plásmidos existentes en estas bacterias y, junto a los plásmidos de resistencia antibiótica, se encuentran los plásmidos de virulencia, que pueden determinar un mayor o menor grado de daño en el hospedador, como es el caso del plásmido *pJM1*, presente en muchas cepas virulentas de *Vibrio anguillarum* (CROSA y cols., 1977).

Profundizar en el conocimiento de los perfiles plasmídicos en especies poco estudiadas como es el caso de la que nos ocupa constituye un reto importante desde un punto de vista científico, a la vez que incierto. Por otro lado, la finalidad de este eslabón supone

conocer mejor las razones mediante las cuales una cepa de *H.alvei* puede ser más o menos virulenta para una especie determinada y tener un espectro de resistencia antibiótica muy diferente a otras cepas conocidas.

Interconectar estas incógnitas en la Sanidad de la Acuicultura moderna forma parte de la meta de la línea de investigación en la que participamos.

Por todo lo expuesto, en el desarrollo del presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Profundizar en el comportamiento bioquímico de *Hafnia alvei*.
- 2.- Caracterizar los perfiles plasmídicos en cepas de *H.alvei* de distinta procedencia y fuente, y establecer posibles patrones.
- 3.-Determinar si alguno de estos plásmidos o perfiles plasmídicos se corresponden con una mayor o menor virulencia en trucha común (*Salmo trutta L*).
- 4.- Investigar si existe alguna interrelación entre resistencia antibiótica y presencia de un determinado perfil plasmídico en las cepas estudiadas.

Revisión Bibliográfica

II.1.- MICROBIOLOGIA DE HAFNIA ALVEI

II.1.1.- TINCION, MORFOLOGIA Y MEDIOS DE CULTIVO

Hafnia alvei en extensiones teñidas por el método de GRAM se presenta como un bacilo gram negativo, de 1.0 μm de diámetro y de 2.0 a 5.0 μm de largo, no capsulado (MÖLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992). La mayoría de los miembros del Género *Hafnia* son móviles por flagelos peritricos a temperaturas entre 25 y 30°C, pero esta motilidad se ve anulada cuando cultivamos las cepas de *Hafnia alvei* a 35°C. La máxima temperatura que permite el crecimiento de *Hafnia alvei* oscila entre 40 y 42°C y no crecen por debajo de los 5°C. Es anaerobia facultativa y presenta tanto metabolismo respiratorio como fermentativo (MÖLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

No existen medios especiales para el aislamiento de *Hafnia alvei*. Normalmente para su cultivo se utilizan medios no selectivos o poco selectivos que son usados de forma rutinaria para el aislamiento de enterobacterias (MÖLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992). Dentro de estos medio destacamos el agar MacConkey (Difco), el Xilosa-Lisina-deoxicolato (XLD) (Difco) y el medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Difco). También se usa en laboratorios clínicos para el aislamiento de *Hafnia alvei* el medio Agar Hektoen Entérico .

En medios muy selectivos como el agar Salmonella-Shigella (SS) (Difco) no se consigue el crecimiento en uno de cada 4 intentos de cultivo de *Hafnia alvei*. En agar Sulfato-Bismuto *Hafnia alvei* tampoco crece (MÖLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

En Agar Nutritivo *Hafnia alvei* crece muy bien dando unas colonias que van a ser mayores al tamaño normal, midiendo de 2 a 3 μm de diámetro.

No existen medios enriquecidos para el crecimiento de *Hafnia alvei*. Algunas cepas de *Hafnia alvei* crecen en medios como el Caldo Selenito y el Caldo de Tetrathionato, usados para el enriquecimiento de *Salmonella spp.* (MÖLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

R. SAKAZAKI y TAMURA (1992) usaron agar Mac Conkey adicionado con un 1% de sorbitol para hacer crecer cepas de *Hafnia alvei*, para diferenciarlas de otras bacterias intestinales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, las cuales fermentan el sorbitol dando colonias rosas o rojas, cosa que no ocurre en el caso de *Hafnia alvei*.

II.1.2.- PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE HAFNIA ALVEI

El Género *Hafnia* se caracteriza por ser bacterias oxidasa negativas y catalasa positivas. Reducen los nitratos a nitritos. Se le define como un género que no produce ácido sulfhídrico (H_2S) en el Agar Hierro de Kligler, pero MÖLLER (1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992) y KAUFFMANN (1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992) describen a *Hafnia alvei* como productor de H_2S al provocar un débil oscurecimiento del medio de gelatina con cloruro férrico (KAUFFMAN, 1951, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992), del medio de SIM (Difco) y del medio hierro peptona (Difco). EWING (1960, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992) sugiere que ni el

medio Agar Hierro de Kligler ni el Agar TSI son medios estándar para evaluar la producción de H₂S de la Familia *Enterobacteriaceae*, pero lo que si permiten con facilidad estos medios es la diferenciación de diferentes géneros dentro de esta Familia. *Hafnia alvei* no produce gelatinasa, lipasa ni desoxiribonucleasa. No utiliza el alginato. No produce fenilalanina desaminasa. Las pruebas de lisina y ornitina decarboxilasa son positivas, mientras que la arginina dehidrolasa es negativa. La glucosa es fermentada con producción de ácido y gas. Producen ácido pero no gas a partir de arabinosa, maltosa, xilosa, ramnosa, trealosa, manosa y glicerina. No producen ácidos a partir de sorbitol, rafinosa, sacarosa, inositol y lactosa. Según LE MINOR y COYNAULT (1976, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992) *Hafnia alvei* puede ser lactosa positiva a través de un vector plasmídico. La prueba de rojo metilo da positiva a 35°C y negativa a 22°C. El acetilmetilcarbinol es producido normalmente a partir de la glucosa entre 22 y 28°C pero no a 35°C. El crecimiento en el medio KCN (Difco) es positivo. La hidrólisis de la esculina es negativa así como la producción de indol. Las características generales del Género *Hafnia* son mostradas en la Tabla 3.

II.1.3.- DIFERENCIACION DE OTRAS ESPECIES BACTERIANAS Y/O GENEROS CERCANOS.

Hafnia spp. es difícil de diferenciar microbiológicamente de otros patógenos comunes en veterinaria. Lesiones septicémicas provocadas por *Hafnia spp.* en muchas especies son muy similares a las producidas por *Salmonella spp.* según KELLY (1993) y RIDELL (1987). Infecciones

Revisión bibliográfica

causadas por *Salmonella spp.* pueden ser particularmente problemáticas, debido a que las colonias de *Hafnia spp.* se confunden con las de *Salmonella spp.* en los medios rutinarios de cultivo causando confusión a la hora de determinar la identidad de ese microorganismo (SAKAZAKI y TAMURA, 1992). Según EVELAN y FABER (1953) y HARADA y cols. (1957) cultivos de *Hafnia spp.* han sido aglutinados con antígeno O de *Salmonella spp.* lo cual lleva a error en la identificación.

Además de la dificultad para diferenciarla de *Salmonella*, *Hafnia* presenta problemas de diferenciación con otros géneros como *Enterobacter* (*E. aerogenes* y *E. gergoviae*) y *Serratia spp.* (SAKAZAKI y TAMURA, 1992). A tales efectos ha demostrado ser extraordinariamente útil el sistema de identificación Microscan (Dade Microscan, Inic, Sacramento, California) (RODRIGUEZ y cols., 1999).

II.2.-INTERES DE HAFNIA ALVEI EN ALGUNAS ESPECIES ANIMALES

Hafnia alvei ha sido descrita durante los últimos años en numerosas ocasiones asociada a diferentes cuadros de enfermedad, afectando a distintas especies animales como son :

Aves

REAL, F y cols. (1997) describen el primer caso de una septicemia originada en gallinas ponedoras por *Hafnia alvei*, con un curso muy similar al originado por *Salmonella spp*, provocando una importante bajada en la puesta, pérdida de apetito, opistótonos y muerte. Las lesiones microscópicas halladas fueron una hepatitis necrótica multifocal e intensa esplenitis..

Equidos

Hafnia alvei ha sido aislada en varias ocasiones asociada a abortos en équidos. KUME (1962, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992) describe un caso de aborto equino en el cual *Hafnia alvei* fue aislada en cultivo puro del feto y de la placenta. También se produjo un alto título de anticuerpos aglutinantes en la yegua convaleciente.

XIMENA y cols. (1983) describen el caso de una yegua que aborta de forma espontánea al 8º mes de gestación. Al realizar la necropsia del feto su aspecto era normal y el examen macroscópico de sus vísceras sólo reveló en el hígado una pequeña zona blanquecina de unos 5 mm en su cara parietal. El examen de la placenta fue totalmente normal. Tanto del

feto como de la placenta se logró aislar en cultivo puro *Hafnia alvei*, por lo que se la consideró la responsable del aborto. Además en la yegua se encontraron gran cantidad de anticuerpos aglutinantes frente a *Hafnia alvei*.

MUKHERJEE y cols. (1986) describen el caso de una yegua que aborta a los 122 días de gestación. El animal presentó descarga vaginal durante 13 días y luego abortó. La única bacteria que se aisló e identificó de sangre extraída del corazón, líquido amniótico y contenido estomacal del feto fue *Hafnia alvei*.

Se realizó un ensayo de patogenicidad, usando cuatro ratones, inoculando dos ratones vía intraperitoneal con 0.5 ml de un cultivo en caldo de peptona de la bacteria aislada, y otros dos como controles. Todos los ratones fueron sacrificados a los tres días postinoculación y su necropsia no reveló daños macroscópicos aparentes. La bacteriología de sangre de corazón, bazo, hígado, riñón y pulmón no reveló la presencia de bacterias en estos órganos, pero sí el posterior cultivo que permitió el aislamiento e identificación de *Hafnia alvei*.

Rumiantes

BINDE y HERMANSEN (1982) realizan un estudio en vacas afectadas con mastitis y encuentran que además de los agentes comunes en las mastitis, se aíslan un 25% de *Bacillus subtilis* y un 25% de *Hafnia alvei* asociados a mastitis de tipo crónico.

JANSEN y HAYES (1983) describen un cuadro de retraso en el crecimiento de la lana de la oveja de raza Merino debida a una infección

bacteriana de la dermis por diversas especies del género *Enterobacter* y por *Hafnia alvei*, que provocaban un cuadro de hiperemia e infiltración celular en la dermis que retrasaba el crecimiento de la lana.

SHARMA y cols. (1991) realizaron un estudio sobre un colectivo de cabras afectado de neumonía en diferentes grados y realizaron cultivos bacterianos de muestras de pulmón de animales sacrificados, obteniendo que *Hafnia alvei* suponía un 9.83% del total de especies bacterianas aisladas de dichas muestras.

Abejas

Es una de las especies de las que más se aísla esta bacteria relacionada con enfermedad y muerte.

GLINSKI y cols. (1994) citan a *Hafnia alvei* como agente secundario de una infección septicémica en abejas. *Hafnia alvei* fue aislada del contenido intestinal, de los tejidos de las abejas afectadas, así como de la miel de la colmena.

KAUKO y GLINSKI (1994) aislaron *Hafnia alvei* del tracto digestivo y tejidos de abejas. Realizaron un ensayo de patogenicidad inoculando un cultivo de *Hafnia alvei* a abejas sanas mediante inyección en el tórax provocando un cuadro septicémico con una mortalidad del 90%, y reaislando posteriormente *Hafnia alvei* en cultivo puro de los tejidos de las abejas muertas.

GLINSKI y cols. (1995) describen un caso de mortalidad en abejas. Realizaron cultivos bacterianos de tejidos e intestinos de abejas, así como de miel de la colmena identificando a *Hafnia alvei* como agente primario en la infección septicémica en abejas, después de eliminar mediante estudios diferenciales otras enfermedades como infecciones virales, envenenamiento por pesticidas, infestación por *Malpighamoeba mellificae* o *Acarapis woodi*.

II.3.- HAFNIA ALVEI COMO PATOGENO EN ACUICULTURA.

GELEV, E y cols. (1990) aislaron una bacteria de un brote epizoótico de septicemia hemorrágica en trucha arcoiris, la cual después de realizarle pruebas bioquímicas, fagotipia e hibridación del DNA la identifican como *Hafnia alvei*.

TESHIMA y cols. (1992) aíslan e identifican *Hafnia alvei* a partir de una lesión en el riñón de un salmón rojo (*Oncorhynchus masou*), a partir de una infección natural, y posteriormente realizaron un estudio de patogenicidad para lo cual se inocularon vía intraperitoneal cuatro grupos de peces: uno testigo, un segundo de 40 peces de unos 15 grs de peso que se inoculó una sola vez, un tercer grupo de 30 peces que se inoculó dos veces con una separación de dos semanas entre ambas inoculaciones y un cuarto grupo de 30 peces que se inoculó tres veces con una separación de de cuatro días. Además de estos cuatro grupos se inoculó un grupo de peces juveniles de un peso de unos 60 grs vía intraperitoneal con un cultivo puro de *Hafnia alvei* en cuatro ocasiones a intervalos de cuatro días.

Los riñones de todos los peces fueron examinados para determinar la presencia o no de lesiones después de dos semanas a un mes de haber comenzado a mostrar síntomas clínicos.

Los peces testigo no mostraron ningún signo de enfermedad. Un 40% de los peces del grupo segundo mostraron signos a los 3 meses de la inoculación mientras los peces del tercer grupo mostraron signos de

enfermedad a los 32 días de la primera inoculación, y los signos fueron evidentes en un 41% de los peces después de los 57 días. Los peces del cuarto grupo comenzaron a mostrar signos a partir del día 12 de la primera inoculación y en un 36% de ellos los signos fueron evidentes después de 26 días. En los peces juveniles inoculados la incidencia fue de un 15% después de los 41 días de la primera inoculación.

Los signos que mostraron los peces externamente fueron oscurecimiento de la superficie corporal, abdomen hinchado y natación lenta. No presentaban exoftalmos. Internamente aparecían diferentes zonas blanco-grisáceas prominentes en la cara ventral del riñón.

RODRIGUEZ y cols (1998) determinaron las dosis letales 50 de siete cepas de *Hafnia alvei* de distinta procedencia mediante inoculaciones intraperitoneales experimentales en trucha común (*Salmo trutta*, L), determinando así las diferencias existentes del grado de patogenicidad de las cepas estudiadas, las cuales estuvieron comprendidas entre 1.3×10^4 y 2.5×10^7 ufc*/ml. En este trabajo resultó evidente la susceptibilidad de la trucha común a enfermar en el curso de una infección por dicho patógeno.

*ufc= unidades formadoras de colonias

II.4.- AGENTES ANTIMICROBIANOS Y FENOMENOS DE RESISTENCIA

Los agentes antimicrobianos se comportan de diversa manera, y así, pueden actuar como bactericidas (producen la muerte del agente infeccioso, como son los β -lactámicos, aminoglucósidos, polimixinas, quinolonas y nitrofurantoínas) o como bacteriostáticos (inhiben el crecimiento bacteriano, como son las tetraciclinas, cloranfenicol y similares, macrólidos, sulfamidas y trimetoprim).

En cuanto a los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos, tenemos los siguientes:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular en fases diversas de la síntesis: β - lactámicos, bacitracina, fosfomicina.
- Desorganización de la membrana citoplasmática, lo que conduce a la desintegración celular: polimixinas, anfotericina B.
- Inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas; en la subunidad 30S las tetraciclinas, en la subunidad 50S el cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas; y en ambas subunidades los aminoglucósidos.
- Interferencia en la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos nucleicos: rifampicina, quinolonas y metronidazol.

- Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico: sulfamidas y trimetoprim.

II.4.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia de una bacteria a un agente antimicrobiano puede darse por dos mecanismos diferentes, la resistencia natural o la resistencia adquirida (PRESCOTT, JF. 1988).

La resistencia natural, también llamada insensibilidad, se produce porque el microorganismo carece del sitio o molécula receptora a la que debe fijarse el antimicrobiano para poder ejercer su acción, o porque poseen una membrana o una pared celular que impiden el acceso de la molécula antibiótica hasta el sitio activo (PRESCOTT, JF. 1988).

La resistencia adquirida se produce cuando una cepa inicialmente sensible, desarrolla un mecanismo que resta actividad a dicho agente. Toda resistencia supone la aparición de una modificación genética en la bacteria. Inicialmente este cambio aparece en un número reducido de bacterias, y en la mayoría de los casos es ajeno a la presencia del antibiótico. Pero la acción letal del antibiótico sobre las cepas sensibles origina una selección de las resistentes, por lo que su proporción aumenta en grado diverso, pudiendo alcanzar una concentración que hace ineficaz el tratamiento antibiótico.

La resistencia bacteriana a los antibióticos se adquiere por los siguientes mecanismos (GARCIA RODRIGUEZ, JA. 1987):

- **Mutación cromosómica.**

Consiste en un cambio, ocurrido espontáneamente, en la secuencia de nucleótidos de un gen del cromosoma bacteriano, por lo que la bacteria desarrolla un mecanismo que le hace resistente al antibiótico.

Este cambio carece de carácter adaptativo por cuanto aparece al azar y, en principio, en ausencia del antibiótico en cuestión.

- **Recombinación o transferencia genética.**

Consiste en la transferencia, de una bacteria a otra, de genes que condicionan la resistencia bacteriana a los antibióticos. Esta transferencia puede realizarse por procesos de transformación, de transducción por bacteriófagos o por conjugación a través de plásmidos o trasposones. De estos tres mecanismos, sin lugar a dudas el más importante es el mediado por la conjugación a través de plásmidos, que llevan en su constitución los genes responsables de la resistencia, de ahí que se llamen plásmidos de resistencia o plásmidos R.

II.5.- GRUPOS ANTIBIOTICOS Y SU RELACION CON LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.

II.5.1.-ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS

Bajo esta denominación se agrupa un número continuamente creciente de antibióticos cuyo origen se remonta a 1928, cuando Fleming descubrió que un hongo del género *Penicillium* producía una sustancia, posteriormente denominada penicilina por él mismo, capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. La Familia de las cefalosporinas se inició en 1948 cuando Botzu obtuvo, a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*, material activo frente a *Staphylococcus aureus*.

Actualmente, penicilinas y cefalosporinas forman el grupo de antibióticos más amplio en número y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Su mecanismo de acción es el de alterar la pared celular bacteriana, ya que inhiben la última etapa de la síntesis del peptidoglicano.

Penicilinas

Las penicilinas se pueden dividir en cuatro grupos en función de su actividad antimicrobiana (PRESCOTT, JF. 1988).

1) penicilinas con actividad máxima frente a bacterias gram positivas, pero sensibles a la actividad de las betalactamasas, como es el caso de la penicilina G.

La resistencia de las bacterias gram positivas, y en particular la de *Staphylococcus aureus*, a la penicilina G, es debida principalmente a la producción de betalactamasas mediada por **plásmidos**. Por el contrario, ciertos grupos de bacterias gram negativas, entre los que están las enterobacterias, y por lo tanto, *Hafnia alvei*, poseen una resistencia natural a la penicilina G debido a la escasa permeabilidad celular y a que carecen de proteínas fijadoras de betalactamasas. En el resto de bacterias gram negativas, la resistencia se debe principalmente a la producción de betalactamasas mediadas por **plásmidos**.

2) Penicilinas resistentes a las betalactamasas, pero inactivas frente a las bacterias gram negativas, como son la meticilina y oxacilina.

3) Penicilinas activas frente a bacterias gram positivas y gram negativas, pero sensibles a la actividad de la betalactamasas, cuyo mecanismo fundamental es el de producir la hidrólisis de la molécula del antibiótico con apertura del anillo β -lactámico y su inactivación biológica. La producción de estas β -lactamasas está mediada por **plásmidos**, y así, las existentes con mayor frecuencia son las que de acuerdo con su actividad hidrolítica, se clasifican como betalactamasas de tipo TEM (descomponen con mayor facilidad a la penicilina G y ampicilina, que a la meticilina y cloxacilina). Las betalactamasas de tipo OXA son menos frecuentes, e hidrolizan la oxacilina, cloxacilina y fármacos emparentados. Dentro de este grupo cabe destacar a la ampicilina y a la amoxicilina.

Cefalosporinas

Tienen actividad frente a las bacterias gram positivas, mientras que su actividad frente a las gram negativas depende tanto de su capacidad para pasar al interior de la célula bacteriana, como para resistir a la actividad destructiva de la betalactamasas de estas bacterias.

Las cefalosporinas importantes desde el punto de vista clínico se dividen en generaciones (PRESCOTT, JF. 1988).

1) cefalosporinas de primera generación

Son activas frente a las bacterias gram positivas, y resistentes a la penicilasa de *S. aureus*. Entre las bacterias gram negativas, son sensibles *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella*, y su posible resistencia estaría mediada por betalactamasas mediadas por **plásmidos**, mientras que los Géneros *Enterobacter* y *Acinetobacter* son resistentes debido a la existencia de betalactamasas cromosómicas inducibles, A este grupo pertenecen la cefalotina y el cefadroxilo.

2) Cefalosporinas de segunda generación

Son más resistentes que las de primera generación a las betalactamasas de las bacterias gram negativas, siendo generalmente sensibles a las especies de *Proteus* indol positivo y frente a las especies del Género *Enterobacter*, así como también frente a aquellas bacterias que son sensibles a las cefalosporinas de primera generación. No son activas frente a la mayoría de especies de *Acinetobacter* ni frente a

Serratia. Pertenecen a este grupo el cefamandol, la cefoxitina y cefuroxime.

3) cefalosporinas de tercera generación

Se caracterizan por ser algo menos activas frente a las bacterias gram positivas, pero extraordinariamente activas frente a las bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae*. La cefoperazona es sensible a las betalactamasas de tipo TEM de las Enterobacterias. La sensibilidad a cada una de las cefalosporinas de tercera generación se debe determinar por separado, ya que todas ellas tienen distinto grado de actividad frente a los distintos géneros y especies bacterianas. Pertenecen a este grupo la cefotaxima, la cefoperazona y cefquinome.

Diversos autores han descrito **plásmidos** que codifican resistencia a las cefalosporinas junto con la de otros antibióticos como los aminoglucósidos (VLIEGENTHART, JS. 1989).

II.5.2.- AMINOGLUCOSIDOS

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de antibióticos de gran importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, fundamentalmente por su acción sobre enterobacterias y otras bacterias gram negativas.

Revisión bibliográfica

El primero que se obtuvo fue la estreptomicina, a partir del *Streptomyces griseus*. De otras cepas de *Streptomyces* se obtuvieron la neomicina y kanamicina, mientras que la gentamicina fue aislada de diferentes especies del Género *Micromonospora* (ESPLUGES, 1981). La amikacina es un derivado por modificación química de la kanamicina. En cuanto a su mecanismo de acción, se basa en la inhibición de la síntesis proteica al interactuar sobre las subunidades 30S y/o 50S.

El mecanismo de resistencia bacteriana más importante a los aminoglucósidos se produce por la síntesis de enzimas bacterianas que, al modificar la estructura química de los aminoglucósidos, reducen su actividad antibacteriana (FOSTER, T.J. 1983). La información genética necesaria para la síntesis de estas enzimas está contenida en **plásmidos**, transmitiéndose por conjugación a las bacterias gram negativas (BRYAN, LE. 1984).

En el caso de la estreptomicina, la resistencia plasmídica es con frecuencia una resistencia múltiple y suele ir ligada a los genes de resistencia a las sulfamidas, ampicilina y tetraciclinas (BROWN, AW. y cols., 2000).

WIENER, J. y cols. (1999), encontraron un **plásmido** conjugativo de 54 kilobases que confería a cepas de *Klebsiella* y *Escherichia coli* resistencia antibiótica frente al trimethoprim y a la gentamicina.

II.5.3.- TETRACICLINAS

La primera de ella, la clortetraciclina, fue obtenida en 1948 a partir del *Streptomyces aureofaciens*. En 1950 se aisló de *Streptomyces rimosus* la oxitetraciclina.

En cuanto a su mecanismo de acción, las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al fijarse a la subunidad ribosómica 30S. Muchas bacterias gram negativas no entéricas son sensibles, pero *Pseudomonas aeruginosa* y las enterobacterias suelen ser resistentes.

El sistema de resistencia bacteriana es debido a la alteración en el transporte activo del antibiótico en el citoplasma bacteriano. Esta resistencia está mediada por **plásmidos** (MAYER, KH. y cols. 1997).

BHALLA, P. y cols. (1998) en un estudio sobre *Neisseria gonorrhoeae* encuentra un **plásmido** de 25.2 Mdaltos que codifica la resistencia a la tetraciclina

RIVERA, MJ. y cols. (1984) , así como KOTARSKI, SF. y cols. (1986) hacen referencia a la existencia de **plásmidos** que codifican la resistencia antibiótica de tetraciclinas junto a aminoglucósidos.

II.5.4.- FENICOLES

El cloranfenicol se aisló inicialmente de una cepa de *Streptomyces venezuelae* en 1947, aunque hoy en día se obtiene mediante síntesis

química. Su mecanismo de acción es fijarse a la subunidad 50S del ribosoma tras penetrar por difusión facilitada en el citoplasma bacteriano.

El mecanismo de resistencia bacteriana más importante es la elaboración de enzimas acetiltransferasas inactivantes, siendo un mecanismo extracromosómico mediado por **plásmidos** (MAYER, KH. 1997).

II.5.5.- MACROLIDOS

Inhiben la síntesis de proteínas de las bacterias al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.

La aparición de resistencias se debe a diferentes mecanismos, como son:

- Muchas bacterias (enterobacterias) son intrínsecamente resistentes a la eritromicina debido a la dificultad de este antibiótico, una base débil, para atravesar la membrana externa de la pared bacteriana.
- Mutación cromosómica que induce alteraciones en el sitio de fijación de la subunidad 50S.

- Alteraciones en el ARN ribosómico de la subunidad 50S, mediadas por la transferencia de **plásmidos** que contienen el gen de una ARN-metilasa.

II.5.6.- TRIMETOPRIM

Su mecanismo de acción es el de impedir la síntesis del ácido tetrahidrofólico. Su asociación a las sulfamidas produce un efecto sinérgico y bactericida. Se ha señalado que la resistencia de los organismos al trimetoprim es cada vez mayor, sobre todo en *Enterobacteriaceae* (PRESCOTT, JF. 1988). La resistencia al trimetoprim está codificada por el trasposón Tn7 de origen plasmídico o cromosómico, aunque estudios recientes también lo achacan a un **plásmido** conjugativo de 150 Kb que codifica multiresistencia al trimetoprim y a la estreptomina, según DALSGAARD, A (2000) en un estudio realizado en *Vibrio cholerae* O1.

II.5.7.- QUINOLONAS

Desde la aparición del primer miembro de este grupo en 1962, el ácido nalidíxico, obtenido por síntesis a partir de la cloroquina, su importancia se ha ido incrementando de forma paralela al descubrimiento o síntesis de nuevos compuestos como son el ácido oxolínico y el flumequine, y, más recientemente, la enrofloxacin y marbofloxacin.

Revisión bibliográfica

Las quinolonas actúan interfiriendo en la síntesis del ADN al bloquear la reacción de superenrollamiento dependiente del ATP y catalizada por la girasa.

Las resistencias que presentan las bacterias frente a este grupo de quimioterápicos son cruzadas entre las de primera generación, y parece serlo también entre las fluorquinolonas entre sí. La base genética de estas resistencias no es plasmídica sino cromosómica.

II.6.- INTERACCION DE HAFNIA ALVEI CON LOS ANTIBIOTICOS

REUTER, G y cols. en 1979 analizaron varias cepas de *Hafnia alvei* procedentes de cerdos y encontraron altos niveles de resistencias antibióticas a la ampicilina (72%), cefalosporinas, sulfamidas (50%), estreptomicina (62%) y tetraciclinas, mientras que el nivel de resistencia frente al cloranfenicol, la kanamicina y la gentamicina estaban por debajo del 10%.

GEDEK, W. en 1984 en un estudio sobre las resistencias antibióticas de cepas de *Hafnia alvei* productoras de mastitis, encontró que ninguno de sus aislamientos fue resistente a la gentamicina. Por el contrario, encontró algunas cepas resistentes a la polimixina B, al trimethoprim y a la neomicina.

VAZQUEZ-MORENO y cols. en 1990 durante un estudio bromatológico realizado en pollos encontraron cepas de *Hafnia alvei* resistentes a la penicilina, tetraciclina y estreptomicina.

KRIEG, NR. y SNEATH, PH. (1994) describen *Hafnia alvei* como una bacteria eminentemente sensible a la estreptomicina, tetraciclina, polimixina B y ácido nalidíxico, pero resistente a las cefalosporinas y ampicilinas.

GLINSKI y cols. en 1995 analizaron las resistencias antibióticas de varias cepas de *Hafnia alvei* de varios brotes epidémicos ocurridos en Finlandia, Italia y otros países, que afectaron a colonias enteras de abejas con mortalidades que oscilaron entre el 33% y el 98%, eviden-

ciándose que carecían de resistencia antibiótica a la estreptomicina, tetraciclina, polimixina B y ácido nalidíxico.

II.7.- LOS PLASMIDOS EN LAS BACTERIAS: FUNCIONES

Los **plásmidos** son elementos genéticos extracromosómicos que presentan una replicación autónoma, es decir, independiente del cromosoma bacteriano. A pesar de que no se consideran esenciales para las células portadoras ya que no aportan funciones vitales, sí lo son bajo determinadas condiciones. Los tipos de **plásmidos** existentes son los **plásmidos** de fertilidad o factores de fertilidad, los **plásmidos** de resistencia o **plásmidos** R, los **plásmidos** metabólicos, los **plásmidos** crípticos, los **plásmidos** col o factores col y los **plásmidos** de patogenicidad (GARCIA RODRIGUEZ, JA. 1987).

Los factores sexuales contienen los genes necesarios para que se lleve a cabo la conjugación. El fenotipo asociado a la presencia de estos **plásmidos** es la habilidad que confiere a la cepa portadora de actuar, durante la conjugación, como donadora de marcadores del cromosoma bacteriano.

Los **plásmidos** metabólicos están implicados en la degradación de compuestos orgánicos complejos. Algunos como los **plásmidos** NAH (degradación del naftaleno) son conjugativos, mientras que otros como el OCT(n-octano) no son conjugativos. Los **plásmidos** crípticos son pequeñas moléculas de ADN circular y sin función conocida. Su tamaño

oscila entre 1 Mdal y 6 Mdal. Los **plásmidos** o factores col portan la información genética de las bacteriocinas (proteínas de determinadas bacterias letales para otras del género o semejantes).

II.7.1.- PLASMIDOS DE RESISTENCIA

Conocidos también como **plásmidos R**, presentan determinantes genéticos responsables de la resistencia de ciertas bacterias. Los **plásmidos** de resistencia se encuentran ampliamente distribuidos entre distintos géneros y su frecuencia y características dependen normalmente de la localización geográfica. Su importancia aumenta cuando estos **plásmidos R** son conjugativos y causan muchas veces fallos en la terapia antimicrobiana con antibióticos. (GARCIA RODRIGUEZ, JA. 1987).

El uso intensivo e indiscriminado de antibióticos selecciona la población resistente de la flora normal. Esta puede transferir sus **plásmidos R** a algún microorganismo patógeno. Los antibióticos facilitan esta transferencia porque propician un medio ambiente en el que sólo las bacterias resistentes a los fármacos pueden desarrollarse. A su vez, destruyen la mayor parte de la flora normal del intestino y aumentan su capacidad de invasión por otras bacterias, y también pueden provocar unas condiciones de pH y oxigenación en el interior del intestino que favorecen una mayor frecuencia de conjugación y transmisión de **plásmidos** (GARCIA RODRIGUEZ, JA. 1987).

II.7.2.- PLASMIDOS DE PATOGENICIDAD

Los **plásmidos** de patogenicidad determinan una mayor patogenicidad en ciertas bacterias. Las publicaciones que hacen referencia a la existencia de **plásmidos** de patogenicidad en los microorganismos son múltiples y de todo tipo, encontrándose en un amplio abanico de especies bacterianas. Por otro lado, su actividad la desarrollan de muy diversa manera según los casos.

SMITH, HW. (1974) descubrió un **plásmido** conjugativo en *Escherichia coli* (Col V) que codificaba la producción de una toxina, la colicina V, que facilita la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal. Más tarde, ZINK y cols. (1980) encontraron este mismo plásmido en *Yersinia enterocolitica*.

El **plásmido** *pJM1* de 50 Mdalton presente en *Vibrio anguillarum* le confiere a la cepa portadora una mayor virulencia al codificar un mayor secuestro de hierro (CROSA y cols., 1977).

GEMSKI y cols. (1980-a) describen un plásmido asociado a la producción de los antígenos V y W, así como a la patogenicidad en *Yersinia pseudotuberculosis*. Estos mismos autores describen un plásmido de 42,2 Mdalton asociado a la patogenicidad de *Yersinia enterocolitica*. (GEMSKI y cols. 1980-b).

Las cepas de *Salmonella dublin* que contiene un **plásmido** de 50 Mdaltons, son de 100 a 1000 veces más virulentas para ratones de

laboratorio que las cepas que no lo tienen TERAOKA y cols. (1983), mientras YAMAMOTO y YOKOTA (1983) han descrito 3 plásmidos presentes en cepas de *E.coli* enterotoxigénicas, como es el *pJY11* de 42 Mdaltos de peso molecular, que codifica la producción de una enterotoxina.

PARDON y cols. (1986) han descrito que la virulencia en *Salmonella typhimurium* está asociada a un plásmido de 60 Mdaltos, cuya presencia es necesaria para que se produzca la colonización de hígado y bazo en inoculaciones experimentales en ratones.

NASSIF y cols. (1989) encuentran en sus estudios, que el **plásmido** de 180 Kb presente en *Klebsiella pneumoniae* es un claro factor de virulencia que actúa codificando el fenotipo mucoso de las colonias.

TULLY (1991) descubrió la existencia de un **plásmido** de 36 Mdaltos que confiere un mayor poder patógeno en cepas de *Legionella pneumophila*, mientras que en algunas cepas de *E.coli*, TOTH y cols. (1990) hallaron un **plásmido** de 60 Mdaltos que confiere una mayor adherencia en las células intestinales, por lo que aumenta su poder patógeno al facilitar la invasión.

También se han descrito los efectos de un **plásmido** de 50 Kb, *pKDSC50*, en *Salmonella choleraesuis*, necesario para la aparición de una fase septicémica en ganado porcino, tras una inoculación intravenosa (DANBARA y cols., 1992).

Revisión bibliográfica

HALAVATKAR, H y cols. (1993) encontraron un **plásmido** de 54Kb determinante de los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella enteritidis* en un experimento de inoculación en ratones.

GIGUERE S, y cols. (2000) describen la existencia de un **plásmido** en *Rhodococcus equi* de peso molecular 85 Kb como el causante de neumonía en caballos jóvenes y personas inmunodeprimidas al codificar la producción de una proteína altamente inmunoreactiva.

BACON (2000) encontró que el **plásmido** *pVir* proporcionaba una mayor patogenicidad a una cepa de *Campylobacter jejuni*, mientras que El **plásmido** *pVM01* de *E.coli* es necesario para la colonización del tracto respiratorio de las aves (GINNS y cols., 2000).

Material y Métodos

III.1.- MATERIAL Y METODOS GENERALES

III.1.1.- CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

Las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en este trabajo fueron 20, 9 pertenecientes a colecciones privadas de laboratorio, 9 a la colección polaca de cultivos tipo (Le Minor) y dos a la colección americana de cultivos tipo (ATCC), que proceden de fuentes diferentes como puede comprobarse en la Tabla 1. En la misma se reflejan igualmente su origen, año de aislamiento y la referencia completa de su donante y/o vendedor.

III.1.2.- MANTENIMIENTO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Para el mantenimiento y conservación de las cepas en el laboratorio, se usó el medio de cultivo Agar Mac Conkey (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan). Los medios fueron incubados durante 24 horas a 37°C. Las cepas aisladas en cultivo puro se resuspendieron en Tryptone Soy Broth (TSB) (Laboratorios Cultimed, Montcada i Reixac, Barcelona, España) adicionado con un 15% de glicerol y congeladas a -80°C para su conservación.

III.1.3.- METODOS DE LABORATORIO

III.1.3.1.- METODOS MICROBIOLÓGICOS

Las cepas fueron sometidas para su identificación a pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa (SMIBERT y KRIEG,

1981) y sistemas miniaturizados (API 20E) (BioMérieux, Madrid, España). Las identificaciones mediante los métodos convencionales se realizaron en colaboración con la Unidad de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo (Orense).

Estas pruebas se utilizaron para clarificar e identificar las cepas objeto de estudio, con la finalidad de distinguir *H. alvei* de otras bacterias taxonómicamente cercanas como *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Edwardsiella spp.* y *Yersinia ruckeri*, tanto a la llegada de las cepas al laboratorio, como en el caso de recuperar las cepas tras la inoculación experimental en trucha común.

Se aplicaron un número de pruebas reducidas pero “suficientes” para garantizar este hecho, e igualmente nos ayudamos de las galerías de identificación API 20E.

1) Tinción de Gram

Realizada según el método descrito por GERHARDT, P. (1993).

Reactivos:

- Solución de cristal violeta
- Solución de iodo-iodurada
- Decolorante
- Solución de safranina

Método:

Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire. Cuando se aplica con una bacteria cultivada es necesario que el cultivo sea joven para evitar una interpretación errónea.

Se fija el material en el portaobjeto pasándolo 3 ó 4 veces a través de la llama de un mechero Bunsen de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción. Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta. Después de 1 minuto, se lava con agua destilada. Se cubre el frotis con solución de iodo-iodurada de Gram durante 1 minuto. Se lava nuevamente con agua destilada. Se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol hasta que no se desprenda más color violeta (habitualmente durante unos 15 segundos). Se lava con agua destilada nuevamente. Se cubre con el colorante de contraste, safranina, durante 15 segundos y se lava. Por último, se seca el frotis al aire.

Interpretación:

Se examina el frotis teñido, con aceite de inmersión con el objetivo 100x del microscopio. Las bacterias gram positivas se tiñen de color azul oscuro y las bacterias gram negativas se ven de color rojo - rosado.

2) Determinación de la tinción mediante KOH

Esta prueba es un sistema no tintorial utilizado para confirmar la tinción de gram con relativa rapidez. Se tratan las bacterias con hidróxido de potasio al 3%. Con este tratamiento se rompen las paredes de las bacterias gram negativas, apareciendo masas filantes viscosas.

Método:

Se suspende en un asa material tomado de la colonia en estudio en una gota de solución de KOH al 3%, colocada previamente sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio. Se agita la suspensión continuamente durante 60 segundos, luego se retira el asa con suavidad.

Interpretación:

Al cabo de unos segundos si las bacterias son gram negativas se habrá roto su pared y aparecerá un material cromosomal viscoso que transforma la suspensión en una masa espesa. Si las bacterias son gram positivas no hay cambio en la viscosidad del hidróxido de potasio.

3) Movilidad

Por observación directa de una suspensión muy diluida de la bacteria en solución salina fisiológica estéril. Se utiliza aceite de inmersión y el objetivo 100x del microscopio. Debemos tener preparaciones frescas a partir de un cultivo en fase exponencial (24 horas) a la temperatura adecuada para interpretar esta prueba. Hay que tener la precaución de diferenciar el movimiento browniano que siempre estará presente.

4) Citocromo-Oxidasa

Determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa según el método de KOVACS (1956).

Reactivo:

Se utiliza el reactivo: dihidrocloruro de N'N'N'- tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma Chemical Co. , St. Louis, Mo.) al 1% en agua

destilada estéril. Se colocan dos gotas del reactivo en un trozo del papel de filtro, y una porción de colonia se frota sobre él con un asa de platino. Se espera reacción con cambio de color.

Interpretación:

Reacción positiva: Color azul oscuro en el lugar de la inoculación, al cabo de 5-10 segundos.

Reacción negativa: No hay cambio de color.

5) Catalasa

Permite comprobar la producción de la enzima catalasa por parte de la bacteria, que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.

Método:

Sobre un portaobjetos de vidrio limpio, con una asa de siembra se recoge el centro de la colonia pura en un cultivo de 18-24 horas de incubación. Se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3% con un gotero o una pipeta de Pasteur (no invertir el orden, pues pueden dar resultados falsos positivos).

Interpretación:

Reacción positiva: inmediata formación de burbujas (liberación de gas: O_2).

Reacción negativa: No formación de burbujas de gas.

Nota : La producción de unas pocas burbujas formadas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo.

6) Oxidación-Fermentación de azúcares

Para evaluar la producción de ácido a partir de los diferentes azúcares se emplea el medio basal de Hugh-Leifson (SMIBERT y KRIEG, 1981) suplementándolo con un 1% (P/V) del azúcar a probar.

Se investigó la oxidación y fermentación de la glucosa, y solamente la producción de ácido del resto de azúcares y polialcoholes. Los azúcares utilizados fueron: glucosa, arabinosa, meliobiosa, sacarosa, amigdalina y ramnosa. Los polialcoholes utilizados fueron : sorbitol, manitol e inositol.

Para el caso de la glucosa se sembraron por picadura dos tubos, sellándose uno de ellos con parafina estéril en los casos en los que se estudió la fermentación. Para el resto de los azúcares y polialcoholes, sólo se sembró un tubo por medio de un asa de picadura. La incubación se realiza hasta una semana a 37°C, pero la mayoría de las reacciones se produjeron entre las 24-48 horas de incubación.

Interpretación:

Reacción positiva: viraje a color amarillo

Reacción negativa: sin cambio.

Determinaciones O/F de la glucosa:

Fermentación: reacción positiva en tubos con parafina

Oxidación: viraje en el tubo sin parafina

Ni oxidación, ni fermentación: ausencia de viraje.

Medio basal de Hugh-Leifson

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Cloruro sódico	10 g
Agar	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Tras esterilizar a 121°C durante 15 minutos se adiciona al medio una solución del azúcar esterilizada por filtración hasta alcanzar una concentración del 1%.

7) Decarboxilación de aminoácidos

Para realizarla usamos el Caldo de Moeller (Difco) (MOELLER, 1955, cit. SEELEY, HW y cols., 1991) suplementado con los aminoácidos L-arginina, L-lisina y L-ornitina (en forma de clorhidratos) a una concentración final del 1%. La reacción tiene lugar en anaerobiosis por lo que los tubos inoculados se cubren con una capa de parafina estéril y se incuban de 48 horas a 1 semana antes de interpretar una reacción como definitivamente negativa.

Interpretación:

Reacción positiva: Se observa la aparición de un color violeta que indica la alcalinización del medio.

Reacción negativa: aparece una coloración amarilla que indica acidificación, o bien no existe cambio de color.

8) Producción gas a partir de la glucosa

Se utiliza el caldo de Hugh-leifson adicionado con un 1% de glucosa (SMIBERT y KRIEG, 1981) y colocando una campana de Durham antes de su esterilización en autoclave.

Interpretación producción de ácido:

Reacción positiva: aparición de color amarillo en el medio

Reacción negativa: ausencia de viraje

Interpretación (producción de gas):

Reacción positiva: aparición de una burbuja de gas en la campana de Durham.

Reacción negativa: ausencia de gas en la campana de Durham.

Caldo de Hugh-leifson

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Cloruro sódico	10 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

El caldo se reparte en tubos conteniendo campanas de Durham. Tras esterilizar a 121°C durante 15 minutos se adiciona al medio una solución de glucosa esterilizada por filtración hasta alcanzar una concentración del 1%.

9) Utilización del Citrato

El medio usado para esta prueba es el Citrato de Simmons (Difco). El medio lo inoculamos mediante picadura y lo incubamos 24-48 horas a 37°C. El color que presenta el medio sin inocular es verde.

Interpretación:

Reacción positiva: el medio se vuelve de color azul.

Reacción negativa: el medio continúa verde.

10) Reacción de Voges-Prokauer

Esta prueba permite determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. El medio empleado es el Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (Difco).

Se inoculan los tubos con cultivo puro de 18-24h, con un inóculo poco denso, se incuban 24 horas a 37°C, después se agregan dos o tres gotas de los reactivos I y II de Voges-Proskauer directamente, y se espera unos 10 minutos antes de leer la reacción.

Reactivos:

Reactivo I (agente oxidante):

Hidróxido potásico	40 g
Agua destilada	100 ml

Reactivo II (intensificador de color):

α -naftol	5 g
Etanol	100 ml

Interpretaciones

Reacción positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina).

Reacción negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aún así la reacción es negativa, esto es debido a la acción de los reactivos al mezclarse.

11) Producción de Indol

La cepa a estudiar se suspende en Caldo de Triptona al 1% (Difco), al cual, a las 24 horas de incubación a 37°C, le añadimos unas gotas del reactivo de Kovacs (KOVACS, 1956).

Interpretación:

Reacción positiva: formación de un anillo rojo en la superficie del medio.

Reacción negativa: no se produce color en la superficie, toma el color del reactivo de Kovacs (rosado claro).

12) Reacción de la ureasa

Se cultivan las cepas en un caldo base de urea (Cultimed)

Interpretación:

Reacción positiva: Color rojo rosado intenso

Reacción negativa: No se produce cambio de color.

13) Hidrólisis de la esculina

Para la realización de esta prueba usamos el medio TSA (Cultimed) suplementado con esculina al 0,1%(Difco) y citrato férrico al 0,5%.

Interpretación:

Reacción positiva: cuando se observa un halo negro o marrón alrededor de las colonias en la placa de agar.

Reacción negativa: ausencia de ennegrecimiento del medio.

14) Prueba de la ONPG (O-nitrofenil- β -galactósido):

Las bacterias que fermentan la lactosa poseen β -Galactosidasa y lactosa permeasa, dos enzimas necesarios para la producción de ácidos en la prueba de fermentación de lactosa. La permeasa es necesaria para que la molécula de lactosa ingrese en la célula bacteriana, donde la β -Galactosidasa, rompe la molécula de ONPG en dos residuos, galactosa y ortonitrofenol.

Esta prueba no es un sustituto de la fermentación de la lactosa, porque sólo mide la producción de la enzima β -Galactosidasa. Se utilizan tubos con solución salina estéril, agregando 1 disco de ONPG (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, England) al tubo con la solución salina más el inóculo bacteriano. Se incuba a 37°C durante 24h.

Interpretación

Reacción positiva: Color amarillo

Reacción negativa: Incoloro

15) Prueba de reducción de nitratos

Los microorganismos que reducen los nitratos a nitritos tienen la capacidad de extraer oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción. Mediante esta prueba se determina la capacidad de la bacteria para reducir los nitratos a nitritos o nitrógeno libre. Como medio de incubación se usa el Caldo Nitrato (Difco). Los tubos se inoculan con la bacteria y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al terminar la incubación, se agregan unas gotas de cada uno de los reactivos I y II al medio base, y en ese orden.

La aparición de color rojo oscuro antes de los diez minutos posteriores a la adición de los reactivos indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva. Si no aparece color después de añadir los reactivos, puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a otros productos como amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico u óxido nitroso e hidroxilamina. Dado que los reactivos de prueba detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falso negativa.

Reactivos

Reactivo I:

α -Naftilamina	5 g
Acido acético 5N	1000 ml

Reactivo II:

Ácido sulfanílico	8 g
Acido acético 5N	1000 ml

Reacción positiva: Color rosado a rojo intenso.

Reacción negativa: No desarrolla color.

16) Gelatinasa.

La actividad proteolítica gelatinasa se determina usando un medio basal suplementado con un 1% de gelatina (Sigma). Se siembra la bacteria en placas con el medio de gelatina y se deja incubar a 37°C durante 3-5 días. Posteriormente se introduce el cultivo en la nevera durante 15 minutos y se añade el reactivo de la gelatinasa (cloruro de mercurio al 15% en una solución de ácido clorhídrico al 20%).

Interpretación:

Reacción positiva: se producen halos de licuefacción del medio.

Reacción negativa: no aparece halos de licuefacción

Medio basal para la detección de actividad gelatinasa

Composición	
Peptona	4 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro sódico	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH= 7.2	
Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.	

III.1.3.2 IDENTIFICACION MEDIANTE SISTEMA API 20E

Las galerías API constan de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Cada microtubo se inocula con una suspensión bacteriana obtenida por la suspensión de una colonia de un cultivo puro y reciente (24 horas) de la bacteria a identificar, en 5 ml de solución salina fisiológica estéril. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneos, o bien estos ocurren al añadir los reactivos específicos de lectura.

El sistema API utilizado en este trabajo ha sido el específico para Enterobacterias, denominado API 20E (BioMerieux), grupo al que pertenece *Hafnia alvei* (SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

La utilización de las galerías API 20E en nuestro estudio se hizo para comparar, y corroborar en su caso, los resultados de identificación, con respecto a la metodología clásica, de las cepas que recibimos en el laboratorio, y, colonias aisladas a partir de la siembra en riñón de los animales muertos después de la inoculación experimental en trucha común para la determinación de su DL₅₀.

Para la preparación y lectura de una galería API 20E, han de seguirse los siguientes pasos:

Acondicionamiento de la galería

Se saca la galería del refrigerador (se conservan entre 2 y 8°C), se deja que alcance la temperatura ambiente.

Se prepara una cámara de incubación con su tapa y a continuación se reparten 5 ml de agua destilada estéril en los alvéolos del fondo de la cubeta para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. De forma paralela, se debe realizar la prueba de la oxidasa y la movilidad a partir del cultivo a identificar, y se adjuntan los resultados en la hoja de identificación correspondiente.

Preparación del inóculo

A partir de una colonia crecida en un medio general, MacConkey (Difco) se prepara un inóculo tal que su absorbancia sea aproximadamente 0.5 en la escala MacFarland. Con ello lo que se consigue es la uniformidad en la cantidad de inóculo que se emplea después para comparar los resultados, y que estos no se vean influidos por la cantidad de bacterias con que se prepara la suspensión.

Inoculación de la galería.

Cada microtubo consta de una sección tubular y una cúpula. Se inclina la cubeta de incubación y se llena la parte tubular del microtubo con la suspensión bacteriana colocando la punta de la pipeta contra el lado de la cúpula. Se llena la sección tubular y la cúpula de los microtubos que aparezcan de la siguiente manera: ej. CIT. Después de inocular, se llenan completamente con aceite de parafina, las cúpulas de los microtubos que aparezcan subrayados de la siguiente manera: ej. URE.

Incubación de las galerías.

La incubación de las galerías depende del sistema API utilizado. En el caso del sistema API 20E la incubación se realiza a 37°C durante 18 a 24 horas.

Lectura de la galería.

La lectura de la galería debe hacerse si el microtubo de la glucosa es positivo y/o 3 ó más pruebas son positivas. Se anotan en la hoja de resultados las reacciones espontáneas y se efectúa el revelado de las pruebas que requieren reactivos: producción de acetoina, triptófano desaminasa, producción de indol y reducción de nitratos a nitritos y/o nitrógeno libre. Si la galería no tuviese lectura a las 24 horas de incubación se reincuba 24 horas más y se procede luego a su lectura.

En la hoja de resultados las pruebas están separadas en grupos de tres y un valor de 1, 2 ó 4 está indicado para cada una. Sumando los valores correspondientes (1,2 ó 4) de las pruebas positivas para cada grupo se obtiene un código de 7 cifras que se interpreta en el API 20E Index, permitiendo la identificación concreta, y asignando un nivel de fiabilidad a dicha interpretación (baja discriminación, aceptable, buena, muy buena o excelente).

III.1.3.3.- LISIS DE LA BACTERIA POR EL FAGO 1672

Con esta prueba fueron evaluadas todas las cepas de *H. alvei* al comenzar este estudio según el método descrito por GUINEE y VALKENBURG (1968). Esta prueba nos permite diferenciar claramente *Hafnia alvei* de otras enterobacterias que bioquímicamente son muy parecidas a esta como son *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*, y es la única prueba que nos permite diferenciar *H. alvei* de otras bacterias similares con absoluta garantía.

Método de realización

Partimos de los cultivos en fase exponencial de las cepas a estudiar. Además tenemos el bacteriófago 1672 (ATCC) liofilizado, lo resuspendemos en 5 ml de medio líquido Tripticasa Soja (TSB, Difco) y realizamos diluciones seriadas hasta 10^{-6} en tampón fosfato (PBS), pH 7.2. Como sistema marcador usaremos dos tipos de agar uno blando en tubo y un agar soporte.

Agar blando en tubo para fagotipia (GUINEE y VALKENBURG, 1968)

Composición:

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro sódico	5g
Agar	8g
Agua destilada	1000 ml
	pH 7,2

Se esteriliza a 121°C durante 20 minutos

Agar soporte en placa para fagotipia (GUINEÉ y VALKENBURG, 1968).

Composición:

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro sódico	5g
Agar	12g
Agua destilada	1000 ml
	pH 7,2

Se esteriliza a 121°C durante 20 minutos

Fundimos el agar blando y lo mantenemos en un baño a 45 °C. Añadimos entonces 0,2 ml de cultivo bacteriano y 0,1 ml de lisado fágico, lo mezclamos de forma suave y rápida para que no gelifique en el tubo y lo vertemos sobre el agar soporte. Cuando gelifique se incuba a 37 °C durante 12 horas.

Interpretación

En la interpretación cualitativa vemos si la cepa es sensible o no al fago, es decir, observamos si hay o no placas de lisis, mientras que en la cuantitativa vemos la E.O.P. (Eficiencia de Plaqueo). Buscaremos aquella placa cuya dilución de fago nos permita contar de forma clara las placas de lisis, y esto nos dirá cual es la mejor cepa hospedadora del fago.

II.2.- METODOS ESPECIFICOS

II.2.1 ANALISIS DEL CONTENIDO PLASMIDICO DE HAFNIA ALVEI

II.2.1.1.- EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO DE HAFNIA ALVEI

El ADN plasmídico fue extraído por dos métodos distintos, el protocolo de KADO y LIU (1981) modificado por TORANZO (1983), y por la modificación de los métodos de BIRNBOIM and DOLY (1979) e ISH-HOROWICZ and BURKE (1981).

Protocolo de la modificación de los métodos de BIRNBOIM and DOLY (1979) e ISH-HOROWICZ and BURKE (1981).

1.- Transferir una colonia bacteriana a 2 ml de medio Luria-Bertani (LB). Incubar durante 16 horas a 37°C con vigorosa agitación.

Composición del medio LB

Por litro :

- 950 ml de agua destilada
 - Bacto-triptona 10 grs
 - Extracto de levadura 5 grs
 - NaCl 10 grs
- pH 7.0

- 2.- Pasar 1.5 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga, para luego centrifugar a 12000 g durante 40 segundos a 4°C (centrífuga Sigma 3K 30).
- 3.- Retirar el medio líquido por aspiración, dejando el precipitado bacteriano tan seco como sea posible.
- 4.- Resuspender en P.B.S y volver a centrifugar a 12000 g durante 40 segundos a 4°C.
- 5.- Retirar el medio líquido por aspiración, dejando el precipitado bacteriano tan seco como sea posible.
- 6.- Resuspender el precipitado bacteriano en 100 µl de SOLUCIÓN I a una temperatura de entre 0 - 4 °C.

Composición de la Solución I

- 50 mM de Glucosa
- 25 mM de Tris-Cl (pH 8.0)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)

Hay que asegurarse que el precipitado quede completamente disperso en la solución I. Esto se puede conseguir rápidamente poniendo simultáneamente en el agitador (Velp Scientifica Zx³) dos tubos de microcentrifuga con sus bases tocándose.

- 7.- Añadir 200 µl de solución II preparada recientemente

Composición de la Solución II

- 0.2 N de NaOH (a partir de un stock 10 N)
- SDS al 1%

Mezclar los contenidos por inversión suave de los tubos de microcentrifuga unas 5 veces y guardarlo en hielo durante unos minutos.

8.- Añadir 150 µl de solución III a una temperatura entre 0 - 4°C.

Composición de la Solución III

- Acetato potásico 5M 60 ml
- Acido acético glacial 11.5 ml
- Agua destilada 28.5 ml

La solución resultante es 3M respecto al potásico y 5M con respecto al acetato.

Pasar los tubos suavemente por el agitador en una posición invertida durante 10 segundos para dispersar la solución III. Guardar los tubos en hielo durante 3 - 5 minutos.

9.- Centrifugar a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga, teniendo la precaución de no coger restos de sedimento.

10.- Añadir igual volumen de fenol/cloroformo. Mezclar por agitación, y centrifugar a 12000 g durante 2 minutos a 4°C. Posteriormente, transferir el sobrenadante a otro tubo.

11.- Precipitar el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Mezclar mediante agitador y dejar reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

12.- Centrifugar a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. y retirar posteriormente el sobrenadante con una Pipeta Pasteur alargada a la llama.

13.- Lavar el precipitado de ADN con 1ml de etanol al 70% a una temperatura de 4°C, y posteriormente retirar el sobrenadante con una Pipeta Pasteur alargada a la llama.

14.- Secar el ADN a 37 °C durante 10 minutos.

15.- Resuspender el ADN plasmídico en TE y conservar a 4°C

Composición del TE

- 10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 1mM EDTA (pH 8.0)

Protocolo de KADO y LIU (1981) modificado por TORANZO (1983)

- 1.- Transferir una colonia bacteriana a 3 ó 4 ml de medio Luria-Bertani (LB). Incubar hasta la fase exponencial (aproximadamente 16-18 horas) a 37°C con vigorosa agitación.
- 2.- Pasar 1.5 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga, para luego centrifugar a 12000 g durante 3 minutos a 4°C.
- 3.- Resuspender el precipitado bacteriano directamente en 50-75 µl de solución de lisis (3% SDS en 50 mM Tris acetato buffer[pH12,4]) e incubar a 55-60°C durante 45 minutos al baño maría
- 4.-Añadir igual volumen de fenol-cloroformo (relación 1:1), y centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 12000g.
- 5.- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga y conservar a 4°C.

II.2.1.2.- ELECTROFORESIS DEL ADN PLASMÍDICO EN GELES DE AGAROSA

Los geles se prepararon disolviendo agarosa (Sigma) por calentamiento en Tampón Tris-Acetato (TAE). La disolución se vierte en una placa en la que se ha dispuesto el peine para formar los pocillos en los que se depositará la muestra. La concentración de agarosa utilizada es del 0,7%.

Muestras de 30 μ l de ADN plasmídico se depositan en los pocillos de los geles y se sumergen en el tampón Tris-Acetato (TAE) a 80 voltios durante 4 horas.

Los geles fueron teñidos durante 2 horas en una solución de agua destilada con 0.5 μ g de bromuro de etidio por mililitro, lavadas en agua destilada, y fotografiadas con una cámara Polaroid MP-4 Land Camera, usando una película tipo Polaroid 665.

Composición del Tris Acetato buffer (TAE)

- 40 mM Tris-acetato
- 2mM Na₂ EDTA

pH 7.9

II.2.2.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIOTICA.

El antibiograma constituye el sistema de difusión más rápido y eficaz para determinar la sensibilidad antibiótica. Mediante este método se trata de conseguir *in vitro*, una aproximación a las características que el organismo encuentra *in vivo*, en el huésped. El procedimiento empleado es el método de difusión de discos (BAUER-KIRBY, 1966).

A partir de una o dos colonias aisladas se prepara una suspensión bacteriana en solución salina estéril, hasta obtener un inóculo de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Posteriormente se decantan unos mililitros de dicho inóculo sobre una placa de Agar de Mueller Hinton (Cultimed) y se extiende uniformemente por toda la placa. Pasado un minuto se retira el inóculo sobrante, y se procede a la colocación de los discos de antibióticos y se incuba a 37°C durante 24 horas. Los discos, cargados con una concentración antibiótica conocida, se humedecen al entrar en contacto con la superficie del agar de forma que el antibiótico difunde, creándose un gradiente de concentración.

Las bacterias crecen alrededor del disco si su crecimiento no es inhibido por el antibiótico, y no se observará crecimiento en los alrededores del disco en aquellas zonas en las que la concentración del antibiótico sea inhibitoria para la bacteria. El halo de inhibición que se crea, será mayor cuanto mayor sea la susceptibilidad frente a un antimicrobiano.

Sobre la base de esto último, las bacterias se clasifican como:

Sensibles

Son aquellas que son inhibidas fácilmente con las concentraciones de antibiótico que se alcanzan en sangre tras la administración de las dosis consideradas normales.

Moderadamente sensibles

Son las que se inhiben solamente con las concentraciones que se alcanzan en las zonas donde el antibiótico está más concentrado, o con concentraciones que se alcanzan en sangre tras la administración de dosis más elevadas de las habituales.

Resistentes

Son las que no se inhiben con las concentraciones que se alcanzan en sangre tras administrar las dosis máximas que se pueden emplear en clínica.

Los halos de sensibilidad, sensibilidad moderada y resistencia de los antibióticos usados, figuran en la tabla 2. Sin embargo, como las infecciones por *H.alvei* pueden involucrar tanto a especies homeotermas como poiquilotermas hemos creído conveniente presentar ambos resultados. Debido a esto, en el caso de las especies poiquilotermas, no existen actualmente criterios microbiológicos fiables para la interpretación de los resultados. Por tanto, en este último caso, la aparición de un halo de inhibición del crecimiento en torno al disco

se consideró indicativo de la sensibilidad de la bacteria al agente antimicrobiano (SMITH, 1999 ; SCHNICK, 1999).

Agar Mueller Hinton (Cultimed)

Composición:

Almidón	1,5 g
Infusión de carne de res	300 g
Peptona de caseína hidrolizada	17,5 g
Agar	17 g
	PH 7,4

Preparación:

Suspender 38 g en un litro de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Regular el pH a 7.4 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

III.2.2.1.- ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO Y METODO

Todos los antimicrobianos utilizados son de la casa Oxoid. En la Tabla 2 están representados los antimicrobianos utilizados agrupados por tipo, figurando la concentración del disco, ya sea en Unidades Internacionales (UI) o en microgramos (μg).

II.2.3.- MEDIDA DE PATOGENICIDAD

II.2.3.1.- ANIMALES SOMETIDOS A ESTUDIO

Para nuestro estudio hemos utilizado a la trucha común (*Salmo trutta, L.*) con un peso comprendido entre 10-15 gramos. Los peces fueron transportados al laboratorio en lotes pequeños para evitar el estrés en tanques con agua bien oxigenada y con hielo para mantener la temperatura del agua del río, pues un cambio brusco de temperatura disminuye la supervivencia de los peces. Una vez en el laboratorio se hicieron lotes de peces, con un total de 8 truchas por lote y se mantuvieron en tanques de 150 litros a 16-18°C con aireación constante mediante compresores. Los animales fueron mantenidos durante un periodo de 10 días como periodo de aclimatación previo a los ensayos, comprobándose la ausencia de algún signo que hiciera sospechar el desarrollo de alguna enfermedad. Durante este periodo se seleccionaron aleatoriamente algunos de estos animales y se comprobó que estaban libres de patógenos mediante análisis microbiológico de sus vísceras. Esta fase del trabajo se realizó en colaboración con la Unidad de Microbiología de la Facultad de Ciencias de La Universidad de Vigo(Orense).

III.2.3.2.- INOCULACION EXPERIMENTAL

Cada cepa a utilizar se siembra en medio Infusión Cerebro Corazón líquido (Difco) y se deja en agitación a 37°C durante 18-24 horas para obtener un cultivo fresco en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo se centrifuga el medio a 4000 r.p.m. durante 20 minutos, se retira el sobrenadante y el precipitado se lava dos veces con PBS o solución salina

fisiológica estéril. El precipitado obtenido fue resuspendido en la misma solución tampón, y se ajustó a una concentración final aproximada de 3×10^8 u.f.c*/ml por medio del espectrofotómetro Spectronic 20D. A partir de aquí, se hacen diluciones seriadas de 10 en 10 hasta una concentración de 3×10^3 u.f.c./ml.

Para cada cepa estudiada se hacen siete lotes de ocho peces cada uno, los cuales se corresponden con cada una de las diluciones seriadas (de 3×10^8 hasta 3×10^3 ufc/ml) más un lote testigo.

Cada pez recibió 0,1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración determinada en el procedimiento de inoculación, mientras que los ocho peces del grupo testigo se inocularon con 0,1 ml de una solución salina fisiológica estéril.

Las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en la inoculación experimental para determinar su DL_{50} fueron: OR/1, 187/95, 1967/82, C/34 y X1. Los datos sobre el origen y procedencia de estas cepas pueden apreciarse en la tabla 1.

ufc* unidades formadoras de colonias

III.2.3.3.- CALCULO DE LA DOSIS LETAL 50

Para el cálculo de la DL₅₀ seguimos el método señalado por REED y MUENCH (1938).

La mortalidad de los peces inoculados fue evaluada entre 1-15 días postinoculación. Tanto los animales muertos, como los enfermos, aparentemente sanos y los testigos que tuvieron que ser sacrificados al final de la fase experimental fueron mantenidos a temperatura de refrigeración y sometidos a necropsia reglada, y seguidamente se obtuvieron muestras para su posterior estudio microbiológico. Para ello, se toman muestras de riñón, hígado y bazo, y se siembran en Mac Conkey (Difco). Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 24-48 horas en ambiente aerobio. La bacteria aislada fue sometida a pruebas clásicas de identificación (SMIBERT y KRIEG., 1981), ayudándonos en su caso con el perfil que nos facilitó el sistema API-20E (Biomerieux, Madrid, España).

El cálculo de la DL₅₀ se hizo finalmente mediante la aplicación de las siguientes fórmulas:

$$\text{Distancia Proporcional(DP)} = \frac{\%mortalidad > \text{del } 50\% - 50\%}{\%mortalidad > \text{del } 50\% - \%mortalidad < \text{del } 50\%}$$

$$\text{Log de la dosis que mata más del } 50\% - \text{DP} = x$$

$$\text{Dosis letal } 50 \text{ (DL}_{50}\text{)} = 4 \times 10^x$$

Resultados

IV.1.- CARACTERES MICROBIOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE *H.ALVEI* UTILIZADAS.

Todas las cepas utilizadas en el estudio crecieron en el agar MacConkey (Difco) formando colonias pequeñas lactosa negativas que estaban bien desarrolladas tras una incubación de 24 horas a 37°C. En todos los casos, extensiones de las cepas teñidas por el método de GRAM se presentaron como bacilos gram negativos de 1.0 µm de diámetro y de 2.0 a 5.0 µm de largo, siendo todas ellas no capsuladas. Todas las cepas fueron identificadas tanto por el sistema API-20E, como por la metodología clásica como *Hafnia alvei*. Con respecto al sistema API-20E, los perfiles obtenidos en las diferentes identificaciones están reflejados en la Tabla 3, indicando a su vez el índice de fiabilidad de cada una de las cepas analizadas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales realizadas a todas las cepas de *H.alvei* están representados en la Tabla 5. Estos resultados pueden compararse con la descripción de esta bacteria que se hace en el Manual de Bergey (Tabla 4).

Utilizando la metodología clásica, todas las cepas analizadas dieron un resultado positivo para la lisina y ornitina decarboxilasa, y negativo para la arginina dehidrolasa. Todas fueron bacterias móviles, citocromo oxidasa negativas y reductoras de nitratos a nitritos. A su vez, todas ellas dieron resultados negativos a la producción de H₂S, urea, triptófano desaminasa, producción de indol, y en la acidificación a partir de los azúcares inositol, sorbitol, sucrosa y melibiosa. Todas las cepas dieron resultados positivos a la utilización de la glucosa, y acidificación del medio a partir de los azúcares maltosa, xilosa y L-arabinosa. Todas fueron β-galactosidasa positivas, excepto la cepa OR-1. Sólo utilizaron

el citrato como única fuente de carbono las cepas 7-67, y 19-68. En cuanto a la producción de acetoina (reacción de Voges Proscauer), dieron positivas las cepas F-4319, 24-65, 25-65, 7-67, 14-67 y 11-69. Sólo se demostró la presencia de la enzima gelatinasa en dos de las cepas de origen estadounidense, la 4094/83 y la 842/81. En cuanto a la acidificación del medio a partir de los azúcares, sólo fueron negativas a la ramnosa las cepas X1, 30-65, 14-76 y la ATCC 9760, y sólo dió un resultado positivo a la salicina la cepa 11-69. En cuanto al manitol, todas las cepas produjeron acidificación excepto la 4094/83.

Con esta batería de pruebas hemos podido distinguir *H. alvei* de otras bacterias taxonómicamente cercanas como *Salmonella spp.* , *Serratia spp.* , *Edwardsiella spp.* y *Yersinia ruckeri*, según la tabla de diferenciación básica entre enterobacterias (Tabla 6).

La prueba irrefutable que nos ha permitido asegurar la identificación de todas las cepas investigadas en la especie *Hafnia alvei* fue la lisis por el fago 1672 (ATCC) con independencia de los resultados que todas ellas hayan podido dar a distintas pruebas bioquímicas realizadas por la metodología clásica o el microsistema API 20-E.

IV.2.-RESISTENCIA ANTIBIOTICA DE *HAFNIA ALVEI*

IV.2.1.-ANTIBIOTICOS DE USO EN ACUICULTURA

Los resultados de los antibiogramas realizados a las 20 cepas de *Hafnia alvei* están representados en las tablas desde la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, en donde figura el halo de inhibición bacteriana en milímetros, y la consiguiente susceptibilidad a dicho antimicrobiano.

Siendo nuestra línea de investigación la acuicultura, hemos creído conveniente expresar los resultados de resistencia/sensibilidad antibiótica además de por la metodología habitual para especies homeotermas, lo descrito por SMITH (1999) y SCHNICK (1999) para especies poiquilotermas.

En la tabla 8 se incluyen los porcentajes de resistencia demostradas por los distintos antibióticos frente a las cepas de *H.alvei* analizadas en el estudio, haciendo referencia tanto a especies homeotermas como poiquilotermas.

Con respecto al grupo de las tetraciclinas (oxitetraciclina y tetraciclina), se ha observado una alta resistencia por parte de todas las cepas de *Hafnia alvei* estudiadas hacia la tetraciclina (75% de resistencias), excepto las cepas LM 30/65, LM 11/69, 187/95, C/34 y LM 1968 (Tablas 7.4, 7.6, 7.11, 7.18 y 7.19, y Tabla 8) que fueron sensibles. Para el caso de la oxitetraciclina ocurre todo lo contrario, evidenciándose solo un 10% de cepas resistentes, la X1 y la 4256/83 (Tablas 7.2 y 7.10, y Tabla 8).

En el caso de las quinolonas de uso habitual en la acuicultura, como son el ácido nalidíxico, el flumequine y la enrofloxacin, todas las cepas han mostrado una enorme susceptibilidad frente a este grupo de antimicrobianos en concreto, siendo del 100% para el ácido nalidíxico y para la enrofloxacin (Tabla 8). La única quinolona que mostró resistencias bacterianas fue el flumequine, donde hubo un 25% de cepas resistentes, la LM 25/65, LM 11/69, OR-1, 4256/83 y LM 19/68 (Tablas 7.5, 7.6, 7.7, 7.10 y 7.19, y Tabla 8).

En el grupo de los aminoglucósidos, al que pertenecen la estreptomycin, kanamicina, amikacina y la gentamicina, los resultados han sido desiguales, existiendo un índice de resistencias del 55% frente a la estreptomycin, y por el contrario, una susceptibilidad del 0% frente a la gentamicina y kanamicina (Tabla 8).

Las cepas resistentes a la acción de la estreptomycin son la X1, 14/67, 30/65, 11/69, 4256/83, 1967/82, 842/81, 7/67, F4319, C/34 y la cepa 7/68 (Tablas 7.2, 7.3, 7.4, 7.6, 7.10, 7.12, 7.13, 7.14, 7.17, 7.18 y 7.20).

Al contrario que en el caso de la estreptomycin, el 100% de las cepas fueron sensibles a la gentamicina y kanamicina (Tablas de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive), mientras que sólo la cepa C/34 (Tabla 7.18) fue resistente a la amikacina.

Con respecto a otros antibióticos utilizados en la acuicultura, en el caso de la bacitracina el 100% de las cepas se mostró resistente a su acción (Tablas de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, y Tabla 8). El 90% de las cepas fue resistente a la eritromycin (Tabla 8), observándose las

únicas dos resistencias en las cepas OR-1 y 187/95 (Tablas 7.7 y 7.11). El 100% de las cepas fue sensible al trimetoprim, al igual que para el fluorfenicol (Tablas de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, y Tabla 8).

IV.2.2.-OTROS ANTIBIOTICOS

En el grupo de los β -lactámicos, en donde se encuadran las penicilinas y las cefalosporinas, las resistencias antibióticas han resultado ser bastante elevadas, a excepción de las cefalosporinas de última generación. Así, tenemos que para el caso de las penicilinas analizadas, la ampicilina, penicilina G y la meticilina, el 100% de las cepas mostraron resistencia antibiótica frente a ellas (Tablas de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, y Tabla 8).

Entre las cefalosporinas de segunda generación analizadas, cefamandole, cefoxitina y cefuroxime, fue este último, el cefuroxime, el que ha demostrado tener un menor efecto sobre las cepas de *Hafnia alvei*, ya que sólo la cepa americana 4094/83 (Tabla 7.9), ha sido sensible, siendo el resto altamente resistente. En el caso del cefamandole, el 60% de las cepas fue resistente (cepas X1, LM 11/69, OR/1, ATCC 9760, 4256/83, 1967/82, 842/81, LM 24/65, LM 23/65, F4319, LM19/68 y LM 7/68, mientras que para la cefoxitina el porcentaje de cepas resistentes fue del 50% (Tabla 8), siendo las misma que para el caso del cefamandole, excepto las cepas 842/81 y LM 24/65 (Tablas 7.2, 7.6, 7.7, 7.8, 7.10, 7,12, 7.13, 7.15, 7.16, 7.17, 7.19 y 7.20).

En las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxime y cefoperazona, ha sido el cefotaxime el que ha demostrado un mayor nivel de resistencia al existir únicamente 3 cepas sensibles, dos americanas, la 4256/83 y la 4094/83 (Tablas 7.10 y 7.9), y la aislada en Canarias 187/95 (Tabla 7.11), siendo el resto (un 85%) resistente a la acción del cefotaxime (Tabla 8). Para la cefoperazona no ocurre lo mismo, ya que el porcentaje de resistencia fue del 25% (Tabla 8), siendo resistentes las cepas X1, OR/1, 4256/83, 19/68 y 7/68 (Tablas 7.2, 7.7, 7.10, 7.19 y 7.20).

El cefquinome, una cefalosporina de última generación, no ha evidenciado resistencia alguna, al ser el 100% de las cepas sensibles a su acción (Tabla de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, y Tabla 8).

En las quinolonas de uso no habitual en acuicultura, la susceptibilidad fue del 100%, al no existir cepas resistentes a la acción de la marbofloxacina o del ácido oxolínico (Tabla de la 7.1 a la 7.20, ambas inclusive, y Tabla 8).

IV.2.3.-RESISTENCIA ANTIBIOTICA DE HAFNIA ALVEI PARA ESPECIES POIQUILOTERMAS

Tomando como base lo descrito por SMITH (1999) y SCHNICK (1999) para especies poiquilothermas, *Hafnia alvei* demuestra tener un elevadísimo grado de sensibilidad frente a los antibióticos analizados. Así, refleja una susceptibilidad del 100% frente a los aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, polimixina B, fluorfenicol y trimetoprim, así como frente al cefquinome y la eritromicina (Tabla 8).

Para la cefoperazona, cefotaxime y bacitracina, el porcentaje de cepas resistentes fue sólo del 5%. Para la cefoxitina, cefuroxime y cefamandole, el porcentaje de cepas resistentes osciló entre el 40 y el 45% (Tabla 8).

Por el contrario, el grupo de las penicilinas y la oleandomicina mostraron un índice de resistencia del 100% (Tabla 8).

IV.3.-CONTENIDO PLASMIDICO DE HAFNIA ALVEI: PERFILES

Comparando los dos métodos de extracción de ADN plasmídico utilizados, los mejores resultados se pusieron de manifiesto con el método basado en la modificación de los métodos de BIRNBOIM and DOLY (1979) e ISH-HOROWICZ and BURKE (1981), observándose una extracción de ADN plasmídico con menos impurezas y una mayor definición de bandas que con el protocolo de TORANZO (1983) (Figura 4 y Figuras 1, 2 y3).

La Tabla 9 muestra el número de plásmidos totales detectados en cada una de las 20 cepas de *Hafnia alvei* analizadas. Cada tipo de plásmido lo hemos denominado con una letra (desde la "a" a la "p").

Los resultados muestran que de las 20 cepas analizadas, el 100% de las mismas contienen uno o más plásmidos. De estas 20 cepas, 13 (65%) resultaron ser cepas multiplasmídicas.

Haciendo un análisis comparativo entre las 20 cepas analizadas, encontramos una gran diversidad en el contenido plasmídico de *Hafnia alvei*, encontrando 16 plásmidos diferentes. De estos 16 plásmidos, 3 corren en el gel de agarosa por encima del ADN cromosómico y 13 corren por debajo del ADN cromosómico.

Los plásmidos que corren en el gel por encima del ADN cromosómico son el "a", "b" y "c" (Figura 1 y Tabla 9). El plásmido de mayor peso molecular, el denominado plásmido "a", se encuentra únicamente en dos cepas, la ATCC 13337 y la OR/1. El plásmido "b" se encuentra en un 45% de las cepas, más concretamente en la X1, LM 14/67, LM 25/65, LM 11/69, LM 30/65, 187/95, 842/81, LM 7/68 y

LM 7/67 (Figura 1 y Tabla 9) El otro plásmido que corre en el gel por encima del ADN cromosómico, el plásmido “c”, se encontró en un mayor número de cepas, el 70% de las mismas, estando en todas las cepas excepto en la ATCC 13337, X1, LM 30/65, LM 25/65, LM 11/69 y 187/95 (Figura 1 y Tabla 9).

Con respecto a los plásmidos que corren en el gel por debajo del ADN cromosómico, se han encontrado 13 diferentes (Figura 1 y Tabla 9). Hay que señalar que el más abundante fue el plásmido “h”, encontrándose en 5 cepas diferentes, la ATCC 9760, 4094/83, 4256/83, 1967/82 y LM 7/68 (Figura 1 y Tabla 9). El plásmido “g” se encontró en 3 cepas distintas, la ATCC 9760, 4094/83 y 4256/83, es decir, en las mismas cepas en donde estaba presente el plásmido “h”, a excepción de las cepas LM 7/68 y 1967/82 (Figura 1 y Tabla 9). El plásmido “n” se encontró en las cepas 187/95 y C/34, mientras que el plásmido “p” se encontró en las cepas 25/65 y 7/68. Los plásmidos presentes en una sola cepa son el plásmido “d”, que se encontró en la cepa 1967/82, el plásmido “e” en la 7/68, el plásmido “f” en la cepa 7/68, el plásmido “i” en la cepa 4094/83, el plásmido “j” en LM 25/65, el plásmido “k” en 187/95, el plásmido “m” en la cepa C/34, y los plásmidos “ñ” y “o” presentes en la cepa 7/68.

IV.4.-RELACION DEL PERFIL PLASMIDICO CON:

IV.4.1.-ORIGEN DE LA CEPA

Tomando todas las cepas en conjunto, resulta complicado determinar patrones de perfiles plasmídicos. Por el contrario, agrupando las cepas por su origen geográfico, se pueden obtener patrones europeos y otros americanos, mientras que la cepa LM 7/68, de origen marroquí, queda fuera de estos dos patrones. Los patrones de perfiles plasmídicos de cepas europeas y americanas se muestran en las Figuras 2 y 3.

Con respecto a las cepas europeas, las cepas LM 24/65, LM 23/65, F4319 y LM 19/68 tienen el mismo patrón plasmídico, teniendo sólo el plásmido “c”. Las cepas X1, LM 30/65, y LM 11/69 se agrupan formando el segundo patrón, teniendo todos únicamente el plásmido “b”. Las cepas LM 7/67 y LM 14/67 contienen ambas los plásmidos “b” y “c”. El resto de las cepas europeas no se agrupan en patrones iguales (Figura 2).

En las cepas americanas el patrón 1 está formado por el perfil de las cepas 4256/83 y ATCC 9760, estando formado por los plásmidos “c”, “g” y “h”. El resto de las cepas americanas tienen unos perfiles plasmídicos individuales, no agrupando varias cepas en un mismo patrón (Figura 3).

IV.4.2.-RESISTENCIA ANTIBIOTICA

Debido a la gran variabilidad en los perfiles plasmídicos, a la diversidad heterogénea de niveles de sensibilidad y/o resistencia antibiótica mostrada, y al elevado número de plásmidos detectados en las distintas cepas estudiadas, resulta imposible encontrar una correlación entre la resistencia antibiótica de *Hafnia alvei* y los perfiles plasmídicos para todos los antibióticos utilizados, con independencia del grupo al que pertenezcan. No es posible por tanto relacionar la presencia de un determinado plásmido en las cepas estudiadas con su nivel de resistencia a un antibiótico o a un grupo de antibióticos (Tabla 8).

Las Tablas 11, 12 y 13 encuadran a las cepas por origen geográfico (españolas, estadounidenses y francesas), y muestra a su vez, las resistencias antibióticas de las mismas, no existiendo diferencias entre los resultados globales de los antibiogramas, y los resultados encuadrando cepas por su origen geográfico.

IV.4.3.-PATOGENICIDAD

Tomando como referencia los datos ya publicados por RODRIGUEZ, L.A y cols. (1998), en donde se analizaban las dosis letales 50 en trucha común de las cepas F4319, ATCC 9760, C/34, X1, OR/1, ATCC 13337 y 187/95, la correlación entre perfiles plasmídicos y patogenicidad queda reflejada en la Tabla 10, en donde se muestra la dosis letal 50 de cada cepa y el contenido plasmídicos de las mismas.

Como se ve reflejado en dicha Tabla, las cepas de mayor virulencia, la X1 y la OR/1, no comparten ningún plásmido entre sí, por lo que no cabe suponer relación entre perfil plasmídico y grado de patogenicidad.

Podemos afirmar que, con independencia a un determinado contenido en plásmidos (Figura 1) de una cepa, y a su correspondencia con un determinado patrón plasmídico (Figuras 2 y 3), la virulencia de estas cepas es un fenómeno no relacionado con este factor, por cuanto que cepas relacionadas con diversos patrones presentan alta o baja virulencia, indistintamente.

Discusión

V.1.-COMPORTAMIENTO BIOQUIMICO Y RESISTENCIA ANTIBIOTICA DE HAFNIA ALVEI.

Todas las cepas utilizadas en este estudio, e identificadas como *Hafnia alvei*, muestran una gran semejanza con lo previamente descrito por MÖLLER (1954), cit. SAKAZAKI Y TAMURA (1992) en el Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, como lo demuestra que el 100% de las cepas tuvieron el mismo resultado para la utilización de la lisina, ornitina, arginina, reducción de nitratos a nitritos, producción de H₂S, urea, triptófano desaminasa, indol, y acidificación a partir de los azúcares inositol, sorbitol, sucrosa y melibiosa, glucosa, maltosa, xilosa y L-arabinosa.

La única variabilidad bioquímica se observó en pruebas como la β -galactosidasa en donde todas fueron β -galactosidasa positivas, excepto la cepa OR-1. Todas fueron negativas a la utilización del citrato como única fuente de carbono, excepto las cepas 7-67, y 19-68. En cuanto a la producción de acetoina (reacción de Voges Proscauer), únicamente dieron positivas las cepas F-4319, 24-65, 25-65, 7-67, 14-67 y 11-69. Sólo se demostró la presencia de la enzima gelatinasa en las cepas 4094/83 y la 842/81. En cuanto a la acidificación del medio a partir de los azúcares, sólo fueron negativas a la ramnosa las cepas X1, 30-65, 14-76 y la ATCC 9760, y sólo dió un resultado positivo a la salicina la cepa 11-69. En cuanto al manitol, todas las cepas produjeron acidificación excepto la 4094/83.

Con respecto al sistema API-20E, todos los perfiles obtenidos estuvieron encuadrados con una excelente identificación (por encima del 95%) excepto la cepa 14-67. A pesar de este resultado, queda de manifiesto la enorme utilidad del sistema API-20E para la identificación

de *Hafnia alvei*, pudiéndola diferenciar de otros géneros semejantes como *Salmonella*, *Enterobacter* y *Serratia* (SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

RODRIGUEZ y cols., (1999) proponen la utilización del sistema de identificación Microscan (Dade Microscan), en donde se compara con los métodos convencionales de identificación. En dicho estudio se logra identificar correctamente 20 de las 21 cepas analizadas, siendo la cepa 14-67 la única que no pudo ser identificada, al igual que ocurre con el sistema API- 20E en nuestro estudio, cuyos resultados dieron un bajo nivel de discriminación en su identificación. RODRIGUEZ y cols., (1999) proponen que la cepa 14-67 presenta un biotipo inusual, y por ello no se identifica correctamente como el resto de las cepas. Como queda de manifiesto, tanto el sistema API-20E, como el sistema Microscan, son válidos para la correcta identificación de *Hafnia alvei*, no llegando a identificar con una elevada fiabilidad biotipos inusuales.

Comparando la identificación mediante el sistema API-20E y las pruebas bioquímicas en tubo, tenemos una correlación del 100% en las pruebas relacionadas con los aminoácidos arginina, lisina y ornitina, producción de sulfídrico, triptófano desaminasa, indol, y acidificación a partir de la glucosa, inositol y sorbitol.

Las pruebas ONPG, utilización de citrato, ureasa, Voges Proscauer, gelatinasa, y acidificación a partir de manitol, arabinosa y ramnosa ofrecen resultados desiguales entre la identificación mediante el sistema API y las pruebas bioquímicas en tubo. No obstante, dicha variación no influye en la correcta identificación por los dos sistemas reseñados.

Según SARTI, M. y GIORGETTI, G. (1988), los antibióticos de uso común en acuicultura son las tetraciclinas como la oxitetraciclina y la tetraciclina, las quinolonas como el ácido nalidíxico y el flumequine, los aminoglucósidos como la estreptomina, kanamicina y la gentamicina, así como la bacitracina, eritromicina y trimetoprim. Hoy en día también son usados por parte de las empresas de acuicultura, la enrofloxacin y el fluorfenicol (Datos no publicados).

Tal y como quedó de manifiesto en la revisión bibliográfica sobre los escasos trabajos existentes relacionados con las resistencias antibióticas de *Hafnia alvei*, en nuestro trabajo nos hemos encontrado con unas resistencias muy variadas, y así, si GLINSKY y cols.(1995) no encontraron cepas resistentes frente a la estreptomina y tetraciclina, en nuestro estudio sí se han puesto de manifiesto cepas resistentes a dichos antibióticos. Y al contrario, si GEDEK y cols.(1984) encontraron cepas resistentes frente a la polimixina B, en nuestro estudio ninguna cepa demostró tener resistencia antibiótica hacia la polimixina B.

Sin embargo, los escasos trabajos encontrados ponen de manifiesto la alta susceptibilidad de *Hafnia alvei* frente a la gentamicina y al ácido nalidíxico, al igual que ocurre en nuestra investigación, al no encontrar cepas resistentes a alguno de estos antibióticos.

V.2.-PERFIL PLASMIDICO Y SU RELACION CON RESISTENCIA ANTIBIOTICA Y/O PATOGENICIDAD.

La diversidad en el contenido plasmídico de *Hafnia alvei* hace difícil poder encuadrar los perfiles plasmídicos de estas 20 cepas en unos patrones plasmídicos determinados. Agrupando cepas por origen geográfico (cepas europeas y americanas) se pueden simplificar algo los resultados, pero sin llegar a establecerse unos patrones que se puedan considerar como fijos de una manera exclusiva.

Hay descritos múltiples ejemplos de patrones plásmidicos homogéneos, pero también lo contrario, es decir, especies bacterianas con un contenido pasmídico tan diverso, como ocurre en nuestro estudio con *Hafnia alvei*, que resulta imposible agrupar las cepas por patrones homogéneos de perfiles plasmídicos. Esto mismo se ha comprobado en *Escherichia coli* (MALKAWI, cols., 1998), en donde no se pudo agrupar un total de 89 cepas en patrones claramente definidos, encontrándose plásmidos de pesos moleculares comprendidos entre 54 y 1,5 Kilobases.

Por el contrario, la homogeneidad de patrones queda demostrada en otras especies bacterianas como puede ser *Aeromonas salmonicida* (TORANZO y cols., 1991) donde se analizaron los perfiles plasmídicos de aislamientos españoles. Todas las cepas tenían un triplete de plásmidos con pesos moleculares de 3,6, 3,5 y 3,4 Megadaltons, y nueve de las trece cepas analizadas poseían además un plásmido de 4,2 Md. Estos patrones plasmídicos coinciden con un estudio de HACKET y cols. (1984), en donde ciertas cepas de *A.salmonicida* poseían también plásmidos de elevado peso molecular, comprendidos entre los 40 y 55 Md., así como uno de 110 Md.

Otro ejemplo de homogeneidad en patrones plasmídicos está descrito por ALZUGARAY y cols. (1995) que encontraron 5 patrones diferentes de *Yersinia enterocolitica*, no existiendo correlación entre los perfiles plasmídicos y la resistencia antibiótica. GEBRE y cols (1997) encontraron homogeneidad de patrones plasmídicos entre distintos serotipos de *Shigella boydii*, en donde cada uno de ellos contenía una serie de plásmidos diferentes al del resto de los serotipos.

Una vez llegado a este punto, en donde resulta imposible agrupar a *H.alvei* en patrones homogéneos de perfiles plasmídicos, y a su vez, resulta complicado hacer una correlación entre perfil plasmídico y resistencia antibiótica, el camino correcto sería la realización de experiencias de conjugación o de electroporación, para, a través de la inclusión de cada plásmido de *H.alvei* en una cepa receptora (como podría ser *Escherichia coli* sensible a los antibióticos a investigar), averiguar qué resistencia adquiere la cepa de *E.coli* al introducir un plásmido en concreto. Mediante múltiples experiencias de este tipo, podríamos llegar a conocer perfectamente la(s) resistencia(s) antibiótica(s) que codificaría cada plásmido en concreto.

Con respecto a la relación de la patogenicidad con el perfil plasmídico, quedó de manifiesto en este trabajo que las cepas de mayor virulencia (X1 y OR1) en las inoculaciones experimentales en trucha común (*Salmo trutta*), no poseían plásmidos en común, por lo que no cabe suponer la existencia de un único plásmido de patogenicidad, o que la vía plasmídica exista en *H.alvei* como codificante de algún mecanismo de virulencia. Asimismo, cepas con un perfil plasmídico similar, aunque no idéntico, como la OR/1 y la ATCC 13337 presentaron para esta especie de peces una virulencia absolutamente

dispar, 1.3×10^4 para la primera, y $> 10^8$ para la ATCC 13337. No obstante, para esclarecer esta posibilidad en posteriores experiencias, se podrían transferir plásmidos de cepas muy patógenas hacia cepas no patógenas y realizar una nueva inoculación experimental para intentar ver diferencias en el grado de virulencia de la cepa modificada por conjugación o electroporación. Llegado el caso de la existencia de diferencias significativas de patogenicidad entre la cepa original y la cepa modificada, el siguiente paso sería determinar el mecanismo de acción patógena que codifica dicho plásmido.

Conclusiones

PRIMERA.- Los métodos clásicos y el microsistema API-20E aplicados a la identificación de *Hafnia alvei* han presentado una correspondencia adecuada a este fin y un buen nivel de fiabilidad.

SEGUNDA.- Con especial referencia a la microbiología aplicada a la ictiopatología, los grupos de antibióticos que presentan un mayor grado de resistencia (100%) fue el de las penicilinas y la oleandomicina.

TERCERA.- Con la misma aplicación que en el caso anterior, los mayores niveles de sensibilidad antibiótica los hemos observado en el grupo de los aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, fenicoles, polimixina B y trimetoprim, que mostraron el 100% de sensibilidad en las cepas probadas.

CUARTA.- Existe una multivariedad en el contenido plasmídico de *H.alvei*, como se desprende de que de las veinte cepas analizadas encontramos 16 plásmidos diferentes, siendo cepas multiplasmídicas el 65% de las mismas.

QUINTA.- La mayor parte de los plásmidos encontrados (82%) se han situado por debajo del ADN cromosómico de la bacteria.

SEXTA.- Nuestro estudio facilita agrupar los plásmidos analizados en patrones, según el origen geográfico de la cepa, permitiéndonos discernir patrones europeos, americanos, y un perfil distinto para cepas de orígenes diferentes.

SEPTIMA.- No hemos encontrado en las cepas de *H.alvei* estudiadas una relación directa entre perfil plasmídico y una determinada resistencia antibiótica o nivel de virulencia para trucha común (*Salmo trutta*, L).

Resumen

Veinte cepas de *Hafnia alvei* de distintos orígenes y fuentes se utilizaron para comparar métodos microbiológicos clásicos con el microsistema API 20E de identificación a la vez que realizamos un análisis de su contenido plasmídico, con el objetivo de describir patrones y relacionarlos con fenómenos de resistencia antibiótica, virulencia en trucha común y origen geográfico de la cepa.

La extracción de ADN plasmídico la realizamos por el método de BIRNBOIM and DOLY (1979) e ISH-HOROWICZ and BURKE (1981). Los antibiogramas de todas las cepas de *H. alvei* los hicimos siguiendo el método de difusión de discos (BAUER-KIRBY., 1966), y se correlacionaron estos datos con los perfiles plasmídicos de cada cepa. Los estudios de virulencia los hicimos calculando la DL₅₀ en trucha común, para cada cepa después de su inoculación experimental

Tanto los métodos clásicos como el microsistema API 20E han sido adecuados en la identificación de las cepas de *H. alvei* estudiadas.

Debido a la gran variabilidad en los perfiles plasmídicos, a la diversidad heterogénea de resistencia antibiótica mostrada, y al elevado número de plásmidos detectados en las distintas cepas estudiadas, nos resultó imposible encontrar una correlación entre la resistencia antibiótica, virulencia de la cepa en trucha común y origen geográfico de la misma con los perfiles plasmídicos mostrados por *Hafnia alvei*.

Summary

Twenty *H.alvei* strains from different origin and sources were used to compare classic microbiological methods and the microstrips API 20E systems for identification. They were also used to obtain the bacterium harbors plasmids. The job of this work was to describe different plasmids patterns and looking for some relationship with antibiotic resistance, virulence in brown trout (*Salmo trutta, L.*) and geographic origin of the studied strain.

Plasmid DNA was obtained by BIRNBOIM and DOLY (1979) and ISH-HOROWICZ and BURKE (1981) methods. Antibiotic sensitivity was measured by the disc diffusion methods (BAUER-KIRBY, 1966) and compared with the plasmid patterns showed by all the strains studied. Virulence of *H.alvei* was measured in brown trout by lethal dose 50 test after intraperitoneal inoculation.

Classical methods as much as API 20E microstrips of identification have showed as reliable test with all the *H.alvei* strains used. It was imposible to find a relationship among virulence of strains tested in brown trout, antibiotic sensitivity and geographics origin of them, with the plasmids contents showed by all the strains.

Tablas y Figuras

Tabla 1.- Relación de cepas de *H. atvei* analizadas

Cepa bacteriana	Origen de la cepa	Año de aislamiento	Fuente*
187	Gallina ponedora, España	1995	F.Real
C34	Trucha Arcoiris, España	1990	J.L.Múzquiz
OR-1	Crema pastelera, España	1996	L.A.Rodríguez
F4319	Enteritis humana, Reino Unido	1995	T.G.Winstanley
X1	Enteritis humana, Reino Unido	1996	T.G.Winstanley
4256	Sangre humana, E.E.U.U	1983	C.D.C
4094	Espuito humano, E.E.U.U	1983	C.D.C
1967	Heces humanas, E.E.U.U	1982	C.D.C
842	Vejiga humana, E.E.U.U	1981	C.D.C
23	Heces humanas, Francia	1965	Le Minor
24	Líquido gástrico humano, Francia	1965	Le Minor
25	Heces humanas, Francia	1965	Le Minor
30	Humano (desconocido), Francia	1965	Le Minor
7	Heces humanas, Francia	1967	Le Minor
14	Heces humanas, Francia	1967	Le Minor
7	Heces humanas, Marruecos	1968	Le Minor
11	Heces humanas, Francia	1969	Le Minor
19	Lagarto, Italia	1968	Le Minor
ATCC 13337	Heces humanas, E.E.U.U	1965	ATCC
ATCC 9760	Paracolon humano, E.E.U.U	1943	ATCC

F.Real. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

J.L.Múzquiz. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España.

L.A.Rodríguez. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, Orense. España

T.G.Winstanley. Hospital Royal Hallamshire, Sheffield. Reino Unido.

ATCC. American Type Culture Collection, Rockville, MD. Estados Unidos.

CDC. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta. Estados Unidos

Le Minor. Instituto Pasteur, Paris. Francia

Tabla 2.- Interpretación de los niveles de resistencia y/o sensibilidad bacteriana a los diferentes antimicrobianos utilizados

GRUPO	ANTIBIOTICO	CARGA DISCO (µg/ UI)	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
PENICILINAS					
	AMPICILINA	10	0-11	12-13	>14
	PENICILINA G	10UI	0-20	21-28	>29
	METICILINA	5	0-9	10-13	>14
CEFALOSPORINAS					
	CEFUROXIME	30	0-14	15-22	>23
	CEFOXITINA	30	0-14	15-17	>18
	CEFAMANDOLE	30	0-14	15-17	>18
	CEFQUINOME	10	0-18		>19
	CEFOPERAZONA	75	0-15	16-20	>21
	CEFOTAXIME	30	0-14	15-22	>23
AMINOGLICOSIDOS					
	ESTREPTOMICINA	10	0-11	12-14	>15
	KANAMICINA	30	0-13	14-17	>18
	GENTAMICINA	10	0-12	13-14	>15
	AMIKACINA	30	0-14	14-15	>17
TETRACICLINAS					
	OXITETRACICLINA	30	0-14	15-18	>19
	DOXICICLINA	30	0-12	13-15	>16
	TETRACICLINA	30	0-14	15-18	>19
MACROLIDOS					
	ERITROMICINA	15	0-13	14-17	>18
	OLEANDOMICINA	15	0-11	12-16	>17
QUINOLONAS					
	AC.NALIDIXICO	30	0-13	14-18	>19
	OXOLINICO (AC.)	2	0-10		>11
	FLUMEQUINE	30	0-21	20-24	>25
	ENROFLOXACINA	5	0-17	18-22	>23
	MARBOFLOXACINA	5	0-14	14-18	>18
POLIMIXINAS					
	POLIMIXINA B	300UI	0-8	9-11	>12
BACITRACINAS					
	BACITRACINA	10UI	0-8	9-12	>13
FENICOLES					
	FLUORFENICOL	30	0-12	13-17	>18
TRIMETOPRIM					
	TRIMETOPRIM	5	0-10	11-15	>16

Tabla 3.- Código y nivel de identificación suministrado por el sistema API 20-E con las cepas de *H. alvei* utilizadas

CODIGO API 20-E	CEPAS	NIVEL IDENTIFICACION
4104112	OR-1	95 %
4105112	187/95 C-34 19-68 30-65	99, 8 %
4114112	X1	99, 7 %
5105103	14-67	BAJA DISCRIMINACION
5105110	ATCC 9760	98 %
5105112	25-65 23-65 7-68 F4319	99, 8 %
5105113	ATCC 13337 842-81	98,3%
5115113	24-65	99, 7 %
5305103	11-69	97, 3 %
5305112	7-67 4256-83 1976-82 4094-83	99, 9 %

Tabla 4.- Características bioquímicas de *Hafnia alvei*

Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática.

Indol	-	Producción de ácido a partir de:	
VP (a 22°C)	+	Glucosa	+
VP (a 35°C)	v	L-arabinosa	+
Citrato (a 22°C)	v	Maltosa	+
Citrato (a 35°C)	-	Ramnosa	+
Producción H ₂ S	-	Xylosa	+
Ureasa	-	Manitol	+
Gelatinasa	-	Lactosa	-
Lisina decarboxilasa	+	Melibiosa	-
Arginina dehidrolasa	-	Rafinosa	-
Ornitina decarboxilasa	+	Sucrosa	-
Hidrólisis de la esculina	-	Sorbitol	-
ONPG	v	Inositol	-
Gas de glucosa	+		

v.- reacciones variables

Tabla 5.- Identificación de *H.alvei* por pruebas bioquímicas convencionales

Tests	187 /95	C34 /90	OR1 /96	F4319 /95	X1 /96	4256 /83	4094 /83	1967 /82	842 /81	23 /65	24 /65	25 /65	30 /65	7 /67	14 /67	7 /68	11 /69	19 /68	ATCC 13337	ATCC 9760
β-galactosidasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina decarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización del Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Producción del H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Acetoina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Sucrosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citocromo-oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nº placas de lisis (Fago)*	350	126	215	149	339	184	112	163	149	115	161	137	121	127	153	210	144	126	143	134

* Concentración del fago utilizado 1/10⁴

Tabla 6.- Tabla de diferenciación básica de la Familia *Enterobacteriaceae*

Test	<i>H.alvei</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Y.ruckeri</i>
Fermentación de la glucosa	+				
KCN	+				v
Reducción del Nitrato	+				
Acido del Glicerol	+				-
Citrato	-	+a	+		+
Arginina dehidrolasa	-		-		
Lisina decarboxilasa	+		v		
Ornitina decarboxilasa	+				
Catalasa	+				
Producción H ₂ S	-	+a			
Gelatinasa	-		+b		+
Producción Indol	-			+	

v.- Resultados variables

(a) más del 90% de las cepas positivas

(b) excepto *S.fonticola*

Resultados obtenidos de SAKAZAKI & TAMURA (1992) y KRIEG & SNEATH (1994)

Tabla 7.1.- Resultado del antibiograma de la cepa ATCC 1337

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	22	RESISTENTE
	CEFOXITINA	24	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	21	SENSIBLE
	CEFQUINOME	19	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	25	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	22	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	15	SENSIBLE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	21	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	22	SENSIBLE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	16	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	22	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	33	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	35	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	12	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	20	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	25	SENSIBLE

Tabla 7.2.- Resultado del antibiograma de la cepa X1

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	20	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	20	RESISTENTE
	CEFOTAXIME	17	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	12	RESISTENTE
	KANAMICINA	18	SENSIBLE
	GENTAMICINA	17	SENSIBLE
	AMIKACINA	17	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	17	RESISTENTE
	DOXICICLINA	15	RESISTENTE
	TETRACICLINA	15	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	14	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	23	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	26	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	35	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	35	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	22	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	19	SENSIBLE

Tabla 7.3.- Resultado del antibiograma de la cepa LM 14-67

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	20	RESISTENTE
	CEFOXITINA	24	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	20	SENSIBLE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	24	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	16	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	13	RESISTENTE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	21	SENSIBLE
	AMIKACINA	19	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	21	SENSIBLE
	DOXICICLINA	12	RESISTENTE
	TETRACICLINA	17	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	10	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	22	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	31	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	33	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	12	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	20	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	19	SENSIBLE

Tabla 7.4.- Resultado del antibiograma de la cepa 30-65

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	20	RESISTENTE
	CEFOXITINA	25	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	20	SENSIBLE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	25	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	18	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	14	RESISTENTE
	KANAMICINA	24	SENSIBLE
	GENTAMICINA	21	SENSIBLE
	AMIKACINA	21	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	25	SENSIBLE
	DOXICICLINA	19	SENSIBLE
	TETRACICLINA	19	SENSIBLE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	14	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	27	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	32	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	35	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	36	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	9	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	25	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	25	SENSIBLE

Tabla 7.5.- Resultado del antibiograma de la cepa 25-65

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	22	RESISTENTE
	CEFOXITINA	24	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	22	SENSIBLE
	CEFQUINOME	30	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	30	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	20	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	17	SENSIBLE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	18	SENSIBLE
	AMIKACINA	22	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	20	SENSIBLE
	DOXICICLINA	20	SENSIBLE
	TETRACICLINA	17	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	17	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	22	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	29	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	24	RESISTENTE
	ENROFLOXACINA	26	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	40	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	27	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	20	SENSIBLE

Tabla 7.6.- Resultado del antibiograma de la cepa LM 11-69

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	23	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	23	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	22	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	12	RESISTENTE
	KANAMICINA	19	SENSIBLE
	GENTAMICINA	18	SENSIBLE
	AMIKACINA	20	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	24	SENSIBLE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	19	SENSIBLE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	12	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	23	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	27	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	24	RESISTENTE
	ENROFLOXACINA	24	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	33	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	15	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLURFENICOL	20	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	23	SENSIBLE

Tabla 7.7.- Resultado del antibiograma de la cepa OR-1

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	23	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	20	RESISTENTE
	CEFOTAXIME	20	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	20	SENSIBLE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	17	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	23	SENSIBLE
	DOXICICLINA	18	SENSIBLE
	TETRACICLINA	17	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	20	SENSIBLE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	21	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	27	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	31	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	32	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	13	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	20	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	22	SENSIBLE

Tabla 7.8.- Resultado del antibiograma de la cepa ATCC 9760

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	17	RESISTENTE
	CEFOXITINA	13	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	12	RESISTENTE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	21	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	16	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	16	SENSIBLE
	KANAMICINA	19	SENSIBLE
	GENTAMICINA	21	SENSIBLE
	AMIKACINA	20	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	25	SENSIBLE
	DOXICICLINA	15	RESISTENTE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	12	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	26	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	34	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	33	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	35	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	37	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	25	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	23	SENSIBLE

Tabla 7.9.- Resultado del antibiograma de la cepa 4094-83

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	25	SENSIBLE
	CEFOXITINA	28	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	30	SENSIBLE
	CEFQUINOME	21	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	28	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	23	SENSIBLE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	20	SENSIBLE
	KANAMICINA	25	SENSIBLE
	GENTAMICINA	26	SENSIBLE
	AMIKACINA	22	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	21	SENSIBLE
	DOXICICLINA	15	RESISTENTE
	TETRACICLINA	17	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	13	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	20	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	31	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	28	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	35	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	16	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	22	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	18	SENSIBLE

Tabla 7.10.- Resultado del antibiograma de la cepa 4256/83

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	17	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	20	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	20	RESISTENTE
	CEFOTAXIME	25	SENSIBLE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	13	RESISTENTE
	KANAMICINA	24	SENSIBLE
	GENTAMICINA	18	SENSIBLE
	AMIKACINA	18	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	18	RESISTENTE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	15	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	20	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	27	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	24	RESISTENTE
	ENROFLOXACINA	25	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	34	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	13	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	28	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	20	SENSIBLE

Tabla 7.11.- Resultado del antibiograma de la cepa 187/95

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	21	RESISTENTE
	CEFOXITINA	23	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	20	SENSIBLE
	CEFQUINOME	28	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	26	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	23	SENSIBLE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	20	SENSIBLE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	19	SENSIBLE
	AMIKACINA	24	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	20	SENSIBLE
	DOXICICLINA	19	SENSIBLE
	TETRACICLINA	19	SENSIBLE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	18	SENSIBLE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	23	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	29	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	25	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	35	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	34	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	15	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	28	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	20	SENSIBLE

Tabla 7.12.- Resultado del antibiograma de la cepa 1967/82

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	21	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	21	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	20	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	17	RESISTENTE
	KANAMICINA	21	SENSIBLE
	GENTAMICINA	22	SENSIBLE
	AMIKACINA	20	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	23	SENSIBLE
	DOXICICLINA	20	SENSIBLE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	16	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	22	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	28	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	26	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	34	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	35	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	22	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	21	SENSIBLE

Tabla 7.13.- Resultado del antibiograma de la cepa 842/81

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	10	RESISTENTE
	CEFOXITINA	22	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	10	RESISTENTE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	23	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	12	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	14	RESISTENTE
	KANAMICINA	23	SENSIBLE
	GENTAMICINA	24	SENSIBLE
	AMIKACINA	20	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	24	SENSIBLE
	DOXICICLINA	20	SENSIBLE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	10	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	25	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	35	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	38	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	25	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	20	SENSIBLE

Tabla 7.14.- Resultado del antibiograma de la cepa LM 7/67

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	13	RESISTENTE
	CEFOXITINA	24	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	23	SENSIBLE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	24	SENSIBLE
	CEPOTAXIME	22	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	14	RESISTENTE
	KANAMICINA	21	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	21	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	23	SENSIBLE
	DOXICICLINA	20	SENSIBLE
	TETRACICLINA	18	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	13	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	20	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	33	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	25	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	30	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	30	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	24	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	23	SENSIBLE

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2009

Tabla 7.15.- Resultado del antibiograma de la cepa LM24/65

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	20	RESISTENTE
	CEFOXITINA	22	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	16	RESISTENTE
	CEFQUINOME	28	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	25	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	20	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	17	SENSIBLE
	KANAMICINA	25	SENSIBLE
	GENTAMICINA	24	SENSIBLE
	AMIKACINA	23	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	22	SENSIBLE
	DOXICICLINA	20	SENSIBLE
	TETRACICLINA	16	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	12	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	25	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	33	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	30	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	26	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	38	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	15	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	28	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	25	SENSIBLE

Tabla 7.16.- Resultado del antibiograma de la cepa LM 23/65

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	22	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	22	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	19	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	16	SENSIBLE
	KANAMICINA	22	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	18	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	21	SENSIBLE
	DOXICICLINA	18	SENSIBLE
	TETRACICLINA	16	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	15	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	25	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	28	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	27	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	35	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	15	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	25	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	18	SENSIBLE

Tabla 7.17.- Resultado del antibiograma de la cepa F4319

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	23	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	22	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	19	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	14	RESISTENTE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	18	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	20	SENSIBLE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	16	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	13	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	31	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	27	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	27	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	33	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	13	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	22	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	20	SENSIBLE

Tabla 7.18.- Resultado del antibiograma de la cepa C/34

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	15	RESISTENTE
	CEFOXITINA	24	SENSIBLE
	CEFAMANDOLE	18	SENSIBLE
	CEFQUINOME	25	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	27	SENSIBLE
	CEFOTAXIME	21	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	13	RESISTENTE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	18	SENSIBLE
	AMIKACINA	15	RESISTENTE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	20	SENSIBLE
	DOXICICLINA	18	SENSIBLE
	TETRACICLINA	19	SENSIBLE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	10	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	22	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	30	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	24	RESISTENTE
	ENROFLOXACINA	26	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	32	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	18	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	20	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	19	SENSIBLE

Tabla 7.19.- Resultado del antibiograma de la cepa LM 19/68

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFUINOME	20	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	0	RESISTENTE
	CEFOTAXIME	12	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	15	SENSIBLE
	KANAMICINA	20	SENSIBLE
	GENTAMICINA	21	SENSIBLE
	AMIKACINA	18	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	27	SENSIBLE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	20	SENSIBLE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	13	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	20	SENSIBLE
	OXOLINICO (AC.)	31	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	30	SENSIBLE
	ENROFLOXACINA	28	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	30	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	14	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	24	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	24	SENSIBLE

Tabla 7.20.-Resultado del antibiograma de la cepa LM 7/68

GRUPO	ANTIBIOTICO	DIAMETRO EN MM	NIVEL DE SENSIBILIDAD
PENICILINAS			
	AMPICILINA	0	RESISTENTE
	PENICILINA G	0	RESISTENTE
	METICILINA	0	RESISTENTE
CEFALOSPORINAS			
	CEFUROXIME	0	RESISTENTE
	CEFOXITINA	0	RESISTENTE
	CEFAMANDOLE	0	RESISTENTE
	CEFQUINOME	22	SENSIBLE
	CEFOPERAZONA	20	RESISTENTE
	CEFOTAXIME	0	RESISTENTE
AMINOGLICOSIDOS			
	ESTREPTOMICINA	13	RESISTENTE
	KANAMICINA	22	SENSIBLE
	GENTAMICINA	20	SENSIBLE
	AMIKACINA	19	SENSIBLE
TETRACICLINAS			
	OXITETRACICLINA	22	SENSIBLE
	DOXICICLINA	17	SENSIBLE
	TETRACICLINA	16	RESISTENTE
MACROLIDOS			
	ERITROMICINA	12	RESISTENTE
	OLEANDOMICINA	0	RESISTENTE
QUINOLONAS			
	AC.NALIDIXICO	18	RESISTENTE
	OXOLINICO (AC.)	33	SENSIBLE
	FLUMEQUINE	20	RESISTENTE
	ENROFLOXACINA	26	SENSIBLE
	MARBOFLOXACINA	30	SENSIBLE
POLIMIXINAS			
	POLIMIXINA B	13	SENSIBLE
BACITRACINAS			
	BACITRACINA	0	RESISTENTE
FENICOLES			
	FLUORFENICOL	21	SENSIBLE
TRIMETOPRIM			
	TRIMETOPRIM	19	SENSIBLE

Tabla 8.- Resumen de los resultados del antibiograma por grupos de antibióticos de todas las cepas de *H. alvei* estudiadas

Grupo	Antibiótico	n° cepas resistentes(%)	Resultados para
			Acuicultura* n° cepas resistentes(%)
penicilinas			
	Ampicilina	20 (100)	20 (100)
	Penicilina G	20 (100)	20 (100)
	Meticilina	20 (100)	20 (100)
Cefalosporinas			
	Cefuroxime	19 (95)	9(45)
	Cefoxitina	10 (50)	8(40)
	Cefamandole	12 (60)	9(45)
	Cefquinome	0 (0)	0(0)
	Cefoperazona	5 (25)	1(5)
	Cefotaxime	17 (85)	1(5)
Aminoglucósidos			
	Estreptomina	11 (55)	0(0)
	Kanamicina	0 (0)	0(0)
	Gentamicina	0 (0)	0(0)
	Amikacina	1 (5)	0(0)
Tetraciclinas			
	Oxitetraciclina	2 (10)	0(0)
	Doxiciclina	4 (20)	0(0)
	Tetraciclina	15 (75)	0(0)
Macrólidos			
	Eritromicina	18 (90)	0(0)
	Oleandomicina	20 (100)	20(100)
Quinolonas			
	Ac.nalidixico	0 (0)	0(0)
	Ac. Oxolínico	0 (0)	0(0)
	Flumequine	5 (25)	0(0)
	Enrofloxacina	0 (0)	0(0)
	Marbofloxacina	0 (0)	0(0)
Polimixinas			
	Polimixina B	0 (0)	0(0)
Bacitracinas			
	Bacitracina	20 (100)	1(5)
Fenicoles			
	Fluorfenicol	0 (0)	0(0)
Trimetoprim			
	Trimetoprim	0 (0)	0(0)

*Lectura hecha considerando simplemente si había o no inhibición de crecimiento para cada antibiótico utilizado

Tabla 9.- Número y tipo de plásmidos detectados en las cepas de *Hafnia alvei* estudiadas.

Cepa	Número total de plásmidos presentes	Plásmidos presentes
187/95	3	<i>b, k, n,</i>
C34/90	3	<i>c, m, n</i>
OR1/96	2	<i>a, c</i>
F4319/95	1	<i>c</i>
X1/96	1	<i>b</i>
4256/83	3	<i>c, g, h</i>
4094/83	4	<i>c, g, h, i</i>
1967/82	3	<i>c, d, h</i>
842/81	2	<i>b, c</i>
23/65	1	<i>c</i>
24/65	1	<i>c</i>
25/65	3	<i>b, j, l</i>
30/65	1	<i>b</i>
7/67	2	<i>b, c</i>
14/67	2	<i>b, c</i>
7/68	8	<i>b, c, e, f, h, l, o, ñ</i>
11/69	1	<i>b</i>
19/68	1	<i>c</i>
ATCC 13337	1	<i>a</i>
ATCC 9760	3	<i>c, g, h</i>

Tabla 10.- Relación entre contenido en plásmidos y virulencia de las cepas de *H. alvei* estudiadas en trucha común (*Salmo trutta*, L).

CEPA	DOSIS LETAL 50	CONTENIDO EN PLASMIDOS
F4319	1.8×10^6	Plásmido <i>c</i>
ATCC 9760	1.3×10^6	Plásmido <i>c, g, h</i>
C/34	7.4×10^8	Plásmido <i>c, m, n</i>
X1	2.15×10^4	Plásmido <i>b</i>
OR/1	1.3×10^4	Plásmido <i>a, c</i>
ATCC 13337	$> 10^8$	Plásmido <i>a</i>
187/95	2.5×10^7	Plásmido <i>b, k, n</i>

Tabla 11.-Resultado de los antibiogramas de las cepas españolas

ANTIBIOTICO	187/95	C/34	OR/1
AMPICILINA	R	R	R
PENICILINA G	R	R	R
METICILINA	R	R	R
CEFUROXIME	R	R	R
CEFOXITINA	S	S	R
CEFAMANDOLE	S	S	R
CEFQUINOME	S	S	S
CEFOPERAZONA	S	S	R
CEFOTAXIME	S	R	R
ESTREPTOMICINA	S	R	S
KANAMICINA	S	S	S
GENTAMICINA	S	S	S
AMIKACINA	S	R	S
OXITETRACICLINA	S	S	S
DOXICICLINA	S	S	S
TETRACICLINA	S	S	R
ERITROMICINA	S	R	S
OLEANDOMICINA	R	R	R
AC.NALIDIXICO	S	S	S
OXOLINICO (AC.)	S	S	S
FLUMEQUINE	S	R	S
ENROFLOXACINA	S	S	S
MARBOFLOXACINA	S	S	S
POLIMIXINA B	S	S	S
BACITRACINA	R	R	R
FLUORFENICOL	S	S	S
TRIMETOPRIM	S	S	S

Tabla 12.-Resultado de los antibiogramas de las cepas americanas

ANTIBIOTICO	ATCC 13337	ATCC 9760	842/81	1967/82	4094/83	4256/83
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R
PENICILINA G	R	R	R	R	R	R
METICILINA	R	R	R	R	R	R
CEFUROXIME	R	R	R	R	S	R
CEFOXITINA	S	R	S	R	S	R
CEFAMANDOLE	S	R	R	R	S	R
CEFQUINOME	S	S	S	S	S	S
CEFOPERAZONA	S	S	S	S	S	R
CEFOTAXIME	R	R	R	R	S	S
ESTREPTOMICINA	S	S	R	R	S	R
KANAMICINA	S	S	S	S	S	S
GENTAMICINA	S	S	S	S	S	S
AMIKACINA	S	S	S	S	S	S
OXITETRACICLINA	S	S	S	S	S	R
DOXICICLINA	S	R	S	S	R	S
TETRACICLINA	R	R	R	R	R	R
ERITROMICINA	R	R	R	R	R	R
OLEANDOMICINA	R	R	R	R	R	R
AC.NALIDIXICO	S	S	S	S	S	S
OXOLINICO (AC.)	S	S	S	S	S	S
FLUMEQUINE	S	S	S	S	S	R
ENROFLOXACINA	S	S	S	S	S	S
MARBOFLOXACINA	S	S	S	S	S	S
POLIMIXINA B	S	S	S	S	S	S
BACITRACINA	R	R	R	R	R	R
FLUORFENICOL	S	S	S	S	S	S
TRIMETOPRIM	S	S	S	S	S	S

Tabla 13.-Resultado de los antibiogramas de las cepas francesas

ANTIBIOTICO	LM 23/65	LM 24/65	LM 7/67	LM 25/65	LM 30/65	LM 14/67	LM 11/69
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R	R
PENICILINA G	R	R	R	R	R	R	R
METICILINA	R	R	R	R	R	R	R
CEFUROXIME	R	R	R	R	R	R	R
CEFOXITINA	R	S	S	S	S	S	R
CEFAMANDOLE	R	R	S	S	S	S	R
CEFQUINOME	S	S	S	S	S	S	S
CEFOPERAZONA	S	S	S	S	S	S	S
CEFOTAXIME	R	R	R	R	R	R	R
ESTREPTOMICINA	S	S	R	S	R	R	R
KANAMICINA	S	S	S	S	S	S	S
GENTAMICINA	S	S	S	S	S	S	S
AMIKACINA	S	S	S	S	S	S	S
OXITETRACICLINA	S	S	S	S	S	S	S
DOXICICLINA	S	S	S	S	S	R	S
TETRACICLINA	R	R	R	R	S	R	S
ERITROMICINA	R	R	R	R	R	R	R
OLEANDOMICINA	R	R	R	R	R	R	R
AC.NALIDIXICO	S	S	S	S	S	S	S
OXOLINICO (AC.)	S	S	S	S	S	S	S
FLUMEQUINE	S	S	S	R	S	S	R
ENROFLOXACINA	S	S	S	S	S	S	S
MARBOFLOXACINA	S	S	S	S	S	S	S
POLIMIXINA B	S	S	S	S	S	S	S
BACITRACINA	R	R	R	R	R	R	R
FLUORFENICOL	S	S	S	S	S	S	S
TRIMETOPRIM	S	S	S	S	S	S	S

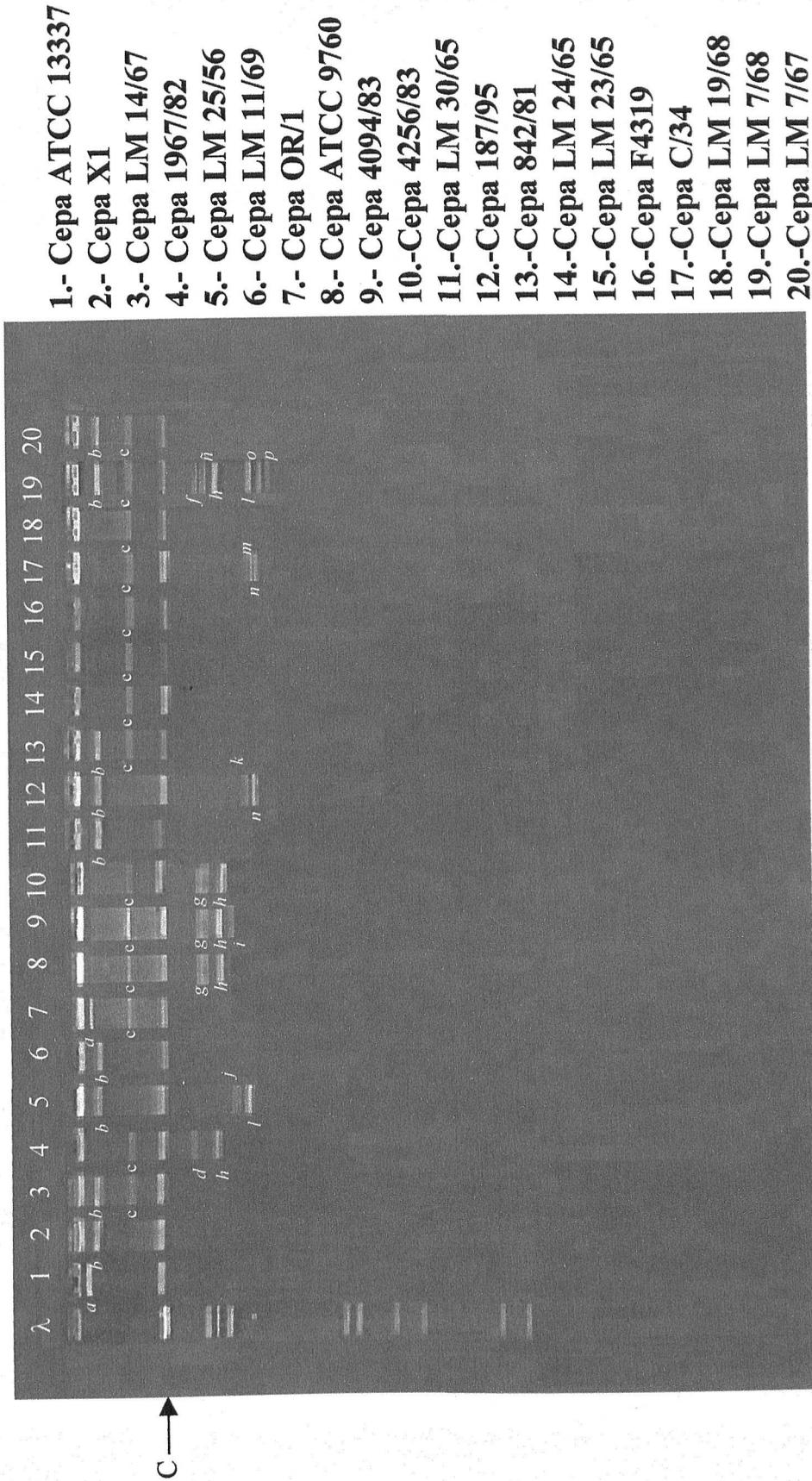


Figura 1.- Patrones de ADN plasmídico mostrado por las cepas de *Hafnia alvei* analizadas.

*C.- ADN cromosómico

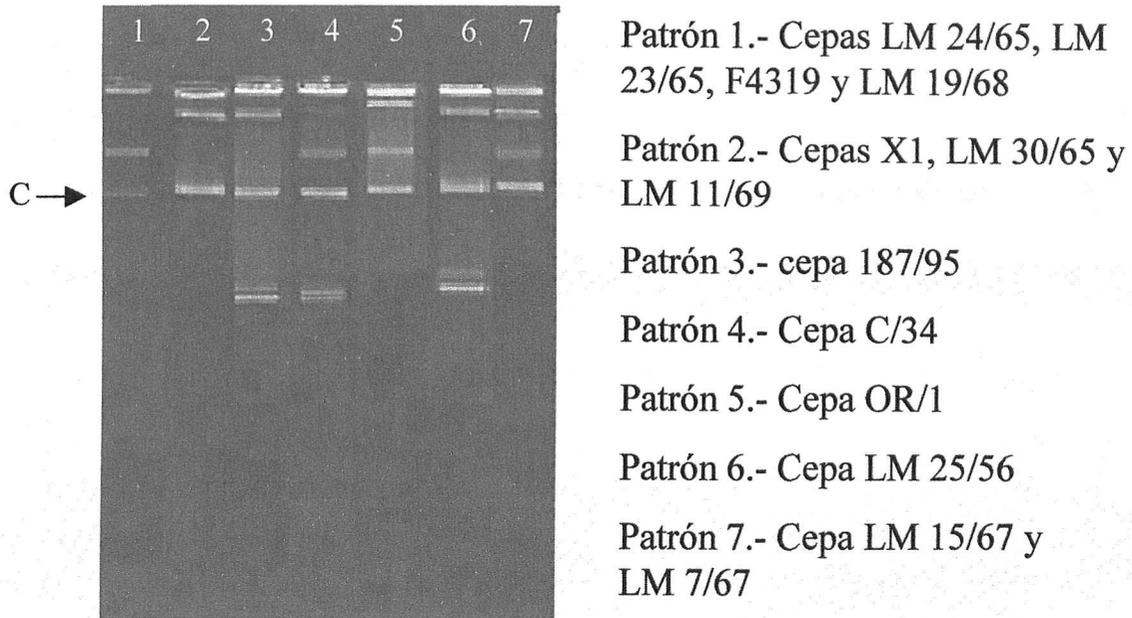


Figura 2.- Patrones plasmídicos representados por las cepas de *H. alvei* de origen europeo estudiadas

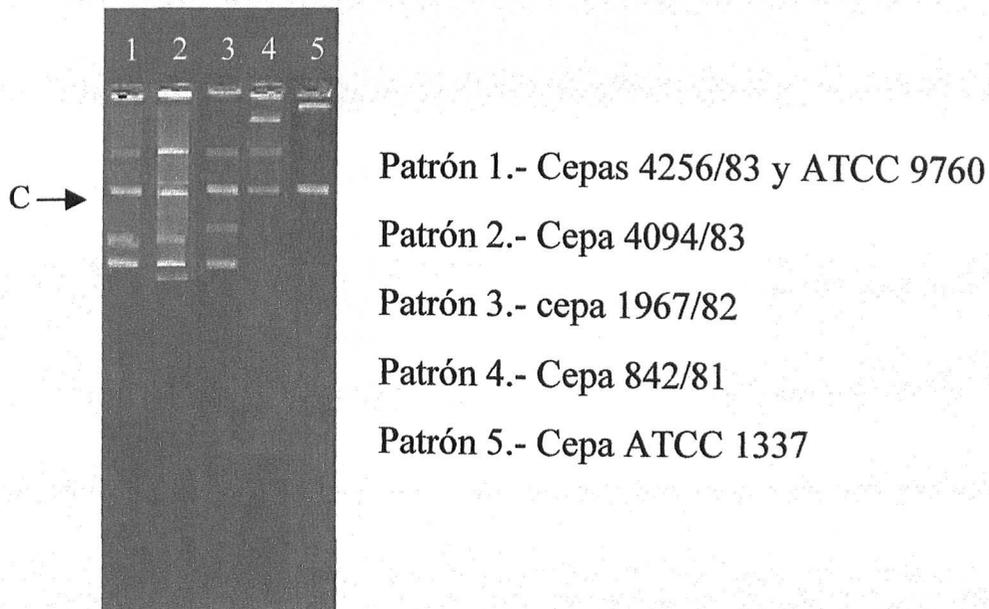
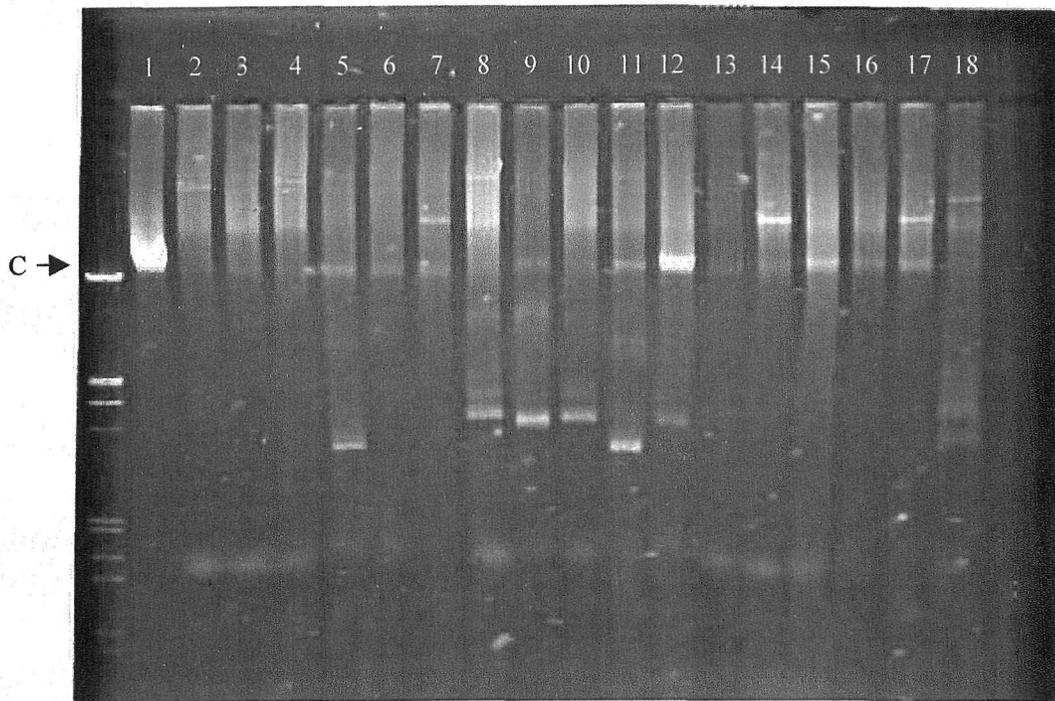


Figura 3.- Patrones plasmídicos representados por las cepas de *H. alvei* de origen americano estudiadas.

*C.- ADN cromosómico

Figura 4.- Extracción ADN plasmídico con el protocolo de TORANZO (1983)



- 1.- Cepa ATCC 13337
- 2.- Cepa X1
- 3.- Cepa LM 14/67
- 4.- Cepa 1967/82
- 5.- Cepa LM 25/56
- 6.- Cepa LM 11/69
- 7.- Cepa OR/1
- 8.- Cepa ATCC 9760
- 9.- Cepa 4094/83

- 10.-Cepa 4256/83
- 11.-Cepa 187/95
- 12.-Cepa C/34
- 13.-Cepa 842/81
- 14.-Cepa LM 24/65
- 15.-Cepa F4319
- 16.-Cepa LM 30/65
- 17.-Cepa LM 19/68
- 18.-Cepa LM 7/68

Bibliografía

- Allen, DA. Austin, B. And Cowell, RR.** 1983. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with freshwater fishery. *J. Gen. Microbiol.* 129: 7, 2043-2062.
- Allen, DA.** 1985. Bacteria associated with freshwater fish farming, with emphasis on the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*. *Diss. Abstr. Int.* 45, 3163.
- Alzugaray, R. González Hevia, MA. Landeras, E. Mendoza, MC.** 1995. *Yersinia enterocolitica* O:3. Antimicrobial resistance patterns, virulence profiles and plasmids. *New Microbiol.* 18(2):215-22.
- Bacon, DJ. Alm, RA. Burr, DH. HU, L. Kopecko, DJ. Ewing, CP. Trust, TJ. Guerry, P.** 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*; 68(8):4384-90.
- Bauer, HC. Kirby, WMM. Sherris, JC. Turk, M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single-disc method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45:459-496
- Bhalla, P. Sethi, K. Reddy, BS. Mathur MD.** 1998. Antimicrobial susceptibility and plasmid profile of *Neisseria gonorrhoeae* in India (New Delhi). *Sex Transm Infect* ; 74(3):210-2.
- Binde, M. and Hermansen, O.** 1982. *Hafnia alvei* in mastitis secretion, a case report. *Norsk Veterin.*, 94: 569-570.
- Birnboim, HC. and Doly, DJ.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure from screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513.
- Borah, P. Patgiri, GP. and Boro, BR.** 1992. Bacteriological quality of market pork in Guwahati city. *Indian Vet. J*; 69: 9, 773-775.
- Brown, AW. Rankin, SC. Platt, DJ.** 2000. Detection and characterisation of integrons in *Salmonella enterica* serotype enteritidis. *FEMS Microbiol Lett*; 191(1):145-149.
- Bryan, LE.** 1984. Aminoglycoside resistance. En: Antimicrobial drugs resistance. Bryan, LE (ed). *Academis Press, Inc.* Orlando, USA. Pp:241-277.

- Crosa, JH. Schiewe, MH. Falkow, S.** 1977. Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun*; 18(2):509-13.
- Dalsgaard, A. Forslund, A. Petersen, A. Brown, DJ. Dias, F. Monteiro, S. Molbak, K. Aaby, P. Rodrigues, A. Sandstrom, A.** 2000. Class 1 Integron-Borne, Multiple-Antibiotic Resistance Encoded by a 150-Kilobase Conjugative Plasmid in Epidemic *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol* ;38(10):3774-3779
- Danbara, H. Moriguchi, R. Suzuki, S. Tamura, Y. Kijima, M. Oishi, K. Matsui, H. Abe, A. Nakamura, M.** 1992. Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC 50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strain on pig septicemia. *J Vet Med Sci* ;54(6):1175-8.
- Espluges, J.** 1981. Aminoglicósidos. En: *Terapéutica antibiótica*. Belmonte, A (ed). RUAN S.A. Madrid, España. Pp:65-74.
- Eveland, WC. and Faber, JE.** 1953. Antigenic studies of the group of paracolón bacteria (32011 group). *J. Infect. Dis.*, 93:226-236.
- Foster, TJ.** 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metals ions in bacteria. *Microbiol Rev.*, 47:361-409.
- García Rodríguez, JA.** 1987. Antimicrobianos. En: *Microbiología y Parasitología Médica*. Pumarola, A. Rodríguez Torres, A. García Rodríguez, JA. Piédrola Angulo, G. 2ª ed, Masson. Barcelona. España. Pp 120-152.
- Gebre-Yohannes, A. Drasar, BS.** 1997. Plasmid profiles of drug resistant *Shigella boydii* types 1-5, 8, 10, 12-14 from Ethiopia (1974-85). *Epidemiol. Infect.* 119(3):293-8.
- Gedek, W.** 1984. Drug resistant gram negative mastitis pathogens. *Tiergesundheitsdienst Bayern*; 39:7, 513-514.
- Gelev, I. Gelev, E. Steigerwalt, AG. Carter, GP. and Brenner, DJ.** 1990. Identification of the bacterium associated with haemorrhagic septicaemia in rainbow trout as *Hafnia alvei*. *Res. Microbiol.* 141: 573-576.

- Gemski, P. Lazere, JR. Casey, T. Wohlhieter, JA.** 1980-a. Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*; 28(3):1044-7.
- Gemski, P. Lazere, JR. Casey, T.** 1980-b. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*; 27(2):682-5.
- Gerhardt, P.** 1993. Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington.USA.
- Giguere, S. Hondalus, MK. Yager, JA. Darrah, P. Mosser, DM. Prescott, JF.** 1999. Role of the 85 Kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*; 67(7):3548-57.
- Ginns, CA. Benham, ML. Adams, LM. Whithear, KG. Bettelheim, KA. Crabb, BS. Browning, GF.** 2000. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect Immun* ; 68(3):1535-41.
- Glinski, Z. Kauko, L. Buczek, J and Gacek, G.** 1994. *Hafnia alvei* infection of the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Med. Weterynaryjna*. 50:74-77.
- Glinski, Z. Chmielewski, M. and Kauko, L.** 1995. The causative agents of septicaemia of the honey bee, isolation and identification. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 39: 1, 107-112.
- Guinée, P.A.M. and J.J. Valkenburg.** 1968. Diagnostic value of a *Hafnia*-specific Bacteriophage. *J. Bact.* 96: 564.
- Hackett, JL. Lynch, WH. Paterson, WD. and Coombs, DH.** 1984. Extracellular protease, extracellular haemolysin, and virulence in *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41:1354-1360.0
- Halavatkar, H. Barrow, PA.** 1993. The role of a 54-Kb plasmid in the virulence of strains of *Salmonella enteritidis* of phage type 4 for chickens and mice. *J med Microbiol* ;38(3):171-6.
- Harada, K. Shimizu, K. and Matsuyama, T.** 1957. *Hafnia* isolated from man. *Gunma J. Med. Sci.* 6:109-112.

- Ish-Horowicz, D. and Burke, J.** 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*, 9:2989.
- Jansen, BC. And Hayes, M.** 1983. Retardation of wool growth in Merino sheep caused by bacteria. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 50:271-274.
- Kado, CI and LIU, S.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1373.
- Kauko, L. and Glinski, Z.** 1994. *Hafnia alvei* infection in honeybees. *Suomen Elainlaakarilehti.* 100: 5, 314-317.
- Kelly, WR.** 1993. Patterns of hepatic necrosis. In K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer (ed), *Pathology of Domestic Animals*, vol II, 4th ed., Academic Press, San Diego. Pp 337-346
- Kleeberger, A. Braatz, R. and Busse, M.** 1980. Taxonomy and ecology Enterobacteriaceae in milk. *Milchwissenschaft.* 35: 8, 457-460.
- Kotarski, SF. Merriwether, TL. Tkalcevic, GT. Gemski, P.** 1986. Genetic studies of kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30:225-230.
- Kovacs, N.** 1956. Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. *Nature.* 178, 703.
- Krieg, NR. and Sneath, PH.** 1994. The genus *Hafnia*. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. J.G. Holt, N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. pp. 180-234.
- Malkawi, HI. And Youssef, MT.** 1998. Antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal patients. *J. Trop. Pediatr.* 44(3):128-32.
- Mayer, KH. Opal, SM. Medeiros, AA.** 1997. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. En: *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica.* Mandell, Douglas y Bennett (ed). *Editorial Panamericana.*

Mukherjee, SR. Das, AM. Paranjape, VL. and Marwah, SR. 1986. *Hafnia alvei* isolated from an equine aborted foetus. *Indian J. Vet. Med.* 6:101-102.

Nassif, X. Fournier, JM. Arondel, J. Sansonetti, PJ. 1989. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun*;57(2):546-52.

Pardon, P. Popoff, MY. Coynault, C. Marly, J. Miras,I. 1986. Virulence-associated plasmids of *Salmonella serotype Typhimurium* in experimental murine infection. *Ann Inst Pasteur Microbiol*; 137B(1):47-60.

Prescott, JF. 1988. Agentes antimicrobianos. En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria*. Prescott, JF. Desmond Baggot, J. (ed) Acribia, Zaragoza, España. Pp 19-31.

Real, F. Fernández, A. Acosta, F. Acosta, B. Castro, P. Déniz, S. and Orós, J. 1997. Septicemia associated with *Hafnia alvei* in laying hens. *Avian Dis.*, 41 : 741-747.

Reed, LJ. & Muench, M. 1938. A simple methods of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.

Refaie, RS. Abou, AA. Seham, MA and Sayed, AM. 1993. Microbiological quality of suspected corned beef in Assiut. *Assiut Vet. Med. J.*, 28: 205-210.

Reuter, G. Sasse-Patzer, B. 1979. Resistance of members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* in beef and pig meat to antibiotics and chemotherapeutics. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*; 66:5, 172-177.

Ridell, C. 1987. Bacterial hepatitis. In *American Association of Avian Pathologists*, (ed), *Avian Histopathology*, 1st ed. Allen Press, Lawrence. , p. 61

Rivera, MJ. Martín, C. Gómez-Lus, ML. Robledano, L. Ota, I. Gómez Lus, R. 1988. Characterization of an hospital disseminated plasmid encoding resistance to gentamicin and other antimicrobial agents. *Microbiologia* ;4(1):55-9.

Rodríguez, LA. Vivas, J. Gallardo, CS. Acosta, F. Barbeyto, L. Real, F. 1999. Identification of *Hafnia alvei* with the MicroScan WalkAway system. *J Clin Microbiol* ;37(12):4186-8.

Rodríguez, LA. Gallardo, CS. Acosta, F. Nieto, TP. Acosta, B. and Real F. 1998. *Hafnia alvei* as a opportunistic pathogen causing mortality in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Fish Dis.* 21: 365-370.

Sakazaki, R. and Tamura, K. 1992. The Genus *Hafnia*. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., vol.1. Springer-Verlag, New York. , Pp. 2816-2821

Salimov, RM. 1978. *Hafnia* strains isolated from honey. *Veterinar.*4:44-46.

Sarti, M y Giorgetti, G. 1988. Terapia y profilaxis en ictiopatrología. En. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (ed.). *Patología en Acuicultura*. Madrid. Pp 429-479.

Schnick, RA. 1999. International harmonisation of antibacterial agent approvals and susceptibility testing. *EAFP 9th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish"*, 0-135. Rhodes.Grecia.

Seeley, HW. Van Demark, PJ. and Lee, JJ. 1991. Microbes in action. In *A laboratory manual of Microbiology*, 4^a ed. Freeman, WH. New York.

Sharma, RK. Boro, BR. and Borah, P.1991. Incidence of caprine pneumonia and associated bacterial species. *Indian J. Anim. Sci.* 61:54-55.

Smibert, RM. and Krieg, NR. 1981. Systematics: general characterization, In P. Herhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, N.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips (ed.), *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp 409-443.

Smith, HW. 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J Gen Microbiol*; 83(0):95-111.

Smith, P. 1999. Development of internationally accepted standard methods for determination of antibacterial susceptibility of fish pathogens. *EAFP 9th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish"*, 0-143. Rhodes.Grecia.

Terakado, N. Sekizaki, T. Hashimoto, K. Naitoh, S. 1983. Correlation between the presence of a fifty-megadalton plasmid in *Salmonella dublin* and virulence for mice. *Infect Immun* ;41(1):443-4.

Teshima, C., S. Kudo, Y. Ohtani and A. Saito. 1992. Kidney pathology from the bacterium *Hafnia alvei*: experimental evidence. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121 : 599-607.

Texdorf, V. I. Kielwein, G. and Ergüllü, E. 1975. Differentiation of enterobacteria isolated from milk. *Archiv. für Lebensmit.* 26: 46-49.

Toranzo, AE. Barja, JL. Colwell, RR. Hetrick, FM. 1983. Characterization of plasmid in bacterial fish pathogens. *Infect Immun*, 1:184-192.

Toranzo, AE. Santos, Y. Núñez, S. and Barja, JL. 1991. Biochemical and Serological Characteristics, Drug Resistance and Plasmid Profiles of Spanish Isolates of *Aeromonas salmonicida*. *Gyobyu Kenkyu*, 26(2):55-60.

Toth, I. Cohen, ML. Rumschlag, HS. Riley, LW. White, EH. Carr, JH. Bond, WW. Wachsmuth, IK. 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect Immun*; 58(5):1223-31.

Tully, M. 1991. A plasmid from a virulent strain of *Legionella pneumophila* is conjugate and confers resistance to ultraviolet light. *FEMS Microbiol Lett*; 69(1):43-8.

Vázquez-Moreno, L. Bermúdez, A. Langure, A. Higuera-Ciapara, I. Diaz de Aguayo, M. Flores, E. 1990. Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *J Food Science* ; 55:3, 632-634.

Bibliografía

Vliegthart, JS. Ketelaar-van Gaalen, PA. Van de Klundert, JA. 1989. Nucleotide sequence of the aacC2 gene, a gentamicin resistance determinant involved in a hospital epidemic of multiply resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* ,33(8):1153-9.

Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, Weinstein RA. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* ;10;281(6):517-23.

Ximena, MV. and Oriole, TM. 1983. *Hafnia alvei* aislada en un caso de aborto equino. *Arch. Med. Vet.*, 15: 90-91.

Yamamoto, T. Yokota, T. 1983. Plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407: evidence for two heat-stable enterotoxin genes and a conjugal transfer system. *J Bacteriol*, 153(3):1352-60.

Zink, DL. Feeley, JC. Wells, JG. Vanderzant, C. Vickery, JC. Roof, WD. O'Donovan, GA. 1980. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature*, 10;283. 224-226.

Agradecimientos

Agradecimientos

Al Doctor D. Fernando Real Valcárcel, director de este trabajo, por su apoyo incondicional en todo momento y colaboración en la realización de esta tesina de licenciatura.

A Feluco, mi media naranja en el terreno investigador, que siempre estaba ahí cuando le necesitaba.

A Vilma, que siempre soportó estoicamente mis despistes y nos reíamos juntos de ellos.

A Patricia, que llegó un día de Portugal y se tuvo que quedar por aquí porque nadie entendía que se quería ir.

A Inma, por hacer más agradable la estancia en el laboratorio.

A Soraya y Begoña, por ser como son.

A Juanma, María Jesús, Silvia y Víctor, por sus ayuda y consejos.

A Pablo y Maite, por compartir sus conocimientos conmigo.

A Nicolás y Héctor, por aguantar mis penas y yo las suyas cuando no salen las cosas.

A Noemí y Angeles, dos caras alegres frente al trabajo duro.

A Raúl, Petri, Jorge y Manolo, grandes amigos que también se dedican a esto de la investigación y me hacen más agradable la estancia en la Facultad .

A la U.L.P.G.C., por haberme concedido una beca de investigación durante el periodo 1998-2001, y haber podido dar mis primeros pasos como investigador.

Y como no, a todos aquellos que de alguna forma han colaborado en la realización de esta Tesina de Licenciatura.

ULPGC.Biblioteca Universitaria



659292

VET 579.8 PAD car

