

241102



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA A TETRACICLINA EN
Shigella sp y Salmonella sp AISLADAS EN MEXICO.**

T E S I S

Que para obtener el Titulo de:
B I O L O G O
P r e s e n t a:

JAIME MARIANO MARTINEZ SALAZAR

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

	Pág.
Resúmen	1
Introducción	
1.- Generalidades	3
2.- Plásmidos y Transposones	6
3.- Mecanismo de acción de los antibióticos y mecanismo de resistencia a los antibióticos	9
A.- Antibióticos en general	9
B.- Tetraciclina	12
a) Acción y penetración de Tetraciclina	12
b) Resistencia a Tetraciclina mediada por plásmidos	15
Objetivo	25
Metodología	27
Resultados	
1.- Características generales	39
a) Inducción y nivel de resistencia a Tetraciclina	39
b) Producción de bactericina	44
c) Transferencia de la resistencia a Tetraciclina	45
d) Visualización de DNA extracromosomal por electroforesis en geles de agarosa	46
2.- Obtención de rastreadores genéticos	53
a) Construcción del plásmido pMS02	53
b) Caracterización del plásmido pMS02	54
c) Obtención de los fragmentos de DNA utilizados como rastreadores	55

3.- Frecuencia de tres determinantes genéticos de resistencia a Tetraciclina en <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i>	55
a) <i>Shigella</i>	58
b) <i>Salmonella</i>	62
Discusión y Conclusiones	65
a) Variabilidad fenotípica mediada por plásmidos	66
b) Variabilidad genotípica mediada por plásmidos	68
Bibliografía	76

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron algunas características de una población de cepas clínicas de *Shigella* (34) y *Salmonella* (20) aisladas en México, D. F. en los años de -- 1978-1979. Esta población permitió estudiar comparativamente algunas características fenotípicas mediadas por plásmidos y la distribución de diferentes clases de genes de resistencia a Tc.

Los resultados obtenidos, muestran que entre los dos géneros y entre las especies de un mismo género existen diferencias importantes en el fenotipo y genotipo mediados por plásmidos. En el género *Shigella* se observó que la mayoría de las cepas de *Sh. sonnei* son resistentes a bajas concentraciones de Tc, producen bactericina y son sensibles a Sp, mientras que *Sh. flexneri* hay mayor frecuencia de cepas que resisten a altas concentraciones de Tc, resisten a Sp y pocas cepas producen bactericina. En el género *Salmonella* el 55.0 % de las cepas producen bactericina y la mayoría presentan altos niveles de resistencia a Tc. Otra variabilidad genética encontrada entre los dos géneros, es la existencia de un gran número de elementos genéticos extracromosomales de bajo peso molecular en las cepas de *Shigella*, -- mientras que en las *Salmonella* no son tan frecuentes; Estos plásmidos pequeños posiblemente son similares a los plásmidos tipo Col EI ya que muchas de las cepas hibridizan con -- el pBR322.

De los determinantes genéticos de resistencia a Tc rastreados en las cepas clínicas, se encontró que la clase B -- (Tn10) es más frecuente (48.14 % de la población) tanto en *Shigella* como en *Salmonella*; la clase C se encontró con baja frecuencia (9.25 %) principalmente en salmonellas; y la

clase A es poco frecuente (5.55 %) y sólo se encontró en -- *Shigella*. Un alto porcentaje de shigellas (58.88 %) y algunas cepas de *Salmonella* (15.0 %) no hibridizaron con ninguno de los determinantes genéticos de resistencia a Tc. Es posible que estas cepas presenten un nuevo determinante genético ó bien presenten el determinante de la clase D o algunos de los determinantes encontrados en gram-positivas.

I N T R O D U C C I O N

1.- Generalidades

Uno de los problemas de salud pública mundial, son las enfermedades gastrointestinales producidas por diferentes organismos: 1) bacterias (*Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Vibrio cholera*, etc.); 2) virus (rotavirus, adenovirus, etc.); 3) parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Taenia sp*, etc.) y 4) hongos (*Cándida albicans*, etc) (1).

Las bacterias patógenas producen diarrea por tres mecanismos principales: 1) acción tóxica, 2) invasión superficial del epitelio intestinal y 3) invasión profunda del epitelio intestinal. El primero se efectúa por acción directa de toxinas producidas por algunas bacterias como *V. cholera*, *E. coli*, salmonellas, shigellas, etc. sobre el epitelio intestinal. Estas toxinas alteran el transporte de líquidos y electrolitos sin producir alteración morfológica en la mucosa intestinal. El segundo mecanismo lo realizan algunas cepas de *E. coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* y mycobacterias. Estas producen alteraciones morfológicas en la pared intestinal ocasionando una absorción inadecuada de líquidos. La invasión profunda del epitelio intestinal por algunas cepas de *Salmonella sp*, *Clostridium perfringes*, etc. causan una alteración morfológica en la mucosa intestinal, lo que altera la permeabilidad epitelial causando en algunos casos gangrena (2, 3).

En este trabajo sólo se hará referencia a los géneros *Shigella* y *Salmonella*. Para estas enterobacterias la especie predominante en cuadros de diarrea infecciosa varía de

pendiendo del área geográfica y del período estudiado. Por ejemplo, para el género *Shigella* se ha reportado que la especie *Shigella flexneri* predominó en Europa y E.U.A. en el año de 1964 y en Etiopía en los años 1975-1980; sin embargo, *Sh. sonnei* predominó en E.U.A., Suecia y Reino Unido - en los años 1966-1974, 1966-1970 y 1964 respectivamente (4, 5,6). Aparentemente las especies de *Sh. sonnei* y *Sh. flexneri* predominan alternándose, aunque en algunos casos puede predominar otra especie, como en Etiopía (1977-1978) en donde predominó *Sh. dysenteriae* (4).

Con las salmonellas ocurre algo similar. Por ejemplo, en Roma en el período 1977-1978 las especies más frecuentes fueron *S. wien* (23%) y *S. typhimurium* (21%); en Indonesia *S. oranenburg* (70%) (7,8).

A partir de la segunda guerra mundial, el uso de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas se incrementó, esto ha repercutido en una selección de bacterias multiresistentes. Se ha reportado para diferentes ciudades del mundo que más del 60% de las shigellas y salmonellas aisladas presentaron resistencia a más de un antibiótico. Sin embargo, especies de un mismo género aisladas en una región geográfica y en la misma época presentaron diferencias en el porcentaje de resistencia a uno o más antibióticos (4,7,8,9,10,11,12). Las especies del mismo género aisladas en una región geográfica pueden presentar diferencias en el número, así como en su patrón de resistencia a antibióticos; por ejemplo, en Roma (1977-1978) de las Salmonellas aisladas, *S. wein* presentó resistencia hasta 7 antibióticos diferentes. El 50% de las cepas de esta especie resistieron a ampicilina (Ap), carbemina (Car), cephalotina (Ce), kanamicina (Km), estreptomina

cina (Sm), sulfametoxasol (Su), y tetraciclina (Tc). En las *S. typhimurium* se encontró una resistencia máxima a 2 antibióticos, el 10% de las cepas tenían resistencia única a Tc ó Su y el 8% a los 2 antibióticos (7).

A partir de éstos datos se puede decir que en una población de bacterias, la especie predominante, el porcentaje de cepas resistentes a más de 1 antibiótico, la multiresistencia, y el patrón de resistencia, varían entre diferentes géneros y especies, así como entre diferentes regiones geográficas y períodos estudiados; ésta gran variabilidad hace imposible la extrapolación de datos de una región a otra.

En la Ciudad de México se ha observado que de 1953-1980, la frecuencia de cepas de *Shigella* resistentes a antibióticos se incrementó de 0% hasta 36-100% dependiendo del antibiótico. En el período 1953-1963 hubo una mayor frecuencia de resistencia múltiple a los antibióticos Sm, Tc, Cm y resistencia única a Sm (13, 14,15).

Para los años de 1978-1979 se encontró que el 86% de las shigellas y el 69.4% de las salmonellas de Hospitales y Laboratorios Clínicos mexicanos presentaron resistencia a más de un antibiótico.

Las frecuencias de resistencia a diferentes antibióticos en shigellas fueron: Su (91 %), Tc (57 %) y Sm (34 %); mientras que en salmonellas fueron: Su (90 %), Sm (49 %), Ap (48.5 %), Ce (45 %), Car (43 %) y Tc (37 %). Dentro de las salmonellas el 30.6 % fueron sensibles a 15 antibióticos; los patrones más frecuentes encontrados fueron: Su (8.4 %); Ap, Car, Ce, Km, Su, Tc, cloramfenicol (Cm), gentamicina (Gm) y sisomicina (Si) (8.29 %); Ap, Car, Ce, Cm, Km,

Gm, Sm, Su y Si (5.59 %); Ap. Car, Ce, Cm, Km, Si, Su y Tc (5.38 %). De las shigellas el 13.9 % fué sensible, el 68.7 % resistente a 1-3 antibióticos y el 17.4 % de 4-7 antibióticos, siendo el patrón más frecuente Sm, Su con un 33.9 % (16). Estos datos indican que en las salmonellas hay una mayor probabilidad de encontrar cepas multiresistentes que en las shigellas.

Se ha encontrado que muchos de los genes de resistencia a antibióticos, metales, complemento, luz ultravioleta, así como genes que codifican para la producción de enterotoxinas, colicinas, factores de colonización, propiedades de virulencia e invasión y la formación de pili sexuales, se localizan principalmente en Plásmidos (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29).

2.- Plásmidos y Transposones.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal, circular cerradas heredables y con replicación autónoma; el peso molecular puede variar de 1 hasta 150 megadaltones (Md) o más. Dentro de la bacteria pueden existir varias copias del plásmido. Por ejemplo, el R100 tiene 1 ó 2 copias por célula, el pSC101 de 5-7 copias, el pBR322 puede tener 20 ó más copias por célula, etc. Este número de copias está regulado por información genética presente en el plásmido y en la bacteria huésped (23, 24, 25).

Dentro de una célula varios plásmidos pueden coexistir siempre y cuando la regulación de cada uno de ellos sea di

ferente; así dos plásmidos muy relacionados, por ejemplo F y F'_{lac}, no pueden coexistir en una misma célula y uno de ellos es eliminado de la población. Este fenómeno se denomina incompatibilidad y se utiliza para clasificar a los plásmidos en grupos. En bacterias gram-negativas se conocen aproximadamente 20 grupos de incompatibilidad (22, 24, 25).

Los plásmidos pueden introducirse a una bacteria por tres mecanismos: 1) transformación 2) conjugación y 3) transducción. El primero se efectúa por la penetración directa del DNA por la pared y membrana bacteriana al interior de la célula. En gram-negativas hay métodos en donde la transformación se puede incrementar con un tratamiento CaCl₂; la eficiencia de estos métodos dependen del tamaño del plásmido y generalmente son utilizados para plásmidos menores de 30 Md, aunque puede transformarse plásmidos de 40-100 Md pero con muy baja frecuencia. La conjugación se realiza por una interacción célula-célula a través de pili sexuales por donde se transfiere el DNA de la bacteria donadora a la receptora; esta transferencia está mediada por genes plasmídicos. Algunos plásmidos no tienen genes de transferencia pero pueden ser movilizados por plásmidos que tengan un sistema de transferencia; otros plásmidos, los cuales no pueden conjugarse ni ser movilizados por otros, como el pBR322 (30). Se han descrito por lo menos 14 genes involucrados para la transferencia por conjugación del plásmido R100 (32). El fenómeno de transducción se lleva por medio de fagos, los cuales dentro de la cápside pueden incorporar DNA plasmídico y así transferir el DNA a otra bacteria cuando se infectan (33).

Los plásmidos pueden proporcionar al hospedero ventaja selectiva sobre otras bacterias si producen algún tipo de bactericina, microcina, toxinas ó antibióticos. Estas moléculas generalmente son producidas por plásmidos en diferentes organismos, tanto procariotes como eucariotes (31). Se ha encontrado en *E. coli* por lo menos 17 clases diferentes de colicinas que son liberadas por la bacteria e inhibe el crecimiento de bacterias que no contienen la colicina por 3 mecanismos diferentes (25).

Mecanismo I.- Las colicinas con Col E1 y Col K actúan en la membrana citoplasmática, desacoplando los procesos dependientes de energía.

Mecanismo II.- Las colicinas como Col E2 producen degradación del DNA e inhibición de la división celular.

Mecanismo III.- Colicina E2 previene la síntesis de proteínas por ruptura del RNA 16S ribosomal.

En los últimos años se ha descrito que las resistencias a los antibióticos Ap, Su, Tc, Km, etc., utilización de lactosa, biosíntesis de arginina e histidina, así como la producción de la enterotoxina termoestable de *E. coli* pueden localizarse en secuencias de DNA llamadas transposones(34).

Un transposón es una secuencia de DNA que varía de 4 a 32 Md, capaz de integrar una copia en otra región de la molécula de DNA donde se localiza o bien en otra molécula de DNA vecina como plásmidos, fagos, cromosoma, etc.. Estructuralmente los transposones (Tn) son secuencias de DNA que en los extremos 3' y 5' tienen la misma secuencia pero en sentido contrario (secuencias invertidas repetidas), estas

secuencias flanquean a una región no repetida que contiene genes estructurales de resistencia a antibióticos, etc. La transposición se lleva a cabo por un evento de recombinación que requiere de mínima homología entre el Tn y el sitio donde transpone. Este evento induce la duplicación de un número de pares de bases (3-12) originalmente presentes en la secuencia blanco; estas bases duplicadas se localizan en los extremos del Tn con la misma dirección (secuencias repetidas directas) y no forman parte de su estructura. Los transposones pueden portar genes para la resistencia a antibióticos o producción de una proteína no involucrada en la transposición. Hay secuencias de DNA que pueden transponer y no tener un marcador genético, estas secuencias denominadas secuencias de inserción (IS) generalmente son menores de 1500 pares de bases. La presencia de un transposón o secuencia de inserción puede inducir la inversión, duplicación o delección de genes vecinos, así como cambios en la regulación de su expresión (34).

3.- Mecanismo de acción de los antibióticos y mecanismo de resistencia a los antibióticos.

A.- Antibióticos en general.

La acción bactericida o bacteriostática de los antibióticos se debe a la inhibición de alguna(s) función(es) - importante(s) para la bacteria; en base a esto se pueden clasificar en 5 grupos, dependiendo de la función que afectan. 1) Síntesis de DNA (ácido nalidíxico, novobiocina, mitomicinas y porfiromicinas); 2) síntesis de RNA (actinomicinas y rifampicinas); 3) síntesis de proteínas (puromicina, aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincomicina); 4) síntesis de la pared celular (cicloserina, oxamicilina).

na, bacitracina, vancomicina, penicilinas y cefalosporinas) y 5) vías metabólicas (psicofuranina y canavanina) (35).

Dentro de una población bacteriana, algunas cepas pueden crecer en presencia de uno o más antibióticos. El análisis de estas cepas bacterianas ha revelado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos: 1) alteración -- del sitio blanco; 2) bloqueo del transporte del antibiótico; 3) inactivación del antibiótico; 4) reemplazamiento de la vía inhibida por otra equivalente; 5) incremento en la cantidad de la enzima inhibida; 6) producción de un antagonista y 7) disminución del requerimiento por el metabolito afectado (36). Algunos de estos mecanismos todavía no se han encontrado, pero teóricamente pueden existir. Los mecanismos 1, 2, 5 y 6 pueden ser producidos con mayor frecuencia por una mutación cromosomal; mientras que los mecanismos 3,4, y 7 generalmente están determinados por genes localizados en plásmidos o transposones (36, 37).

Dentro de las mutantes cromosomales que determinan resistencia a antibióticos y que se encuentran con mayor frecuencia, están las mutantes que alteran el sitio blanco. - Por ejemplo, algunas cepas resistentes a Sm presentan una mutación en la proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma (lisina es reemplazada por aspártico, treonina o arginina) involucrada en la iniciación de la síntesis de proteínas. Para otros antibióticos como Sp, Km, neomicina, eritromicina, kasugamicina y ácido fusídico, las modificaciones que sufren las mutantes resistentes se localizan en diferentes sitios. En algunos casos hay alteración de proteínas ribosomales (Sp, Km, neomicina), en otros, la mutación está relacionada con la metilación de un rRNA (kasugamicina, eritromicina), etc. (36, 37).

Los plásmidos o elementos extracromosomales también pueden determinar resistencia a ciertos antibióticos como anteriormente se mencionó. Se han encontrado tres mecanismos principales de resistencia en plásmidos: 1) modificación del antibiótico, 2) reemplazamiento de la vía metabólica y 3) alteración del transporte del antibiótico.

Para los derivados aminoglicósidos se han reportado tres tipos de modificaciones a los antibióticos determinados por genes plasmídicos: a) acetilación del grupo amino del antibiótico. Para esta modificación se han encontrado tres enzimas, las cuales requieren de acetyl-coenzima A; b) adenilación de varios grupos hidroxilo de los aminoglicósidos; las cuatro enzimas encontradas con este tipo de inactivación requieren de ATP; c) fosforilación. Se han encontrado cinco enzimas que fosforilan a los grupos hidroxilo del antibiótico. Estas tres modificaciones afectan la unión del antibiótico al sitio blanco o en algunos casos el transporte del antibiótico. Otro ejemplo de inactivación del antibiótico son las penicilinasas, las cuales rompen el anillo β -lactámico (37).

Hay pocos casos en que el reemplazamiento de la vía metabólica está mediada por plásmidos. Existen dos ejemplos en donde la enzima inactivada por el antibiótico es reemplazada por una enzima mutada activa en presencia del antibiótico. Esta nueva enzima está codificada por un gen plasmídico. Estas dos enzimas son: dihidroptoridina sintetasa que es inhibida por sulfadiazina y la enzima dihidrofolato reductasa inactivada por el antibiótico trimetoprima (37).

El tercer mecanismo de resistencia en plásmidos, se ha encontrado para Tc. El mecanismo de alteración en el trans

porte de este antibiótico, así como algunos puntos de mayor interés, serán revisados con mayor profundidad por ser necesarios para el presente trabajo.

B.- Tetraciclina.

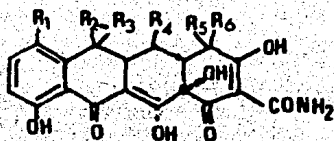
a) Acción y penetración de tetraciclina.

Tetraciclina y algunos derivados (Fig. 1) son producidos por las especies de *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*. Estos antibióticos son muy hidrofílicos, teniendo varios grupos que se pueden disociar y además pueden unirse o formar un complejo con iones divalentes como el Mg^{++} y Ca^{++} (Fig. 2) (38, 39).

Se ha observado que la concentración mínima inhibitoria de algunos antibióticos es mayor para bacterias gram-positivas que para bacterias gram-negativas. En especial para Tc y algunos de sus derivados, la concentración mínima inhibitoria es de 2 a 9 veces mayor, dependiendo de la hidrofobicidad del antibiótico, en las gram-positivas que en las gram-negativas; este fenómeno se explica por la existencia en las primeras de una pared celular predominantemente aniónica (40). Aunque no existe un modelo convincente que explique la penetración y acumulación de Tc en la célula, se han descrito dos mecanismos de penetración en *Escherichia coli*: 1) independiente de energía y 2) dependiente de energía (41).

La penetración de Tc en *E. coli* es afectada por la concentración de Mg^{++} (la concentración óptima es de 0.01-1.0 mM) y por la concentración de protones del medio. El pH óptimo para la penetración es de 6.0 a 7.0, a este pH las es

Figura 1.- Fórmulas estructurales para Tetraciclina y algunos de sus análogos.^a

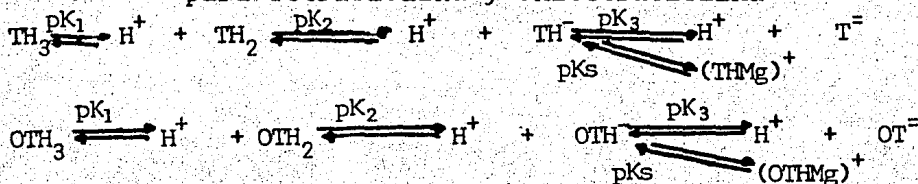


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Coef. partición octanol/agua ^b
Tetraciclina	H	OH	CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂	0.052
Oxitetraciclina	H	OH	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	0.087
Clorotetraciclina	Cl	OH	CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂	0.320
Dimetilclorotetraciclina	Cl	OH	H	H	H	N(CH ₃) ₂	0.190
Doxiciclina	H	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	0.920
β-chelocardina	H	H	CH ₃	H	NH	H	-----
minociclina	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H	N(CH ₃) ₂	1.1

a) Chopra, I., *et al*(38)

b) Chopra, I. & Howe. B.G.T.(39)

Figura 2.- Esquemas de disociación y constantes de ionización para Tetraciclina y Oxitetraciclina^a



	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK _s
Tc	3.3-3.45	7.68-7.92	9.57-9.81	4.16-4.29
OTc	3.1-3.46	7.26-7.76	9.11-9.7	3.80-3.96

a) Chopra, I. & Howe, B.G.T. (39).

pecies predominantes son TH_2 y TH^- (Fig. 2). Varios estudios (44, 45, 47) indican que sólo el primer producto de la disociación (TH_2) penetra por la membrana externa, posiblemente por difusión a través de los poros acuosos formados por el grupo de proteínas Ia (terminología de Henning); por estos poros además pueden penetrar moléculas inferiores a 650 daltones como nucleótidos y β -lactámicos (39,43).

La penetración pasiva del antibiótico por la membrana interna no se conoce claramente, pero se puede acumular en el interior de la célula de 2.5 a 3.0 veces la concentración externa existente (42). Esta acumulación se explica por la presencia de un pH ácido en el espacio periplásmico, ocasionando una protonación del antibiótico, el cual puede interaccionar más fácilmente con la membrana interna; de esta forma Tc se acumula en la célula por un mecanismo independiente de energía (46). Otros antibióticos análogos a Tc como minociclina y doxiciclina, que son más lipofílicos, parecen penetrar por difusión a través de la región lipídica de la membrana (47).

Hay tres tipos de transporte activo en *E. coli* (48): --
1) los que requieren de ATP, 2) los que durante el transporte el sustrato es modificado por enzimas membranales -- y/o citoplasmáticas y 3) los que dependen de un gradiente de protones a través de la membrana formado por el transporte de electrones y/o hidrólisis de ATP. Hay datos contradictorios sobre la acumulación de Tc dependiente de energía dentro de la bacteria. Por ejemplo, la acumulación es inhibida por a) anaerobiosis y cianatos (que bloquean la respiración), b) arsenatos (inhiben la síntesis de ATP) y c) 2-4 dinitrofenol y carbonil-cianato m-clorofenilhidrazona (que destruyen el gradiente de protones) (39, 42). Estos inhibidores afectan de alguna forma la respiración y/o hi-

drólisis del ATP, disminuyendo el gradiente de protones directa o indirectamente. Por otro lado, Mc Murray, *et al* -- (42) proponen que el transporte activo de Tc puede requerir de un gradiente de protones basal muy alto y que la mayor parte de la penetración del antibiótico se efectúa por este mecanismo.

Otros estudios (39) revelan que Tc, oxitetraciclina y clorotetraciclina pueden ser acumulados en *E. coli* y *S. aureus* por medio del transporte de ácidos dicarboxílicos y que además se puede inducir con AMPcíclico como un control positivo (49); aunque otros acareadores pueden estar involucrados (50).

Hasta ahora no se sabe bien cual es el mecanismo molecular, por el cual las tetraciclinas inhiben el crecimiento celular, pero se sabe que Tc se une específicamente a las proteínas S4 y S18 del ribosoma, además de unirse con menos especificidad a las proteínas S7, S13 y S14 del ribosoma (51). Hay dos teorías de como las tetraciclinas previenen la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma (38):

- 1) Se ha sugerido que la interferencia en la unión se realiza por una interacción entre los grupos polares de la droga y el anticodón del tRNA.
- 2) Las tetraciclinas interrumpen la interacción entre el factor Tu en el sitio A durante la elongación. Este efecto puede ser opuesto a la interacción entre el ribosoma y el factor de elongación Tu.

b) Resistencia a tetraciclina mediada por plásmidos.

Se han encontrado más de 25 plásmidos diferentes que -

confieren resistencia a Tc por lo menos en 19 especies bacterianas incluyendo gram-positivas y gram-negativas. Sin embargo en *Neisseria gonorrhoeae*, presumiblemente la resistencia a Tc está determinada por una mutación en genes cromosomales (39, 52). Una característica de la mayoría de estos plásmidos es su inducibilidad por Tc a niveles de resistencia superiores a los basales. Esta inducibilidad en algunos casos está asociada con el incremento en la síntesis de algunas proteínas involucradas en la resistencia a Tc. En estos plásmidos se pueden encontrar diferencias en el nivel de resistencia que confieren, peso molecular y en el grupo de incompatibilidad (53, 54).

Esta gran variabilidad en plásmidos que confieren resistencia a Tc fué estudiada fenotípicamente en *E. coli* por Chabbert y Scavizzi (53), los cuales agrupan a los plásmidos en dos clases, dependiendo del comportamiento a determinados análogos de Tc: a) Tet A, este grupo confiere niveles de resistencia a Tc inferiores a 100 µg/ml, inferiores a 3 µg/ml de minociclina y no resisten a chelocardina y b) Tet B, este grupo confiere resistencia superior a 100 µg/ml de Tc y a 3 µg/ml de minociclina, además con concentraciones subinhibitorias de Tc se puede inducir la resistencia a chelocardina.

Méndez, Tachibana y Levy (54), agruparon 25 plásmidos de enterobacterias dentro de cuatro clases principales, genotípicamente diferentes (Tabla 1). Esta clasificación se realizó por medio de hibridización DNA:DNA. La hibridización se efectuó con fragmentos de DNA de plásmidos prototipo, encontrando que el fragmento del Tn^{10} es más frecuente que las otras dos secuencias de resistencia a Tc y sólo un plásmido no hibridiza con las tres secuencias de DNA analizadas agrupándolo en una clase diferente; este plásmido --

Tabla 1.- Clasificación de los diferentes determinantes genéticos de resistencia a tetraciclina en plásmidos de bacterias gram-negativas^a.

Clase	Plásmido	Resistencia a Tc (µg/ml)	Resist. análogos (µg/ml)		Plásmido prototipo	Rastreador de Tc
			minociclina	chelocardina		
A	RP4,R446b Rp1, pIP15 pIP7,pIP13	75 a 150	5 a 10	5	RP1	Fragmento de SmaI de RP1 (750pb)
A1	R386,N3	75	5 a 10	5 a 10	R386	
B	R222,pIP69 R136, R455 R688, R7 R621a, R64 R124, R724	150 a 200	10	5	R222	Fragmento de HindIII del Tn10 (4885pb)
B1	R725, R27	50 a 100	5 a 10	5 a 10	R27	
C	pSC101, R144 Sp219,pR120	25	5	5	pSC101	Fragmento de BstI del pBR322 (780 pb)
D	RA1	100	5	5	RA1	no son de la clase A,B,C.

a) Méndez, B., et al (54).

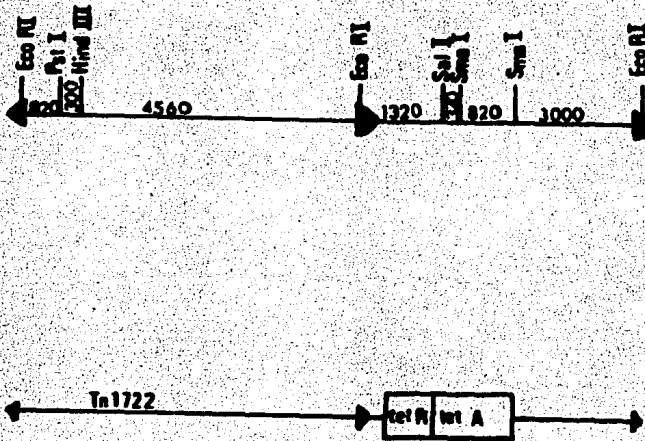
RA1 no se ha caracterizado y estudiado con mucho detalle.

Todos estos plásmidos confieren resistencia a Tc por medio de alteraciones en el transporte del antibiótico, -- además de que hasta ahora no se ha encontrado otro mecanismo de resistencia. Se han encontrado proteínas codificadas por diferentes plásmidos y que son inducibles con concentraciones subinhibitorias de Tc.

Clase A.

Para la clase A, el plásmido prototipo es el RP1, pero se ha estudiado más este determinante genético en el transposón Tn1721 (Fig. 3). El Tn1721 de 11.2 kilo pares de bases (Kpb) está formado por dos regiones, una de ellas codifica para las funciones de resistencia a Tc y la otra denominada Tn1722 para las de transposición. Este transposón está flanqueado por secuencias invertidas repetidas de 38 pares de bases (pb) y las dos regiones funcionalmente diferentes son separadas por otros 38 pb idénticos a los encontrados en los extremos (55, 56). Usando deleciones e inserciones en el transposón se han mapeado y caracterizado los genes de resistencia a Tc, localizándolos en una región de 2.1 Kpb. Con el uso de minicélulas se ha demostrado que con concentraciones subinhibitorias a Tc este transposón puede inducir tres proteínas. La primera proteína es de 26 Kilodaltones (Kd) y funciona como un represor del gene estructural de Tc. Esta proteína es soluble. La segunda proteína pesa 34 Kd, se localiza en la membrana, y es la principal responsable de la resistencia. La tercera -- proteína encontrada es de 65 Kd y es codificada por el -- Tn1722 (57).

Fig. 3.- Mapa de restricción y localización de las proteínas inducibles con Tc del Tn1721^a.



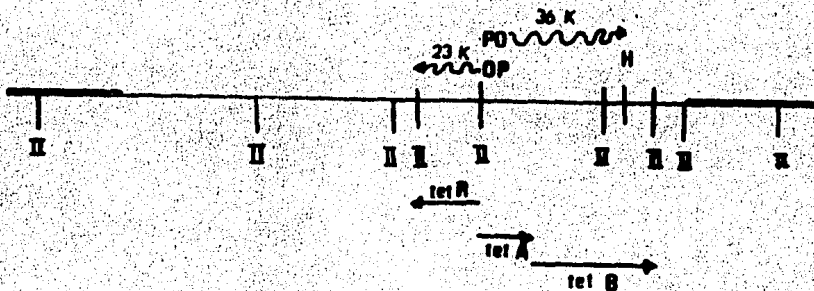
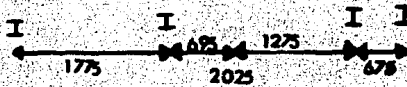
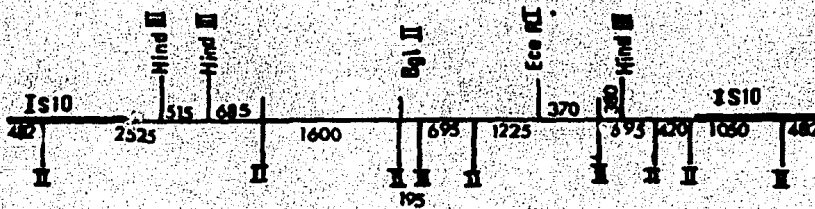
a) Altenbuchner, J. *et al* (57).

Clase B.

En la clase B, el determinante genético prototipo es - el Tn10. Este determinante se encuentra con mayor frecuencia en la población bacteriana (58). El transposón está - formado por secuencias invertidas repetidas de 1450 pb en los extremos y por una región no repetida de 6400 pb. Los genes para la resistencia se localizan en un fragmento de la enzima de restricción HpaI de 2700 pb (59).

Este transposón codifica para tres proteínas inducibles con concentraciones subinhibitorias de Tc; 1) 36 Kd, 2) --

Fig. 4.- Mapa de restricción y localización de genes y proteínas inducibles con Tc del Tn10^a. *HincII* (II), *HpaI* (I).



- a) Jorgensen, A. R., et al (59).
- Coleman, C. A., et al (64).

25 Kd, 3) 13-15 Kd. La segunda proteína se ha observado claramente cuando se marca con α | 3 H | -leucina y no con α | 35 S | -metionina (62, 63); la tercera proteína sólo se observa bajo determinadas condiciones y cuando el transposón se encuentra en el plásmido R100. Para algunos autores (66) el gene para la tercera proteína no se localiza dentro del Tn10 siendo una proteína del plásmido R100; sin embargo, Chopra I., *et al* (64) por datos fenotípicos proponen la existencia de una proteína del mismo peso molecular localizada a la derecha del gene de 36 Kd denominándole *tet A* (Fig. 4). La proteína de 36 Kd siempre se observa y se localiza en la membrana interna, mientras que la de 25 Kd se ha encontrado en membrana externa (62, 65). Estudios recientes hechos por complementación en plásmidos han revelado la existencia de dos genes involucrados en la resistencia: *tet A* y *tet B*; éste último presumiblemente codifica para la proteína de 36Kd, pero para el gene *tet A* no se detectó algún producto proteico (64, 74). Estos genes están regulados por un represor localizado antes y en sentido contrario al de la transcripción, teniendo promotores translapados. Este represor es de 23.5 Kd y está codificado por un fragmento de 650 pb, algunos autores piensan que la proteína de 25 Kd es la misma que el represor (60).

Uno de los fenómenos no muy bien conocidos, es el efecto multicopia, el cual consiste en expresar bajos niveles de resistencia al antibiótico si hay varias copias del transposón, pero con 1 ó 2 copias los niveles de resistencia son altos (61,71). Se han encontrado mutantes en el fragmento del gene *tet A* que elimina el efecto multicopia. Este efecto sólo se ha encontrado en este determinante genético.

Clase C.

De los 4 plásmidos pertenecientes a la clase C, el pSC101 es el más estudiado. Este plásmido en un sistema de minicélulas codifica tres proteínas inducibles con Tc: 1) 34 Kd, 2) 26 Kd, 3) 14 Kd (67, 68), además de una proteína constitutiva de 18Kd involucrada en la resistencia (69). Sin embargo, León, P. y Gómez, C. (70) encontraron que esta proteína es inducible. Este plásmido parece codificar también para un represor de 38 Kd. Las proteínas de 34 y 18 Kd están involucradas en prevenir la acumulación de Tc en la célula, la proteína de 14 Kd en disminuir la absorción inicial de Tc, mientras que la proteína de 26 Kd parece no tener una función.

De las proteínas antes mencionadas, algunas tienen la función de proporcionar resistencia al hospedero, pero ¿se sabe cómo cada una de ellas actúa en la célula?. Por medio de estudios fenotípicos se ha podido determinar tres mecanismos de resistencia en el transposón Tn10 que pueden estar mediados por proteínas codificadas por el determinante (73). Desafortunadamente los productos que medían estos mecanismos, no se han identificado. Los fenotipos de los tres mecanismos son:

Mecanismo I.- Un incremento en la resistencia a Tc de 10-20 veces que no está asociada con una disminución en la acumulación del antibiótico.

Mecanismo II.- Un incremento en la resistencia a Tc de 4-7 veces asociado con disminución en la acumulación de Tc. Este mecanismo es el resultado parcial de la salida del antibiótico

Mecanismo III.- Hay un incremento en la resistencia a Tc y

a un derivado hidrofóbico de Tc (minociclina) de 2-3 veces sin existir una disminución en la concentración interna del antibiótico.

Chopra *et al* (71) proponen que la proteína de 36 Kd codificada por el Tn10, localizada en membrana citoplasmática, puede ser la responsable de la expulsión de Tc dependiente de energía. Esta proteína puede mediar el mecanismo II, mientras que el mecanismo III puede estar envuelto en la protección de los ribosomas citoplasmáticos por la proteína de 13-15 Kd. Para el mecanismo I se propone que existe un producto que protege a los ribosomas unidos a membrana.

En el transposón Tn10 los mecanismos II y III se pueden inducir con concentraciones subinhibitorias de Tc, el mecanismo I se expresa constitutivamente (71). Cuando este determinante se encuentra en varias copias (efecto multicopia) hay evidencias que los mecanismos I y II disminuyen y hay un incremento en el mecanismo III que es menos eficiente que los dos primeros.

El segundo mecanismo posiblemente exista en los cuatro determinantes, ya que tres de ellos (clase A, B, C) codifican para una proteína de 34-36 Kd (73), además Mc Murray, L., *et al* (75) demostró que los cuatro determinantes (RP1, R100, R144 y RA1) son capaces de expulsar Tc por medio de un sistema dependiente de energía. La magnitud de la expulsión del antibiótico está relacionado con el nivel de resistencia codificado por el plásmido.

La clase C (pSC101) presenta únicamente el mecanismo I; la clase B (Tn10) los tres mecanismos y la clase A (RP1, pRSD1, pIP7) los mecanismos I y II. El único plásmido de

la clase D (RA1) no se analizó; sin embargo, las evidencias indican que puede presentar el mecanismo II (72).

Aparentemente los cuatro determinantes genéticos descritos en bacterias gram-negativas, no son los únicos dentro de las bacterias. Estudios realizados en bacterias gram-positivas han revelado otros determinantes. En *Streptococcus*, por hibridización DNA:DNA, se han encontrado tres determinantes: *tet L*, *tet M* y *tet N* (76). El determinante *tet L* se localiza en plásmidos pequeños no conjugativos (pMV158, pMV163 y pAMa1). Estos plásmidos determinan resistencia a su hospedero original a Tc (12.5 µg/ml y sensibilidad a minociclina y chelocardina. *tet M* es un determinante no asociado con plásmidos, pero puede transferirse de una cepa a otra. Ciertos estudios demuestran que éste fenómeno está mediado por un transposón conjugativo capaz de integrarse al cromosoma denominado *In916*(77). Este determinante media la resistencia a Tc y minociclina (25-50 µg/ml y 3.1 a 6.2 µg/ml respectivamente). El tercer determinante se localiza en el plásmido conjugativo pMV120 que codifica para resistencia Tc y minociclina (25-50 µg/ml y 3.1-6.2 µg/ml respectivamente).

Estos tres determinantes además de no hibridizar con las cuatro clases reportadas por Méndez, B., *et al*, no hibridizan con el plásmido pT181 aislado de *S. aureus* y el pJP106 de *B. sphaericus* (76). Además se han encontrado otros plásmidos en *H. influenzae* que fenotípicamente dan resistencia a Tc (38). Estos datos demuestran que por lo menos hay 7 diferentes determinantes genéticos que codifican resistencia a Tc en bacterias.

O B J E T I V O

En una población bacteriana, la información genética localizada en los plásmidos puede transferirse entre diferentes géneros o especies por medio de transformación, conjugación y transducción. Esta transferencia es más probable entre géneros y especies genéticamente relacionados. La existencia de este flujo de información genética presente en plásmidos haría suponer que la poza de plásmidos, compartida por una población de bacterias, se encontraría distribuida de manera homogénea; es decir, que la probabilidad de encontrar un plásmido o transposón determinado en los diferentes géneros y especies de esa población, sería similar. Sin embargo, es posible que la presión selectiva por antibióticos, bactericinas, nutrientes, etc., así como las diferencias genéticas entre las bacterias determinen una distribución diferente.

Considerando lo anterior, se planteó el siguiente objetivo para este trabajo: analizar en una población bacteriana constituida por géneros y especies relacionadas genéticamente, a) la frecuencia de plásmidos y de algunas características fenotípicas mediadas por plásmidos y b) la distribución en esta población de los genes de resistencia a Tc pertenecientes a las Clases A, B y C (54).

Para ésto se seleccionó una población de 54 cepas clínicas constituida por dos géneros diferentes: 34 shigellas y 20 salmonellas y por varias especies de estos géneros. Los genes de resistencia a Tc de tres de las cuatro clases descritas para Gram-negativos se tomaron como sistema modelo experimental para conocer la dispersión de los genes o plásmidos en la población bacteriana. Este análisis permitirá conocer el grado de heterogeneidad en la distribución de --

los plásmidos y de la información genética presente en ellos en una población bacteriana definida.

M E T O D O L O G I A

1.- Cepas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas de *Shigella sp* y *Salmonella sp* utilizadas en este trabajo se enumeran en la Tabla 2. Estas cepas se aislaron de Hospitales y Laboratorios clínicos de la Ciudad de México, D.F. y fueron donadas por el Dr. Jacobo Kupersztch.* Las cepas de *E. coli* y plásmidos se enumeran en la Tabla 3.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria, Mc Conkey (78) o en medio mínimo 56 (KH_2PO_4 0.68 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 %, CaCl 5×10^{-4} %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.5×10^{-5} %, Dextrosa 0.2 %, Triptofano 0.003 %, Bactoagar 1.5 %). En algunos casos, a estos medios se les agregó uno o más - antibióticos. Los antibióticos usados y sus concentraciones fueron las siguientes: estreptomina (Sm) 50 $\mu\text{g/ml}$. sulfametoaxol (Su) 200 $\mu\text{g/ml}$, espectinomicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina de 1 a 250 $\mu\text{g/ml}$.

Para sembrar por vaciado se utilizó agar blando (agar 0.7 %, NaCl 0.8 % y caldo Luria al 3 %) a 45°C.

2.- Inducción y nivel de resistencia a tetraciclina.

Para obtener el grado de inducción y el nivel de resistencia a Tc se utilizó el método descrito por Méndez, B., - *et al* (54) con algunas modificaciones. Se inocularon 0.05 ml de una dilución 10^{-5} de un cultivo en la fase exponencial ($2-3 \times 10^8$ células/ml) en Luria y en Luria con Tc 1 $\mu\text{g/ml}$ (esta última para inducir el nivel basal de resistencia a Tc). Con esta modificación se pueden colocar hasta 10 cepas un - una caja. Las cajas se incubaron 24 horas a 37°C y se replicaron a cajas con diferentes concentraciones de Tc (1, 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 275 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 2.- Cepas de *Shigella* y *Salmonella* aisladas en Hospitales y Laboratorios de la Ciudad de México durante los años 1978-1979.^a

A) *Shigella*

Cepa	Especie	Fecha de aislamiento	Fenotipo
MSH04 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	I-1979	Tc ^r Sm ^r
MSH09 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	I-1979	Tc ^r Sm ^r
MSH27	<i>Sh. sonnei</i>	I -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH28	<i>Sh. sonnei</i>	XI -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH29	<i>Sh. sonnei</i>	I -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH30	<i>Sh. sonnei</i>	VI -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH31	<i>Sh. sonnei</i>	-----	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH32	<i>Sh. sonnei</i>	IX -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH33	<i>Sh. sonnei</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH34	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH35	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH36	<i>Sh. sonnei</i>	VI -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH37	<i>Sh. sonnei</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH38	<i>Sh. sonnei</i>	VI -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH39 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH40 ^b	<i>Sh. flexneri</i>	VII-1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH41 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH42 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH43 ^b	<i>Sh. flexneri</i>	VIII-1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH44 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	V -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH45	<i>Sh. sonnei</i>	V -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH46	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH47	<i>Sh. flexneri</i>	XI -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH48	<i>Sh. flexneri</i>	VI -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH49 ^b	<i>Sh. flexneri</i>	XI -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH50 ^b	<i>Sh. sonnei</i>	VI -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH53	<i>Sh. flexneri</i>	IV -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH54	<i>Sh. flexneri</i>	II -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH55	<i>Sh. sonnei</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH56	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH57	<i>Sh. flexneri</i>	VI -1978	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH58	<i>Sh. sonnei</i>	VII-1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r Sp ^r
MSH59	<i>Sh. sonnei</i>	X -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH60	<i>Sh. sonnei</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r
MSH51 ^c	<i>E. coli</i>	V -1979	Tc ^r Sm ^r Su ^r

continúa

Tabla 2.- Continuación

B) *Salmonella*

Cepa	Especie	Fecha de aislamiento	Fenotipo		
MSS01 ^d	<i>S. typhimurium</i>	III -1979	Tc ^r	Sm ^r	
MSS03 ^d	<i>S. London E1</i>	II -1979	Tc ^r	Sm ^r	
MSS05 ^d	<i>S. enteritidis</i>	VIII-1978	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS06 ^d	<i>S. typhimurium</i>	II -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS07 ^d	<i>S. typhimurium</i>	VI -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS08 ^d	<i>S. typhimurium</i>	-----	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS09 ^d	<i>S. typhimurium</i>	III 1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS10 ^d	<i>S. typhimurium</i>	IV -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS11	<i>S. typhimurium</i>	I -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS12	<i>S. typhimurium</i>	II -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS13	<i>S. typhimurium</i>	II -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS14	<i>S. typhimurium</i>	III -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS15	<i>S. typhimurium</i>	V -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS16 ^d	<i>S. typhimurium</i>	III -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS17 ^d	<i>S. typhimurium</i>	VI -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS18 ^d	<i>E. enteritidis</i>	VII -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS19 ^d	<i>S. typhimurium</i>	IX -1978	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS20 ^d	<i>S. poona G1</i>	IX -1979	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS21 ^d	<i>S. typhimurium</i>	IX -1978	Tc ^r	Sm ^r	Su ^r
MSS22 ^d	<i>S. typhimurium</i>	IV -1979	Tc ^r	Sm ^r	

a) Cepas donadas por el Dr. J. Kupersztoch

b) Cepas identificadas por la Dra. S. Giono

c) Al identificarse de manera más rigurosa, esta cepa se clasificó como *Escherichia coli*

d) Cepas identificadas por el Dr. J. Olarte

Tabla 3.- Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en el trabajo.

A.- Cepas de *E. coli*

Cepa	Fenotipo	Origen
C600	Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Lac ⁻ F ⁻	C. Gómez
GM31	Thr ⁻ Leu ⁻ B ₁ ⁻ His ⁻ Dam ^r Sm ^r	M. Marinus
HB96	Nal ^r Rif ^r M ⁻ R ⁻	J. Martuscelli
HB95	Nal ^r M ⁻ R ⁻	J. Martuscelli
J53	Pro ⁻ Met ⁻ λ ^r	C. Gómez

B.- Plásmidos

Plásmido	Fenotipo	Origen
R1-19	Km ^r Sm ^r Sp ^r Su ^r Cm ^r	G. Alfaro
R100	Hg ^r Sm ^r Sp ^r Su ^r Cm ^r Tc ^r	G. Alfaro
pNK81	Ap ^r Tc ^r	N. Kleckner
pRSD1	Tc ^r	Plásmid Stock Center
pBR322	Ap ^r Tc ^r	F. Bolivar
pSC101	Tc ^r	N. Willetts
pMS01	Ap ^r	Este trabajo
pMS02	Ap ^r Tc ^r	Este trabajo

3.- Producción de bactericina.

Las colonias a probar se sembraron por piquete con palillos estériles en cajas con Luria y se sembraron a 37°C por 10-12 hrs. Las células se mataron exponiéndolas a vapores de cloroformo por 20 mins. -- Posteriormente se sembró por vaciado 0.1 ml de la cepa sensible a bactericinas (C600) en 2 ml de agar blando. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs. Un halo claro alrededor de la cepa sembrada por piquete - indicó que es productora de bactericinas.

4.- Conjugación bacteriana.

El método empleado fué reportado por Miller, H. J., (78). Se mezclaron cultivos en la fase exponencial tardía de la cepa donadora y receptora en una relación 1:5 ó 1:10 respectivamente. Se incubaron 16 horas a 30°C sin agitación. Posteriormente se sembró 0.05 ml de la mezcla de cultivo en el medio selectivo.

5.- Transformación.

El método utilizado para las transformaciones con plásmidos fué descrito por Cohen, N. S., *et al* (79). Este método se basa en un tratamiento con CaCl y un pulso de calor.

6.- Obtención de lisados claros.

Para la obtención de lisados claros se utilizaron varias técnicas dependiendo del peso molecular de los plásmidos a analizar.

6.1) Lisados rápidos por ebullición.

Para plásmidos menores de 6 Md se utilizó la técnica descrita por Holmes, D.S. y Quisley, M., (80). Esta técnica consiste en lisar las células con Tritón X-100 y lisozima e incubar el lisado en baño maría por 1 min. a 96°C. El DNA se precipitó con dos volúmenes de isopropanol y una incubación en hielo seco por 30 min. Posteriormente se centrifugó el DNA en una microcentrífuga Eppendorf.

6.2) Lisados para plásmidos pequeños.

Para plásmidos de 1 a 20 Md se utilizó el método de Borbom, A.C., y Doly, ., (81). La lisis se obtuvo con lisozima, NaOH y Doedecil -- sulfato de sodio (SDS). Parte de las proteínas y el SDS se precipitaron con acetato de sodio. El DNA se precipitó añadiendo dos volúmenes

de etanol frío e incubando por 30 min en hielo seco. Finalmente el DNA se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf y se secó por aereación.

6.3) Lisados con Tritón X-100.

Esta metodología se usó para plásmidos pequeños y grandes en un rango de 1 a 100 Md. La cepa con los plásmidos se creció en 15 ml de Luria hasta una densidad de 7×10^8 células/ml. El cultivo se centrifugó a 3500 rpm por 10 min en una centrífuga clínica; el paquete celular se resuspendió en 5 ml de amortiguador TE (Tris.HCl 10mM, etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM, pH 8) y se centrifugó nuevamente. La pastilla celular se resuspendió en 0.25 ml de amortiguador TE. Las células se lisaron añadiendo y mezclando suavemente: 0.06 ml de NaOH 1M, 0.1 ml de mezcla lítica (Tritón X-100 0.6%, EDTA 0.18 M, Tris.HCl 0.15 M pH 8), 0.07 ml de solución neutralizadora (Tris.HCl 0.15 M pH 8), y 4 μ l de RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M, EDTA 3.3 por 10^{-5} M, pH 5.5 previamente incubada 10 min. a 80°C para inactivar DNasas contaminantes). Después de la adición de NaOH y de la mezcla lítica se incubó por 10 min a 37°C y después de añadir la RNasa se incubó por 4 a 5 hrs. a 50°C, posteriormente por 14 a 16 hrs a -20°C. La fase viscosa (DNA cromosomal principalmente) se separó de la fase acuosa (DNA del plásmido) por decantación. A la fase acuosa se le agregó un volumen de fenol destilado (previamente equilibrado con amortiguador TE) se mezcló vigorosamente y se centrifugó 5 min en una microcentrífuga Eppendorf. La fase superior se transfirió a un tubo, se adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó 3 min. La fase superior acuosa se le añadió 1/25 del volumen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol frío. Se incubó 30 min en hielo seco y el DNA se centrifugó, se

secó por aereación y se resuspendió el amortiguador TE.

7.-Purificación de plásmidos.

Para la purificación de grandes cantidades de DNA de plásmido se utilizaron los métodos reportados por Clewell, D.B. & Helinski, D.R., (82) y por Bolívar, F., *et al* (83). Al cultivo bacteriano en la fase exponencial ($2-3 \times 10^8$ células / ml) se le añadió cloranfenicol (200 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó por 16 hrs a 37°C con agitación vigorosa. Con este tratamiento se incrementa el número de plásmidos por célula de 20-30 a más de 1000 (amplificación del plásmido). Este fenómeno sólo lo presentan plásmidos tipo Col E1 (82).- El lisado se extrajo con fenol y cloroformo, se precipitó con NaCl y etanol como anteriormente se mencionó. El DNA se sometió a cromatografía en una columna de 50×2.7 cms. de Bio-Gel A-50. Las fracciones con el DNA del plásmido se precipitaron con dos volúmenes de etanol. El precipitado se separó en DNA cromosomal contaminante y en DNA del plásmido usando un gradiente de cloruro de cesio-ioduro de propidio, el gradiente se formó centrifugando en el rotor SW50.1 a 38000 rpm por 20 hrs en la ultracentrífuga Beckman.

8.- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción usadas son del tipo II las cuales reconocen dentro del DNA una secuencia específica de bases (3-6) que generalmente son secuencias palíndromicas. Estas enzimas rompen el enlace fosfodiéster en las dos cadenas sin utilización de ATP. Para la mayoría de las endonucleasas de restricción se usaron los tres amortiguadores publicados por Maniatis, T., *et al* (84). Estos amortiguadores varían en la concentración de sales. Para la enzima *Hind*III se usó el recomendado por los proveedo-

res (Tris.HCl 20 mM, MgSO₄ 7mM, NaCl 60 mM, pH7.4).

Para cantidades pequeñas de DNA (1-3 µg) se utilizó una unidad de la enzima en un volúmen final de 20-50 µl de amortiguador y se incubó por una hora a la temperatura óptima.- En algunos casos se cortaron 100 µg de DNA de plásmido con menos de 30 unidades de la enzima en un volúmen final de -- 250-300 µl incubándose a la temperatura óptima por 6-24 hrs.

9.- Utilización de otras enzimas para construcción de plásmidos.

9.1) Nucleasa SI de *Aspergillus eryzae*.

La nucleasa SI de *Aspergillus* degrada principalmente - DNA ó RNA de cadena sencilla en mono y oligonucleótidos. - El DNA de doble cadena, RNA de doble cadena e híbridos DNA: RNA son relativamente estables. Para esta enzima se usaron 1.5 µg de DNA de doble cadena con extremos de cadena sencilla y una unidad de la enzima SI en un volúmen final de 50 µl. El amortiguador usado fué, 25 mM de acetato de sodio, 0.3 M de NaCl, 1 mM ZnCl₂ a pH 5.0. El DNA se difirió por 30 min a temperatura ambiente (84).

9.2) Ligasa de T4.

Para la ligasa del fago T4 que une DNA de extremos rasos y cohesivos se usó el amortiguador siguiente: 20 mM -- Tris.HCl, 10 mM ditriotreitol (DTT), 10 mM MgCl₂ pH 7.4. - Se usaron 25 ng de DNA con extremos rasos o cohesivos con una unidad de la enzima en un volúmen final de 50 µl. Se incubó a 4°C por 14-16 hrs (83,84).

10.- Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis se realizaron en geles verticales - en placas con dimensiones de 18 x 14 x 0.15 cms. Se utilizó agarosa al 0.8% y 1.0 % en amortiguador de acetatos --- (Tris.HCl 50mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM, NaCl 18 mM, pH 8.15). La electroforesis se efectuó con un amperaje constante de 80 mA por 2-4 horas.

Para geles preparativos se utilizaron geles de agarosa al 1.0 % en placas de 3 mm de grosor y 18 x 14 cms. Los geles se prepararon con el amortiguador de acetatos anteriormente mencionado. A los geles se les aplicó 140 mA -- constantes por 2-4 hrs.

Los geles se observaron con luz ultravioleta después - de una tinción con bromuro de etidio (10 µg/ml). Se fotografiaron con una cámara Polaroid Type 55, utilizando un - filtro amarillo.

11.- Electroelución de fragmentos de DNA.

La región del gel preparativo con la banda de DNA deseada se cortó y electroeluyó en una cámara que contiene - dos reservorios colocados en extremos opuestos y abiertos - en la parte inferior; esta parte es sellada con membranas - de diálisis de celulosa Spectrapor. Los reservorios están comunicados por un puente. El gel se fragmentó y se colocó en uno de los reservorios. La cámara de electroelusión se llenó con el amortiguador TE y se sumergió en las cámaras de los electrodos que contienen amortiguador TEA (Tris ma-base 20 mM, acetato de sodio 6 mM, EDTA 0.9 mM pH 8.1). Se aplicó un voltaje constante de 100 V por una hora 30 minutos, se invirtió la polaridad por un minuto. Se colectó

el amortiguador del reservorio opuesto al que contiene los fragmentos del gel. Se repitió el procedimiento. Por último se extrajo el bromuro de etidio del DNA con butanol - (equilibrado con amortiguador TE). A la fase inferior - acuosa con DNA se le añadió 1/25 de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol frío, se incubó a -20°C por 14-16 hrs. y se centrifugó 10 min en una centrífuga Eppendorf. El DNA se secó por aereación y se resuspendió en agua tridesionizada.

12.- Marcaje radioactivo de DNA.

El marcaje con α - ^{32}P -dCTP de plásmidos o fragmentos de DNA previamente purificados, se efectuó con el sistema de "Nick-translation" de la New England Nuclear. Este método se basa en la ruptura de algunos enlaces fosfodiester del DNA con DNasaI y la polimerización de fragmentos con DNA-polimerasa I. La segunda enzima remueve nucleótidos del extremo 5' y añade nucleótidos tomando el extremo 3' como "primer". La mezcla de reacción contiene dATP, dTTP, dGTP y α - ^{32}P -dCTP. La reacción se efectúa a 12°C por 90-120 min. La mezcla de reacción se cromatografió en una columna de 15 x 0.5 cms de Sephadex G-50 eluyendo con el amortiguador siguiente: NaCl 100 mM, Tris.HCl 10 mM, EDTA 1 mM, azida de sodio (NaN_3) 1 mM, SDS 0.01 % pH 8. La cromatografía sirve para separar los fragmentos de DNA del nucleótido libre radioactivo. Los tubos con DNA radioactivo se precipitaron con 1/50 de volúmen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol frío, Se incubaron a -20°C por 14-16 hrs. Por último se centrifugó a 8000 rpm en el rotor SS34 en una centrífuga Sorvall RC-5B. El DNA se secó por aereación.

13.- Hibridización DNA:DNA con colonias bacterianas en filtros de nitrocelulosa.

El método utilizado fué descrito por Grunstein, M., & Hogness, S.D., (85). Las colonias bacterianas se crecieron en filtros de nitrocelulosa Millipore HA (con poro de 0.45 μm) previamente incubados tres veces por 10 min en agua - en ebullición y esterilizados en autoclave. Los filtros se colocaron dentro de una caja de Petri con Luria. Sobre el filtro se sembraron por parchado las cepas bacterianas a probar y se incubaron a 37°C por 10-12 hrs. Las colonias se lisaron y el DNA se desnaturalizó por incubación de los filtros sobre una solución de NaOH 0.5 N embebida en un -- filtro Whatman por 15 min. El filtro se neutralizó con el amortiguador Tris.HCl 1 M pH 7.4 y con el amortiguador - - Tris.HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M pH 7.4, se secó por aereación y se limpió de restos celulares con una espátula. Finalmente el filtró se incubó 2 horas a 80°C con o sin vacío. Los filtros así tratados pueden guardarse por 2-4 meses.

Prehibridización: La prehibridización se realiza para evitar la hibridización inespecífica de los fragmentos radioactivos. Se lleva a cabo colocando los filtros en bolsas_ de plástico con 5 ml del siguiente amortiguador: formamida desionizada 50 %, SSC 1.25 X (SSC 1X = 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio, pH 7.0), SDS 0.001 %, EDTA 5 mM, Tris. HCl 50 mM pH 8.0, solución Denhard's (ficoll 0.02 %, poli vinil pirrolidona 0.02%, albúmina de suero de bovino 0.02%) y 500 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón previamente frag-- mentado por sonicación y desnaturalizado a 95°C por 10 min en baño maría. Los filtros se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Hibridización: Esta se llevó a cabo retirando primero el amortiguador de prehibridización y agregando 5 ml de amortiguador de prehibridización fresco con el fragmento de DNA marcado con α - ^{32}P -dCTP desnaturalizado. Se utilizan aproximadamente $1-2 \times 10^6$ cpm por filtro. El filtro se incubó por 48 horas a 40°C con agitación suave.

Lavado del filtro: El filtro se lavó primero con 500ml de SSC 2X, SDS 0.1 % por 15 min a temperatura ambiente. Un segundo lavado se efectuó con 500 ml de SSC 0.1 X, SDS 0.1% por 15 min a 50°C , por último con SSC 0.1 X varias veces. El filtro se secó por aereación y se sometió a autoradiografía en una película Kodak X-Omat S XS-5. La película con el filtro se incubó por 24-78 horas. Posteriormente la película se reveló y analizó.

RESULTADOS

1.- Características generales de las cepas

Las 34 cepas de *Shigella*, 20 de *Salmonella* y una *Escherichia coli* estudiadas en el presente trabajo se aislaron en -- Hospitales y Laboratorios clínicos del D.F. en los años de -- 1978-1979. En la población predominan *Sh. sonnei* (79.4 % de shigellas) y *S. typhimurium* (80.0 % de las salmonellas). Originalmente todas las cepas presentaban el fenotipo de resistencia a Tc, Sm, Su. Sin embargo, este fenotipo no fué estable -- en todas las cepas, ya que algunas cepas en cultivos posteriores perdieron espontáneamente la resistencia a Su. El 75.0 % de las cepas de *Sh. flexneri* y el 2.95 % de las *Sh. sonnei* presentan además resistencia a Sp. Este resultado indica que por lo menos hay dos enzimas diferentes para la resistencia a Sm; una de ellas confiere resistencia a Sm y otra a Sm y Sp y que el gene responsable de la resistencia a Sm y Sp es más frecuente en *Sh. flexneri*. En las salmonellas el nivel basal de resistencia a Sp es más elevado que en las shigellas, lo que dificultó su clasificación como Sp^F.

Las características generales estudiadas fueron: a) inducción y nivel de resistencia a Tc, b) producción de bactericina, c) transferencia de la resistencia a Tc y d) electroforesis en geles de agarosa del DNA extracromosomal.

a) Inducción y nivel de resistencia a tetraciclina.

El nivel basal de resistencia así como el grado de inducción de resistencia a Tc con concentraciones subletales al antibiótico, se calculó como se menciona en Metodología. La Tabla 4 muestra para cada cepa el nivel basal y el nivel inducido de resistencia a Tc, además de otras características y parámetros cuantificados en el trabajo. En la Tabla 5 las cepas de

Tabla 4.- Características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Shigella* y *Salmonella* relacionadas con plásmidos.

A) *Shigella*

Cepa	Especie	Resistencia a Tc ^a		Prod. Bacteri- cina	Transf. de Tc ^b	No. bandas de DNA ^b	Hibridización DNA:DNA en colonia			
		s/Ind.	c/Ind.				clase A	clase B	clase C	pBR322
MSH04	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	7	-	-	-	-
MSH09	<i>Sh. sonnei</i>	150	200	+	+	7	-	+	-	+
MSH27	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	6	-	-	-	+
MSH28	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	7	-	-	-	+
MSH29	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	7	-	-	-	+
MSH30	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH31	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH32	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH33	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH34	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH35	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	8	-	-	-	+
MSH36	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	4	-	-	-	+
MSH37	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	4	-	-	-	+
MSH38	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	5	-	-	-	+
MSH39	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	9	-	-	-	+
MSH40	<i>Sh. flexneri</i>	150	200	-	-	5	+	+	-	-
MSH41	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	5	-	-	-	+
MSH42	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	-	5	-	-	-	+
MSH43	<i>Sh. flexneri</i>	100	100	-	+	7	+	-	+	+
MSH44	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	6	-	-	-	+
MSH45	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	6	-	-	-	+
MSH46	<i>Sh. sonnei</i>	15	25	+	+	9	-	-	-	+
MSH47	<i>Sh. flexneri</i>	150	200	-	+	8	-	+	-	+
MSH48	<i>Sh. flexneri</i>	150	200	-	-	3	-	-	-	+
MSH49	<i>Sh. flexneri</i>	100	150	-	-	6	-	+	-	+
MSH50	<i>Sh. sonnei</i>	75	150	+	+	8	+	-	-	-
MSH53	<i>Sh. flexneri</i>	150	200	-	+	5	-	+	-	-
MSH54	<i>Sh. flexneri</i>	100	150	-	+	3	-	+	-	+
MSH55	<i>Sh. sonnei</i>	100	150	+	-	4	-	+	-	+
MSH56	<i>Sh. sonnei</i>	150	200	+	-	9	-	+	-	+
MSH57	<i>Sh. flexneri</i>	150	200	+	-	4	-	+	-	+
MSH58	<i>Sh. sonnei</i>	150	200	+	-	8	-	+	-	+
MSH59	<i>Sh. sonnei</i>	150	200	+	-	5	-	+	-	+
MSH60	<i>Sh. sonnei</i>	150	200	+	-	6	-	+	-	+

continúa

Tabla 4.- Continuación

B) *Salmonella*

Cepa	Especie	Resistencia a Tc ^a		Prod. bactericina	Transf. de Tc ^b	No. bandas de DNA ^b	Hibridización DNA:DNA en colonia			
		s/Ind.	c/Ind.				clase A	clase B	clase C	pBR322
MSS01	<i>S. typhimurium</i>	25	50	-	-	4	-	-	-	+
MSS03	<i>S. london E1</i>	75	100	-	+	1	-	-	+	+
MSS05	<i>S. enteritidis</i>	50	75	-	-	3	-	-	-	+
MSS06	<i>S. typhimurium</i>	100	100	+	-	11	-	-	+	+
MSS07	<i>S. typhimurium</i>	75	100	+	-	4	-	-	+	+
MSS08	<i>S. typhimurium</i>	275	275	-	+	4	-	+	-	-
MSS09	<i>S. typhimurium</i>	150	200	-	+	5	-	+	-	-
MSS10	<i>S. typhimurium</i>	150	200	-	+	7	-	+	-	+
MSS11	<i>S. typhimurium</i>	250	275	+	+	4	-	+	-	-
MSS12	<i>S. typhimurium</i>	150	200	+	+	3	-	+	-	-
MSS13	<i>S. typhimurium</i>	150	200	+	+	3	-	+	-	-
MSS14	<i>S. typhimurium</i>	150	200	+	+	3	-	+	-	-
MSS15	<i>S. typhimurium</i>	250	275	+	-	4	-	+	-	-
MSS16	<i>S. typhimurium</i>	275	275	+	-	3	-	+	-	-
MSS17	<i>S. typhimurium</i>	150	200	+	+	2	-	+	-	-
MSS18	<i>S. enteritidis</i>	275	275	-	+	1	-	+	-	-
MSS19	<i>S. typhimurium</i>	250	275	+	+	2	-	+	-	-
MSS20	<i>S. poona G1</i>	250	275	-	+	1	-	+	-	-
MSS21	<i>S. typhimurium</i>	225	250	-	+	5	-	+	-	-
MSS22	<i>S. typhimurium</i>	100	150	+	+	9	-	-	+	+
MSH51	<i>E. coli</i>	75	150	+	+	8	+	-	-	+

a) Valores de resistencia a Tc sin inducción y con inducción en µg/ml

b) Número total de bandas de DNA extracromosomal

Tabla 5.- Nivel de resistencia inducida a Tc de las diferentes especies de *Shigella* y *Salmonella*.

A) *Shigella*

Nivel de resistencia a Tc ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de shigellas(34)
	<i>Sh sonnei</i> (26)	<i>Sh flexneri</i> (8)	
15 a 50	73.07 (19)	0.0	55.88 (19)
50 a 150	7.69 (2)	37.5 (3)	14.71 (5)
150 a 275	19.25 (5)	62.5 (5)	29.41 (10)

B) *Salmonella*

Nivel de resistencia a Tc ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de salmonellas(20)
	<i>S.typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella</i> ^b	
15 a 50	6.25 (1)	0.0	5.0 (1)
50 a 150	18.75 (3)	50.0 (2)	25.0 (5)
150 a 275	75.0 (12)	50.0 (2)	70.0 (14)

- a) El primer número corresponde al porcentaje y el número entre paréntesis representa el número de cepas.
b) Se incluyen dos cepas de *S. enteritidis*, una cepa de *S. london* y una cepa de *S. poona*.

las especies de los géneros *Shigella* y *Salmonella* se agruparon en 3 rangos arbitrarios de nivel de resistencia a Tc. -- Los utilizados son los del nivel inducido de resistencia al antibiótico.

En las shigellas se observa un alto porcentaje de cepas que resisten bajas concentraciones de Tc (55.58 %), siendo todas ellas *Sh. sonnei*. En el rango de 150 a 275 $\mu\text{g/ml}$ de resistencia a Tc, se encuentran el 67.5 % de *Sh. flexneri* y únicamente el 19.23 % de las *Sh. sonnei*. La población con niveles de resistencia intermedios (50 a 150 $\mu\text{g/ml}$) es poco frecuente en las shigellas; en este grupo hay una cepa de *Sh. flexneri* que no presenta grado de inducción a Tc (MSH43). -- Comparando las especies en cada rango de nivel de resistencia a Tc, es notorio que la mayoría de las cepas de *Sh. sonnei* resisten bajas concentraciones de Tc, mientras que la mayoría de las cepas de *Sh. flexneri* resisten altas concentraciones del antibiótico.

De las salmonellas, el 70.0 % de las cepas resisten concentraciones mayores a 150 $\mu\text{g/ml}$ de Tc; de éstas el 60.0 % pertenece a la especie *S. typhimurium*. Los dos rangos inferiores de resistencia a Tc son poco frecuentes, encontrándose sólo el 5.0 % (1 cepa) en el rango de 15 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de resistencia a Tc y el 25.0 % (5 cepas) en el rango de 50 a 150 $\mu\text{g/ml}$ de resistencia a Tc (Tabla 4 y 5).

En el género de *Shigella* existe mayor frecuencia de cepas que resisten bajas concentraciones de Tc, mientras que en *Salmonella* el 75 % resisten concentraciones mayores a 150 $\mu\text{g/ml}$ de Tc, encontrándose algunas cepas (35 %) que resisten hasta 275 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico.

Tabla 6.- Producción de bactericinas en las diferentes especies de *Shigella* y *Salmonella*.

A) *Shigella*

Producción de bactericina	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de shigellas(34)
	<i>Sh. sonnei</i> (26)	<i>Sh. flexneri</i> (8)	
Positivo	100.0 (26)	12.5 (1)	79.41 (27)
Negativo	0.0	87.5 (7)	20.57 (7)

B) *Salmonella*

Producción de bactericina	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de salmonellas(20)
	<i>S. typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella sp</i> ^b	
Positivo	68.75 (11)	0.0	55.0 (11)
Negativo	31.25 (5)	100.0 (4)	45.0 (9)

a) El primer número corresponde al porcentaje y el número entre paréntesis representa el número de cepas.

b) Se incluyen dos cepas de *S. enteritidis*, una cepa de *S. london* y una cepa de *S. poona*.

b) Producción de bactericina.

En las shigellas hay un 79.41 % de cepas que producen alguna bactericina ensayada como se menciona en Metodología. El 100 % de las cepas de *Sh. sonnei* producen bactericina, - mientras que sólo el 12.5 % de *Sh. flexneri* lo hacen. Para las salmonellas el 55.0 % de las cepas producen bactericina, correspondiendo todas a la especie *S. typhimurium*. Se observa que mientras todas las *Sh. sonnei* y un alto porcentaje - de *S. typhimurium* sí producen bactericina, la mayoría de la *Sh. flexneri* y de las salmonellas que no pertenecen a la especie *S. typhimurium* no producen bactericina (Tabla 6). Cabe señalar que con el método utilizado no se pueden decir - qué tipo o tipos de bactericinas se producen en estas cepas.

Tabla 7.- Frecuencia de la transferencia de la resistencia a Tc por conjugación a *E. coli*.

A) *Shigella*

Transferencia de Tc ^r	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de shigellas (34)
	<i>Sh. sonnei</i> (26)	<i>Sh. flexneri</i> (8)	
Positivo	76.92 (20)	75.0 (6)	76.47 (26)
Negativo	23.08 (6)	25.0 (2)	23.58 (8)

B) *Salmonella*

Transferencia de Tc ^r	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de salmonellas (20)
	<i>S. typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella sp</i> ^b	
Positivo	68.75 (11)	75.0 (3)	70.0 (14)
Negativo	31.25 (5)	25.0 (1)	30.0 (6)

a) El primer número corresponde al porcentaje y el número entre paréntesis representa el número de cepas.

b) Se incluyen dos cepas de *S. enteritidis* una cepa de *S. london* y una cepa de *S. poona*.

c) Transferencia de la resistencia de Tetraciclina.

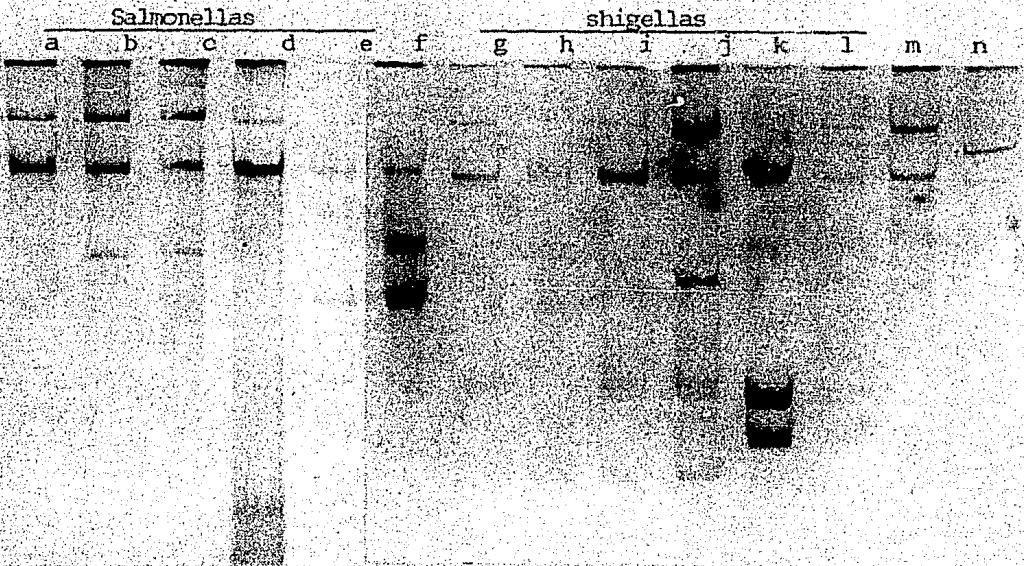
Para la transferencia de los genes de resistencia a Tc por conjugación en las shigellas y salmonellas, se utilizaron las cepas HB95 y HB96 respectivamente como células receptoras, por no presentar sistema de modificación-restricción. Los resultados se muestran en la Tabla 7, observándose que el 76.47 % y el 70.0 % de las cepas de *Shigella* y *Salmonella* respectivamente transfieren los genes de resistencia a Tc a la cepa de *E. coli*. Estos resultados no implican que los genes de resistencia a Tc se localicen en plásmidos conjugativos, ya que algunos plásmidos no conjugativos pueden ser movilizados por plásmidos conjugativos.

d) Visualización de DNA extracromosomal por electroforesis en geles de agarosa.

A las cepas de *Shigella* y *Salmonella* se les extrajo el DNA extracromosomal con el método de lisados con Tritón -- X-100 descrito en Metodología. Las moléculas de DNA extracromosomal se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %; los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas de DNA se visualizaron con luz ultravioleta. De la fotografía del gel se calculó la migración relativa (Rf) de las diferentes bandas de DNA, en relación a la banda -- cromosomal que se tomó como referencia. En los experimentos se usaron como controles de peso molecular los plásmidos R1-19 (65 Md), R100 (60 Md), pRSD1 (30 Md), pSC101 -- (5.8 Md) y pMS01 (1.9 Md). En la Fig. 5 se observan las -- bandas de DNA extracromosomal de algunas cepas. El número de DNA extracromosomal que migran más rápido que el DNA lineal cromosomal, no representa necesariamente al número total de plásmidos diferentes presentes en una cepa, ya que un mismo plásmido puede generar varias bandas con diferente velocidad migratoria; estas diferentes velocidades electroforéticas dependen de las diferentes conformaciones y estructuras moleculares que pueden presentar un plásmido -- (relajado, superenrollado y formas oligoméricas).

La Tabla 4 muestra el número total de bandas de DNA extracromosomal para cada cepa, el cual varía de 1 hasta 11 bandas. Estas bandas se clasificaron en tres grupos arbitrarios dependiendo de su movilidad electroforética: 1) -- aquellos plásmidos que migran más lento que el DNA lineal cromosomal (con Rf menor a 1); 2) bandas que migran más rápido que el DNA cromosomal pero más lento que la banda de mayor movilidad electroforética del plásmido pSC101 ($1 < Rf < 2.21$) y 3) bandas que migran más rápido que el plásmido -- pSC101 (Rf mayor a 2.21). Estos grupos se encuentran en --

Figura 5.- Gel de agarosa al 1 % de lisados de *Salmonella* y *Shigella*. a) MSS19, b) MSS16, c) MSS12, d) MSS09, e) MSS06, f) pSC101, g) MSH40 h) MSH43, i) MSH47, j) MSH49, k) MSH53, l) MSH54, m) R100 y n) pNK81



la Tabla 8, observándose un plásmido grande de aproximadamente 60 Md en casi todas las cepas (Fig. 5). En las shigellas se encontró un promedio de 2.29 bandas por cepa en el grupo 2; en las salmonellas el promedio de bandas para este grupo fué de 1.75. Para las bandas del grupo 3, el número promedio de las shigellas fué de 3.14 y para salmonellas de 1.05. Este último resultado sugiere que es más probable encontrar plásmidos pequeños en el género *Shigella* que en *Salmonella*. Además se observa que el 55.0 % de las cepas de *Salmonella* no presentan bandas de DNA con un valor de Rf mayor a 2.21.

Tabla 8.- Número de bandas de DNA extracromosomal de diferentes rangos de Rf presentes en las cepas de *Shigella* y *Salmonella*^a.

A) <i>Shigella</i>		G r u p o b		
Cepa	Especie	1	2	3
MSH04	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	2
MSH09	<i>Sh. sonnei</i>	1	3	3
MSH27	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	4
MSH28	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	2
MSH29	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	2
MSH30	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH31	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH32	<i>Sh. sonnei</i>	1	5	2
MSH33	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH34	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH35	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH36	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	2
MSH37	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	2
MSH38	<i>Sh. sonnei</i>	2	0	3
MSH39	<i>Sh. sonnei</i>	2	5	2
MSH40	<i>Sh. flexneri</i>	1	0	4
MSH41	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	3
MSH42	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	3
MSH43	<i>Sh. flexneri</i>	1	0	6
MSH44	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	4
MSH45	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	4
MSH46	<i>Sh. sonnei</i>	2	5	2
MSH47	<i>Sh. flexneri</i>	1	2	5
MSH48	<i>Sh. flexneri</i>	0	0	3
MSH49	<i>Sh. flexneri</i>	1	1	4
MSH50	<i>Sh. sonnei</i>	2	3	3
MSH51	<i>E. coli</i>	2	3	3
MSH53	<i>Sh. flexneri</i>	1	0	4
MSH54	<i>Sh. flexneri</i>	1	0	2
MSH55	<i>Sh. sonnei</i>	1	0	2
MSH56	<i>Sh. sonnei</i>	1	5	3
MSH57	<i>Sh. flexneri</i>	0	2	2
MSH58	<i>Sh. sonnei</i>	1	4	3
MSH59	<i>Sh. sonnei</i>	1	1	3
MSH60	<i>Sh. sonnei</i>	2	0	4
Promedio		1.147	2.29	3.147

B) <i>Salmonella</i>		G r u p o b		
Cepa	Especie	1	2	3
MSS01	<i>S. typhimurium</i>	0	3	1
MSS03	<i>S. london EI</i>	1	0	0
MSS05	<i>S. enteritidis</i>	1	2	0
MSS06	<i>S. typhimurium</i>	1	5	5
MSS07	<i>S. typhimurium</i>	1	1	2
MSS08	<i>S. typhimurium</i>	3	1	0
MSS09	<i>S. typhimurium</i>	1	3	1
MSS10	<i>S. typhimurium</i>	2	2	3
MSS11	<i>S. typhimurium</i>	1	1	2
MSS12	<i>S. typhimurium</i>	1	1	1
MSS13	<i>S. typhimurium</i>	1	2	0
MSS14	<i>S. typhimurium</i>	1	2	0
MSS15	<i>S. typhimurium</i>	1	3	0
MSS16	<i>S. typhimurium</i>	1	1	1
MSS17	<i>S. typhimurium</i>	1	1	0
MSS18	<i>S. enteritidis</i>	1	0	0
MSS19	<i>S. typhimurium</i>	1	1	0
MSS20	<i>S. poona G1</i>	1	0	0
MSS21	<i>S. typhimurium</i>	2	3	0
MSS22	<i>S. typhimurium</i>	1	3	5
Promedio		1.15	1.75	1.05

- a) A las cepas de *Shigella* y *Salmonella* se les extrajo el DNA por el método de lisados con Tritón X-100, el DNA se separó por electroforesis en agarosa al 1% a 100 V por 3-4 hrs.
- b) Grupo 1.- Bandas con Rf menor de 1.
 Grupo 2.- Bandas con $1 < Rf > 2.21$
 Grupo 3.- Bandas con Rf mayor a 2.21

En el género *Shigella* se encontró que algunas cepas tienen el mismo patrón electroforético de bandas de DNA extracromosomal: grupo 1) MSH30, MSH31, MSH33, MSH34, MSH35 -- (14.7 % de las shigellas); grupo 2) MSH04, MSH28 y MSH29 (8.82 %); grupo 3) MSH27, MSH44 y MSH45 (8.82 %); grupo 4) MSH39 y MSH46 (5.88 %); grupo 5) MSH41 y MSH42 (5.58 %). En las salmonellas sólo dos grupos tienen el mismo patrón de bandas: grupo 6) MSS13 y MSS14 (10% de las salmonellas), y grupo 7) MSS12 y MSS16 (10 %). Además una cepa de *Sh. sonnei* (MSH50) y la cepa de *E. coli* (MSH51) presentan el mismo patrón de DNA extracromosomal (Tabla 9). Todas las cepas restantes tienen patrones electroforéticos diferentes, aunque algunas cepas presentan bandas de DNA extracromosomal similares.

Se trató de cuantificar la frecuencia de las bandas de DNA extracromosomal con velocidades migratorias diferentes; para ellos se eligieron dos criterios, el valor de Rf de cada banda y el análisis visual de los patrones de bandas de cada cepa. Las bandas de DNA que comigran (Rf's similares) en las diferentes cepas pueden corresponder a plásmidos iguales ó bien a plásmidos diferentes genéticamente, pero con el mismo peso molecular. Debe considerarse también que las formas moleculares de un plásmido (oligómeros, forma superenrollada o relajada) generan bandas de DNA -- con Rf diferente. En la Tabla 10 se puede observar que en shigellas las bandas más frecuentes son: banda 2 (85.29 %), banda 9 (73.53 %) y banda 11 (64.7 %) y que la frecuencia en *Sh. sonnei* y *Sh. flexneri* de algunas bandas es diferente; por ejemplo, banda 2 (100 % y 37.5 %, *Sh. sonnei* y *Sh. flexneri* respectivamente), banda 9 (89.22 % y 25.0 %), -- bandas 7, 8 y 15 (50-54 % y 12.5 %), banda 13 (3.85 % y -- 75 %), banda 18 (38.46 % y 62.0 %). Para las salmonellas la banda 2 es muy frecuente (58.0 %) y muchas de las bandas

Tabla 9. Número de bandas y Rf de cada banda de DNA extracromosomal presente en las cepas de *Shigella* y *Salmonella*.

A) *Shigella*.

Cepa	Valores de Rf de las bandas de DNA extracromosomal ^a																			total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
MSH30		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05	2.344	2.5				3.25					(8)
MSH31		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05	2.344	2.5				3.25					(8)
MSH33		0.512			1.3		1.733	1.844	2.15	2.344	2.5				3.25					(8)
MSH34		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05	2.344	2.5				3.25					(8)
MSH35		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05	2.344	2.5				3.25					(8)
MSH32		0.553		1.065		1.585	1.696	1.844	2.181			2.772				3.319				(8)
MSH47			0.599	1.116					1.956	2.451	2.568	2.877	2.975						3.748	(8)
MSH50		0.505	0.723			1.667		1.894	2.04		2.525				3.232				3.686	(8)
MSH51		0.505	0.723			1.667		1.894	2.04		2.525				3.233				3.786	(8)
MSH58		0.50			1.3	1.5		1.867	2.067		2.533					3.333			3.70	(8)
MSH39		0.553	0.613	1.065		1.585	1.697	1.884	2.181			2.772				3.319				(9)
MSH46		0.553	0.623	1.065		1.584	1.697	1.882	2.181			2.772				3.316				(9)
MSH56		0.533		1.066	1.346		1.696	1.763	1.941		2.537				3.295				3.70	(9)
MSH04		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05		2.5				3.25					(7)
MSH28		0.512			1.3		1.737	1.844	2.15		2.52				3.25					(7)
MSH29		0.512			1.3		1.737	1.844	2.05		2.50				3.27					(7)
MSH09		0.512			1.3		1.737		2.16		2.50				3.25				3.625	(7)
MSH43	0.466									2.309				3.045	3.28	3.320	3.480		3.632	(7)
MSH27		0.515								2.15				3.116	3.289	3.466			3.699	(6)
MSH44		0.523								2.16				3.116	3.280	3.446			3.699	(6)
MSH45		0.523								2.15				3.116	3.289	3.446			3.699	(6)
MSH49		0.512					1.784				2.568	2.817	2.975						3.748	(6)
MSH60		0.586	0.664							2.414					3.400	3.487			3.662	(6)
MSH41		0.50							2.10	2.267	2.533				3.333					(5)
MSH42		0.50							2.10	2.267	2.533				3.333					(5)
MSH40		0.537									2.613		2.905	3.012		3.323				(5)
MSH53	0.468										2.495	2.884	2.895						3.69	(5)
MSH59		0.5							2.067		2.533				3.333				3.7	(5)
MSH38		0.589	0.649							2.414					3.40				3.668	(5)
MSH36		0.5								2.10	2.533				3.333					(4)
MSH37		0.510								2.10	2.533				3.333					(4)
MSH57							1.833	2.167					2.90		3.333					(4)
MSH55		0.515									2.554	2.885	2.97							(4)
MSH48														3.012		3.333			3.58	(3)
MSH54		0.512												2.899	2.994					(3)

Tabla 9.

- 51 -

B) *Salmonella*.Valores de Rf de las bandas de DNA extracromosomal^a

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	total	
MSS06		0.554		1.191		1.466	1.670	1.823	2.081	2.272	2.453	2.653	2.99		3.232						(11)
MSS22		0.572		1.181		1.454			2.082	2.26	2.533	2.709		3.098	3.302						(9)
MSS10		0.50	0.735				1.706		1.971	2.235	2.529									4.029	(7)
MSS09		0.583			1.25			1.815	2.142											4.274	(5)
MSS21		0.555	0.613		1.279	1.651		1.874													(5)
MSS11		0.513					1.728			2.235		2.667									(4)
MSS08	0.457	0.523	0.701				1.728														(4)
MSS07		0.567							1.988	2.246	2.511										(4)
MSS15		0.523			1.279	1.633		1.874													(4)
MSS01							1.695	1.942	2.131						2.757						(4)
MSS13		0.564			1.286	1.679															(3)
MSS14		0.562			1.278	1.633															(3)
MSS12		0.512						1.81		2.321											(3)
MSS16		0.524						1.815		2.321											(3)
MSS05			0.69	1.107		1.633															(3)
MSS17		0.513					1.728														(2)
MSS19		0.513						1.815													(2)
MSS03		0.565																			(1)
MSS20	0.482																				(1)
MSS18		0.513																			(1)

C) Valores de Rf de plásmidos control^a

Plásmido	peso mole-ular	Rf
R100	60 Md	0.547
R1-19	65 Md	0.569
pRSD-1	30 Md	0.746
pSC101	5.8 Md	1.726 y 2.21
pMS01	1.9 Md	3.04 y 3.3

a) Para obtener los valores de Rf se tomó a la banda de DNA lineal cromosomal como referencia

Tabla 10.- Frecuencia de las diferentes bandas de DNA extracromosomal en las especies de *Shigella* y *Salmonella*.

Rango de Rf de la banda	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total <i>Shigella</i>	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total <i>Salmonellas</i>
	<i>Sh. sonnei</i> (26)	<i>Sh. flexneri</i> (8)		<i>S. typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella</i> sp ^b	
1) 0.457-0.478	-----	25.0 (2)	5.88 (2)	6.25 (1)	25.0 (1)	10.0 (2)
2) 0.500-0.589	100.0 (26)	37.5 (3)	85.29 (29)	93.75 (15)	50.0 (2)	85.0 (17)
3) 0.599-0.735	19.23 (5)	12.5 (1)	17.64 (6)	18.75 (3)	25.0 (1)	20.0 (4)
4) 1.065-1.191	15.38 (4)	12.5 (1)	14.60 (5)	12.5 (2)	25.0 (1)	15.0 (3)
5) 1.250-1.346	42.30 (11)	-----	32.35 (11)	31.25 (5)	-----	25.0 (5)
6) 1.454-1.679	19.23 (5)	-----	14.70 (5)	37.50 (6)	25.0 (1)	35.0 (7)
7) 1.695-1.737	50.00 (13)	12.5 (1)	41.18 (14)	37.50 (6)	-----	30.0 (6)
8) 1.763-1.942	53.85 (14)	12.5 (1)	44.12 (15)	50.0 (8)	-----	40.0 (8)
9) 1.956-2.181	89.22 (23)	25.0 (2)	73.53 (25)	37.5 (6)	-----	30.0 (6)
10) 2.246-2.450	34.62 (9)	25.0 (2)	32.35 (11)	43.75 (7)	-----	35.0 (7)
11) 2.495-2.613	69.23 (18)	50.0 (4)	64.70 (22)	25.0 (4)	-----	20.0 (4)
12) 2.653-2.885	15.38 (4)	37.5 (3)	20.59 (7)	25.0 (4)	-----	20.0 (4)
13) 2.895-2.990	3.85 (1)	75.0 (6)	20.59 (7)	6.25 (1)	-----	5.0 (1)
14) 2.994-3.120	11.54 (3)	50.0 (4)	20.59 (7)	6.25 (1)	-----	5.0 (1)
15) 3.232-3.302	53.85 (14)	12.5 (1)	44.12 (15)	12.5 (2)	-----	10.0 (2)
16) 3.319-3.446	53.85 (14)	50.0 (4)	52.94 (18)	-----	-----	-----
17) 3.480-3.489	3.85 (1)	12.5 (1)	5.88 (2)	-----	-----	-----
18) 3.580-3.748	38.46 (10)	62.5 (5)	44.12 (15)	-----	-----	-----
19) 4.029-4.274	-----	-----	-----	12.5 (2)	-----	10.0 (2)

a) El primer número representa el porcentaje y el número entre parentesis corresponde al número de especies.

b) Los rangos se eligieron por valores cercanos de Rf y por análisis visual de los patrones de DNA extracromosomal de las cepas.

que se observan sólo aparecen en *S. typhimurium* y no en -- otras especies del género *Salmonella*.

2.- Obtención de rastreadores genéticos.

Para obtener los rastreadores de los diferentes determinantes genéticos de resistencia a Tc, se eligieron los - determinantes prototipo: clase A (Tn1721), clase B (Tn10) y clase C (pSC101). Estas secuencias de DNA, para los fines del trabajo, se deben encontrar en un plásmido pequeño y amplificable, lo que facilita su purificación y la obtención del fragmento rastreador. Un fragmento del determinante de resistencia a Tc del plásmido pSC101 forma parte del plásmido pBR322 (26); el transposón Tn10 se encuentra en el plásmido pNK81 (86). En estos plásmidos es fácil obtener el fragmento de DNA rastreador como se describe más adelante. El Tn1721 se encuentra en el plásmido pRSD1 de 30 Md no amplificable, por lo que se decidió obtener un derivado Tc sensible del pBR322 con el transposón Tn1721.

a) Construcción del plásmido pMS02.

La construcción del plásmido pMS02 se efectuó en 2 etapas: en la primera se deletó la región de Tc-resistencia - del plásmido pBR322 y en la segunda se insertó el transposón Tn1721. La delección del fragmento de resistencia a Tc del pBR322 se efectuó por una digestión del DNA del plásmido con dos enzimas de restricción EcoRI y AvaI que reconocen sitios únicos en el pBR322. Las enzimas producen dos fragmentos de DNA: a) un fragmento de 2.94 Kpb que contiene los genes de resistencia para ampicilina y el origen de replicación y b) un fragmento de 1.42 Kpb con el gene de - resistencia a Tc. Los fragmentos se separaron por electrofóresis en agarosa al 1 % y el fragmento de 2.94 Kpb se --

electroeluyó (ver Metodología). Este fragmento se incubó con la exonucleasa SI de *Aspergillus nysae*, la cual deja extremos de DNA rasos y se unieron con la enzima Ligasa de T4 como se menciona en Metodología. Posteriormente el DNA circular cerrado se introdujo por transformación a la cepa GM31. Este plásmido se denominó pMS01 (Fig. 6).

Para la segunda etapa de la construcción del pMS02, primero se purificó el plásmido pMS01 por el método de lisado rápido por ebullición descrito en Metodología. Con aproximadamente 1 µg de DNA del pMS01 se transformó la cepa J53/pRSD1. Una colonia con los dos plásmidos se creció por 24 horas en medio Luria líquido para que se efectuara la transposición. Del cultivo se purificó el DNA por el método de lisados rápidos por ebullición (con esta técnica muchas moléculas de plásmidos grandes se rompen y desnaturalizan) y se transformó a la cepa GM31 seleccionando para Tc y Ap. Se purificó una colonia en donde el Tn 1721 transpuso al plásmido pMS01; este nuevo plásmido se denominó -- pMS02.

b) Caracterización del plásmido pMS02.

Para caracterizar al plásmido pMS02 se obtuvo su patrón de restricción con las enzimas EcoRI, PstI, así como el patrón de digestiones dobles con EcoRI-PstI y PstI-SalI. El peso molecular de los fragmentos de DNA se calculó por su migración relativa en relación a fragmentos de DNA control de peso molecular conocido.

Enzimas	Kpb de las Bandas				
EcoRI	a) 5.5	b) 5.5	c) 2.9		
PstI	a) 9.4	b) 2.25			
PstI-EcoRI	a) 5.05	b) 4.6	c) 1.7	d) 1.29	e) 0.9
PstI-SalI	a) 5.4	b) 5.4	c) 2.05		

Con estos datos y el patrón de restricción reportado para el Tn1721 podemos decir que el transposón se encuentra aproximadamente a 1.4 Kpb del sitio PstI del pBR322, casi en donde se encontraba Tc originalmente en el pBR322, (Fig. 6).

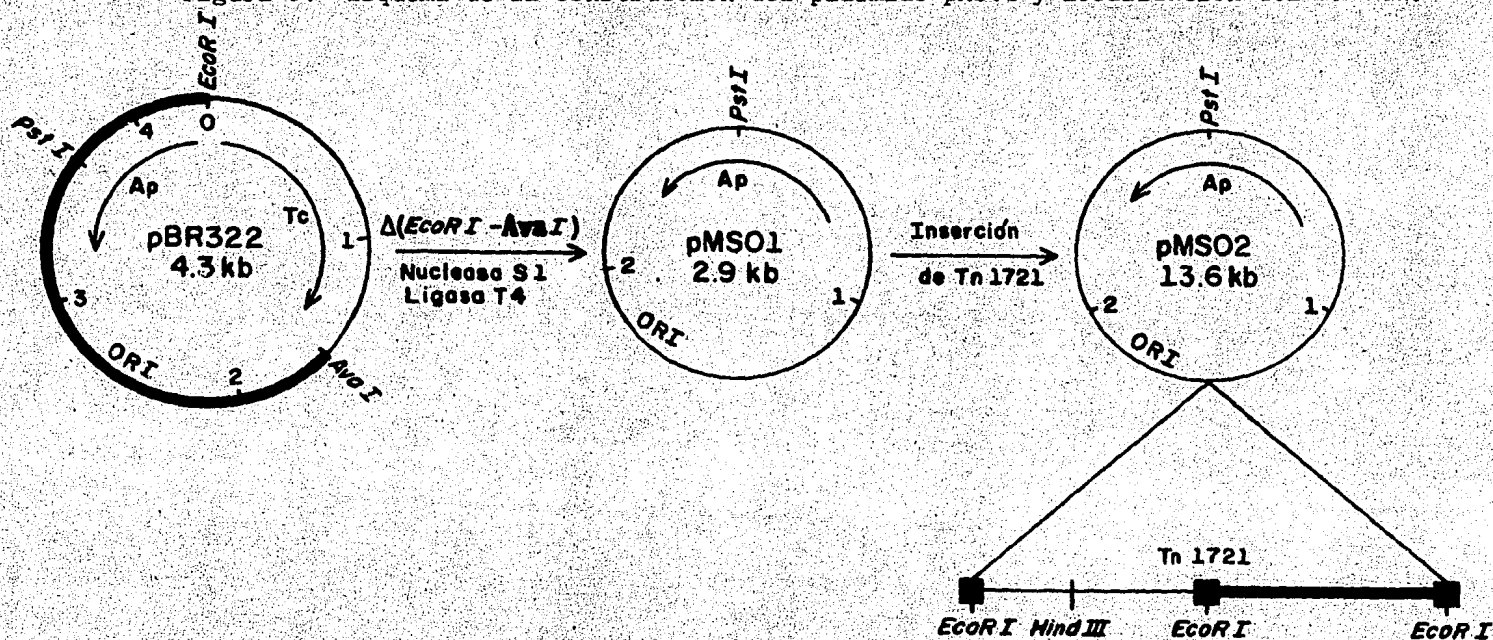
c) Obtención de los fragmentos de DNA utilizados como rastreadores.

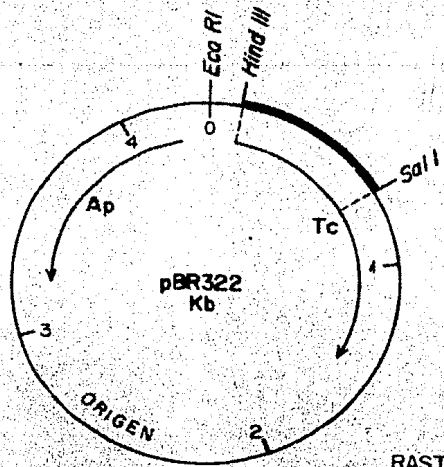
Los plásmidos pMS02, pNK81 y pBR322 se purificaron por un gradiente de cloruro de cesio. El fragmento rastreador de la clase A. se obtuvo a partir del plásmido pMS02 purificado; este plásmido se incubó con las enzimas EcoRI y -- HindIII, los fragmentos se separaron por electroforesis en agarosa al 1 % y se electroeluyó el fragmento de 5.48 Kpb. Para la clase B el plásmido pNK81 se digirió con la enzima HindIII y se purificó el fragmento de 4.8 Kpb. Para la clase C el pBR322 se incubó con las enzimas EcoRI y SalI y se purificó el fragmento de 650 pb (Fig. 7).

3.- Frecuencia de tres determinantes genéticos de resistencia a Tetraciclina en cepas de Shigella y Salmonella.

Los fragmentos de DNA utilizados como rastreadores se marcaron radioactivamente con α - ^{32}P -dCTP con el sistema -- "Nick translation" (DNasa, Polimerasa I) de New England Nuclear. El DNA marcado radioactivamente se hibridizó con el DNA de las colonias de *Shigella* y *Salmonella* en filtros de

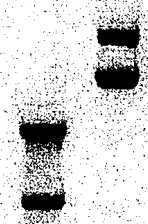
Figura 6.- Esquema de la construcción del plásmido pMS02 y localización del Tn1721.



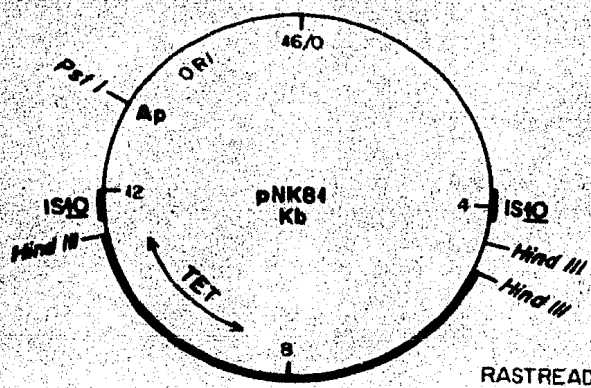


RASTREADOR 1 (class C)

Hind III, Sal I



Frg. Tc

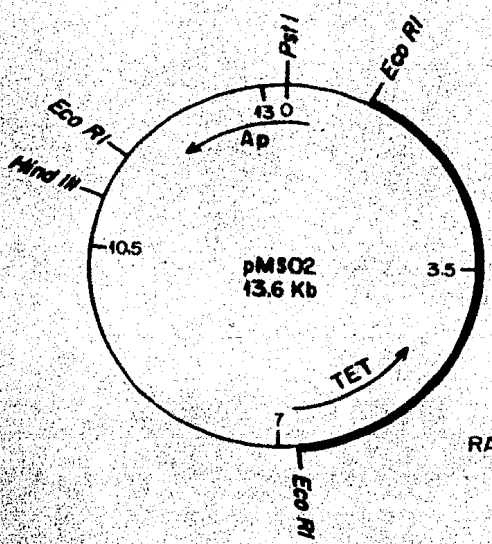


RASTREADOR 2 (class B; Tn 10)

Hind III



Frg. Tc



RASTREADOR 3 (class A; Tn 1721)

Hind III, Eco RI



Frg. Tc

Fig 7.- Rastreadores utilizados

nitrocelulosa como se describe en la Metodología (Fig. 8).

a) *Shigella*.

De las 34 shigellas analizadas, el 8.82 % hibridizan con el fragmento de Tn1721 (clase A), el 35.29 % con el fragmento del transposón Tn10 (clase B), el 2.94 % con el fragmento de pBR322 (clase C) y el 55.82 % no hibridizan con ninguno de los tres determinantes utilizados (Tabla 11).

Las shigellas que hibridizan con la clase A son dos cepas de *Sh. flexneri* y una cepa de *Sh. sonnei*; estas cepas presentan resistencia a concentraciones mayores de 100 µg/ml de Tc, el determinante se puede transferir de su hospedero original a la cepa de *E. coli* HB95 (Tablas 12 y 13).- El determinante genético de la clase B es el más frecuente de las tres clases estudiadas en *Shigella* y se encuentra en 6 cepas de *Sh. sonnei* y 6 *Sh. flexneri*, confiriendo a la bacteria resistencia a concentraciones mayores de 150µg/ml de Tc (Tabla 12). De las 12 cepas de *Shigella* con el determinante genético de la clase B, 6 cepas pueden transferir la resistencia a Tc a la cepa HB95 (Tabla 13), mientras que 5 cepas de *Sh. sonnei* y una de *Sh. flexneri* no transfieren la resistencia. El fragmento de la clase C sólo hibridiza con una cepa de *Sh. flexneri* (MSH43), en esta cepa el nivel de resistencia a Tc no se puede inducir, pero sí transferirse por conjugación.

En la población de shigellas hay dos cepas de *Sh. flexneri* que hibridizan con dos determinantes genéticos: la cepa MSH40 (hibridiza con la clase A y B) y la cepa MSH43 (clase A y C). En estas dos cepas no se puede decir, con los datos obtenidos, si uno o los dos determinantes genéticos de transfieren por conjugación a *E. coli* y como es - -

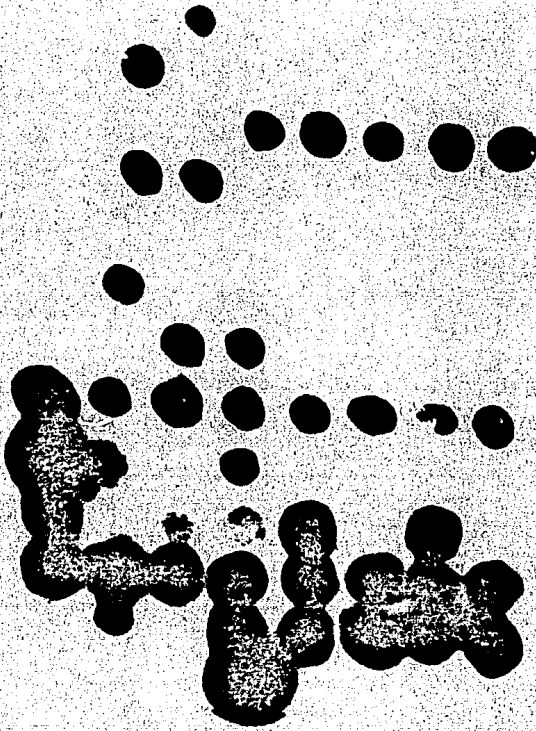


Figura 8.- Autoradiografía de la hibridización en colonias de cepas de *Shigella* y *Salmonella* con el fragmento Tc^r del Tn10.

Tabla 11.- Clases de determinantes de resistencia d Tc presentes en las diferentes especies de *Shigella* y *Salmonella*^a.

A) *Shigella*.

	Porcentaje de cepas ^b		Porcentaje del total de shigellas (34)
	<i>Sh. sonnei</i> (26)	<i>Sh. flexneri</i> (8)	
Clase A (Tn1721)	3.85 (1)	25.0 (2)	8.82 (3)
Clase B (Tn10)	23.08 (6)	75.0 (6)	35.29 (12)
Clase C (pSC101)	0.0	12.5 (1)	2.94 (1)
N.D.	73.07 (19)	12.5 (1)	58.82 (20)
<u>T o t a l</u>	100.0	125.0 ^c	105.88 ^c

B) *Salmonella*

	Porcentaje de cepas ^b		Porcentaje del total de salmonellas (20)
	<i>S. typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella</i> sp ^d	
Clase A (Tn1721)	0.0	0.0	0.0
Clase B (Tn10)	75.0 (12)	50.0 (2)	70.0 (14)
Clase C (pSC101)	18.75 (3)	25.0 (1)	20.0 (4)
N.D.	6.25 (1)	25.0 (1)	10.0 (2)

- a) Las clases se determinaron por hibridación DNA:DNA como se describe en la Metodología.
 b) El primer número corresponde al porcentaje y el número entre paréntesis al número de cepas.
 c) Un porcentaje mayor de 100 indica que algunas cepas (2) hibridaron con dos clases.
 d) Se incluyen dos cepas de *S. entititidis*, una cepa de *S. london* y una cepa de *S. poona*.

Tabla 12.- Relación entre el nivel de resistencia a Tc y los diferentes determinantes genéticos de resistencia a Tc.

A) *Shigella*.

Nivel de resistencia a Tc ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de cepas ^a				Porcentaje del total de shigellas (34)
	clase A	clase B	clase C	N.D.	
15 a 50	0.0	0.0	0.0	55.88(19)	55.88(19)
50 a 150	5.88(2)	8.82(3)	2.94(1)	0.0	17.64(6)
150 a 275	2.94(1)	29.47(9)	0.0	2.94(1)	32.35(11)
<u>Total</u>	8.82(3)	35.29(12)	2.94(1)	58.82(20)	105.88 ^b

B)

Nivel de resistencia a Tc ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de cepas ^a				Porcentaje del total de salmonellas (20)
	clase A	clase B	clase C	N.D.	
15 a 50	0.0	0.0	0.0	5.0(1)	5.0(1)
50 a 150	0.0	0.0	20.0(4)	5.0(1)	25.0(5)
150 a 275	0.0	70.0(14)	0.0	0.0	70.0(14)
<u>Total</u>	0.0	70.0(14)	20.0(4)	10.0(2)	100.0

a) El primer número corresponde al porcentaje y el número entre paréntesis al número de cepas.

b) Un porcentaje mayor de 100 indica que algunas cepas hibridizaron con dos clases.

Tabla 13.- Relación entre las clase de determinantes de resistencia a Tc y transferencia de la resistencia a Tc.

A) *Shigella*

Transferencia de Tc ^r	Porcentaje de cepas ^a			
	clase A	clase B	clase C	N.D.
Positivo	8.82(3)	17.65(6)	2.94(1)	52.94 (18)
Negativo	0.0	17.65(6)	0.0	5.88 (2)

B) *Salmonella*

Transferencia de Tc ^r	Porcentaje de cepas ^a			
	clase A	clase B	clase C	N.D.
Positivo	0.0	60.0(12)	10.0(2)	0.0
Negativo	0.0	10.0(2)	10.0(2)	10.0(2)

a) El primer número representa el porcentaje y el número entre paréntesis al número de cepas.

afectado el nivel de resistencia a Tc con los dos determinantes.

El 55.82 % de las shigellas que no hibridizan con ninguna de las tres clases estudiadas está constituida por 19 *Sh. sonnei* y 1 cepa de *Sh. flexneri*. Las cepas de *Sh. sonnei* presentan niveles bajos de resistencia de Tc y 18 de estas cepas pueden transferir su resistencia a *E. coli*. La cepa de *Sh. flexneri* presenta resistencia a 200 µg/ml de Tc y el determinante de resistencia no es transferible a *E. coli*.

b) *Salmonella*.

De las 20 cepas de *Salmonella* estudiadas en el trabajo, ninguna hibridiza con el fragmento de DNA de la clase A. -

El 70.0 % de las salmonellas hibridizan con el fragmento de la clase B. Esta población está constituida por 12 cepas de *S. typhimurium*, una de *S. entirritidis* y una de *S. poona*; todas confieren resistencia a concentraciones mayores de 200 µg/ml de Tc y el determinante es transferible por conjugación a la cepa de *E. coli* HB96 (Tabla 11, 12 y 13). El fragmento de DNA rastreador de la clase C hibridiza con tres cepas de *S. typhimurium* y una *S. london* (20 %), confiriendo resistencia a concentraciones menores de 150 µg/ml de Tc; de esta población sólo dos cepas de *S. typhimurium* no transfieren la resistencia a Tc. Una cepa de *S. typhimurium* y una cepa de *S. entirritidis* no hibridizan con ninguna de las tres clases además de presentar bajos niveles de resistencia a Tc y no ser transferibles por conjugación a la cepa HB96.

La única cepa clínica de *E. coli* analizada, hibridiza con la clase A confiriendo resistencia a 150 µg/ml de Tc y el plásmido con este determinante es transferible por conjugación.

Comparativamente, en shigellas y salmonellas la clase B (Tn10) es el más frecuente de las tres analizadas, aunque en *Sh. sonnei* predomina un determinante genético no identificado que confiere un bajo nivel de resistencia a Tc y que es transferible a *E. coli*. El determinante de la clase A (Tn1721) no se encontró en *Salmonella* y *Sh. sonnei* y el determinante de la clase C es poco frecuente tanto en *Shigella* como en *Salmonella*.

En general, el determinante de la clase B confiere niveles altos de resistencia a Tc tanto en shigellas como en salmonellas, el A se comporta de manera similar a lo reportado en *E. coli*; la clase C en *E. coli* confiere bajos nive

Tabla 14.- Hibridización del plásmido pBR322 con las diferentes especies de *Shigella* y *Salmonella*.

A) *Shigella*

Hibridización con el pBR322	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de shigellas (34)
	<i>Sh. sonnei</i> (26)	<i>Sh. flexneri</i> (8)	
Positivo	92.31 (24)	62.5 (5)	85.29 (29)
Negativo	7.69 (2)	37.5 (3)	14.71 (5)

B) *Salmonella*

Hibridización con el pBR322	Porcentaje de cepas ^a		Porcentaje del total de salmonellas (20)
	<i>S. typhimurium</i> (16)	<i>Salmonella</i> ^b	
Positivo	31.25 (5)	50.0 (2)	35.0 (7)
Negativo	68.75 (11)	50.0 (2)	65.0 (13)

a) El primer número representa el porcentaje y el número entre paréntesis al número de cepas.

b) Se incluyen dos cepas de *S. enteritidis*, una cepa de *S. london* y una cepa de *S. london*.

les de resistencia a Tc, en las cepas de *Salmonella* con este determinante se encontró que los niveles de resistencia a Tc son mucho mayores a los reportados en *E. coli*.

Por último, en la Tabla 13 se observa que la mayoría - de las *Sh. sonnei* y *Sh. flexneri* (92.3 % y 62.5 %) respectivamente hibridizan con el pBR322, mientras que en *Salmonella* sólo el 35 % de las cepas hibridizan.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizaron algunas características de una población de enterobacterias aisladas de Hospitales y Laboratorios clínicos de México, D. F. en los años 1978-1979. La población se seleccionó por presentar resistencia a Tc y un fenotipo relativamente frecuente (Tc^R , Sm^R y Su^R) en pacientes con enfermedades gastrointestinales. Esta población permitió estudiar comparativamente la distribución de determinantes genéticos de resistencia a Tc, así como otras características mediadas por plásmidos en una población heterogénea en cuanto a género y especie, pero homogénea en cuanto a tipos de resistencia a antibióticos, lugar geográfico y período de colecta.

Hay que señalar que la población bacteriana estudiada se eligió para tratar de conocer el comportamiento de los plásmidos en diferentes especies y no se trató de realizar un estudio de dinámica de poblaciones con respecto al tiempo y lugar geográfico porque como se mencionó en la Introducción existen diferencias tanto en fenotipo de resistencia a antibióticos como en la dominancia de algunas especies en diferentes poblaciones. Por lo tanto los datos obtenidos en el presente trabajo no se pueden extrapolar a otras regiones geográficas, ni a la misma área geográfica en otra época. Sin embargo se puede pensar, que si en esta población hay diferencias fenotípicas y genotípicas, en otras poblaciones de shigellas y salmonellas pueden existir diferencias intragénero e intergénero, aunque no con la misma frecuencia encontrada en el trabajo.

Algunas cepas bacterianas después de varios subcultivos perdieron la resistencia a Su (MSH04, MSH09, MSH48, MSS01 y MSS03) posiblemente por la inestabilidad del plásmido δ de -

las secuencias de DNA que confiere resistencia a Su en estas cepas y que sólo se mantienen bajo determinadas condiciones medio ambientales; sin embargo, se analizaron por seguir presentando resistencia a Tc y porque originalmente presentaban resistencia a Tc, Sm y Su.

a) Variabilidad fenotípica mediada por plásmidos.

Algunas cepas de *Shigella* presentan además de la resistencia a Sm, resistencia a Sp; este fenotipo ($Sm^r Sp^r$) es más frecuente en *Sh. flexneri* que en *Sh. sonnei* y posiblemente está dado por una sola enzima capaz de inactivar a -- ambos antibióticos. En las salmonellas no se pudo identificar las cepas resistentes a Sp porque presentaban resistencia a concentraciones superiores de Sp comparadas con las shigellas y *E. coli* sensibles a Sp.

En el género *Shigella* se distingue claramente que las dos especies presentan otras características fenotípicas diferentes; en *Sh. sonnei* hay mayor frecuencia de cepas que resisten a bajas concentraciones de Tc y todas producen bactericina, mientras que en *Sh. flexneri* hay una baja frecuencia de cepas productoras de bactericina y la mayoría de las cepas resisten altas concentraciones de Tc. El género *Salmonella* tiene una mayor frecuencia de cepas resistentes a altas concentraciones y sólo algunas cepas de *S. typhimurium* son capaces de producir bactericina. A varias cepas se les probó inmunidad a Col EI, obteniendo resultados negativos; aunque se puede pensar que las cepas producen Col EI y otra bactericina que enmascara a la colicina EI en el ensayo utilizado para detectarlo. Esta suposición se basa en: a) muchas de las cepas de *Shigella* hibridizaron con el pBR322, el cual contiene el origen de replicación de Col EI, aunque también puede haber hibridizado con el gene de β -lactamasa

que en *E. coli* se ha encontrado en el cromosoma, pero esta suposición es poco probable porque hay algunas cepas que no hibridizan con el pBR322 y b) algunos investigadores han reportado que un alto porcentaje de *Sh. sonnei* contienen un plásmido de 3.2 Md con el gene de producción e inmunidad para Col EI (28); además de que es frecuente que las shigellas produzcan otras bactericinas como la colicina Ib (88,89); sin embargo, en la *Sh. flexneri* no se encontró producción de bactericina (27). Este último dato concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

La bactericina encontrada en el 68.75 % de las cepas de *S. typhimurium* podría ser similar al compuesto de 500 daltons con acción bactericida denominado typhimuricina encontrada en un plásmido de 60 Md de la especie *S. typhimurium* LT2 (87).

El encontrar una mayor frecuencia de cepas productoras de bactericina en las shigellas podría explicarse por qué estas presentan un menor número de hospederos que otras especies y la bactericina les proporciona una ventaja selectiva sobre aquellas que no la producen, permitiéndole así tener una mayor competencia por nichos ecológicos; sin embargo, no explicaría la diferencia entre *Sh. sonnei* y *Sh. flexneri*. Otra explicación posible, es la inestabilidad del plásmido productor de bactericina en las especies de *Sh. flexneri* y *Salmonella*. Este fenómeno ha sido reportado para el plásmido productor de typhimuricina, el cual no se mantiene estable autónomamente en la población de *E. coli*, pero se ha encontrado que el gene se puede integrar al cromosoma con muy baja frecuencia (87).

La producción de bactericina en las bacterias analizadas, independientemente del tipo que sea, les provee una ma

yor ventaja selectiva para poder colonizar un nicho ecológico. Un dato que apoya esto, es que de la población analizada las especies predominantes son *Sh. sonnei* y *S. typhimurium*, las cuales presentan producción de bactericina. Para la especie *Sh. flexneri* que es la tercera más frecuente en la población, posiblemente exista algún otro mecanismo de competencia por nichos ecológicos; uno de ellos podría ser la resistencia a antibióticos. Dos datos apoyan esta hipótesis: a) en las *Sh. flexneri* predomina la resistencia a concentraciones muy altas de Tc, mientras que *Sh. sonnei* un alto porcentaje resiste bajas concentraciones de Tc y b) muchas de las cepas de *Sh. flexneri* que no producen bactericina presentan resistencia a Sp (62.5 % de las *Sh. flexneri*, 5 cepas). Otro mecanismo puede ser la presencia de los factores de virulencia, colonización y toxinas necesarias para la patogenicidad.

La transferencia de los genes de resistencia a Tc por conjugación a *E. coli* se efectúa en la mayoría de las cepas, no encontrándose diferencia estadística entre los géneros y especies de la población analizada.

b) Variabilidad fenotípica mediada por plásmidos.

En las shigellas se encontraron 24 patrones electroforéticos diferentes de DNA extracromosomal en las 34 cepas analizadas, de estas sólo 5 patrones lo presentan dos o más cepas correspondiendo a la especie *Sh. sonnei*. En las salmonellas hay 18 patrones diferentes y sólo dos se encuentran repetidos en las cepas de *S. typhimurium*. La heterogeneidad en los patrones electroforéticos puede ser por una gran diversidad de cepas ó bien porque un número bajo de cepas se diversifican rápidamente por la pérdida y/o adquisición de plásmidos; con los datos obtenidos no podemos descartar una de las dos suposiciones. Las cepas que tienen un mismo pa-

trón electroforético presentan las mismas características genéticas y fenotípicas analizadas, pero corresponden a diferente fecha de colecta; ésto puede deberse a que: 1) Las cepas con el mismo patrón plasmídico son la misma cepa, la cual se ha dispersado en la población humana; 2) existe una poza común de plásmidos para diferentes géneros que se pueden transferir de una bacteria a otra y se mantienen estables únicamente en ciertos géneros y especies y 3) las cepas con el mismo patrón electroforético, contienen plásmidos genéticamente diferentes pero con pesos moleculares similares.

Analizando los patrones plasmídicos en los géneros *Shigella* y *Salmonella* se puede observar que las bandas con una mayor movilidad electroforética al valor de Rf de 2.21 (Rf de la banda de DNA superenrollado del plásmido pSC101) se encuentran con mayor frecuencia en la *Shigella* que en *Salmonella*, posiblemente porque estos plásmidos son más estables en *Shigella* o presentan información genética que le confiere a la bacteria mayor ventaja selectiva. Los plásmidos pequeños o bandas de DNA con un Rf mayor posiblemente sean plásmidos similares a Col EI 6 por lo menos con un origen de replicación similar.

Las diferentes frecuencias de las bandas de DNA extracromosomal en las especies analizadas, se puede explicar por una diferente estabilidad de los diversos plásmidos en estas enterobacterias. Este efecto puede deberse a que los sistemas de replicación, recombinación, expresión de incompatibilidad no son iguales en los diferentes géneros y especies.

La existencia de varios determinantes genéticos con diferentes secuencias de DNA que confieren resistencia a Tc -

encontrados en muchas especies bacterianas permite utilizarlos como un sistema experimental para analizar la dispersión de genes y plásmidos en diferentes bacterias y para saber si existe una selección bacteriana para los plásmidos.

De los tres determinantes analizados el más frecuente es el de la clase B (Tn10) (48.14 %), el cual se encontró tanto en *Salmonella* como en *Shigella*; el de la clase A (Tn1721) (5.55 %) se encontró sólo en *Shigella*, mientras que el de la clase C (pSC101) (9.25 %) se encontró principalmente en salmonellas.

La clase A hibridiza con 4 cepas clínicas, una *E. coli* (MSH51), una *Sh. sonnei* (MSH50) y dos *Sh. flexneri* (MSH40 y MSH43). Las dos primeras cepas presentan el mismo nivel de resistencia a los reportados para plásmidos prototipo en *E. coli* indicando que no hay alteración en el nivel de resistencia en la cepa de *Sh. sonnei*, las dos cepas pueden transferir su resistencia a *E. coli*, similar a los plásmidos prototipo (pRSD1, RP4, ó RP1). Las cepas de *Sh. flexneri* hibridizan además con otro determinante, la cepa MSH40 con la clase B (Tn10) la cepa MSH43 con la clase C (pSC101). En la cepa MSH40 el nivel de resistencia es inducible a 200 µg/ml de Tc; sin embargo, es difícil analizar este dato, ya que el nivel de resistencia puede deberse a: a) la expresión de sólo uno de los dos determinantes, b) la expresión del determinante A en presencia de un Tn10 multicopia y c) la expresión de los dos determinantes. En este caso existiría una limitante fisiológica que impediría que el nivel de resistencia correspondiera a la suma de los niveles de los dos determinantes. Esta limitante podría deberse a que la proteína TET (34-36 Kd) responsable de la salida de Tc por transporte activo, sature la membrana interna plasmática, presentando así una expulsión máxima de Tc. Además es inte

resante que las únicas cepas que presentan dos determinantes sean de *Sh. flexneri* y que en ambos casos el nivel de resistencia no corresponda a la sumatoria de los niveles de resistencia por separado. Con los datos presentados no se puede decir si el determinante de la clase A se encuentra en un transposón o como una secuencia no transponible, como en los plásmidos RP1 ó RP4. En el caso de predominar este determinante como transposón podría esperarse una mayor dispersión; sin embargo, los plásmidos RP1 ó RP4 pueden transferirse a un gran número de géneros y especies diferentes lo que también podría contribuir a la dispersión de este determinante. El hecho de encontrarse este determinante en *Shigella* y no en *Salmonella* podría explicarse porque el Tn1721 o los plásmidos con este determinante son más estables en las shigellas.

La clase B (Tn10) se encuentra con mayor frecuencia en las cepas de *Sh. flexneri* y *S. typhimurium*, mientras que en *Sh. sonnei* es poco frecuente. El nivel de resistencia de cepas de *Shigella* con este determinante es idéntico al reportado en *E. coli* con el Tn10 en monocopia, ya sea integrado al cromosoma o en un plásmido. En algunas cepas (5 cepas de *Sh. sonnei* y una de *Sh. flexneri*) el determinante genético no se puede transferir a la cepa de *E. coli*. Esto puede deberse a que el Tn10 se localiza en el cromosoma o en un plásmido no conjugativo. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el determinante de encuentre como un transposón similar al encontrado en gram-positivas, el cual es conjugativo en ausencia de plásmidos. Para la cepa MSH56, que no transfiere la resistencia a Tc a *E. coli*, por eliminación selectiva de plásmidos o curación con rifampicina, se encontró el determinante de resistencia a Tc se localiza en un plásmido grande de aproximadamente 60 Md. Las cepas de *Salmonella* MSS18 y MSS20 con este determinante presentan también un plásmido de 60 Md el cual es transferible por conjugación.

En las cepas de *S. typhimurium* con el determinante de la clase B (Tn10) el nivel de resistencia es mayor a 200 µg/ml de Tc (niveles inducidos); el 50 % de las cepas con este determinante presentan niveles de resistencia a 275 µg/ml de Tc. Este nivel de resistencia es mayor a los encontrados en *E. coli* con los plásmidos prototipo. Este comportamiento en las diferentes especies se puede explicar por diferencias en la composición de la membrana plasmática o bien por diferencias en la expresión genética dependientes del hospedero; este fenómeno se ha observado en los diferentes determinantes de *Streptococcus* en donde *tetL* incrementa en nivel de resistencia de 50-60 veces en *E. coli* y *Streptococcus sp*, mientras que *tetM* en *Streptococcus sp* incrementa en nivel de resistencia de 250-500 veces y en *E. coli* solamente 10 veces. Además en *Streptococcus sp*, *tetL*, *tetM* y *tetN* se expresan constitutivamente, mientras que en *E. coli* son inducibles (76).

Todas las cepas de *Shigella* y *Salmonella* con el determinante del Tn10 presentan altos niveles de resistencia a Tc, lo cual nos indica que el fenómeno o efecto multicopia no se presenta en estas cepas; este es otro dato que permite portular que el determinante de la clase B se encuentra en un plásmido grande monocopia, aunque no se puede descartar que el transposón se encuentre integrado al cromosoma o bien que el efecto multicopia del Tn10 sólo se exprese en *E. coli*.

La clase C hibridiza sólo con una cepa de *Sh. flexneri* (MSH43) y con tres cepas de *S. typhimurium* y una cepa de *S. London*. Cabe mencionar que este determinante sólo se ha reportado en especies del género *Salmonella* (54); sin embargo, -- aquí se describe una cepa de *Shigella* con este determinante genético.

Las cepas de *Salmonella* pertenecientes a la clase C presentan resistencia a 75-150 $\mu\text{g/ml}$ de Tc, pero los plásmidos prototipo en cepas de *E. coli* sólo confieren resistencia a 25 $\mu\text{g/ml}$ de Tc. Este aumento en el nivel de resistencia posiblemente sea porque el gene de resistencia se encuentra en un plásmido multicopia, porque se transcribe más eficientemente o bien porque la función de la proteína codificada por dicho gene sea incrementada por algunos componentes de la membrana plasmática que no están presentes en *E. coli*.

El resultado más importante de este trabajo es que de las cepas analizadas, 20 *Shigellas* y 2 *Salmonellas* no pertenecen a ninguna de las 3 clases probadas. Diez y nueve de las 20 *Shigellas* pertenecen a la especie *Sh. sonnei*, presentando bajos niveles de resistencia a Tc y la mayoría de las cepas transfieren la resistencia a Tc por conjugación. Además, una cepa de *Sh. flexneri* (MSH48) presenta altos niveles de resistencia a Tc no transferible a *E. coli*. La población de *Sh. sonnei* es muy homogénea fenotípicamente y el hecho de presentar un nivel bajo de resistencia a Tc permite suponer que el determinante presente en estas cepas: a) es el determinante de la clase D que se expresa diferente en las shigellas, ya que este determinante confiere niveles altos de resistencia en *E. coli*. Podría también ser similar al Tn10 y presentar efecto multicopia; en este caso tendría que encontrarse en multicopia en todas las shigellas; b) es un nuevo determinante genético no descrito; c) es uno de los determinantes descritos en gram-positivas. En este caso podría tratarse de un transposón o bien de un determinante presente en un plásmido que puede cruzar la barrera de intercambio genético existente entre gram-negativas y gram-positivas. La cepa MSH43 por el nivel de resistencia es más posible que pertenezca a la clase D.

Las cepas de *Salmonella* que no hibridizan con las 3 clases analizadas, presentan niveles de resistencia a Tc muy bajos y este determinante no es transferible a *E. coli*.

Es interesante que en las cepas analizadas, un alto porcentaje contienen el determinante de mayor resistencia a Tc (clase B), posiblemente sea por tener una mayor ventaja selectiva o porque el uso de altas concentraciones del antibiótico causó una selección de este determinante. Esta última suposición puede descartarse por la existencia en *Sh. sonnei* de un alto número de cepas con resistencia a baja concentraciones de Tc. Estos datos aunados a las frecuencias de los determinantes de resistencia a Tc de las clases A y C, nos sugiere que los determinantes de resistencia a Tc se pueden mantener sólo en diferentes especies; la clase A es más frecuente en *Shigella*, la clase C parece ser exclusiva de *Salmonella* y la clase B se puede encontrar en una gran número de cepas de ambos géneros. Finalmente, la clase no identificada y que podría corresponder a una nueva clase predominante en *Sh. sonnei*.

Del análisis de los resultados de este trabajo surgen varias preguntas: ¿ por que el determinante de la clase B (Tn10) se puede dispersar más en la población bacteriana y además encontrarse en diferentes géneros y especies ?, ¿ como influye la frecuencia de transposición en la dispersión de los determinantes ?, ¿ existe algún sistema codificado por la bacteria que restrinja la entrada o estabilidad de una secuencia de DNA ?, ¿ existe alguna relación entre el nivel de resistencia a Tc codificado por el determinante y la frecuencia de éste en una población bacteriana ?. Hay varios datos que apoyan la existencia de sistemas que impiden la entrada y/o permanencia de un plásmido: a) el plásmido pAM α 1 (*tetL*) encontrado en *Streptococcus faecalis* no

se ha podido transformar a la especie *Streptococcus sanguis*, mientras que otros plásmidos con el mismo determinante (pMV-158 y pMV163) si se pueden transformar y b) los plásmidos - tipo Col E1 no se pueden replicar en una cepa de *E. coli* mutante en la polimerasa I necesaria para la replicación del plásmido pero no para la replicación del cromosoma bacteriano.

Por último habrá que mencionar que la heterogeneidad en determinantes genéticos de resistencia a Tc puede corresponder a una evolución convergente y que de alguna forma esta convergencia puede estar favorecida por que las diferentes clases de genes de resistencia a Tc no se pueden establecer con la misma facilidad en los diferentes géneros y/o especies bacterianas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Coello, C.C.C. (1983). Caracterización genética y molecular de elementos genéticos extracromosomales portados por cepas de *Salmonella* sp de interes epidemiológico. Tesis profesional para obtener el título de Biólogo.
- 2.- Calderón, E. (1977). Conceptos clínicos de infectología. 4a Ed., editorial Méndez Cervantes, México.
- 3.- Gallo, S. & Guevara, L. (1975). La diarrea. Ed Pfizer.
- 4.- Gedebo, M. & Tassew, A. (1982). *Shigella* species from Addis Ababa: frequency of isolation and *in vitro* drug sensitivity. J. Hyg. Camb. 88:47-55.
- 5.- Byers, P. A., et al (1976). Antimicrobial susceptibilities of *Shigellae* isolated in Houston Texas in 1974. Antimicrobial. Agents Chemother. 9:288-291.
- 6.- Neu, H.C., et al (1975). Antimicrobial resistance of *Shigella* isolated in New York City in 1973. Antimicrobial. Agents Chemother. 7: 833-839.
- 7.- Falbo, V., Caprioli, A., Mondello, F., Cacace, M.L., Luzi, S. & Greco, D. (1982). Antimicrobial resistance among salmonellas isolates from hospitales in Rome. J. Hyg. Camb. 88: 275-284.
- 8.- Cobet, B.A., Gershman, M., Moechtar, M.A., Sumarmo & Sunoto. (1981). Salmonellosis in Indonesia: phage-type of *Salmonella oranienburg* obtained from hospitalized patients in Jakarta, Indonesia. J. Hyg. Camb. 86:227-236.
- 9.- Ishiguno, N., Goto, J. & Sata, G. (1980). Genetical relationship between R plasmids derived from *Salmonella* & *E. coli* obtained from a pig farm, and its epidemiological significance. J. Hyg. Camb. 84: 565-579.

- 10.- Anderson, D.M. (1980). Plasmid studies of *Salmonella typhi* phage-type 179 resistant to ampicillin, tetracycline, sulfonamides and trimetoprim. J. Hyg. Camb. 85: 293-301.
- 11.- Hinton, M. & Linton, A.H. (1982). The survival of multi-antigen bacterial drug-resistance *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in stored static slurry from a veal calf unit. J. Hyg. Camb. 88: 557-565.
- 12.- Frost, J.A., Rowe, B., World, L.R. & Threlfall, E.J. (1982). Characterization of resistance plasmids and carried phages in an epidemic clone of multi-resistant *Salmonella typhimurium* in India. J. Hyg. Camb. 88:193-204.
- 13.- Olarte, J. (1981). R Factors present in epidemic strain of *Shigella* and *Salmonella* species found in México. en Molecular Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids, editado por Levy, B.S., Clowes, C.R. & Koenig, L.E., Plenum Press. New York. Pag 11-21.
- 14.- Olarte, J. & Galindo, E., (1973). Naturaleza e importancia de la resistencia a múltiples antibióticos: Factores R - encontrados en cepas epidémicas de *Shigella* y *Salmonella typhi* aisladas en México. Gaceta Médica de México. 105 (2): 123-133.
- 15.- Olarte, J. & Galindo, E. (1980). Factores de resistencia a los antibióticos encontrados en bacterias enteropatógenas aisladas en la Ciudad de México. Rev. Lat. Microbiol. 12: 173-179.
- 16.- Kupersztoch, J. Comunicación personal.
- 17.- Datta, N. & Olarte, J. (1974). R Factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* 1 isolated during epidemics in México. Clasificación by compatibility. Antimicrobial Agents. Chemother. 5(3): 310-317.

- 18.- Thorne, M.G. & Farrar, E. Jr. (1973). Genetic propieties of R factors associated with epidemic strans of *Shigella dysenteriae type 1* from Central America and *Salmonella typhi* from México. *J. of Inf. Diss.* 128(1):132-136.
- 19.- Perry, L.K. & Walker, C.G. (1982). Identification of plasmid (pKN101) coded proteins involved in mutagenesis and UV resistance. *Nature.* 300 : 278-281.
- 20.- López, M. & Alfaro, G. (1981). Resistencia a antibióticos en cepas de *S. typhimurium* aisladas de muestras clínicas. Caracterización de algunos plásmidos R. *Rev. Lat. Microbiol.* 23: 199-205.
- 21.- Takedo, & Sato, G. (1979). Demostration of the so-called mexican type R plasmids in naturally occurring *Escherichia coli*. en *Microbial Drug Resistance*, Ed. Mitsuhashi, Japan Scientific Societies. Press Tokio. 2: 215-217.
- 22.- Miki, T., Easton, M.A. & Rownd, H.R. (1980). Cloning of replication, incompatibility and stability functions of R plasmid NR1. *J. Bacteriol.* 141(1): 87-99.
- 23.- Molin, S., Stougaard, P., Light, J., Nordström, M. & Nordström, K. (1981). Isolation and Characterization of new copy mutants of plasmid R1, and identification of a polipeptide involved of copy number control. *Mol. Gen. Genet.* 181: 123-130
- 24.- Molin, S., Stougaard, P., Uhlin, E.B., Gostafsson, P. & Nordström, K. (1979). Clustering of genes involved in replication, copy number, incompatibility, and maintenance of the resistance plasmid R1 drd19. *J. Bacteriol.* 138(4): 70-79.
- 25.- Broda, P. (1979). *Plasmid*. W. H. Freeman and Co. Ltd. Oxford.
- 26.- Sutcliffe, (1978) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold. Spring Harbor. Symp.* 40: 77-90

- 27.- Sansonetti, S.P., Kopecko, S.D. & Formal, B.S. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Sh. flexneri*. *Infection and Immunity*. 35(3): 852-860.
- 28.- Sansonetti, J.P., Kopecko, J.D & Formal, B.S. (1981). *Shigella sonnei* plasmid : evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infection and Immunity* . 34(1): 75-83.
- 29.- Bukhari, A.L., Shapiro. J.A. & Adhya, S.L. eds (1977). - DNA insertion elements, plasmids and episomes. Cold. Spring Harbor Lab.
- 30.- Bolívar, F., Rodríguez, L.R., Greene, J.P., Betlach, C.M., Heyneker, L.H., Boyer, W.H. Grosa. H. J. & Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2: 95-113.
- 31.- Hopwood, D.A. (1978). Extrachromosomal determined antibiotic production. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 373-392.
- 32.- Willets, N. (1981). Sites and systems for conjugal DNA transfer in bacterial. en *Molecular Biology, Pathogenecity and Ecology of Bacterial Plasmids*, editado por Levy, B.S., - Clowees, C.R. & Koenig, L.E. Plenum Press. New York: 207-216.
- 33.- Piffaratti, J.C. & Faget, O. (1981). Phage lambda-mediated transduction of non conjugative plasmids is promoted by transposons. *Gene*. 13: 319-325.
- 34.- Kleckner, N. (1981). Transposable elements in prokariotes *Ann. Rev. Genet.* 15: 341-404.
- 35.- Hash, H.J. (1972). Antibiotic mechanisms. *Ann. Rev. Pharmacology*. 22: 35-55.
- 36.- Benveniste, R. & Davies, S. (1973). Mechanims of antibiotic resistance in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 42:471-507.
- 37.- Davies, J. & Smith, I.D. (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agentes. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 368-518.

- 38.- Chopra, I., Howe, B.G.T., Linton, B.K., Richmond, H.M. & Speller, E.C.D. (1981). The tetracyclines: prospects of - the beginning of the 1980s. *J. Antimicrob. Chemot.* 8: 5-21.
- 39.- Chopra, I. & Howe, B.G.T. (1978). Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microb. Rev.* 42(4):707-724.
- 40.- Blakwood, R.K. & English, A.R. (1970). Structure-activity relationships in the tetracyclines series. *Adv. Microb. Physiol.* 13:237-266.
- 41.- Mc Murray, L., Petrucci, E.R. & Levy, B.S. (1978). Two - transport systems for tetracycline in sensitive *Escherichia coli*: critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 14:201-209.
- 42.- Mc Murray, M.L., Cullinane, C.S., Petrucci, E.R. & Levy, B.J. (1981). Active uptake of tetracycline by membrane vesicles from susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 20: 307-313.
- 43.- Di Rienzo, J.M., Nakamura, K. & Inouye, M. (1978). The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 47:481-532.
- 44.- Benbuogh, J.E. & Morrison, A.G. (1967). The molecular basis of an inhibition by tetracyclines. *J. Gen. Microbiol.* 49: 469-485
- 45.- Jones, S.G. & Morrison, A.G. (1962). The bacteriostatic actions of tetracycline and oxytetracycline. *J. Pharm.* 14: 808-824.
- 46.- de Zeeuw, J.R. (1968). Accumulation of the tetracyclines - by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 95:498-506.
- 47.- Chopra, I. & Eccles, J.S. (1978). Diffusion of tetracycline across the outer membrane of *Escherichia coli* K-12: involvement of protein Ia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 550-557.

- 48.- Rosen, B.P. & Kashket, R.E. (1978). Energetics of active transport. en B.P. Rosen (ed), Bacterial Transport. Marcel Dekker. New York: 559-620.
- 49.- Lo, T.C., Rayman, K.M. & Sanwal, D.B. (1972). Transport of succinate in *Escherichia coli*. I. Biochemical and genetic studies of transport in whole cells. J. Biol. Chem. 247: 6323-6331.
- 50.- Del Bene, V.E. & Rogers, M. (1975). Comparison of Tetracycline and minocycline transport in *Escherichia coli*. Antimicrobial. Agents Chemother. 7: 801-806.
- 51.- Goldman, R.A., Cooperman, B.S., Strycharz, W.A. & Tritton, T.R. (1980). Photoincorporation of tetracyclines into *Escherichia coli* ribosomes: identification of labelled proteins and functions consequences. FEBS Letters. 118: 113-118.
- 52.- Warner, P.F., Zubrzycki, L.J. & Chila, M. (1980). Poligenes and modifier genes for tetracycline and penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, J. Gen. Microb. 117: 104-110.
- 53.- Chabbert, A.Y. & Scavizzi, M.R. (1976). Chelocadin-inducible resistance in *Escherichia coli* bearing R plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 9(1): 36-41.
- 54.- Mendez, B., Tachibana, C. & Levy, B.S. (1980). Heterogeneity of tetracycline resistance determinat. Plasmid. 3:99-108.
- 55.- Schmitt, R., Bernhard, E. & Mattes, R. (1979). Characterization of Tn1721 a new transposon containing tetracycline resistance genes capable of amplification. Mol. Gen. Genet. 172: 53- 65.
- 56.- Schöffl, F., Arnold, W., Pühler, A., Altenbuchner, J. & Schmitt, R. (1981). The tetracycline resistance transposons Tn1721 and Tn1771 have three 38- base-pair repeats and generative five-base -pair direct repeats. Mol. Gen. Genet. 181: 87-94.

- 57.- Altenbuchner, J., Schmitt, K. & Schmitt, R. (1983). Tn1721 encoded tetracycline resistance: mapping of structural -- and regulatory gene mediated resistance. J. Bacteriol. 153 (1): 116-123.
- 58.- Reeve, E.C. (1978). Evidence that there are two types of determinant for tetracycline resistance among R-factors. Genet. Res. 34: 75-84.
- 59.- Jorgensen, A.R., Berg, E.D. Allet, B. & Reznikoff, S.W. (1979). Restriction enzyme cleavage map of Tn10, a transposon -- which encodes tetracycline resistance. J. Bacteriol. 137 (7): 681-685.
- 60.- Wray, V.L., Jorgensen, A.R., Reznikoff, S.W. (1981). Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. J. Bacteriol. 147(2): 297-304.
- 61.- Coleman, D.C & Foster, J.T. (1981). Analysis of the reduction in expression of tetracycline resistance determined by transposon Tn10 in the multicopy state. Mol. Gen. Genet. 182: 171-177.
- 62.- Yang, H.Z., Zubay, G. & Levy, B.S. (1976). Synthesis of an R plasmid protein associated with tetracycline resistance is negatively regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 1509-1512.
- 63.- Zupancic, T.J., King, S.R., Pogue-Geile, K.Z. & Jaskunas, S.R. (1980). Identification of a second tetracycline-inducible polypeptide encoded by Tn10. J. Bacteriol. 138: 705-714.
- 64.- Coleman, D.C., Chopra, I., Shales, W.S., Howe B.G.T & Foster, S.T. (1983). Analysis of tetracycline resistance encoded by Tn10: deletion mapping of tetracycline-sensitivity point mutations an identification of two genes, J. Bacteriol. 153(2): 921-929.

- 65.- Chopra, I., Ball, R.P., Eccles, J.S. Shales, W.S. (1980). Tn10 encoded proteins that mediate resistance in *E. coli*. en *Molecular Biology, Pathogenecity and Ecology of Bacterial Plasmid*, editado por Levy, B.S., Clowes, C.R. & Koenig, L.E. Plenum Press. New York. pag. 592.
- 66.- Bertrand, K., Postle, K., Wray, L. & Reznicoff, W. (1981). Regulation of transposon Tn10 tetracycline resistance. en *Molecular Biology, Pathogenecity and Ecology of Bacterial Plasmid*, editado por Levy, B.S., Clowes, C.R. & Koenig, L.E.. Plenum Press. New York. pag. 582.
- 67.- Meagler, B.R., Tait, C.R., Betlach, M. & Boyer, W.H. (1977) Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *Cell*. 10: 521-536.
- 68.- Tait, C.R., Boyer, W.H. (1978). On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101. *Cell*. 13: 73-81.
- 69.- Tait, C.R., Heyneker, L.H., Rodriguez, L.R., Bolivar, F., Covarrubias, A., Betlach, M., Boyer, W.H. (1978). Tetracycline resistance conferred by pSC101, pMB9 and their derivatives. en Ashlessinger (ed) *Microbiology: American Society for Microbiology*, Washington. D.C. pag. 174-176.
- 70.- León, P. & Gómez, C. en prensa.
- 71.- Chopra, I., Shales, W.S., Ward, M.J. & Wallace J.L. (1981). Reduced expression of Tn10 mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* containing more than one copy of the transposon. *J. Gen. Microbiol.* 126: 45-54.
- 72.- Chopra, I., Shales, S., Ball, P. (1982). Tetracycline resistance determinants from groups A to D vary in their ability to confer decreased accumulation of tetracycline derivative by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 689-692.
- 73.- Shales, W.S., Chopra, I. & Ball, P. (1980). Evidence for more than one mechanism of plasmid determined tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 221- 229.

- 74.- Curiale, M.S. & Levy, B.S. (1982). Two complementation groups mediate tetracycline resistance determined by Tn10. *J. Bacteriol.* 151: 209-215.
- 75.- Mc Murray, L., Petrucci, R.E. & Levy, B.S. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different resistance determinant in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3974-3977.
- 76.- Burdett, V., Inamine, J. & Rajagopalan, S. (1982). Heterogeneity of tetracycline determinants in *Streptococcus*. *J. Bacteriol.* 149 (3): 995-1004.
- 77.- Clewell, B. (1981). Conjugation and resistance transfer in *Streptococci* and other gram-positive species: plasmid, sex pheromones and conjugative "transposon" (A review). In *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmid*. editado por Levy, B.S., Clowes, C.R. & Koenig, L.E.. Plenum Press. New York. pag 191-206.
- 78.- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. 2da Ed.. Cold Spring Harbor. New York.
- 79.- Cohen, N.S., Chang, Y.C.A. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *E. coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:2110-2114.
- 80.- Holgnes, D.S. & Quisley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Ann. Biochem.* 114: 193-196.
- 81.- Borbourn, A.C. & Doly (1979). A rapid alkaline extract procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research.* 7 (6):1513-1519.
- 82.- Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 62: 1159-1166.

- 83.- Bolivar, F., Rodriguez, L.R., Betlach, C.M. & Boyer, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning - vehicles. I. Ampicilin-resistance derivatives of the plas mid pMB9. *Gene*. 2: 75-93.
- 84.- Maniatis, T., Fritsch, F.E. & Sanbrook, J. (1982). *Molecu lar cloning*. Cold Spring Harbor. New. York.
- 85.- Grunstein, M. & Hogness, S.D. (1975). Colony hibridiza - tion: a method for the isolated of cloned DNA that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72: 158-164.
- 86.- Foster, J.T., Davies, A.M., Denise, E.R., Takeshita, K. & Kleckner, N. (1981). Genetic organization of transposon Tn10. *Cell*. 23:201-213.
- 87.- Ben-Gurion, R. & Flashner, Y. (1982). New antibiotic subs - tance produced by *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 152 (1): 542-544.
- 88.- Helgason, S. & Old, C.D. (1981). Comparison of four methods of differential typing of isolates of *Sh. sonnei*. *J. Hyg. Comb.* 87: 339-355.
- 89.- Waleh, S.N. (1981). Distribution of group E colicin types in Shiraz, Iran. *J. Gen. Microbiol.* 127: 219-222.