

Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia a antibióticos seleccionados, en cepas de *Salmonella spp.* aisladas en Antioquia durante los años 2002 y 2003.

MIRYAN MARGOT SÁNCHEZ JIMÉNEZ* , ARLEY JOSÉ CARABALLO GUZMÁN**, NORA MARÍA CARDONA CASTRO***, CARLOS BERNAL PARRA§ , CARMEN TULIA ZAPATA§§, HAROLD EDUARDO DURANGO§§

Entidad Financiadora: Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES.

RESUMEN

Se determinó el perfil de sensibilidad y resistencia de 91 cepas de *Salmonella spp.* aisladas de muestras clínicas durante el año 2002 y 2003 en Antioquia, a un grupo de antibióticos. La susceptibilidad antimicrobiana determinó que 44 (48.4%) de las cepas eran resistentes y de éstas 40 (91%) fueron multirresistentes. El comportamiento de los aislamientos de *Salmonella spp.* mostró que el 4.4% fueron resistentes al ácido nalidíxico, 39.6% a ampicilina, 3.3% a cefalotina, 16.5% a cloramfenicol, 7.7% a gentamicina, 14.3% a kanamicina, 16.5% a estreptomina, 37.4% a tetraciclina y 26.4% a trimetoprim-sulfametoxazole.

* Miembro del Grupo de Investigación del Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Correspondencia: msanchez@ces.edu.co

** Bacteriólogo y Laboratorista clínico. Instituto Colombiano de Medicina Tropical- CES.

*** Miembro del Grupo de Investigación del Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES. Médica. Especialista en Medicina de Laboratorio.

§ Grupo Vida infantil. Universidad de Antioquia. Médico Pediatra.

§§ Grupo vida Infantil. Universidad de Antioquia. Laboratorio de Investigación en Infectología Pediátrica. Bacteriólogo.

Al clasificar las cepas por serovariedades, se encontró que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fue la que presentó mayor multirresistencia. La resistencia a los antibióticos de los serovares de *Salmonella* en nuestro estudio presenta un patrón similar a lo reportado en la literatura nacional en los últimos 2 años.

PALABRAS CLAVE

Salmonella
Sensibilidad
Resistencia
Antibióticos
Multirresistencia

SUMMARY

Antibiotic sensitivity of 99 *Salmonella* spp strains, isolated from clinical samples during 2002 in Antioquia were performed. The antimicrobial susceptibility showed that 44 (48.4%) of *Salmonella* spp were resistant and from this 40 (91%) were multiresistant. *Salmonella* spp showed resistance to nalidixic acid 4.4%, ampicillin 39.6%, cephalothin 3.3%, chloramphenicol 16.5%, gentamicin 7.7%, kanamycin 14.3%, streptomycin 16.5%, tetracycline 37.4% and 26.4% to trimethoprim-sulfamethoxazole.

The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium showed highest level of multiresistance. The *Salmonella* serotypes resistance to antibiotics in our region is similar to the pattern reported previously in the country in the last two years.

KEY WORDS

Salmonella
Sensitivity

Resistance
Antibiotics
Multiresistance

INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema de salud pública en los países en vía de desarrollo, afectando principalmente a niños, ancianos e inmunosuprimidos. Su alta tasa de mortalidad y el costo para el sistema de salud hace que la prevención y el control sean prioritarios (1).

Las características de transmisión de esta infección, asociada al consumo de alimentos y agua contaminada, hacen que sean endémicas en países en desarrollo donde la infraestructura de saneamiento no es adecuada y que se presenten brotes asociados a alimentos contaminados en países desarrollados.

Específicamente la salmonelosis es un problema de salud pública en países en desarrollo de Latinoamérica, Asia y Africa, con rangos de prevalencia desde 200 a 500 casos por 100.000 habitantes (2). Entre las salmonelosis encontradas en países en desarrollo está la fiebre tifoidea producida por *Salmonella enterica* serovar Typhi y Paratyphi, la cual es una infección severa que puede producir complicaciones y muerte. Las salmonelosis producidas por *Salmonella* non-Typhi son también importantes en países en desarrollo, donde se reportan brotes de infección intestinal (2). En Colombia la prevalencia de esta enfermedad es la misma que en los países endémicos. A pesar de que varios brotes epidémicos han sido publicados hay una ausencia de reportes reales debido al subregistro y a la dificultad en realizar el diagnóstico. Así, la mayoría de los casos son apreciaciones clínicas sin confirmación por el laboratorio. De acuerdo con el Sistema de Vigilancia del Ministerio de Salud, Colombia se ha presentado en los últimos 5 años una tasa para la enfermedad diarreica aguda mayor de 1.500

por 100.000 habitantes. El mismo sistema informa que el 50% de los egresos hospitalarios por EDA, se deben a *Salmonella spp* y *Shigella spp*. (3).

El Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia junto con los Laboratorios de salud pública departamentales, iniciaron en 1997 un programa de vigilancia para determinar las mas frecuentes bacterias patógenas asociadas con diarrea. Entre 1997 y 1999, realizaron 976 aislamientos de *Salmonella spp*, 96% asociados a casos clínicos de diarrea y 4% de alimentos; 34% de los aislamientos fueron *Salmonella spp*, 39% serovar Enteritidis, 27% Typhimurium, 9% del grupo E1, 5% Typhi y 20% de otros serotipos (4, 5).

Según la susceptibilidad a antimicrobianos, se determinó que el 56% de los aislamientos de *Salmonella spp*. fue resistente y el 22% multirresistente, con un patrón predominante de resistencia a ampicilina, tetraciclina, y trimetoprim sulfametoxazole (SXT).

Los análisis de multirresistencia de los aislamientos de *Salmonella spp* señalaron que 45/118 (51%) aislamientos de Antioquia fueron multirresistentes, comparados con 21/136 (15.4%) de Bogotá, 2/13(15.4%) del Valle, 1/13(7.7%) del Tolima y 6/41(1.5%) de Santander (4).

Posteriores estudios del grupo de Microbiología del INS entre los años 2000 y 2001 reportaron 336

aislamientos de *Salmonella spp*. en diferentes regiones del país en el marco del programa de vigilancia de sensibilidad a los antimicrobianos, mostrando los siguientes resultados: en Bogotá 52% de las cepas aisladas fueron resistentes, en Antioquia 27%, en Santander 5.4%, en Valle 3.9%, y en otros departamentos 11.5%. De las cepas aisladas se registró una resistencia a tetraciclina en el 65.9%, a la ampicilina 18.9%, a SXT 18.6%, al ácido nalidíxico 6.8% y al cloramfenicol 1.2% (5). Estos sistemas de vigilancia han permitido obtener información importante para hacer intervenciones que disminuyan la morbimortalidad en la población; y para establecer mejores esquemas terapéuticos que ayuden a frenar la creciente resistencia a los antimicrobianos.

En cuanto su clasificación taxonómica, el género *Salmonella* se agrupa dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Se halla ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose con frecuencia en el tracto gastrointestinal de los animales domésticos, reptiles, pájaros e incluso insectos. En la actualidad, por la gran similitud del DNA encontrada entre las especies, el género *Salmonella* ha sido clasificado en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, esta ultima no constituye un patógeno para el hombre. La especie *enterica* comprende 6 subespecies (subesp) (Tabla 1). Cada una de las cuales posee múltiples serovariedades.

Tabla N° 1.
Clasificación taxonómica del género *Salmonella*.

Familia	Género	Especie	Subespecie
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (más de 2000 serovares)
			<i>salamae</i>
			<i>arizonae</i>
			<i>diarizonae</i>
			<i>houtenae</i>
			<i>indica</i>
		<i>bongori</i>	

La mayor parte de los serovares de *Salmonella* patógenos para el ser humano, hacen parte de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y sus nombres se escriben con mayúscula la inicial y con letra capitalizada y no cursiva como se hacía anteriormente cuando cada uno de los serovares se consideraban una especie diferente (6, 7).

En el presente trabajo se determinaron los perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos de 91 cepas de *Salmonella spp.* aisladas de muestras clínicas (sangre, materia fecal y otras), durante los años 2002 y 2003 en Antioquia, estableciendo el porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos utilizados, identificando los serovares que presentan mayor resistencia y multiresistencia a los antibióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de las cepas. Se utilizaron 91 cepas de *Salmonella spp.* aisladas en diferentes laboratorios del departamento de Antioquia, clasificadas en el laboratorio Departamental de Salud Pública, en el Laboratorio de Infectados del Hospital infantil del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín y en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical durante los años 2002 y 2003.

Serotipificación. Todos los aislamientos fueron serotipificados utilizando antisueros específicos marcas BioRad y del Instituto Pasteur, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Prueba de sensibilidad a los antibióticos. Se utilizó el método de difusión en disco Kirby Bauer en agar Mueller Hinton, de acuerdo con el protocolo del Comité nacional para estándares de laboratorio (NCCLS).

Antibiograma. Se transfirieron 3 o 4 colonias aisladas en agar MacConkey a 5 ml de caldo Brain Heart

Infusion (BHI) y se realizó una suspensión de la bacteria en el caldo. Se incubó a 37° C hasta alcanzar una turbidez similar a la del patrón 0.5 de bario de la escala de Macfarland. Luego se sembró en la superficie de cajas de agar Mueller Hinton, allí se colocaron los sensibilizadores correspondientes, para incubarlas a 37° C durante 16 a 24 horas.

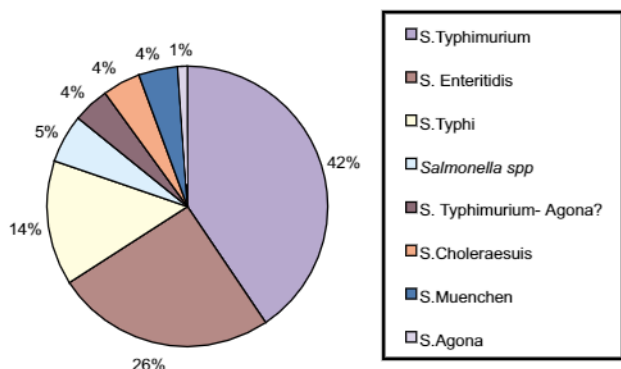
Los antibióticos seleccionados para determinar la sensibilidad y resistencia en este estudio fueron: ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cloramfenicol, ciprofloxacina, estreptomina, kanamicina, gentamicina, tetraciclina y SXT. Estos antibióticos se escogieron de acuerdo al uso frecuente en el tratamiento de los diferentes cuadros clínicos producidos por *Salmonella spp.*

En la lectura del antibiograma, para determinar si una cepa era resistente se midió el tamaño de la zona de inhibición y se comparó con los datos recomendados por la casa comercial (Becton Dickinson, Microbiology System), que tiene en cuenta el tamaño del halo de inhibición, para discriminar la sensibilidad completa, sensibilidad intermedia o resistencia de las cepas al antibiótico. Los datos obtenidos se digitalizaron y analizaron en EpiInfo versión 6.0, para calcular la cantidad y el porcentaje de serovares en los cuales se presentaron resistencia y multiresistencia.

RESULTADOS

Por medio de la serotipificación, se logró identificar las siguientes serovariedades: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (37 aislamientos), S. serovar Enteritidis (23 aislamientos), S. serovar Typhi (13 aislamientos), S. serovar Choleraesuis (4 aislamientos), S. serovar Muenchen (4 aislamientos), S. serovar Agona (1 aislamiento). En 4 aislamientos no se pudo definir si correspondían al serovar Typhimurium o al serovar Agona y 5 aislamientos se describen como *Salmonella spp.*, porque no pudieron ser serotipificados (figura 1).

Figura 1: Distribución porcentual de las cepas según serovariedades



Al determinar el origen de las cepas según el tipo de muestra se encontró que 71 fueron obtenidos en muestras de materia fecal, 13 de sangre, 2 de líquido cefalorraquídeo (LCR), y 5 de otro tipo de muestras (tabla 2).

En materia fecal se obtuvieron 36 aislamientos correspondientes a *Salmonella* serovar Typhimurium, 18 a serovar Enteritidis, 4 a serovar Choleraesuis, 4 a serovar Muenchen, 4 a *Salmonella spp.*, 4 aislamientos fueron clasificados como *Salmonella* Typhimurium o Agona y un aislamiento del serovar Agona.

En Sangre se obtuvieron 9 aislamientos correspondientes a *Salmonella enterica* serovar Typhi, 3 a *Salmonella* serovar Enteritidis y 1 a *Salmonella* serovar Typhimurium. Adicionalmente se aisló *Salmonella* serovar Typhi de LCR (2 aislamientos), hueso y líquido peritoneal (1 aislamiento de cada uno), *Salmonella* serovar Enteritidis de secreción de un dedo de pie y de líquido articular (1 aislamiento de cada uno) y 1 aislamiento de *Salmonella spp* de líquido pleural.

Tabla N° 2. Serovariedades aisladas según el tipo de muestra

Tipo de Muestra	HECES	SANGRE	LCR	OTROS	Total
Serovariedades					
Typhimurium	36	1		0	37
Enteritidis	18	3		2	23
Typhi		9	2	2	13
<i>Salmonella spp</i>	4			1	5
Typhimurium –Agona	4				4
Choleraesuis	4	0	0	0	4
Muenchen	4	0	0	0	4
Agona	1	0	0	0	1
Total	71	13	2	5	91

La susceptibilidad antimicrobiana determinó que 44 (48.4%) de las cepas eran resistentes y de éstas 40 (91%) fueron multirresistentes a los antibióticos empleados. El comportamiento de los aislamientos

de *Salmonella spp* demostró que el 4.4% fueron resistentes al ácido nalidíxico, 39.6% a la ampicilina, 3.3% a cefalotina, 16.5% a cloramfenicol, 7.7% a gentamicina, 14.3% a kanamicina, 16.5%

estreptomicina, 37.4% a tetraciclina, y 26.4% a SXT; ninguno de los aislamientos fue resistente a ciprofloxacina. (Tabla 3).

De las 34 cepas resistentes a tetraciclina, 29 fueron resistente también a ampicilina y otros antibióticos. El 100% de estas cepas tetraciclina resistente fueron multiresistentes. El patrón de multiresistencia encontrado con mayor frecuen-

cia fue ampicilina- cloramfenicol- estreptomicina- tetraciclina, con un 22.5%, seguido por el patrón ampicilina- kanamicina- tetraciclina- trimetoprim sulfametoxazol con un 10%. Otros patrones encontrados fueron: kanamicina- estreptomicina- tetraciclina- trimetoprim sulfametoxazol.

El serovar que mayor resistencia mostró fue *Salmonella* serovar Typhimurium. Tabla 4.

Tabla N° 3.
Porcentaje de Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos.

Antibióticos	% Sensible	% Sensibilidad Intermedia	% Resistente	Sin Dato
Acido nalidíxico	93.4	2.2	4.4	0
Ampicilina	58.2	2.2	39.6	0
Cefalotina	96.7	0	3.3	0
Ciprofloxacina	97.8	2.2	0	0
Cloramfenicol	83.5	0	16.5	0
Gentamicina	92.3	0	7.7	0
Kanamicina	74.7	11	14.3	0
Estreptomicina	72.5	11	16.5	0
Tetraciclina	61.5	0	37.4	1.1
SXT	73.6	0	26.4	0

Tabla N° 4.
Resistencia a antibióticos según serovariedad.

Serovariedades Antibióticos	Enteritidis	Typhimurium	Typhi	Chole-raesuis	Muenchen	Agona	Typhimurium-Agona?	Salmonella spp	Total
Ac. Nalidíxico	1	2		1					4
Ampicilina	8	20	2	1		1	3	1	36
Cefalotina	2	1							3
Ciprofloxacina									0
Cloramfenicol	3	10		1			1		15
Gentamicina	1	5			1				7
Kanamicina	1	8	2			1	1		13
Estreptomicina	3	9	1				1	1	15
Tetraciclina	4	22	2	1			4	1	34
SXT	2	15	2	1		1	3		24

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha presentado a escala mundial un marcado incremento del número de cepas de *Salmonella spp.* resistentes a antibióticos, lo cual se convierte en un problema grave al momento de la elección del medicamento para tratar a los pacientes. En el presente estudio la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina sigue siendo alta, 39.6% y 37.4% respectivamente de todos los aislamientos, similar a lo reportado en estudios previos hechos en Colombia (4, 5), Estados Unidos, España, y otros países (8, 9).

En otros países como Estados Unidos se aislaron cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT-104 en los años 1985, 1990 y 1995 en las cuales se demostraron plásmidos que le confieren resistencia a antibióticos como: tetraciclina, ampicilina, cloramfenicol, SXT, y estreptomycin. También se informaron casos en Europa (8, 10). Los cambios en los perfiles de resistencias bacterianas dependen de varios factores, entre ellos: región geográfica, tipo de hospital y el uso de antibióticos a escala local. (11). Algunos estudios han demostrado que la probabilidad de ser portador crónico de *Salmonella spp* está relacionada directamente con el uso de antibióticos (12).

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo reportado en la literatura nacional (5, 13); es importante mencionar que la resistencia a la tetraciclina se comporta como un marcador de multiresistencia. El mecanismo de resistencia más importante descrito en este tipo de antibióticos, se refiere a la capacidad que adquiere la bacteria para evitar la acumulación intracelular adecuada del antibiótico al impedir el ingreso por medio de bombas de transporte alrededor de la membrana celular bacteriana; estas bombas proteicas son codificadas por genes incluidos en plásmidos. Adicionalmente pueden incluir genes de resistencia para otros antibióticos y pueden ser transmitidos de una bacteria a otra por transducción

o conjugación (14). La resistencia a la ampicilina (antibiótico β -lactámicos) se describe debido a: 1. Inactivación del antibiótico por β -lactamasas; 2. Modificación del sitio de unión de las proteínas fijadoras de penicilina (PFP). 3. Acceso difícil del antibiótico al sitio de unión con las PFP y 4. La presencia de una bomba de egreso (14, 15). También es importante mencionar que en los últimos años se ha demostrado la transferencia *in vivo* de genes de resistencia incluidos en plásmidos entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (13, 15) lo que explicaría la emergencia de una mayor frecuencia en la resistencia entre los miembros de esta familia.

Adicionalmente otro de los factores que influyen sobre la resistencia puede estar relacionado con el amplio uso de los antibióticos en animales, los cuales actúan como reservorios que posteriormente son utilizados como fuente de alimento para el consumo humano originando la diseminación de cepas multiresistentes en alimentos de origen animal hecho que afecta no sólo a países del tercer mundo sino también a países desarrollados (16). La importancia de este tipo de estudios radica en permitir identificar perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella spp* circulantes en el departamento de Antioquia, y de esta forma implementar mejores esquemas terapéuticos que ayuden a frenar la creciente resistencia a antibióticos.

La resistencia de serovares de *Salmonella spp.* a los antibióticos en nuestro estudio muestra un patrón similar a lo reportado en los últimos 2 años por otros grupos en el país (4,5,13).

AGRADECIMIENTOS

A Daniel Agudelo y Clara Lina Salazar del Instituto Colombiano de Medicina Tropical y a Claudia Cuervo del Colegio Mayor de Antioquia, por sus valiosos aportes durante la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Mandal BK. *Salmonella* infection. In: Manson-Bahr PEC, Bell DR, Manson P, eds. *Manson's Tropical Medicine*. 20th ed. London UK: Saunders; 1996. p. 849-63.
2. Miller IS, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella* (Including *Salmonella typhi*). En: Mandel, Douglas and Bennett, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*; 4th ed ; Churchill Livingstone; 1995. p. 2013-33.
3. Velandia M, Reyes G, Porras A, García I, Saboya M, Prieto F et al. Otros eventos de notificación obligatoria: segundo semestre del 2003: EDA, IRA, ETA, rabia y meningitis. *Inf Quinc Epidemiol Nac Colombia* 2003;15:241-56.
4. Muñoz N, Agudelo CI, Ovalle MV, Realpe MH, et al. Vigilancia en red de los serotipos y la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Shigella* sp. y *Vibrio cholerae* O1, 1997-1999. *Biomédica* 2000;9:210-7.
5. Muñoz N, Agudelo CI, Realpe ME, Ovalle M y laboratorios de salud pública. Vigilancia en red de la susceptibilidad antimicrobiana y de los serotipos de *Salmonella* spp, *Shigella* sp y *Vibrio cholerae*: informe de 2000-2001. *Inf Quinc Epidemiol Nac Colombia* 2002;12:177-92.
6. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxw R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature (Guest commentary). *J Clin Microbiol* 2000;38:2465-7.
7. Uzzau S, Down DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S et al. Review: host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 2000;125:229-55.
8. Ribot EM, Wierzbza RK, Agudelo FJ, Barrett TJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerging infectious diseases* 2002;4:387-91.
9. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolated identified in Canada. *J Clin Microbiol* 2003;4:460-2.
10. Miriagou V, Filip R, Coman G, Tzouveleakis LS. Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains in Romania. *J Clin Microbiol* 2002;40:4334-6.
11. Crespo MP, Vélez JD, Castañeda CR. Epidemiología de la resistencia bacteriana en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia 1997-2000. *Infectio* 2001;2:116.
12. Vélez JD. Enfermedad por Salmonellas. En: Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya VI, editores. *Fundamentos de medicina: enfermedades infecciosas*. 6^a edición. Medellín: Fondo editorial CIB; 2003. p. 450-8.
13. Bernal Parra C, Zapata CT, Durango HE, Álvarez C. Agentes etiológicos de diarrea en niños atendidos en la Unidad de capacitación para el tratamiento de la diarrea del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín. *Infectio* 2002;4:204-11.
14. Jane J, Burns MD. Mecanismos de Resistencia Bacteriana. *Clin Ped N Am* 1995;3:463-70.
15. Levertein-Van Hall Ma, Box Ata, Blok Hem, Paauw A, Fluit Ac, Jan Vehoef J. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant enterobacteriaceae clinical setting. *Journals Infect Dis* 2002;186:49-56.
16. Frech G, Kehrenberg C, Schwarz S. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J Antimicrob Chemoth* 2003;51:180-2.