

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México.

ESCUELA DE BIOLOGIA



Perfil Plasmídico de Tres Géneros Bacterianos Patógenos
Aislados de Leche en la Cd. de Hermosillo, Sonora.
Comparación de Cuatro Métodos de Extracción
de ADN Extracromosómico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA

FRANCISCO MONTES DE OCA CANASTILLO



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE CUADROS	vii
OBJETIVOS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
Plásmidos	4
Origen, Descubrimiento y Evolución	4
Caracterización y Clasificación	7
Análisis físico-genético	7
Análisis molecular	7
Clasificación	10
Mecanismos de Transferencia de Plásmidos	16
Ecología de Plásmidos	20
Importancia de los Plásmidos en Epidemiología ...	25
MATERIALES Y METODOS	27
Recolección y Procedencia de la Muestra	27
Obtención del ADN plásmídico	29
Método I. Procedimiento rápido de Kado y Liu modificado	29
Método II. Procedimiento de Birnboim y Doly modificado por Manniatis	30

C O N T E N I D O (Continuación)

	Página
Metodo III. Extraccibn con fenol-cloroformo	33
Metodo IV. Modificacibn del metodo de Birn-- boim y Doly en nuestro laboratorio	33
Perfil Plasmídico	34
Electroforesis en gel de agarosa	35
Visualizacibn	35
Tamaño de las bandas	37
RESULTADOS	38
DISCUSION	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Conjugación bacteriana.....	17
2. Transducción especializada	19
3. Frecuencia relativa de microorganismos aislados en 170 muestras de leche pasteurizada, en la Cd. de Hermosillo, Sonora	39
4. Perfil plasmídico obtenido por el método I	43
5. Perfil plasmídico obtenido por el método II	44
6. Perfil plasmídico obtenido por el método III	46
7. Perfiles plasmídicos de <u>E. coli</u> (I-V)	48
8. Perfiles plasmídicos de <u>E. coli</u> (VI)	49
9. Perfiles plasmídicos de <u>E. coli</u> (VII)	50
10. Perfiles plasmídicos de <u>S. paratyphi</u> A	53
11. Perfiles plasmídicos de <u>S. aureus</u>	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Plásmidos R aislados de diferentes microorganismos	12
2. Plásmidos diferentes de R obtenidos en otros estudios	14
3. Distribución por marcas de leches analizadas	28
4. Condiciones de electroforesis en gel de agarosa 0.6%	36
5. Bacterias seleccionadas para el estudio de su perfil plasmídico por su importancia clínica.....	40
6. Serotipo y antibiograma de las bacterias utilizadas en el estudio.....	41
7. Perfiles y tamaños de las bandas plasmídicas obtenidas de <u>E. coli</u>	51
8. Perfiles y tamaños de las bandas plasmídicas obtenidas de <u>S. paratyphi</u>	54
9. Perfiles y tamaños de las bandas plasmídicas obtenidas de <u>S. aureus</u>	56

OBJETIVOS

General

Aislar el ADN plasmídico de tres géneros bacterianos aislados de leche pasteurizada utilizando cuatro métodos distintos para ello.

Particulares

- a) Determinar cuál método resulta más eficiente.
- b) Obtener los perfiles plasmídicos de cada cepa.
- c) Comparar los perfiles obtenidos y observar similitudes entre ellos.

RESUMEN

En el presente estudio se compararon cuatro métodos de extracción de ADN extracromosómico con el fin de obtener el perfil plasmídico de tres géneros de bacterias patógenas aisladas de leche pasteurizada en la Cd. de Hermosillo, Sonora: Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella paratyphi.

Los métodos probados fueron los propuestos por: a) Kado y Liu; b) Birnboim y Doly modificado por Manniatis et al; además c) Método del fenol-cloroformo y d) Una modificación de Birnboim y Doly hecha en nuestro laboratorio.

Este último resultó ser el más efectivo ya que se logró obtener una alta resolución y una muy buena visibilidad de las bandas plasmídicas con respecto a las otras técnicas.

En cuanto a los perfiles plasmídicos se obtuvieron siete distintos en E. coli con alguna similitud entre algunos de ellos; dos diferentes en S. aureus sin similitud alguna; y tres perfiles totalmente diferentes en S. paratyphi.

Hubo un microorganismo por género que no presentó ninguna banda plasmídica aparente.

INTRODUCCION

Hace más de 40 años un sorprendente descubrimiento revolucionó la medicina, específicamente el campo del tratamiento de enfermedades infecciosas: los antibióticos, que son productos de origen natural, poseen acción antimicrobiana y son sintetizados por bacterias u hongos. Los antibióticos vinieron a reforzar el arsenal de agentes terapéuticos que incrementan la esperanza de vida del hombre.

Por otro lado estos maravillosos compuestos hallaron un lugar importante en la alimentación animal como "promotores del crecimiento".

Sin embargo, con el paso del tiempo y como consecuencia de la liberación masiva y uso indiscriminado de antibióticos por el hombre, la sombra del grave problema de las resistencias bacterianas a estos fármacos está al acecho y poco a poco empieza a causar estragos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Aunque aún se controlan con éxito en su mayoría, las enfermedades llamadas intrahospitalarias y las epidemias en que el agente causal es un organismo resistente a uno o varios antibióticos, se convierten paulatinamente en padecimientos letales.

Desde hace treinta años se conoce la resistencia dada por plásmidos, pero estos fueron considerados como una rareza; en la actualidad, en cambio, sabemos que la frecuencia de estos elementos extracromosómicos es sumamente elevada y que están presentes en casi la totalidad de las especies bacterianas conocidas. Se sabe también de la versatilidad funcional de tales macromoléculas y de los complejos mecanismos intrincados en su transferencia y movilidad.

En el presente trabajo se compararon cuatro técnicas de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico con el fin de determinar cuál de ellos era el más eficaz. Se probaron tres géneros distintos de microorganismos patógenos aislados de leche pasteurizada y se observó el perfil plasmídico que mostraban dichas bacterias.

La finalidad de este estudio es la de optimizar y simplificar la metodología para la detección de agentes epidemiológicos en base a la característica de su perfil plasmídico, hecho que será de gran utilidad en la salud pública.

El presente trabajo inicia con una revisión general acerca de los plásmidos, definición, origen; descubrimiento y evolución, estudio, clasificación, mecanismos de transferencia, ecología y finalmente su importancia. Después se continúa con la descripción del trabajo en sí,

los resultados obtenidos, su discusión y culmina con algunas recomendaciones generales en base a las conclusiones del trabajo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ácido desoxirribonucleico, circulares, dúplex, que varían en tamaño, desde dos, hasta varias centenas de kilobases (KB), y poseen genes para la inactivación de antibióticos, para metabolizar productos naturales y para la producción de toxinas, entre otros. En esencia, los plásmidos son cromosomas accesorios que difieren del cromosoma bacteriano, en que solo son indispensables bajo ciertas condiciones. Los plásmidos son también replicones, es decir, contienen una región específica para su replicación y, por ende, pueden replicarse autónomamente (Stryer, 1981). Las diferentes clasificaciones de los plásmidos y las funciones que desempeñan se tratarán más adelante.

Origen, Descubrimiento y Evolución

Se puede decir que el descubrimiento de los plásmidos fue una consecuencia del uso de los antibióticos, ya que los primeros reportes que se tienen de ellos son en base a resistencias transmisibles a antibióticos (Watanabe, 1963). Las moléculas encargadas de este proceso se denominaron plásmidos. Desde entonces, la importancia de los plásmidos ha sido apreciada progresivamente, tanto en sus hospederos bacterianos, como, indirectamente, en el hombre. Hoy se

sabe que además de estar involucrados con organismos resistentes a antibióticos, confieren también importantes características que pueden perjudicar o beneficiar al hombre (Platt et al, 1986).

Sin embargo, el hecho de que el uso de antibióticos haya conducido a la detección de los plásmidos, no quiere decir que éstos hayan sido los que los originaron. Se sabe que las bacterias de la "era pre-antibióticos" (anteriores al uso de antibióticos) ya presentaban plásmidos (Datta and Huges, 1983), y aún más, el grado de similitud de esos plásmidos y los modernos, es muy grande, lo que lleva a pensar que los últimos derivan de los primeros (Datta and Huges, 1983; Platt et al, 1986).

Existen, sin embargo, muchas teorías que tratan de explicar el origen de los plásmidos. Cohen et al (1982), proponen que uno de los primeros pasos evolutivos de los plásmidos consistió en la formación de la región que promueve la replicación autónoma, a la que se le fueron añadiendo genes que proporcionaban ventajas biológicas al organismo que lo poseía. En pasos posteriores de la evolución se agregaron genes que facilitaron la transferencia interbacterial o una existencia extracelular. Lacey (1975), por su parte, propone que quizás los plásmidos y los transposones, pequeños genes móviles que pueden integrarse al cromosoma o a un plásmido, hayan sido formados durante la transducción por fagos; mientras que Datta (1984), atribuye el origen de los plásmidos R,

específicamente, a la transmisión de esa determinante por parte de cepas productoras de antibióticos, lógicamente resistente a ellos, a otras especies sensibles.

Sea cual fuere el origen del ADN plasmídico, el hecho es que existe y está en una continua evolución, acelerada, según la mayoría de los autores (Boe et al, 1987; Datta and Huges, 1983; Kunin, 1983; Lacey, 1984; Levy, 1987; Wiedermann et al, 1985), por la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos.

Pero, en qué consiste ese acelerado proceso evolutivo que ejercen los antibióticos y qué consecuencias pueden acarrear?

Se ha dicho que cada vez que se usa un agente antimicrobiano hay un pequeño, pero acumulativo efecto en la ecología del mundo microbiano (Kunin, 1983), pues bien, dada una presión selectiva ejercida por un antibiótico, aunada a la remarcable diversidad genética y a la habilidad para transferirse resistencias entre bacterias, el resultado no es nada halagador, ya que aparecen organismos multiresistentes (Levy 1987) y hasta organismos con plásmidos híbridos o multifuncionales, plásmidos que además de codificar resistencia a antibióticos, lo hacen también para patogenicidad o producción de toxinas (Hawkey, 1986).

Caracterización y Clasificación

Análisis físico-genéticos

Estos llevan la finalidad de obtener mapas físico-genéticos de los plásmidos, y son muy útiles para la construcción de cepas con marcadores fenotípicos, genotípicos y vehículos de clonación utilizados en estudios de genética molecular e ingeniería genética, tales como transformación y clonación de genes (Stryer, 1981).

Estos mapas resultan de la integración de los resultados de pruebas de recombinación, restricción, delección e inactivación por inserción (Brown et al, 1986; Novick et al, 1979; Tennet, et al, 1986).

Otro análisis que es muy común es el de secuenciación, que revela la estructura primaria de la cadena de ADN (Stryer, 1981).

Cabe mencionar que todas estas técnicas se realizan con ADN plasmídico previamente aislado, por lo que el método de obtención del plásmido se convierte en un paso fundamental y determinante para el éxito de tales estudios.

Análisis molecular

La mayoría de los trabajos de análisis molecular de plásmidos han sido llevados a cabo en el campo de la Epidemiología y solo unos cuantos en relación con problemas de otra naturaleza. Las técnicas usadas con este fin caen

en dos categorías: directas e indirectas, aunque ambas parten de ADN previamente aislado (Meyers et al, 1976; Schaberg, et al, 1981).

Técnicas Indirectas. Estas comprenden la electroforesis en gel de agarosa y el análisis con endonucleasas de restricción. La primera da el tamaño de una molécula plasmídica y la segunda nos dice, en base a los fragmentos generados, la similitud entre moléculas plasmídicas (Meyers et al, 1976).

Técnicas Directas. Estas nos proporcionan información cuantitativa acerca de las homologías entre secuencias de bases de ADN de diferentes fuentes por hibridación. Las técnicas más usadas son: a) Hibridación ADN-ADN en fase líquida, que determina la extensión de homologías entre dos moléculas plasmídicas; b) Análisis heterodúplex, para plásmidos pequeños, en el cual el ADN híbrido se observa directamente al microscopio electrónico, el ADN no homólogo aparece como asas o burbujas de una sola cadena; y c) Hibridación Southern blot, en el que secuencias de ADN muy pequeñas (v.g. genes) pueden ser identificadas, por una sonda (probe) de ADN marcado radioactivamente con anterioridad, el cual se asocia a un fragmento de plásmido que ha sido transferido a un filtro de nitrocelulosa (Farrar, 1983; Lacey 1984).

La información que aportan la aplicación de las técnicas moleculares es muy útil en la Epidemiología, especialmente el perfil plasmídico en gel de agarosa, ya que es posible detectar por medio de él, cepas bacterianas

epidémicas, es decir, cepas con un perfil plasmídico idéntico (Schaberg, 1981); también se ha logrado identificar plásmidos epidémicos (Chabbert et al, 1979; O'Brien et al, 1982), por la capacidad que tienen estos de transferirse de una cepa a otra por conjugación, así, un mismo plásmido puede encontrarse en diferentes especies, biotipos o serotipos bacterianos relacionados por una epidemia. Es importante hacer notar que estos problemas no hubieran podido ser resueltos sin la ayuda de las técnicas moleculares.

El perfil plasmídico tiene la ventaja de que es sumamente rápido y simple, y puede ser aplicado a todos los organismos involucrados en una epidemia, en tanto que otros indicadores epidemiológicos tales como serotipo, biotipo y fagotipo, requieren de pruebas relativamente complicadas, y que muchas veces no son aplicables a todos los microorganismos involucrados (Farrar, 1983).

También se ha utilizado el perfil plasmídico para demostrar o comprobar la transmisión o adquisición de infecciones por alimentos contaminados con bacterias. Se ha logrado observar que en áreas geográficas muy separadas se obtienen organismos con perfiles plasmídicos similares que han viajado en un vehículo común y después se han transmitido por contacto de persona a persona, causando así, una epidemia (Levy, 1987; Levy et al, 1976).

Clasificacibn

Los plásmidos han sido clasificados de diversas maneras. La clasificación más sencilla es aquella que los agrupa en dos clases: autoconjugables y no autoconjugables. La primera incluye aquellos plásmidos que contienen el factor F (fertilidad), que los capacita para promover la conjugación y, por ende, su transmisión.

El hecho de que los plásmidos no autoconjugables carezcan de dicho factor no es un impedimento para su movilización, ya que se ha visto que los primeros promueven la movilidad de los segundos (Archer and Johnston, 1983).

Otra clasificación se da en base a la incompatibilidad genética de los plásmidos. Esta se refiere a la capacidad o incapacidad de un par de plásmidos, de coexistir en una misma célula. Así, plásmidos compatibles pueden existir al mismo tiempo en una célula, mientras que los incompatibles se segregarán durante la primera división celular (Novick, 1967). En la actualidad existen más de 21 grupos de incompatibilidad bien caracterizados (Datta and Huges, 1983).

Por las características fenotípicas y funciones que confieren los plásmidos los podemos clasificar en: resistentes a antibióticos, resistentes a metales pesados, fertilidad, producción de bacteriocinas, producción de antibióticos, producción de enterotoxinas, inducción de

tumores en plantas, factores de virulencia, metabolizadores de alcanfor y octano, producción de enzimas de restricción y modificación del ADN, entre otros (Cohen et al).

En este trabajo sólo nos ocuparemos de aquellos que tienen importancia desde el punto de vista clínico.

Plásmidos de Resistencia (R). Estos plásmidos codifican para la resistencia a antibióticos, su tamaño es muy variable independientemente de si hay una sola resistencia o multi-resistencia (Archer and Johnston, 1983; Novick, 1967; O'Brien et al, 1982; Tennet et al, 1984; Tietze and Tschape, 1983) y pueden ser autotransmisibles. Han sido aislados en casi todas las especies bacterianas estudiadas (Levy, 1987), tanto gram positivas como negativas.

Hay varios mecanismos por los cuales los plásmidos median la resistencia a estos fármacos, tales como: inactivación por medio de enzimas (v.g. beta-lactamasa, cloranfenicol acetil transferasa); producción de proteínas modificadas a las que no se liga el fármaco (v.g. sintetasa dihidropteritoato en la resistencia a sulfonamidas) (Foster, 1983). En el Cuadro 1 se presentan plásmidos R aislados de diferentes especies bacterianas, como se puede apreciar, el rango de tamaño molecular en el que entran estos plásmidos es sumamente amplio y ni siquiera es proporcional al número de resistencias que presenta la cepa.

Microorganismo	Característica	Tamaño Molecular (Kb)
RESISTENCIA =====		
<u>S. aureus</u>	C	4.5
<u>S. pneumoniae</u>	SM	109
<u>P. stuartii</u>	AM	76
<u>Klebsiella sp.</u>	GM	107
<u>P. aeruginosa</u>	GM	15
<u>Klebsiella sp.</u>	SM, AP, SB, SU, CF	68
<u>S. pneumoniae</u>	SM, SP, AM, K, GM, C	121
<u>Serratia sp.</u>	AK, NN	38
<u>Salmonella sp.</u>	SM, AM, TE	145, 4.5
<u>Klebsiella sp.</u>	TE	197, 151
<u>S. aureus</u>	C, E, P, TE	48
<u>Staphylococcus sp.</u>	TE	4.5
<u>S. aureus</u>	TE	4.2
<u>Staphylococcus sp.</u>	TE	4.1
<u>S. epidermidis</u>	TE	4.2

S= cloranfenicol	SM= estreptomina	SP= espectomicina
SU= sulfatiazol	GM= gentamicina	K= kanamicina
E= eritromicina	P= penicilina	MC= metilcilina
AK= amikacina	NN= tobramicina	CLM= clindamicina
TC= tetraciclina	RF= rifampicina	CF= cefalotina

Cuadro modificado de León (1988).

Cuadro 1: Plásmidos R aislados de diferentes microorganismos.

Plásmidos Enterotóxicos (Ent). Son los responsables de la producción de enterotoxinas (Martínez et al, 1987) en E. coli y son las causantes directas de la diarrea al alterar el balance electrolítico en el organismo, aunque no se sabe exactamente como ocurre (Lee et al, 1983). A menudo son transmisibles y por lo general se han aislado con determinantes de resistencia a antibióticos (Gyles et al, 1977; Martínez et al, 1987). Su peso molecular va de 60 a 65 megadaltons (Lee et al, 1983; Tietze and Tschape, 1983).

Plásmidos Asociados con Virulencia. Estos codifican la producción de adhesinas que favorecen la fijación de las bacterias a la membrana celular del hospedero; característica que faculta al organismo para ser virulento. Se han aislado de Salmonella sp. y E. coli y sus pesos moleculares fluctúan entre 30 y 140 MDal (Brown et al, 1986; Hale et al, 1983; Helmuth et al, 1985; Hones et al, 1982; Nataro et al, 1987; Pohl et al, 1987; Popoff, et al, 1984).

En el Cuadro 2 se presentan plásmidos Ent y de virulencia obtenidos en varios estudios y de diferentes especies bacterianas. Como se puede observar, su variabilidad en cuanto a tamaño es muy grande pero, a excepción del plásmido de Chlamydia sp., todos son de un tamaño molecular relativamente alto.

Microorganismo	Característica	Tamaño Molecular (Kb)
<u>Salmonella sp.</u>	Epidemiológico	54
<u>Chlamydia sp.</u>	Parásito Intracelular	7.9
<u>E. coli</u>	Factor de Adherencia	90
<u>E. coli</u>	Factor de Adherencia y TT	106
<u>E. coli</u>	Enterotóxico	82 - 136
<u>E. coli</u>	Enteroinvasivo	212
<u>Shigella sp.</u>	Enteroinvasivo	212

TT= toxina termoestable

Cuadro modificado de Ledn (1988).

Cuadro 2: Plásmidos diferentes de R, obtenidos en otros estudios.

Plásmidos híbridos o multifuncionales. Son aquellos que codifican varias características fenotípicas. Surgen de recombinaciones entre los tres grupos anteriores. A menudo son de alto peso molecular y pueden ser autotransferibles (Gyles et al, 1977; Nataro et al, 1987; Peñaranda et al, 1983).

En la actualidad se han venido aislando cada vez con mas frecuencia, y se ha visto comunmente la asociacion en un mismo plásmido de genes que codifican para la produccion de toxinas y la resistencia a uno o varios antibióticos.

Mecanismos de Transferencia de Plásmidos

La transferencia del ADN plasmídico puede ser tanto natural como inducida. Aquí sólo nos referiremos al primer tipo, dada la orientación del trabajo, pero diremos que la inducida es de gran importancia en el campo de la Ingeniería Genética.

Los mecanismos por los que se da este fenómeno son conjugación y transducción por fagos.

La conjugación se lleva a cabo por contacto célula-célula y está mediada por el gen de fertilidad (F+) (Lehninger, 1982). Esta puede ser tanto interespecífica como intraespecífica (Cohen, 1986; Martínez et al, 1987; Naidoo, 1984; Platt et al, 1984; Tennet et al, 1984), es decir, que puede llevarse a cabo tanto entre organismos de la misma especie como entre organismos de especies diferentes, aunque se ha observado que existe una barrera intergenérica entre los grupos gram positivo y gram negativo (Cooksey and Baldwin, 1985).

La Fig. 1 es un esquema del mecanismo de la conjugación. En a) se observan las dos células, receptora (-) y donadora (+), con un plásmido F que promueve la conjugación; en b) se muestra el acoplamiento de las dos células por medio del pili; en c) se lleva a cabo la transferencia del plásmido y en d) la separación de las células una vez completada la transferencia obteniéndose como resultado dos cepas potencialmente donadoras (+).

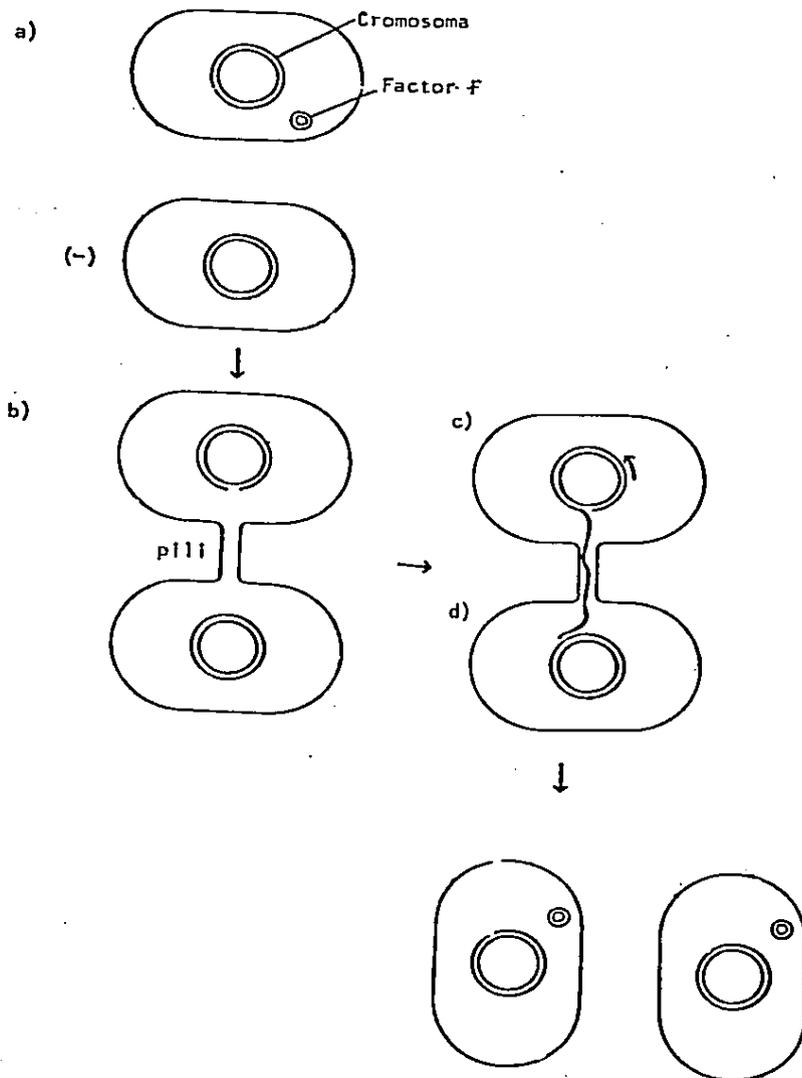


Fig. 1. Conjugación bacteriana.

Se podría pensar que la transmisión por conjugación es exclusiva de los plásmidos que contienen el factor de fertilidad, pero no es así, ya que se ha comprobado que éstos capacitan para transferirse a los plásmidos que carecen de ese factor (Archer and Johnston, 1983; Naidoo, 1984). Dicha capacitación consiste en la formación de cointegrados que resultan de la unión temporal de dos plásmidos, uno de ellos conteniendo el factor de fertilidad, transmitiéndose así, durante la conjugación, como un solo plásmido. A este fenómeno se le conoce como co-transferencia, y es estimulado por el uso de antibióticos (Archer and Johnston, 1983; Arthur and Sherratt, 1979; Naidoo, 1984). Está ligado también a los transposones.

La transducción por fagos se da cuando genes transducibles de una bacteria se unen al ADN viral y son transportados por éste, hacia otra bacteria (Lehninger, 1982). Esta puede ser especializada si involucra la integración de un segmento de ADN bacteriano en el segmento del virus o generalizada si no hay asociación física entre los ADN viral y bacteriano, y el fragmento bacteriano es encapsulado en lugar del ADN viral. La Fig. 2 muestra el tipo de transducción especializada.

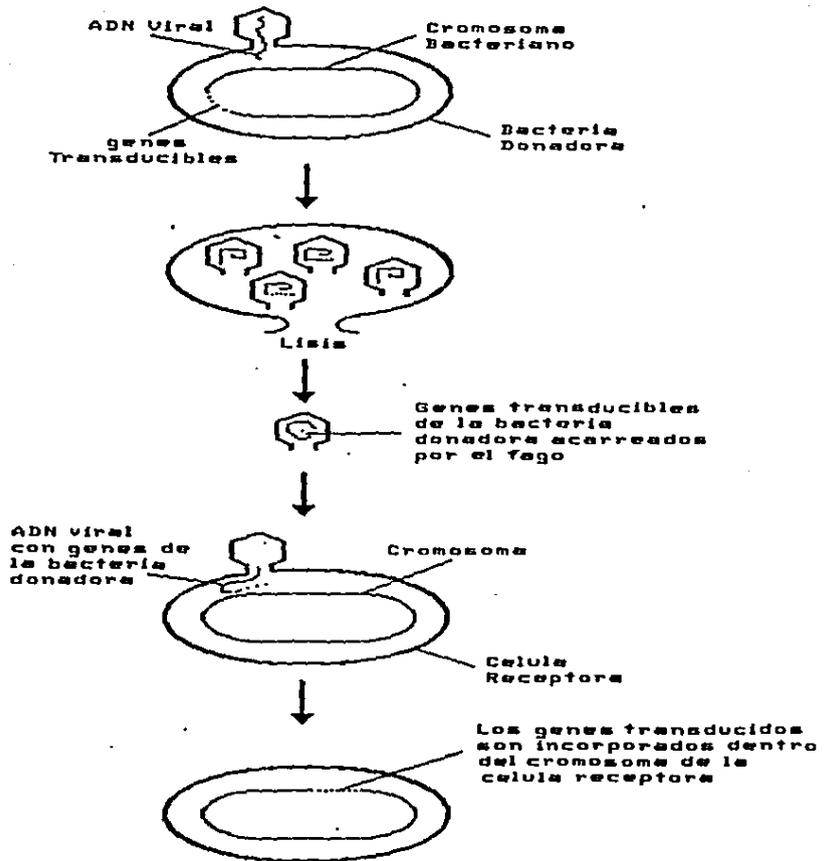


Fig 2. Transducción especializada. Comienza con la infección viral y la incorporación de su ADN en el cromosoma bacteriano, que al momento de la duplicación puede llevar consigo un segmento del ADN bacteriano, quedando también encapsulado. La transducción de los genes, en sí, se lleva a cabo cuando el virus "híbrido" infecta otra bacteria.

Ecología de Plásmidos

Ya hemos visto el papel que desempeñan los plásmidos dentro de sus hospederos, pero, cuáles son las consecuencias ecológicas que esto trae consigo?, cómo repercuten estas consecuencias en el humano?.

Los antibióticos se han venido usando desde hace más de 40 años para tratar infecciones de humanos, animales y plantas, pero como consecuencia de esto, su efectividad se ha visto reducida por la aparición de cepas resistentes (Levy, 1978b; Levy, 1984), es por eso que se dice que el uso de antibióticos promueve la aparición y diseminación de plásmidos R (Platt et al, 1984). Esto explica el hecho de que genes similares de resistencia entre bacterias de diferentes géneros y de diferentes nichos ecológicos presenten un patrón de resistencia similar, ilustrando, así, la complejidad de la dispersión de determinantes de resistencia en los microbios. Estas aparecen en determinada región geográfica e inmediatamente se dispersan hasta zonas muy alejadas (Levy, 1985). Tampoco están restringidas a un grupo animal en particular, sino que organismos originalmente presentes en animales pueden después infectar al hombre que trata con ellos o con sus productos (Holmberg et al, 1984; Levy et al, 1976; Linton, 1977).

Cerca de la mitad de los antibióticos producidos en Estados Unidos son usados en dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento (N.R.C.C., 1980). La situación en los países en vías de desarrollo es más grave aún ya que

flora intestinal de las personas que vivían en la granja. Después de cuatro meses de iniciado el estudio, dichos individuos comenzaron a excretar cantidades cada vez más grandes de microorganismos resistentes a Tetraciclina y multiresistentes, hecho que no se observó en el grupo control integrado por personas ajenas a la granja. Las cepas multiresistentes fueron capaces de transferir todas las resistencias a un índice mayor que el de aquellas que presentaban resistencia simple.

Aunque la transmisión de resistencias de bacterias encontradas en animales a bacterias que afectan al hombre ha sido difícil de detectar por el hecho de que los mismos antibióticos han sido utilizados tanto en humanos como en animales (Levy, 1987), Hummer *et al* (1986) realizaron un seguimiento utilizando nurceotricina, un antibiótico recién introducido como promotor de crecimiento en animales pero no utilizado en el hombre. El grupo de investigadores monitoreó la aparición de organismos resistentes a la droga entre puercos de una granja que consumían un suplemento alimenticio al cual se le había adicionado el antibiótico y también se realizó en los trabajadores de la granja, sus familiares y los vecinos del área. Los resultados que se obtuvieron durante el primer año de uso fueron impactantes, pues se encontró que *E. coli* aislada del tracto intestinal de los puercos que ingirieron el fármaco, presentaba resistencia. Después de un período de dos años de uso, la determinante de la resistencia, un transposón, apareció en

la flora fecal de los empleados de la granja, en sus familias y aún en los vecinos del área. El transposón se localizó en plásmidos transferibles de más de diez grupos de incompatibilidad tanto en cepas aisladas de puercos como de humanos. De aquí que la exposición a un antibiótico amplifica la prevalencia de un plásmido de resistencia, así como también amplifica o incrementa su oportunidad de evolucionar. Después de que la evolución se ha llevado a cabo, una reexposición idéntica incrementará su prevalencia por un factor más grande. De esto se puede concluir que el uso de antibióticos en animales no sólo debe medirse en función del número de cepas resistentes intercambiadas entre éstos y los humanos, sino que además deberá tomarse en cuenta su potencial evolutivo, dispersión y persistencia en la flora humana (O'Brien, 1982). Por su parte, el hecho de que se hallan encontrado plásmidos R similares en bacterias asociadas con el hombre y los animales, como es el caso de los plásmidos que codifican la resistencia a Tetraciclina en Campylobacter sp. (Tenover, 1985), Clostridium perfringens (Abraham et al, 1985) y E. coli (Levy, 1987), nos indica que los ecosistemas microbianos están comunicados e interactúan entre sí; así, bacterias que aparecen en poblaciones animales pueden transmitirse a humanas y viceversa, y ya que la mayoría de las resistencias están en elementos genéticos transferibles, éstas pueden transmitirse entre diferentes hospederos bacterianos, virulentos o no, y poblar las diferentes áreas ecológicas (Levy, 1987).

Otra consideración ecológica no menos importante es aquella que sostiene el hecho de que las resistencias existen en reservorios interactuantes, por un lado humanos y animales, y por otro, las mismas bacterias. Se ha visto que E. coli puede actuar como reservorio de plásmidos R de todas las Enterobacteriaceae (Hale et al, 1983; Marshall et al, 1983). Los estafilococos coagulasa negativos actúan como reservorios de los plásmidos de resistencia de Staphylococcus aureus (Cohen, 1986; Cooksey and Baldwin, 1985; Lacey, 1975; Naidoo, 1987; Tennet et al, 1984). Haemophilus parainfluenzae actúa como reservorio de plásmidos de su pariente patógeno más cercano, H. influenzae (Medeiros et al, 1986; Scheifele and Fusell, 1981), y se cree que E. coli actúa como reservorio del primero, por los altos índices de homología genética entre sus plásmidos (Siopoulou et al, 1978).

Cabe mencionar también, la aparición de bacterias multiresistentes que es promovida por el empleo de un sólo antibiótico por períodos prolongados (mayores de un mes), cuyas causas aún se desconocen (Akiba et al, 1960; Datta et al, 1971; Kloos, 1986; Moller et al, 1977). Christie y Dunny (1984) sugieren que ciertos plásmidos, adaptados a cepas bacterianas que poblan el intestino o la piel, adquieren determinantes de resistencia a antibióticos del medio, que aumentan mientras se prolonga el tratamiento, creando, así, plásmidos multiresistentes, a menudo transferibles.

Importancia de los Plásmidos en Epidemiología

El papel epidemiológico que juegan los plásmidos ha quedado bien establecido.

1) Se sabe que ciertos plásmidos están relacionados con virulencia, ya sea codificando proteínas involucradas en la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero (Hackett et al, 1987; Hale et al, 1983; Pohl et al, 1987) o codificando proteínas que promueven la adhesión e invasión del microorganismo a las células del hospedero (Harris et al, 1982; Jones et al, 1982; Nataro et al, 1987; Peñaranda et al, 1983; Willshaw et al, 1982).

2) Muchos otros plásmidos son los causantes de la resistencia a antibióticos (Cohen, 1986; Martínez et al, 1987; Novick et al, 1979; Panhota and Agorwal, 1981; Wachsmuth et al, 1983) y pueden transferirse de un microorganismo a otro (Mahony et al, 1986; Platt et al, 1986; Wiedermann et al, 1985).

Sirviéndose de estas dos características, la Epidemiología ha desarrollado toda una rama en relación a los plásmidos como marcadores epidemiológicos, así, hoy es posible, en base a perfiles plasmídicos: a) Determinar el papel potencial de cepas no patógenas como donadoras de plásmidos R durante epidemias (Cohen, 1986); b) Conocer la diseminación de distintas especies de plásmidos a través de diferentes cepas bacterianas debido a su proceso epidémico (Schlaes and Currie-McCumber, 1986; Spika et al, 1987;

Tietze and Tschape, 1983); c) Utilizar plásmidos crípticos, cuyo producto es desconocido, como marcadores epidemiológicos (John and Twitty, 1986); d) Confirmar la dispersión de una cepa patógena transmitida en vehículos que alcanzan una gran distribución (v.g. alimentos procesados) (O'Brien et al, 1982; Rieley and Cohen 1982; Rieley et al, 1983). En resumen, el contenido plasmídico de las bacterias se utiliza para la evaluación de epidemias, determinación de resistencia endémica a antibióticos y de transmisión de genes de resistencia específicos.

MATERIALES Y METODOS

Recolección y procedencia de la muestra

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio fueron aisladas de leche pasteurizada expendida en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, entre los meses de junio de 1987 y marzo de 1988. En el Cuadro 3 se muestra la distribución por marcas de leche analizada. Los análisis microbiológicos que se efectuaron fueron los recomendados por la A.O.A.C. (1984) y la F.D.A. (1987) para el aislamiento de bacterias de leche y productos lácteos.

Una vez efectuados los aislamientos se procedió a la identificación de los microorganismos por pruebas bioquímicas y serotipificación. Las cepas de E. coli y Salmonella sp. fueron tipificadas con sueros específicos obtenidos de Becton Dickinson and Co. (Cockeysville, Md., USA.) y se les determinó su resistencia a antibióticos por la técnica de Bauer-Kirby (Bauer et al., 1966) en agar Mueller Hinton.

Para mantener viables los microorganismos durante el periodo del estudio fueron congelados a -40°C , en viales de 3 ml que contenían 0.50 ml de un cultivo de toda la noche a 37°C de la bacteria en Caldo Nutritivo (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA.) y 0.50 ml de Bacto-Glicerol (Difco) estéril.

MARCA	NUMERO DE MUESTRAS
A	66
B	53
C	51
TOTAL	170

Todas las muestras fueron de leche pasteurizada de vaca, seleccionadas al azar en diferentes comercios de la ciudad de Hermosillo, Sonora, de junio de 1987 a marzo de 1988.

Cuadro 3: Distribución por marcas de leches analizadas.

Obtención del ADN Plasmídico

Los plásmidos de las bacterias aisladas fueron obtenidos por cuatro métodos que a continuación se describen. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA.), excepto el fenol, ácido acético glacial, cloroformo, etanol absoluto, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio extracto de levadura y peptona de carne, que fueron de E. Merk (Darmstadt, RFA.).

Método I. Procedimiento Rápido de Kado y Liu (1981) Modificado

El fundamento de este método para la obtención del ADN plasmídico es la precipitación del ADN cromosomal, mediante una lisis alcalina y la precipitación de proteínas por acción de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1).

Las modificaciones hechas al método original fueron la sustitución del Buffer E (Tris-Acetato 40mM y EDTA 2mM, ajustado el pH a 7.9 con ácido acético glacial), por el Buffer TE pH 8.0 (Tris-Cl 10mM pH 8.0 y EDTA 1mM pH 8.0). Además, el volumen original de la solución de fenol-cloroformo que era de un mililitro, se redujo a 200 μ l.

Para realizar la extracción del ADN plasmídico se tomaron 0.50 ml de un cultivo de toda la noche en caldo TY (10g/l peptona de carne, 5g/l extracto de levadura y 10g/l NaCl) con el antibiótico específico y se centrifugó por un minuto (Eppendorf, Brinkmann Instruments Co., Westbury,

N.Y., U.S.A. Mod. 5413). El precipitado obtenido se resuspendió en 167 μ l de Buffer TE, se le agregaron 333 μ l de solución de lisis (SDS 3%, Tris 50mM pH 12.6; el ajuste del pH se efectuó añadiendo 1.6 ml de NaOH 2N y aforando a 100 μ l con agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C a 15 lb/in² de presión por 15 minutos). La mezcla se incubó a 65°C por una hora en baño María. Después se le añadieron 100 μ l de fenol neutralizado (equilibrado primero con 0.5 vol. de Tris 1M pH 8.8 y después con 0.5 vol. de Tris 0.1M pH 8.0) y 100 μ l de cloroformo-alcohol isodámico (24:1) y se emulsificó agitando vigorosamente por unos segundos. Las fases fueron separadas por centrifugación en la Eppendorf a 10,000 rpm. La fase acuosa se retiró con una micropipeta Eppendorf (Brinkmann Instruments Co., Westbury, N.Y., U.S.A., Mod. 4710) con punta de calibre grueso y se transfirió a un microtubo debidamente etiquetado para congelarse a -40°C.

Método 11. Procedimiento de Birnboim y Doly modificado por Maniatis (1982)

Este método también se basa en la precipitación del ADN cromosomal por lisis alcalina y la precipitación de proteínas con una solución concentrada de sales para obtener el ADN plasmídico libre. También recurre a una precipitación de ácidos nucleicos con etanol absoluto.

La técnica fue tomada de Maniatis *et al* (1982) y es una modificación del método descrito por Birnboim y Doly (1979). Consta de varias partes que a continuación se describen.

a) Amplificación del Plásmido. Se inocularon 10 ml de medio TY con antibiótico en un matraz de 125 ml con la cepa deseada. Se incubaron a 37°C por toda la noche. Al día siguiente, se sembró otro matraz con 10 ml de TY con antibiótico hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica tardía (0.6 de absorbancia a 600 nm). De ahí se pasaron a 300 ml del mismo medio y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa hasta que alcanzaron un valor de 0.4 de absorbancia a 600 nm. (la densidad óptica se midió en un Spectronic 21 UVD, Milton Roy Co., Rochester, N.Y., U.S.A.) y se le agregó 1.75 ml de una solución de cloranfenicol (34 mg/ml en etanol absoluto). El cultivo se dejó a 37°C por toda la noche con agitación vigorosa.

b) Recuperación de las bacterias y lisis. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 3900 rpm por 20 minutos a 4°C (Centrífuga de International Equipment Co., Needham Hts., Mass. U.S.A. Mod. Centra BR), y se desechó el sobrenadante. Después se lavaron en 60 ml de STE enfriado en hielo (Tris-Cl 10mM pH 8.0, NaCl 100mM y EDTA 1mM pH 8.0). Las células se resuspendieron en 6 ml de solución I (Glucosa 50mM, Tris-Cl 25mM pH 8.0 y EDTA 10mM) que contenía 5mg/ml de lisozima y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos; enseguida se le añadieron 12 ml de solución II [NaOH 0.2 N y Dodecil-Sulfato de Sodio 1% (SDS)] recién preparada. Se mezcló el contenido invirtiendo varias veces el recipiente y se incubó en hielo por 10 minutos para luego agregársele 9 ml de solución enfriada en

hielo de acetato de amonio 5M (pH 4.8). Nuevamente se mezcló el contenido del recipiente y se dejó 10 minutos en hielo. El contenido se transfirió a tubos nuevos estériles para centrifugar a 3900 rpm por 35 minutos a 4°C. Después de repetir la operación anterior, se transfirió el sobrenadante a otro tubo nuevo y el precipitado, que contenía el ADN cromosómico, ARN y fragmentos celulares bacterianos, fue desechado.

c) Precipitación con etanol. El sobrenadante obtenido en el paso anterior se transfirió a viales y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto enfriado a -40°C, se agitaron y se dejaron en el congelador a -40°C (Congelador profundo REVCO. Rheem Scientific, Asheville, N.C., U.S.A.) por una noche, para que precipitara el ADN plasmídico. Al día siguiente se tomó el precipitado con pipetas Pasteur nuevas y estériles y se colocó en microtubos para centrifugarse por 15 minutos en la microcentrífuga. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%, suspendiéndolo en 3 ml de esta solución por medio de un vórtex llevándolo después a -40°C por 30 minutos para centrifugarse posteriormente por 25 minutos a 0°C. Al terminar cada lavado, el alcohol se dejó secar invirtiendo el tubo sobre un pañuelo de papel. Finalmente el precipitado se resuspendió en una cantidad adecuada de Buffer TE (Tris-Cl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0), se etiquetó y se almacenó en el congelador profundo hasta ser utilizado.

Método III. Extracción con Fenol-Cloroformo

Esta técnica comúnmente se utiliza para purificar ADN pues las proteínas contaminantes son removidas con los solventes orgánicos, últimamente se ha venido usando también para la extracción del mismo, basándose en la eliminación de proteínas por acción de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) (Yépez, 1987).

Se tomó 1 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche, a 37°C con agitación vigorosa en caldo TY con antibiótico y se centrifugó por dos minutos en la microcentrífuga. Se desechó el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 75 μ l de TE (pH 8.0) para resuspenderlo en un vórtex. Enseguida se le agregaron 75 μ l de fenol neutralizado y 75 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se emulsificó por agitación y se centrifugó por 2 a 3 minutos en la microcentrífuga para tomar las fases. Se tomó la acuosa y se almacenó en tubos debidamente etiquetados en el congelador a -40°C.

Método IV. Modificación del Método de Birnboim y Doly (1979) en Nuestro Laboratorio

La modificación se hizo con el fin de acortar el tiempo de extracción, y se incluyó purificación con fenol-cloroformo. Las soluciones utilizadas fueron las mismas que para el método II.

Se partió de 10 ml de un cultivo de toda la noche a 37°C con agitación vigorosa en caldo TY con antibiótico el

cual se centrifugó por 10 minutos a 4°C en la Centra BR. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 2 ml de solución I que contenía 5 mg/ml de lisozima y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 4 ml de solución II recién preparada, se mezcló y se incubó por 10 minutos en hielo. Enseguida se le adicionaron 3 ml de acetato de amonio frío, se mezcló y se incubó por 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 15 minutos a 4°C a 3900 rpm transfiriendo el sobrenadante a microtubos nuevos para llevar a cabo la precipitación del ADN plasmídico, añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto frío y manteniéndolo por 2-3 horas a -40°C. Después se centrifugó por 25 minutos a 4°C en la microcentrífuga y el precipitado obtenido se resuspendió en 100 ul de buffer TE. A esta solución se le añadieron 150 ul de una mezcla de fenol cloroformo, se mezcló y se centrifugó nuevamente en la microcentrífuga por 5 minutos para romper la emulsión; se tomó la fase acuosa y se transfirió a un microtubo nuevo debidamente etiquetado y se almacenó a -40°C.

Los tiempos de incubación con las soluciones I, II y de acetato de amonio 5M, se doblaron al tratar las cepas de Salmonella sp. y Staphylococcus aureus.

Perfil Plasmídico

Se obtuvo por electroforesis en gel de agarosa y se visualizó tíñendo con bromuro de etidio.

Electroforesis en Gel de Agarosa

Se realizó de acuerdo a técnicas ya descritas (Bidwell et al, 1981; Schaberg et al, 1981). La agarosa que se utilizó fue de Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., U.S.A., y siempre al 0.6%. Se fundió en buffer de electroforesis (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2.5 mM, SDS 0.05% con el pH ajustado a 8.3) en una placa de calentamiento y fue enfriado a 45°C antes de vaciarse en la cámara de electroforesis (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD., U.S.A. Mod H-6 y H-4). Todas las electroforesis se corrieron en camas horizontales y el voltaje de corrida se indica en el Cuadro 4. La fuente de poder utilizada fue la PS 150 de Hoeffer Scientific Instruments (San Francisco, CA., U.S.A.).

Visualización

Esta se llevó a cabo teniendo el gel con bromuro de etidio 0.5 ug/ml por 2-3 horas. El gel fue transferido a un transiluminador UV (UVP Inc. San Gabriel, CA., U.S.A., Mod TL-33) para su observación. Se fotografió con una cámara fija (Polaroid Corporation, Cambridge, MASS., U.S.A. Mod MP-4), usando una película instantánea Polaroid 667, y un filtro rojo (Eastman Kodak Mod. 1-A).

Medidas del gel (cm)	Voltaje de entrada de la muestra/tiempo	Voltaje de corrida/tiempo
8 x 5 x 0.5	60 V/20 min	100 V/1.2 hrs
24 x 20 x 1	80 V/40 min	120 V/4 hrs

Cuadro 4: Condiciones de electroforesis en gel de agarosa 0.6%.

Tamaño de las Bandas

Se calcularon de acuerdo con los tamaños de las bandas del ADN del fago lambda digerido con Hind III, que se incluyeron en cada una de las electroforesis. Además se incluyeron marcadores de 56 kilobases (kb) y 23 kb.

RESULTADOS

Aislamiento y Caracterización de los Microorganismos

La frecuencia relativa del total de microorganismos aislados de la leche pasteurizada se muestran en la Fig. 3, que incluye tanto patógenos como no patógenos, de donde se seleccionaron los primeros, dada su importancia como agentes causales de enfermedades; como se puede observar, hay un alto índice de organismos no patógenos, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter sp., Citrobacter sp., y los porcentajes más bajos corresponden a bacterias patógenas. En el Cuadro 5 se presentan los organismos seleccionados para el estudio, siendo diez Escherichia coli, tres Salmonella paratyphi y dos Staphylococcus aureus.

El serotipo y resistencia a antibióticos que presentaron los organismos seleccionados se pueden apreciar en el Cuadro 6. Es muy notoria la similitud del patrón de resistencia que siguen las cepas de E. coli, ya que todas resultaron ser resistentes a tetraciclina, polimixina B, ampicilina y carbencilina, además cuatro de ellas presentaron resistencia a tobramicina. De este género, sólo un microorganismo resultó ser aglutinable. Por su parte todas las cepas de Salmonella presentaron el serotipo paratyphi A y resistencia a penicilina. Una presentó además resistencia a tetraciclina, ampicilina, kanamicina, estreptomomicina y neomicina. Los S. aureus aislados fueron

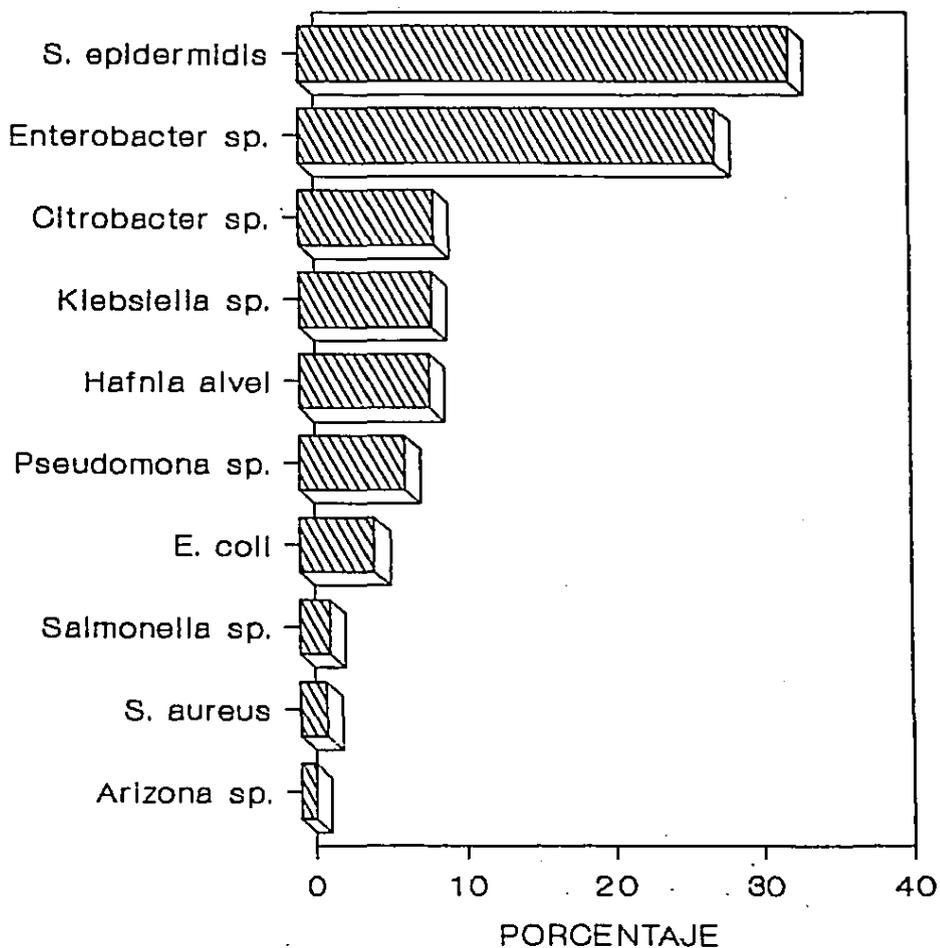


Figura 3. Frecuencia relativa de microorganismos aislados en 170 muestras de leche pasteurizada, en la Cd. de Hermosillo, Sonora.

BACTERIA	NUMERO DE CEPAS SELECCIONADAS
<u>Escherichia coli</u>	10
<u>Salmonella paratyphi</u>	3
<u>Staphylococcus aureus</u>	2

Cuadro 5: Bacterias seleccionadas para el estudio de su perfil plasmídico por su importancia clínica.

BACTERIA	CEPA	SEROTIPO	ANTIBIOGRAMA				
			RESISTENCIA				
<u>Escherichia coli</u>	4	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	123	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	124	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	103	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	107	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	110	N.A.	TE	PB	AM	CB	
	22	poli A	TE	PB	AM	CB	NN
	120	N.A.	TE	PB	AM	CB	NN
	121	N.A.	TE	PB	AM	CB	NN
	125	N.A.	TE	PB	AM	CB	NN
<u>Salmonella sp.</u>	173	paratyphi A					P
	202	paratyphi A					P
	111	paratyphi A	TE	AM	K	S	P
<u>S. aureus</u>	1		TE	AM	F/M	P	E
	9		TE	AM	F/M	P	CF

TE= tetraciclina

CB= carbencilina

K= kanamicina

E= eritromicina

PB= polimixina B

NN= tobramicina

S= estreptomina

F/M= nitrofuranos

AM= ampicilina

P= penicilina

N= neomicina

CF= cefalotina

N.A.= No Aglutinable

Cuadro 6: Serotipo y antibiograma de las bacterias utilizadas en el estudio.

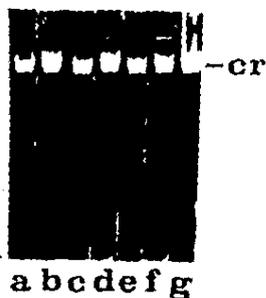


Figura 4. Perfil plasmídico obtenido por el método I. Líneas a-b: S. aureus cepas 1 y 9; líneas c-e: E. coli, cepas 107, 121 y 123; líneas f-g: S. paratyphi cepas 202 y 173. cr= ADN cromosómico.

9, la primera con dos bandas de alto peso molecular (migraron menos que el ADN cromosomal) y la segunda sin ninguna banda aparente.

Método III.

Tal como se observa en la Fig. 6, este resultó ser el método menos efectivo, ya que sólo se lograron visualizar las bandas correspondientes al ADN cromosómico y a ácido ribonucleico (arn), cuyas posibles causas se discuten más adelante. Las líneas a-b contienen ADN de E. coli, cepas 103 y 110; las líneas c-d contienen ADN de S. aureus 1 y 9 y las líneas e-f contienen ADN de S. paratyphi 111 y 173.

Método IV.

Los resultados de las extracciones efectuadas por este método se presentan en las Figs. 7 a la 11, el cual funcionó adecuadamente en las cepas de experimentación. Los resultados obtenidos son muy similares a los del método II, ya que tienen la misma base y sólo los tiempos de incubación y volúmenes de reactivos utilizados en la extracción fueron modificados. Este fue el método que se utilizó para obtener los perfiles plasmídicos de las cepas de experimentación.

Perfil Plasmídico

Para su análisis se hizo una separación de plásmidos por número de bandas presentes, género y cepa del microorganismo.

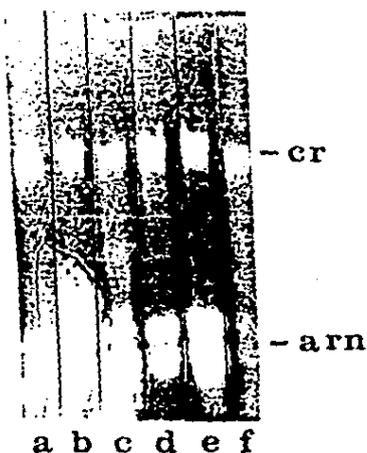


Figura 6. Perfil plasmidico obtenido por el metodo III. Lineas a-b: E. coli cepas 103 y 110; lineas c-d: S. aureus cepas 1 y 9; lineas e-f: S. paratyphi cepas 111 y 173. cr= ADN cromosómico. arn= ácido ribonucleico.



Figura 7. Perfiles plasmídicos de *E. coli*. Línea a: marcadores de tamaño molecular; línea b: cepa 103 (perfil I); líneas c-f: cepas 123, 124, 107 y 121 (perfil II); línea g: cepa 110 (perfil III); línea h: cepa 4 (perfil IV); línea i: cepa 22 (perfil V). cr = cromosómico.

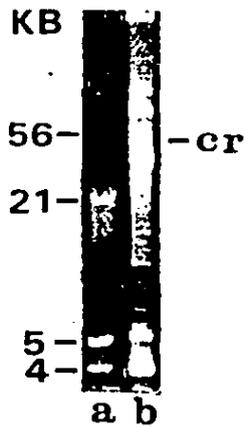


Figura 8. Perfiles plasmídicos de *E. coli*. Línea a: marcadores de tamaño molecular; línea b: cepa 125 (perfil VI). cr= cromosómico.

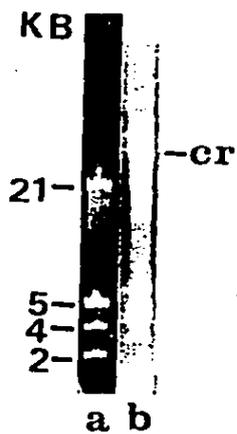


Figura 9. Perfiles plasmídicos de *E. coli*. Línea a: marcadores de tamaño molecular; línea b: cepa 120 (perfil VII). cr= cromosómico.

PERFIL	N.I.	NO. DE BANDAS	TAMANO (KB)
I	103	0	
II	123	1	72
	124	1	70
	107	1	72
	121	1	71
III	110	2	20,6
IV	4	4	20,13,6,4
	22	4	63,56,5,2
V	125	5	79,67,10,5,4
VI	120	8	16,15,12,6,5,*

KB= Kilobases

N.I.= Número de identificación

* tres bandas < 4 KB.

Cuadro 7: Perfiles y tamaños de las bandas plasmídicas obtenidas de Escherichia coli.

tamaño similar. Entre las cepas 10 y 22 (perfiles III y V respectivamente) hay dos bandas en común de 20 y 6 Kb cada una; esta última banda también aparece en la cepa 120 (perfil VII). Entre las cepas restantes no hay una homología tan aparente en cuanto al tamaño de las bandas.

Salmonella paratyphi

Esta especie mostró tres perfiles diferentes como puede observarse en la Fig. 10 y Cuadro B; ninguna de las tres cepas presentó bandas comunes con las otras, aunque las tres son resistentes a P. La cepa 173 que presenta el perfil I (Fig. 10, línea b) no presenta ninguna banda.

En la cepa 202 que define el perfil II (Fig. 10, línea c) con resistencia solo a P, presentó una banda de gran tamaño de aproximadamente de 80 Kb. La cepa 111 con tres bandas de 10, 7 y 4 Kb, respectivamente, define el perfil III (Fig. 10, línea c).

Staphylococcus aureus

Estos organismos a pesar de que presentaron patrones de resistencia muy similares, mostraron dos perfiles muy diferentes como se aprecia en la Fig. 11 y Cuadro 9. La cepa 9 que definió el perfil I no presentó ninguna banda aparente, en cambio la cepa I presentó un perfil con dos bandas, una de 60 y la otra de 40 Kb respectivamente.

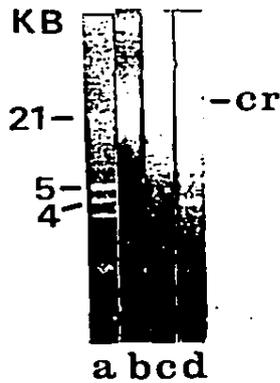


Figura 10. Perfiles plasmídicos de *S. paratyphi* A. Línea a: marcadores de tamaño molecular; línea b: cepa 173 (perfil I); línea c: cepa 202 (perfil II); línea d: cepa III (perfil III). cr= cromosómico.

PERFIL	N. I.	NO. DE BANDAS	TAMANO (KB)
I	173	0	
II	202	1	80
III	111	3	10, 7, 4

KB= Kilobases

N.I.= Número de identificaci6n

Cuadro 8: Perfiles y tamaño de las bandas plasmídicas obtenidas de Salmonella paratyphi.

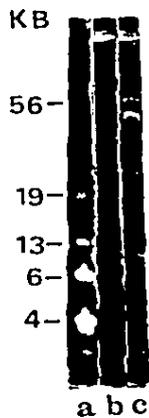


Figura 11. Perfiles plasmídicos de S. aureus. Línea a: marcadores de tamaño molecular; línea b: cepa 9 (perfil I); línea c: cepa 1 (perfil II). cr= cromosómico.

PERFIL	N. I.	ND. DE BANDAS	TAMANO (KB)
I	9	0	
II	1	2	60, 40

KB= Kilobases

N.I.= Número de identificación

Cuadro 9: Perfiles y tamaño de las bandas plasmídicas obtenidas de Staphylococcus aureus.

III es uno de los más rápidos, pero con sensibilidad muy baja, ya que también va ligada al número de copias del plásmido en cada célula. Este método que se utiliza con mucho éxito en la extracción de ADN de plásmidos manipulados, los cuales están en gran número de copias por célula, no funcionó con las cepas silvestres o nativas.

El método IV, que es una modificación del método II, reduciendo su duración en tiempo a un 50%, resultó ser el más efectivo. Se parte de un número elevado de células lo que permite tener más copias plasmídicas por preparación. Su resolución fue alta y trabajó igualmente con las tres especies utilizadas en el estudio. Además tiene la ventaja de que se trabaja con volúmenes pequeños por lo que se pueden analizar simultáneamente tantas muestras como el investigador desee.

Con respecto a los perfiles obtenidos fue sorprendente encontrar cepas con resistencia y sin ningún plásmido aparente, hecho que puede estar relacionado con la cantidad de copias por célula, del plásmido, esto ha sido reportado con anterioridad (Ledn, 1988).

Las bandas observadas en E. coli que van de 56-72 Kb concuerdan con las reportadas para la producción de toxinas, tanto termolábiles como termoresistentes, factor antigénico de colonización I (Pefaranda et al, 1983; Willshaw et al, 1982) y factor de adherencia (Willshaw et al, 1982), sin embargo, esto no se comprobó ya que no se realizaron los análisis correspondientes (prueba de Sereny

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se logró identificar los plásmidos que poseen los tres géneros comprendidos en el estudio.

Sin lugar a dudas el método de elección para la obtención del perfil plasmídico, es la modificación de la técnica de Birnboim y Doly efectuada en nuestro laboratorio, tanto por su alta resolución y su corto tiempo de ejecución, como por el amplio espectro de especies que abarca. Recuérdese que la pared celular de *S. aureus* es una de las más resistentes a la lisis.

Por otro lado, la identificación de cepas epidémicas se ve altamente solucionado cuando otros marcadores fenotípicos resultan insuficientes o no son factibles de realizarse (serotipo, antibiograma, producción de toxinas, etc), y es aquí donde el perfil plasmídico alcanza su mayor importancia. Si asumimos que el perfil plasmídico de cierto clon bacteriano permanece inalterado aunque se exponga a diferentes situaciones ambientales, la información ecológica y epidemiológica que podemos obtener es sorprendente, aunque puede darse el caso de sustituciones de plásmidos por otros incompatibles, tal como la distribución de una cepa epidémica en un largo periodo de tiempo y en un amplio territorio, o la

REFERENCIAS

- ABRAHAM, L.J., A.J. Wales and J.I. Rood. 1985. "Worldwide distribution of the conjugative Clostridium perfringens tetracycline resistance plasmid pCW13". Plasmid 14:37-46.
- AKIBA, T., K. Koyoma, Y. Ishiki, S. Kimura and T. Fukushima. 1960. "On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella". J. Microbiol. 4:219-277.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. 1984. "Official methods of analysis". 14th ed. A.O.A.C., Inc. Virginia, U.S.A.
- ARCHER, G.L. and J.L. Johnston. 1983. "Self-transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides". Antimicrob. Agents and Chemother. 24; 1:70-77.
- ARTHUR, A. and D. Sherratt. 1979. "Dissection of the transposition process: a transposon-encoded site-specific recombination system". Molec. gen. Genet. 175:267-274.
- BAUER, J., M. Sherris and D. Turk. 1966. "Standardized disc susceptibility test". Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
- BIDWELL, J.L., D.A. Lewis and D.S. Reeves. 1981. "A rapid single colony lysate method for the selective visualization of plasmids in Enterobacteriaceae, including Serratia marcescens". J. Antimicrob. Chemother. 8: 481-485.
- BIRNBOIM, H.C. and J. Doly. 1979. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". Nucleic Acids Research 7; 6: 1513-1523.
- BOE, L., K. Gerdes and S. Molin. 1987. "Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance". J. Bacteriol. 169: 4646-4650. 70-77.

- FOSTER, T.J. 1983. "Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria". *Microbiol. Rev.* 47; 3: 361-409.
- GUSTAFSSON, L.L. and Wide K. 1981. "Marketing of obsolete antibiotics in Central America". *Lancet.* 1:777-778.
- GYLES, G.L., S. Polchaudhuri and W.K. Maas. 1977. "Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance". *Science* 198: 198-199.
- HACKETT, J., P.Wyk, P. Reeves and V. Mathan. 1987. "Mediation of serum resistance in Salmonella typhimurium by an 11-kilodalton polypeptide encoded by a cryptic plasmid". *J. Infect. Dis.* 155; 3: 540-549.
- HALE, T.L., P.J. Sansonetti, P.A. Schad, S. Austin and S.B. Formal. 1983. "Characterisation of virulence plasmid and plasmid-associated outer membrane proteins in Shigella flexneri, Shigella sonnei and Escherichia coli". *Infect. Immun.* 40; 1: 340-350.
- HARRIS, J.R., I.K. Wachsmuth, B.R. Davis and M.L. Cohen. 1982. "High-molecular-weight plasmid correlates with Escherichia coli enteroinvasiveness". *Infect. Immun.* 37; 3: 1295-1298.
- HAWKEY, P.M. 1986. "The molecular evolution of antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria". *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 147-151.
- HELMUTH, R., S.C. Bunge, B. Hoog, A. Steinbeck and E. Bulling. 1985. "Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common Salmonella serotypes". *Infect. Immun.* 48; 1: 175-182.
- HOLMBERG, S.D., J.G. Wells and M.L. Cohen. 1984. "Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of U.S. outbreaks 1971-1983". *Science* 225:833-835.
- HUMMEL, R., H. Tschape and W. Witte. 1986. "Spread of plasmid mediated nourseothricin resistance in connection with antibiotic use in animal husbandry". *J. Basic Microbiol.* 26:461-466.

- LEVY, S.B. 1978a. "Emergence of antibiotic resistant bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants" J. Infect. Dis. 137:688-690.
- LEVY, S.B. 1978b. "Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem". Lancet i:83-88.
- LEVY, S.B. 1984 . "L'evolution des resistances bacteriennes. Surveillance locale et mondiale". Med. Mal. Infect. 14:779-787.
- LEVY, S.B. 1985. "Ecology of plasmids and unique DNA sequences". En: H.O. Halvorson, D. Pramer, and M. Rogul (eds.). "Engineered organisms in the environment: Scientific issues". American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. pp.180-190.
- LEVY, S.B. 1987 . "Antibiotic use for growth promotion in animals: ecologic and public health consequences". J. Food Protect. 50;7:616-620.
- LEVY, S.B., G.B. FitzGerald and A.B. Macone. 1976a. "Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of tetracycline-supplemented feed on a farm". New Eng. J. Med. 295:583-588.
- LEVY, S.B., G.B. FitzGerald and A.B. Macone. 1976b. "Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man". Nature 260: 40-42.
- LINTON, A.H. 1977. "Animal to man transmission of Enterobacteriaceae". Royal Soc. Health J. 1:115-119.
- MAHONY, D.E., G.A. Clark, M.F. Stringer, M.C. MacDonald, D.R. Duchesne and J.A. Mader. 1986 . "Rapid extraction of plasmids from Clostridium perfringens". Applied and Environmental Microbiology 51; 3: 521-523.
- MANIATIS, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y., U.S.A.
- MARSHALL, B., C. Tachibana and S.B. Levy. 1983 . "Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms". Antimicrob. Agents and Chemother. 24:835-840.

- PANHOTRA, B.R. and K.C. Agorwal. 1981 . "Plasmids carrying genes for enterotoxin production and drug resistance in Escherichia coli of human origin". Indian J. Med. Res. 74: 652-655.
- FERRARANDA, M.E., D.G. Evans, B.E. Murray and D.J. Evans. 1983. "ST:LT:CFA/II Plasmids in enterotoxigenic Escherichia coli belonging to serogroups O6, O8, O80, O85 and O139". J. Bacteriol. 154; 2: 980-983.
- PLATT, D.J., J.S. Sommerville, C.A. Kraft and M.C. Timbury. 1984 . "Antimicrobial resistance and the ecology of Escherichia coli plasmids." J. Hyg. Camb. 93: 181-188.
- PLATT, D.J., S. Chesam and K.G. Kristinson. 1986. "R-plasmid transfer in vivo: a prospective study". J. Med. Microbiol. 21: 325-330.
- POHL, P., P. Lintermans, F. Bex, A. Desmyter, P. Dreze, P.A. Fonteyne et M. Couturier. 1987. "Propriétés phénotypiques et génotypiques de quatre plasmides de virulence de Salmonella typhimurium". Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138: 523-528.
- POPOFF, M.Y., I. Miras, C. Coynault, C. Lasselin and P. Pardon. 1984 . "Molecular relationships between virulence plasmids of Salmonella serotypes typhimurium and dublin and large plasmids of other Salmonella serotypes". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 135 A: 389-398.
- RILEY, L.W., and M.L. Cohen. 1982 . "Plasmid profiles and salmonella epidemiology" [Letter]. Lancet 1: 573.
- RILEY, L.W., G.T. DiFerdinando, T.M. DeMelfi and M.L. Cohen. 1983 . "Evaluation of isolated cases of salmonellosis by plasmid profile analysis: introduction and transmission of a bacterial clone by precooked roast beef". J. Infect. Dis. 148; 1: 12-17.
- SCHABERG, D.R., L.S. Tompkins and S. Falkow. 1981. "Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacilli". J. Clin. Microbiol. 13; 6: 1105-1108.
- SCHEIFELE D.W. and S.J. Fusell. 1981 . "Frequency of ampicillin-resistant Haemophilus parainfluenzae in children". J. Infect. Dis. 143; 3: 495-498.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- SCHLAES, D.M. and C.M. Currie-McCumber. 1986. "Plasmid analysis in molecular epidemiology: A summary and future directions". *Rev. Infect. Dis.* 8; 5: 738-746.
- SPIKA, J.S., S.H. Waterman, G.W. Soo Hoo, M.E. St. Louis, R.E. Pacer, S.M. James, M.L. Bissett, L.W. Mayer, J.Y. Chiu, B. Hall, K. Greene, M.E. Potter, M.L. Cohen and P.A. Blake. 1987. "Chloramphenicol-resistant Salmonella newport traced through hamburger to dairy farms". *N. Engl. J. Med.* 316; 10: 565-570.
- STRYER, L. 1981. "Biochemistry". 2nd ed. W.H. Freeman and Co. N.Y., U.S.A.
- SIOPOULOU, V., D. Scheifele, A.L. Smith, P.M. Perry, and V.M. Howie. 1978. "Increasing incidence of ampicillin resistance in Hemophilus influenzae". *J. Pediatr.* 92:889-892.
- TENDOVER, F.C., S. Williams, K.P. Gordon, C. Nolan and J.J. Plorde. 1985. "Survey of plasmids and resistance factors in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli". *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:37-41.
- TENNET, J.M., J.W. May and R.A. Skurray 1984. "Multiple antibiotic resistance in Staphylococcus aureus and S. epidermidis: plasmids in strains associated with nosocomial infection". *Pathology* 16; 250-255.
- TENNET, J.M., J.W. May and R.A. Skurray 1986. "Characterisation of chloramphenicol resistance plasmids of Staphylococcus aureus and S. epidermidis by restriction enzyme mapping techniques". *J. Med. Microbiol.* 22 ; 79-84.
- TIETZE, E. and H. Tschape. 1983. "Plasmid pattern analysis of natural bacterial isolates and its epidemiological implication". *J. Hyg. Camb.* 90: 475-488.
- VAARA, M., T. Vaara and M. Sarvas. 1979. "Decreased binding of polymixin by polymixin-resistant mutants of Salmonella typhimurium". *J. Bacteriol.* 139; 2: 664-667.
- WACHSMUTH, K., J. DeBoy, K. Birkness, D. Sack and J. Wells. 1983. "Genetic transfer of antimicrobial resistance and enterotoxigenicity among Escherichia coli strains". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23; 2: 278-283.

- WATANABE, T. 1963 . "Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria". Bacteriol. Rev. 27,87-115.
- WIEDERMANN, B., J.F. Meyer, B.A. Nies and J. Kratz. 1985. "Transposable multiresistance". J. Antimicrob. Chemother. 16: 416-417.
- WILLSHAW, G.A., H.R. Smith, M.M. McConnell, E.A. Barcklay, J. Krnjulac and B. Rowe. 1982 . "Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several Escherichia coli serotypes". Infect. Immun. 37; 3: 858-868.
- YEPIZ, G. (Comunicación personal). Departamento de Bioquímica. Universidad de Arizona, Tucson, Az., U.S.A.