

00366



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



Investigación Sobre la Función de Plásmidos en la
Resistencia de Antibióticos en Vibrios de Importancia
en la Camaronicultura.

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

(Biología Marina)

presenta

Almudena Molina Aja

Director de Tesis: Dr. Bruno Gómez Gil

Comité Tutorial: Dra. Ana M. de Sousa Roque
Dr. Alberto F. Abreu Grobois

Mazatlán, Sinaloa, 2001

20/11/03



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Comité Asesor de Tesis:

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Dra. Ana M. de Sousa Roque

Dr. Alberto F. Abreu Grobois

Tesis desarrollada en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán.

El jurado de tesis:

Dr. Antonio Peña Díaz	Presidente
Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala	Secretario
Dr. Alberto F. Abreu Grobois	Vocal
Dra. Ana M. de Sousa Roque	Suplente
Dr. Francisco Vargas Albores	Suplente

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Dr. Bruno Gómez Gil por todo su apoyo, paciencia y tiempo dedicados a la realización de este trabajo. Así como su amistad y confianza, mil gracias.

A la Dra. Ana Roque, Dr. Alberto Abreu, Dr. Antonio Peña y Dr. Francisco Vargas, integrantes del jurado examinador por su asesoría, colaboración y oportunos comentarios para el mejoramiento de este proyecto.

A la Dra. Alejandra García, cuya experiencia con los plásmidos fue de gran ayuda para resolver muchas de las dudas que se presentaron en el trabajo práctico.

Por su invaluable ayuda y siempre buena disposición en el laboratorio, un profundo agradecimiento a la Q.F.B. Carmen Bolán Mejía, encargada del laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán.

A la encargada del laboratorio de Genética en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, M. en C. Ma. De los Ángeles Herrera Vega, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al Mat. Germán Ramírez Reséndiz por su asesoría y ayuda en el aspecto computacional y apoyo en la edición de la tesis.

Al Ing. Inf. Carlos Suárez Gutiérrez por su ayuda en los menesteres computacionales.

Por su colaboración en la obtención de información bibliográfica a María Clara Ramírez responsable de la Biblioteca de la Unidad Académica Mazatlán del ICML, U.N.A.M.

A la Secretaria y Aux. del Posgrado Margarita Cordero Ruiz por su apoyo en la realización de los trámites que fueron necesarios a lo largo de la maestría.

Al instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, U.N.A.M. y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, por el apoyo brindado.

Este trabajo fue financiado por el proyecto "Caracterización de Bacterias Potencialmente Patógenas con Incidencia Sobre los Mecanismos de Patogenicidad en Camarones Peneidos", CONACYT J-28344.

Mi más profundo agradecimiento a mis padres. A Doña Antonia Aja de M. por enseñarme lo que es ser fuerte ante todo y a Don Cándido Molina por enseñarme el valor de la sensibilidad y nobleza. Para ambos mi amor por creer en mí y respetar siempre mi libertad.

A mi querida Abus por todo su amor.

A Loa, Maite, Meri y Angel por ser y estar siempre ahí, a pesar de los desgarrates de su hermana. Todo mi amor y gratitud siempre.

A Mica y Don Rafa por ser siempre otro excelente par de padres, con todo mi cariño mil gracias.

A Paulo por tan paciente espera y por haber llenado esa parte tan importante de mi vida, mi amor siempre sin condición.

A la familia Villanueva por hacer siempre de su hogar el mío, con todo lo que ello implica. GRACIAS.

A mis sobrinos a quienes nunca les dedico el tiempo que quisiera, por el orgullo de ser su tía.

A Liliana, Alicia, Fernanda y Alberto mis amigos a prueba de tiempo, distancia y penares ¿cómo agradecerles?.

A Carmene con quien tanto he compartido, gracias de corazón por su amistad y confianza.

A Tere por su apoyo, por su cariño.... Gracias "Flaca".

A mis amigos Germán y Rosalba por adoptarme y brindarme tantas atenciones, toda mi gratitud.

A mis queridos amigos Natalia, Magali, Nuria, Caro, Ana, Lucy, Mercedes, Michel, Manuel, Carlos S., Yvette, Carlos Green, Jorge, Ismael, por que sin ellos mi estancia en Mazatlán hubiera sido terriblemente aburrida.

A aquellos cuyos nombres escaparon al papel pero a quienes igualmente se les agradece.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	2
Introducción	3
Justificación	5
Objetivos	5
Antecedentes	6
Cultivo de camarón	6
Mecanismos de acción de los antibacterianos.....	8
1. Interferencia en la membrana citoplásmica.....	8
2. Inhibidores de la síntesis de la pared celular.	8
3. Inhibidores de la síntesis de proteínas.	10
4. Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos	12
5. Interferencia en procesos metabólicos.....	12
Resistencia a los antibióticos.....	15
Resistencia cruzada y resistencia múltiple.....	16
Bases bioquímicas de la resistencia.	16
Bases genéticas de la resistencia.	18
Tipos de resistencia adquirida.....	19
Los plásmidos.....	20
Plásmidos en bacterias de importancia acuícola	23
"curing" de los plásmidos	24
Perfil plasmídico	25
Metodología.....	27
Métodos bacteriológicos	27
Obtención y preservación de cepas bacterianas.....	27
Antibiogramas por el método de difusión en placa (bauer <i>et al.</i> 1966).....	27
Métodos moleculares.....	29
Extracción de los plásmidos.....	29
Electroforesis	30
" curing " de plásmidos	31
Transformación	34
Resultados	36
Procedencia de las cepas.....	36
Sensibilidad de las cepas a diferentes antibióticos.....	38
Presencia de plásmidos.....	41
" curing " de plásmidos.....	41
Discusión.....	55
Conclusiones.....	59
Producción	59
Perspectivas.....	60
Literatura citada.....	61
Apéndice	71

RESUMEN

Se analizó la sensibilidad a 15 antibióticos mediante la aplicación de antibiogramas a 100 cepas bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*, aisladas de camarones peneidos cultivados. El 83% de las cepas analizadas presentó resistencia a uno o más de los antibióticos probados. La mayor parte de las cepas fue resistente a la carbencilina (CB) y ampicilina (AM), 69% y 67% respectivamente, mientras que los antibióticos más efectivos fueron el enrofloxacin, florfenicol y cloranfenicol.

Para el 30% de las cepas estudiadas, se determinó la presencia o ausencia de plásmidos. De éstas cepas, 25 resultaron contener uno o más plásmidos, 21 cepas presentaron un plásmido de aproximadamente 21 kilo bases (kb); en 13 (52%) de estas, es el único plásmido presente, siendo así el perfil dominante. En total, es posible distinguir 12 perfiles distintos, con plásmidos que van de 0.8 a 84 kb.

Se aplicó un tratamiento de limpieza de plásmidos o "curing" a base de bromuro de etidio a todas las cepas que presentaron plásmidos y que a su vez presentaban resistencia a uno o más antibióticos. Se trataron un total de 21 cepas, de las cuales 7 perdieron sus plásmidos: HL2, HL33, HL51, HL60, HL61, HL108 y HP43. Entre estas cepas, fue posible comprobar que el plásmido contenido en HL60 codifica para resistencia a cefalotina, al observar que dicha cepa pasó de ser resistente a ser sensible al antibiótico una vez que había perdido su plásmido. Lo cual se reforzó al lograr transformar a la cepa HL60sp (sin plásmido), con el plásmido que contenía la misma cepa originalmente y de la misma manera se consiguió transformar células competentes de *E. coli* DH5 α con el mismo plásmido.

En ambos casos se observó la expresión del plásmido al darse el crecimiento de las bacterias en LB agar preparado con el antibiótico y la presencia de este en las células se corroboró por medio de electroforesis.

INTRODUCCIÓN

La principal causa de pérdidas económicas en la acuicultura son las enfermedades, y las de origen bacteriano son de las más significativas. La vibriosis es una de las enfermedades más comunes en los peces estuarinos, moluscos y crustáceos (Park *et al.* 1991); esta se ha convertido en los últimos años en la enfermedad bacteriana más importante en maricultura, afectando a un gran número de especies (Woo *et al.* 1995; Wu y Pan 1997).

Las especies de *Vibrio*, tanto patógenas como no patógenas, forman parte de la microflora natural del camarón (Park *et al.* 1991; Gómez-Gil *et al.* 1998a) y toman el carácter de patógenos oportunistas cuando las condiciones del cultivo favorecen su crecimiento a expensas del camarón (Lightner *et al.* 1992).

Varias especies de *Vibrio* también son causantes de enfermedades en el ser humano, por lo que no sólo representan el potencial de altas pérdidas económicas, sino que también son un riesgo para la salud humana (Austin y Austin 1985; Brown 1989). Las especies de *Vibrio* de más alto riesgo para los humanos incluyen *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*, algunas de las cuales son también patógenos de animales acuáticos (Park *et al.* 1994).

El cultivo del camarón es una industria de importancia a nivel mundial; en la actualidad su producción en el mundo es superior a las 700,000 toneladas (Unzueta 2000). Gran parte de este cultivo se realiza en áreas en las que existe poco control sobre el uso de los antibióticos, lo cual es evidenciado en los países importadores en donde se han detectado residuos de antibióticos que pueden ser tóxicos, incluyendo oxitetraciclina y cloranfenicol, en los productos (Alderman y Hastings 1998).

La necesidad del uso de agentes antimicrobianos en la acuicultura es obvia, pero se debe hacer un esfuerzo para reducir y eliminar los compuestos nocivos. Los agentes antimicrobianos no son un sustituto para el buen manejo, y no corregirán los efectos negativos sobre el hacinamiento excesivo y otros manejos inadecuados de cultivo (Plumb 1995).

Los agentes antimicrobianos pueden afectar a los organismos susceptibles de distintas maneras, como la inhibición de la síntesis de la pared celular, alterando las funciones de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas, la síntesis y replicación del ADN, de la ARN polimerasa ADN dependiente o el metabolismo del ácido fólico (Merck 1986). Así mismo, las bacterias pueden protegerse del efecto destructivo de los antibióticos utilizando distintos mecanismos, que incluyen el bloqueo de la entrada de la droga a la célula, la desactivación de la droga, alterando la afinidad del sitio de acción para la droga, o reduciendo la dependencia de la célula del sitio bloqueado por la droga (Davies y Smith 1978), o mediante mecanismos de expulsión del antibiótico u otras drogas hacia el exterior.

La amplia dispersión de la resistencia a los antibióticos ha llevado a la búsqueda en todo el mundo de nuevos y más efectivos antibióticos, debido a que los existentes comienzan a ser obsoletos (Silver y Bostian 1993). Otra forma de acercarse al problema puede ser buscar el origen de las mutaciones responsables de la expresión de la resistencia, con el objeto de identificar los factores y los mecanismos moleculares asociados a éstas. Sólo de esta manera será posible diseñar estrategias para minimizar dicha resistencia (Bastarrachea 1998).

Por estas razones, las pruebas de susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos son fundamentales en el estudio de la resistencia. Dichas pruebas sirven a dos propósitos: proveer información para la prescripción de tratamientos, y para monitorear los cambios en la susceptibilidad de las poblaciones microbianas (Greenwood 2000).

La resistencia antibiótica puede ser natural como una propiedad intrínseca del organismo de manera permanente o condicional; o bien adquirida por un agente extraño como los plásmidos (Merck 1986).

Se denomina como plásmido a cualquier determinante hereditario extracromosomal (Lederberg 1952; citado en Summers 1996). Los plásmidos son elementos autónomos capaces de codificar una gran variedad de propiedades en las bacterias que ocupan; entre estas propiedades se encuentra la resistencia a uno o más antibióticos (Summers 1996). A fin de identificar si la resistencia a un antibiótico es codificada por un plásmido o si esta se encuentra en el genoma de la bacteria, se pueden utilizar pruebas para demostrar la transferencia de dicha resistencia de una bacteria a otra, o bien para proveer evidencia que soporte el papel del plásmido si se han realizado experimentos de "curing" (Stanisich 1988).

JUSTIFICACIÓN

En virtud de la importancia económica que ha cobrado el cultivo del camarón en México, así como el amplio uso de antibióticos y la aparición de cepas bacterianas resistentes a la acción antibiótica, en el presente trabajo se propone determinar la presencia de plásmidos, así como su función, en algunas de ellas, en relación con la resistencia a diversos antibióticos en cepas de bacterias aisladas en su mayoría de camarones peneidos enfermos, procedentes de granjas de cultivo de los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Esto con el interés de dar una idea sobre la situación actual de la presencia de cepas resistentes a antibióticos debido a la presencia de plásmidos que confieran este tipo de resistencia.

OBJETIVOS

Determinar si los plásmidos presentes en las cepas codifican para resistencia a los antibióticos.

- Determinar mediante antibiogramas la sensibilidad a distintos antibióticos de 100 cepas bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*.
- Analizar la presencia/ausencia de plásmidos en 30 de las cepas.
- Determinar el peso molecular de los plásmidos.
- Tratar de eliminar los plásmidos en células vivas, así como su transferencia a cepas que no los contengan.
- Evaluar los posibles cambios en la respuesta antibiótica de las cepas una vez que han sido transformadas mediante la introducción de un plásmido.

ANTECEDENTES

CULTIVO DE CAMARÓN

La demanda de productos marinos, como el camarón, continúa aumentando cada año, y una parte cada vez mayor de esta demanda es aportada por la industria de la acuicultura. La producción mundial de peces cultivados en 1985 fue de 10.6 millones de toneladas y para 1987 aumentó a 13.2 millones de toneladas (FAO 1989). Se estima que para el año 2000, llegó a los 32 millones de toneladas, aportando aproximadamente el 25% de la producción pesquera mundial (Park *et al.* 1994).

El cultivo del camarón se ha desarrollado en los últimos veinte años como industria masiva, principalmente en los países que bordean los océanos Pacífico e Índico. Esta industria se ha encontrado con diversos problemas; el mayor de ellos son las enfermedades (Alderman y Hastings 1998).

En general, la industria de la camaronicultura ha sido afectada durante los últimos años en todo el mundo por enfermedades de diferentes orígenes y en todas las fases de cultivo. Se han detectado enfermedades causadas por bacterias, virus y hongos; así como enfermedades relacionadas con factores nutricionales, o bien como resultado de un mal manejo en las instalaciones (Figueras 2000).

Las bacterias juegan un importante papel en el desarrollo de enfermedades en el camarón, ya que una amplia variedad de ellas forma parte de la flora microbiana normal, tanto del camarón cultivado, como del camarón silvestre; sin embargo, cuando se presenta un desequilibrio en las condiciones del cultivo o el camarón se encuentra bajo factores de estrés, las bacterias, por su carácter oportunista, pueden causar serias enfermedades a los camarones, teniendo fuerte impacto sobre la productividad de las granjas y por ende en su economía (Unzueta 2000).

Se ha implicado a distintas especies de bacterias como agentes causantes de infecciones y enfermedades en el camarón peneido; las reportadas cuyo agente causal es *Vibrio spp.*, son las más numerosas (Lightner 1988).

La importancia de muchas enfermedades de los peneidos depende de alguna manera del tipo de sistema de cultivo empleado. Existen básicamente tres tipos de sistemas de cultivo utilizados actualmente (Lightner *et al.* 1992):

1. Intensivo, son sistemas de cultivo en los que el camarón es criado en altas densidades, en tanques y estanques con un manejo intensivo.
2. Semi-intensivo; en este tipo de sistema se manejan densidades moderadas de organismos en estanques o tanques.
3. Extensivo, en estos sistemas el camarón es cultivado en bajas densidades en estanques o cuerpos de agua naturales; el manejo es mínimo o inexistente.

Es en la mayoría de los sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo en los que es posible el reconocimiento, prevención y tratamiento de enfermedades. En los sistemas extensivos, el tratamiento de enfermedades no resulta práctico, aún cuando exista un diagnóstico. Más aún, la naturaleza de los sistemas de cultivo semi-intensivos e intensivos favorece el desarrollo y transmisión de enfermedades (Bell y Lightner 1987).

El impacto negativo de las enfermedades bacterianas en el camarón comenzó a ser reconocido con la llegada de la acuicultura intensiva. Aún cuando mucha gente considera a los virus como los agentes infecciosos más importantes en el camarón por los limitados medios de control con que se cuenta, las enfermedades bacterianas son igualmente importantes desde el punto de vista económico, porque son responsables de altas mortalidades, tanto en las poblaciones silvestres como en las cultivadas (Lavilla-Pitogo 1995).

Los especímenes obtenidos de granjas de cultivo, mantienen densas poblaciones de bacterias. Estas poblaciones son típicamente de 10^3 - 10^7 bacterias/g (Austin 1995). La mayoría de los reportes de infecciones bacterianas parecen representar infecciones por bacterias oportunistas más que por un patógeno especializado, y la frecuencia de las infecciones suele atribuirse a cultivos intensivos y condiciones ambientales adversas (Bell y Lightner 1992).

En los últimos cinco años, las enfermedades bacterianas se han vuelto factores limitantes para el cultivo de los peneidos, y sus efectos han sido directamente proporcionales al crecimiento de la industria en términos de severidad e impacto. Aunque son ocho géneros los que se han asociado con este problema, solo dos grupos ocurren más comúnmente: bacterias filamentosas y vibrios, siendo los últimos los más importantes. En los peneidos se han reportado varias especies de vibrios como responsables de enfermedades: *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. nereis*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo 1995).

La vibriosis es una enfermedad que ataca a todas las especies de camarones peneidos, afectando desde larvas hasta adultos, causando mortalidades que van desde insignificantes, hasta cercanas al 100% de la población afectada. Los síntomas incluyen periodos de nado errático alternados con periodos de letargia. Las infecciones en la cutícula, apéndices o branquias, son lesiones de color negro o café (debido a la melanina producida por el huésped, involucrados en el proceso inflamatorio), las cuales corroen la cutícula; este síndrome es conocido como el de "mancha negra" o enfermedad del caparazón.

La vibriosis septicémica o las infecciones localizadas internas, con frecuencia incluyen síntomas de estrés severo como opacamiento del músculo abdominal, anorexia y expansión de los cromatóforos. La hemolinfa de los organismos afectados coagula despacio (requiere un minuto o más) y puede aparecer turbia.

En las larvas y postlarvas, los síntomas pueden incluir melanización y necrosis de las puntas de los apéndices (Lightner 1991).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBACTERIANOS

Una clasificación práctica de las drogas antimicrobianas se basa en si estas inhiben el crecimiento microbiano, bacteriostáticas, o si matan a los microorganismos, bactericidas (Shojaee y Lees 2000).

Las drogas antibacterianas ejercen su acción interfiriendo ya sea con la estructura o distintos procesos metabólicos de la bacteria. Importantes mecanismos de acción de los antibióticos incluyen la interferencia en los caminos metabólicos, interferencias en la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos y la interferencia en la biosíntesis de la pared celular (Mann y Crabbe 1996).

1. INTERFERENCIA EN LA MEMBRANA CITOPLÁSMICA.

Muchos compuestos ejercen su acción bactericida uniéndose a la membrana plasmática. Algunos causan desorganización y pérdida de la función de la membrana. Otros, por inserción en la membrana, forman un poro que altera su permeabilidad a los iones. Ejemplos del primer grupo de compuestos incluyen algunos detergentes y ciertos compuestos fenólicos como el hexaclorofeno. Estos compuestos forman la base de las preparaciones antisépticas comerciales cuando se aplican a la superficie externa del cuerpo. Algunos polipéptidos cíclicos, como la tirocidina A, la gramicidina S y las polimixinas, también se unen a la membrana citoplásmica, mientras que otros como la valinomicina, monensina A y nigericina se insertan en la membrana formando poros (Mann y Crabbe 1996), sólo que los tres últimos son tóxicos también para los animales.

2. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.

La pared celular de las bacterias es esencial para su crecimiento y desarrollo normal. La capa de peptidoglicanos representa alrededor del 5% de la pared celular en los Gram-negativos y entre el 30 a 40% en los Gram-positivos, esta capa representa un blanco importante para los compuestos antibacterianos ya que es el principal componente que le confiere la rigidez.

Los peptidoglicanos están compuestos de una cadena lineal de dos aminoazúcares que se alternan: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, los cuales se unen por cadenas de péptidos (Mann y Crabbe 1996).

Los grupos más importantes de antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular son los glicopéptidos y los β -lactamatos (Greenwod 1995a).

- Glicopéptidos

Los glicopeptidos, como el teicoplanin y la vacomicina, son moléculas heterocíclicas que constan de un enlace heptapéptido al que se unen distintos azúcares. Estos actúan uniéndose a la acil-D-alanil-D-alanina de las unidades de los peptidoglicanos; de esta manera impiden la adición de nuevos bloques de construcción a la pared celular en crecimiento. La actividad de los glicopéptidos se restringe a las bacterias Gram-positivas, ya que no logran penetrar la membrana externa de las Gram-negativas (Greenwod 1995a).

- β -lactamatos

Existen más de 40 moléculas de β -lactamatos estructuralmente diferentes, disponibles en 73 fórmulas y la mayoría de ellas se prescribe actualmente para su uso en hospitales (Amyes y Gemel *et al.* 1997). Este tipo de antibióticos es bien tolerado por los humanos, y produce pocos efectos secundarios; interactúan específicamente contra su blanco bacteriano, debido a estas propiedades son la familia de antimicrobianos más prescritos mundialmente (Medeiros 1997).

Los β -lactamatos comprenden seis clases de compuestos que ocurren en la naturaleza; penicilinas, cefalosporinas, clavamatos, carbapenematos, nocardicinas, y monobactamatos. A excepción de las norcadicinas, representantes de las otras clases han sido de utilidad clínica haciendo de los β -lactamatos el grupo antibacteriano más importante comercialmente (O'Sullivan 1990).

Las penicilinas y las cefalosporinas son familias muy cercanas de compuestos que comparten la estructura del anillo de β -lactamato. Dicho anillo es la parte "frágil" de este tipo de antibióticos, ya que muchas bacterias poseen enzimas capaces de romperlo dejando a la molécula antibacterialmente inactiva, dentro de estas familias se encuentran la ampicilina, cefalotina, carbencilina y cefotaxima.

En las penicilinas, el anillo está unido a un anillo de tiazolidina, mientras que en las cefalosporinas se encuentra unido a un anillo de dihidrotiazina (Mann y Crabbe 1996).

A partir de la aparición de cepas resistentes a la penicilina se fueron desarrollando las demás familias de β -lactamatos con modificaciones que ofrecían una solución

momentánea al problema, hasta la aparición de nuevas β -lactamasas capaces de inactivarlos (O'Sullivan 1990).

El mecanismo de acción de los β -lactamatos consiste en bloquear la biosíntesis de peptidoglicanos, impidiendo que la pared celular pueda ser constituida normalmente lo que provoca alteraciones morfológicas en las células. Las consecuencias son, dependiendo del antibiótico utilizado, crecimiento de la bacteria en forma de filamentos largos, forma esférica, o la formación de una pared osmoticamente débil (esferoplastos) (Greenwod 1995a).

La interferencia que ejercen sobre la biosíntesis de la pared celular, se da por la unión de la droga a diversas enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular (Pitout *et al.* 1997).

En los bacilos Gram-negativos la muerte se da por el efecto osmótico; sin embargo, en los Gram-positivos se produce la autólisis de la célula al liberarse ácido lipoteico de la pared celular (Greenwod 1995a).

3. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

La síntesis de las proteínas puede ser vista en tres etapas: iniciación, elongación y liberación. Primero el ADN es transcrito para proveer el ARN mensajero, el cual lleva la información para la biosíntesis de las proteínas en forma de codones (trinucleótidos). Cada uno de estos es específico para un aminoácido en particular, y los codones se ordenan subsecuentemente con anticodones llevados por ARN de transferencia, que tiene un aminoácido específico también unido a su extremo. Ellos entregan el aminoácido correcto cuando tiene lugar la unión codón-anticodón. Durante la iniciación, el ARNm se une al ribosoma y entonces, el iniciador ARNt se asocia con esta parte del ribosoma. La elongación involucra la adición secuencial de aminoácidos a la cadena de polipéptidos, según el orden dictado por el codón del ARNm. Finalmente, el polipéptido completo (la proteína) es liberado por hidrólisis (Mann y Crabbe 1996).

Dentro de los inhibidores de la síntesis de las proteínas bacterianas se encuentran los aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos (Greenwod 1995b).

- **Aminoglicósidos**

Estructuralmente, la mayoría de los aminoglicósidos consta de un sistema de anillos ligados compuestos por amino azúcares y un aminociclitol. Son agentes con amplio espectro bactericida que deben ser inyectados, ya que se absorben pobremente cuando se administran oralmente.

Su modo de acción consiste en unirse a distintas subunidades ribosomales, esto tiende a producir errores en ciertos codones del ARNm, dando como resultado la producción de proteínas defectuosas. En este grupo se encuentran la eritromicina, gentamicina, neomicina y kanamicina.

- Cloranfenicol

Aún siendo un compuesto que ocurre naturalmente, su estructura molecular es relativamente simple y puede ser sintetizado. El cloranfenicol actúa inhibiendo la reacción de la peptidil transferasa (paso en el que el enlace peptídico es formado) en los ribosomas. Su espectro de acción abarca la mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y se extiende a clamidias y rickettsias.

El cloranfenicol es un buen agente antibacteriano; sin embargo, tiende a causar discrasia sanguínea en el ser humano. Se han desarrollado dos compuestos relacionados con este, pero para uso veterinario. El tianfenicol, que es menos efectivo pero más seguro que el cloranfenicol, y el florfenicol, que es un derivado del tiamfenicol (Merck 1986)

- Tetraciclinas

Existen tres clases de tetraciclinas que ocurren en la naturaleza (oxitetraciclina, clorotetraciclina y demetilclortetraciclina) y muchos otros que han sido derivados semi-sintéticamente (Merck 1986).

El grupo de las tetraciclinas se encuentra dentro de los agentes antibacterianos de espectro más amplio, teniendo buena actividad contra la mayoría de las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, rickettsias, clamidias, micoplasmas y espiroquetas. Las bacterias susceptibles a este grupo concentran las tetraciclinas mediante un proceso de transporte activo. Dentro de la célula interactúan a nivel ribosomal interfiriendo con el ARNt (Mann y Crabbe 1996).

- Macrólidos

Se piensa que todos los miembros de este grupo actúan causando la disociación de la cadena peptídica del ribosoma durante la síntesis protéica.

Los macrólidos son notables por su actividad contra los estafilococos y estreptococos, pero su espectro de acción incluye también clamidias, micoplasmas, *Legionella* y algunas mycobacterias.

4. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Se ha descubierto una amplia variedad de agentes antimicrobianos que interfieren selectivamente con las funciones del ADN y ARN. Algunos lo hacen de manera indirecta a través del metabolismo, mientras otros ejercen su acción de manera directa (Greenwod 1995c).

- **Quinolonas**

Estos agentes, generalmente conocidos como quinolonas presentan variantes estructurales dependiendo del arreglo de los átomos de nitrógeno en la estructura heterocíclica. Su sitio de acción es una subunidad de la enzima ADN girasa, la cual desenrolla la doble hélice del ADN antes de la replicación y transcripción. Ejemplo de esta familia de antibióticos son el enrofloxacin, ácido nalidíxico y el ácido oxolínico.

La mayoría de las bacterias Gram-negativas son susceptibles, pero las Gram-positivas son organismos generalmente resistentes. Dentro de este grupo se encuentran también las fluoroquinolonas, las cuales si son activas contra los Gram-positivos.

- **Nitrofuranos**

El derivado más utilizado de este grupo es la nitrofurantoina, activa contra la mayoría de los patógenos del tracto urinario. Su actividad se ve afectada favorablemente bajo condiciones de pH ácido. El mecanismo de acción no ha sido precisado, pero al parecer interactúa de alguna manera con el ADN (Greenwod 1995c).

5. INTERFERENCIA EN PROCESOS METABÓLICOS.

La mayoría de las bacterias sintetizan ácido fólico, y son incapaces de tomarlo del medio ambiente (Greenwod 1995a). Las sulfonamidas interrumpen el proceso metabólico que lleva a la producción de este ácido, al impedir la producción del cofactor tetrahidrofolato. Las consecuencias de este bloqueo son numerosas, llegando a la interrupción de la síntesis de las purinas o pirimidinas. El metabolismo bacteriano, también puede ser inhibido por el trimetoprim. Mientras que las sulfonamidas inhiben la incorporación del ácido p-aminobenzoico (PABA) al ácido fólico, el trimetoprim inhibe la reducción del dihidrofolato en tetrahidrofolato. Este último es esencial en las reacciones de transferencia de fragmentos de un carbono (Mann y Crabbe 1996).

Los antibacterianos utilizados dependen de la especie cultivada, sus principales patógenos, la disponibilidad de la droga y la regulación de las autoridades. La mayoría

de los antibióticos empleados en la acuicultura suelen caer dentro de ocho categorías (Meyer y Schnick 1988; Alderman y Michel 1992), las cuales se presentan a continuación junto con algunas drogas representativas de cada una de ellas:

- Tetraciclinas: oxitetraciclina, clorotetraciclina.
- Antibióticos macrólidos: eritromicina.
- β -lactamatos: penicilina, amoxicilina.
- Aminoglicósidos: estreptomina, neomicina, kanamicina.
- Cloranfenicol
- Quinolonas: enrofloxacin, flumequinona, ácido nalidíxico.
- Nitrofuranos: nitrofurazona, nifupirinol, furaltadona.
- Sulfonamidas: sulfisoxazol, sulfatiazol.

La ventaja del uso de drogas suele radicar en su disponibilidad y rápida aplicación a los primeros indicios de enfermedad. La mayoría son aplicables en una variedad de condiciones; su aplicación es flexible y muchos afectan a varios organismos causantes de enfermedad.

Pero también existen desventajas en su uso en acuicultura: su efecto es a corto plazo, la enfermedad puede volver a ocurrir, especialmente si el factor ambiental que la haya podido desencadenar persiste. Los costos de su uso son variables por que no se puede determinar que tan frecuentemente serán requeridos. Así mismo, su uso continuo o algún otro manejo inapropiado de los antimicrobianos puede promover el desarrollo de bacterias resistentes. Este tipo de bacterias ha ocasionado problemas en varios sistemas de cultivo del mundo como son el del bagre de canal, salmónidos, anguilas y el del camarón (Plumb 1995).

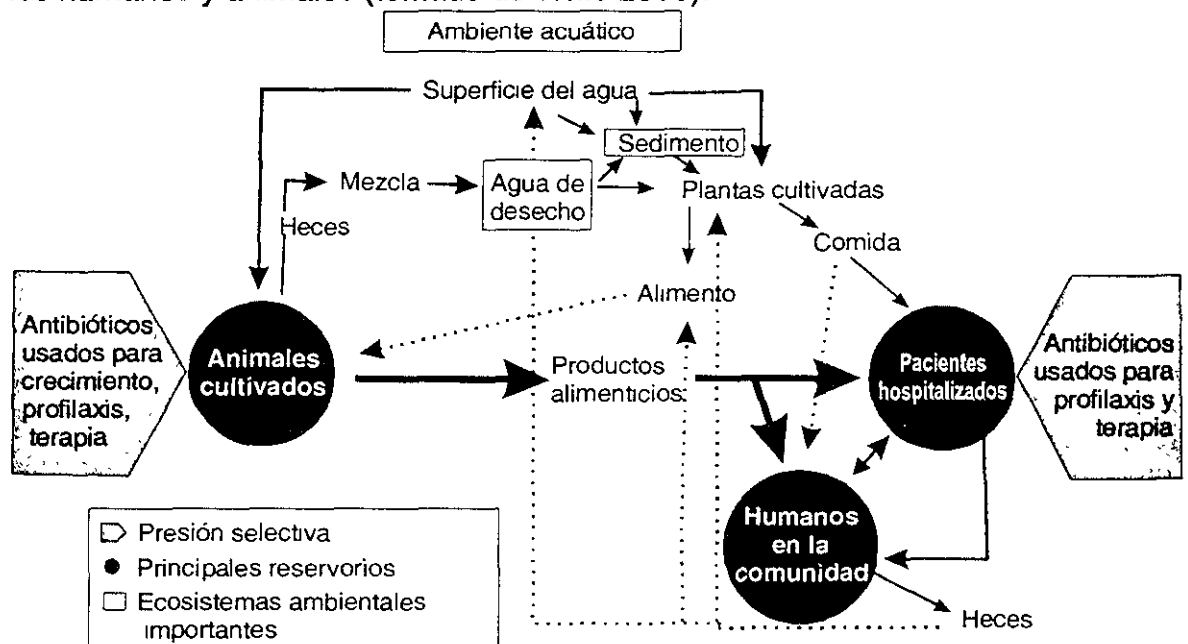
De esta manera, los tratamientos antimicrobianos tienen cuatro efectos, uno potencialmente benéfico (eficacia clínica) y tres potencialmente dañinos (toxicidad en el organismo del animal, inhibición de las bacterias no patógenas y desarrollo de resistencia en la flora comensal normal), por lo que pueden ejercer efectos extensivos e indeseables en la ecología microbiana, afectando no sólo a los microorganismos en el individuo tratado, sino también en el medio ambiente (Shojaee y Lees 2000). Así, las bacterias comensales, constituyen una reserva potencial de genes de resistencia para bacterias patógenas y su nivel de resistencia se considera como un buen indicador de la presión selectiva que ejerce el uso de un antibiótico y de los problemas de resistencia que pueden ser esperados en patógenos (van den Bogaard y Stobberingh 2000).

Además, la falta de control en el uso de los antibióticos puede tener consecuencias en la salud humana, debido a que los residuos de muchos de los antibióticos utilizados en los organismos cultivados no se degradan bajo las condiciones normales de cocción (Moats 1988; Kitts *et al.* 1992). Las consecuencias de la ingestión de estos agentes cae dentro de tres categorías (Yndestad 1992):

1. Toxicidad. Muchos antibióticos tienen efectos tóxicos que van desde el potencial carcinogénico de los nitrofuranos a desórdenes digestivos y hepato-renales asociados con oxitetraciclina y sulfonamidas, hasta el cloranfenicol como agente causal de la anemia aplásica.
2. Hipersensibilidad. La exposición a los antibacterianos puede provocar reacciones alérgicas en los individuos sensibles a alguno de estos agentes.
3. Resistencia microbiana. El consumo de residuos antibacterianos vía productos de la acuicultura, podría ejercer potencialmente una presión selectiva en la microflora humana, incluyendo las bacterias entéricas patógenas. La exposición sub-terapéutica a través de la alimentación, por lo tanto, podría comprometer la eficacia de un tratamiento posterior antibacteriano. Se ha demostrado experimentalmente que es posible la transferencia de la resistencia antibiótica de un patógeno de pez a uno de humano.

Los reservorios de resistencia antibiótica en los humanos y animales pueden interactuar en diferentes formas (Fig. 1); los vectores de transmisión más probables para la flora intestinal son la comida y el agua. La transmisión de cepas bacterianas resistentes de animales a humanos está bien documentada para patógenos como *Salmonella typhimurium* (Witte 2000; Caprioli *et al.* 2000).

Figura 1. Rutas de interacción de los distintos reservorios de resistencia antibiótica en los humanos y animales (tomado de Witte 2000).



Rhodes *et al.* (2000), reportaron la diseminación de los plásmidos que codifican la resistencia a la tetraciclina entre cepas de *Aeromonas spp.* y *Escherichia coli* entre

La mayoría de los agentes antibacterianos debe pasar a través de la pared y la membrana celular para alcanzar su blanco o sitio de acción y muchos entran a la célula por mecanismos de transporte activo normalmente dedicados al transporte de azúcares y otras sustancias benéficas para la bacteria (Towner 1995c).

El desarrollo de la resistencia antibiótica en las bacterias se basa principalmente en dos factores, la presión selectiva que ejerce el antibiótico utilizado y la presencia de genes que codifiquen resistencia (Levy 1994).

RESISTENCIA CRUZADA Y RESISTENCIA MÚLTIPLE.

1. La resistencia cruzada es la resistencia a diferentes miembros de un grupo de antibióticos químicamente relacionados, que son afectados por el mismo mecanismo de resistencia. Por ejemplo, existe casi una completa resistencia cruzada entre todas las tetraciclinas, ya que la resistencia a la tetraciclina resulta de un mecanismo de eflujo que afecta a todos los miembros del grupo. La resistencia cruzada también puede observarse entre antibióticos no relacionados entre sí. Por ejemplo, un cambio en la estructura de la membrana externa de los bacilos Gram-negativos puede impedir el acceso de compuestos de distintos grupos.
2. Resistencia múltiple, se da cuando una bacteria se vuelve resistente a distintos antibióticos no relacionados por distintos mecanismos de resistencia. Por ejemplo, una bacteria resistente a penicilina, gentamicina y tetraciclina. La resistencia en este caso se daría de manera independiente para cada antibiótico, ya que la bacteria destruiría a la penicilina con una β -lactamasa, la gentamicina sería inactivada con una enzima aminoglicosido-modificante y la tetraciclina excluida por un mecanismo activo de expulsión (Towner 1995b).

BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA.

Los mecanismos de resistencia, basados en cambios bioquímicos, se pueden clasificar en cuatro categorías (Mann y Crabbe 1996):

1. Modificación del sitio de acción o la enzima.
2. Bloqueo del acceso del antibiótico.
3. Producción de enzimas que destruyan o inactiven al antibiótico.

4. Expulsión de las drogas por los microorganismos.

La mayoría de los antibióticos actúan inhibiendo una o más enzimas, y la mutación en los genes que producen estas enzimas puede conducir a la producción de enzimas modificadas que tengan una mayor afinidad por su sustrato natural, o una menor afinidad por el antibiótico. Este es el tipo de resistencia que las bacterias han desarrollado contra las sulfonamidas. Además de la modificación de las enzimas, las bacterias pueden presentar cambios estructurales que conllevan una entrada ineficiente del antibiótico. Por ejemplo, alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular o incluso mecanismos para la expulsión activa de los antibióticos (Grinius y Goldberg 1994). La modificación del sitio de acción del antibiótico incluye modificaciones en los ribosomas para impedir la unión del antibiótico a ellas; en otros casos las bacterias pueden ser insensibles a los antibióticos simplemente por la carencia del sitio sobre el que actúa el agente antibacteriano.

Muchas bacterias han desarrollado mecanismos para destruir o inactivar al antibiótico, los ejemplos más estudiados de estos son la producción de β -lactamasas y cloranfenicol acetil transferasas (Mann y Crabbe 1996).

Un mismo grupo de antibióticos puede ser susceptible de varios mecanismos de resistencia; un ejemplo de esto son los β -lactamatos. La resistencia a este tipo de antibióticos puede ocurrir debido a uno o una combinación de los siguientes mecanismos: i) permeabilidad restringida de la membrana (en bacterias Gram-negativas), ii) la producción de β -lactamasas, o iii) la disminución en la afinidad por las transpeptidasas (Guo *et al.* 1999).

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro utilizado en el tratamiento de enfermedades como la fiebre tifoidea, hepatitis infecciosa, disentería, malaria y difteria. La resistencia a este agente suele ser conferida por la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT). La enzima cataliza la O-acetilación del antibiótico, usando acetil coenzima A. El cloranfenicol acetilado no puede unirse al ribosoma bacterial y por lo tanto es inactivo como inhibidor de la síntesis de proteínas. Otras acetil transferasas son responsables por la acetilación de muchos aminoglicósidos, incluyendo la estreptomina y las gentamicinas. Estos antibióticos también son atacados por varias fosfotransferasas y adenil transferasas (Mann y Crabbe 1996).

La producción bacteriana de β -lactamasas es uno de los mecanismos más eficientes y frecuentes en la resistencia a los β -lactamatos. Su evolución en términos de actividad catalítica fue acelerada por el uso intensivo de los β -lactamatos en diversos campos, como la agricultura, industria y medicina (Sanders y Sanders 1992). Más de 50 años de uso inapropiado o abuso de los β -lactamatos ha creado una fuerte presión selectiva en el ecosistema bacteriano, que ha favorecido a las bacterias resistentes que producen nuevas β -lactamasas o variantes de la clásica β -lactamasa mediada por plásmidos (Therrien y Levesque 2000). Su modo de acción consiste en cortar el anillo de β -lactamato tanto en penicilinas como cefalosporinas, produciendo productos intermedios inestables que se fragmentan (Mann y Crabbe 1996).

Aunada a la producción de β -lactamasas, las bacterias pueden ser resistentes a los β -lactamatos por medio de dos mecanismos más: por la transformación de las enzimas que se adhieren los β -lactamatos, denominadas como enzimas que se unen a la penicilina (penicillin-binding proteins (PBP)) o por cambios en los poros de la membrana celular, lo que resulta en la disminución de la cantidad de antibiótico que logra entrar a la célula. La resistencia puede darse por uno o más de los mecanismos citados (Pitout *et al.* 1997)

La creciente cantidad de bacterias productoras de β -lactamasas representa un serio reto para la utilidad clínica de los β -lactamatos. Se pensó que el descubrimiento de los inactivadores de las β -lactamasas resolvería, en parte, el problema de la resistencia. Sin embargo, las bacterias han desarrollado un nuevo mecanismo de resistencia para evitar el efecto inhibitorio de los inactivadores de las β -lactamasas. Esta resistencia podría detener el efecto protector contra las bacterias productoras de β -lactamasas inhibitorias de las clásicas penicilinas (Therrien y Levesque 2000).

Desde el punto de vista clínico, el interés se centra en la gran cantidad de plásmidos que codifican β -lactamasas, que son la mayor causa de resistencia contra las penicilinas y cefalosporinas. Dentro de los cocos Gram-positivos, el único plásmido que codifica β -lactamasas con importancia clínica es encontrado en estafilococos. En cambio, existe una gran variedad de organismos Gram-negativos que producen β -lactamasas codificadas por plásmidos (Towner 1995b; Young *et al.* 1989).

BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA.

La presión de los antibióticos en el medio ambiente puede, de manera simultánea, contribuir al aumento en la diversidad de los fenotipos mutantes que sean resistentes, la selección del más apto entre ellos, y la dispersión de los genes resistentes, lo cual trae como consecuencia una significativa aceleración en la evolución microbiana (Baquero y Blázquez 1997)

La diseminación de la resistencia es mediada por la dispersión clonal de una cepa resistente en particular y/o por la dispersión de genes de resistencia. Esta última puede involucrar la transferencia de plásmidos, transposición o diseminación vía integrones (Witte 2000).

Todas las características de una célula microbiana, incluyendo aquellas de importancia médica como la resistencia antibiótica y virulencia, son determinadas por el genoma microbiano, el cual comprende tres fuentes de información genética en la célula: el cromosoma, los plásmidos y bacteriófagos. La resistencia bacteriana a agentes antibacterianos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca, resistencia "natural" que posee una especie de bacteria suele ser especificada por su cromosoma. En contraste, la resistencia adquirida ocurre en células sensibles, ya sea por

alteraciones en su genoma o por la transferencia de material genético entre células (Towner 1995a).

TIPOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA.

Se pueden encontrar principalmente dos tipos de resistencia adquirida en especies bacterianas que normalmente son consideradas como sensibles a algún agente antibiótico.

Resistencia Mutacional.

En cualquier población bacteriana, una pequeña cantidad de células individuales puede mutar de tal forma que espontáneamente se vuelva resistente. Dichas células resistentes no cuentan con ninguna ventaja de sobrevivencia en particular estando en ausencia del antibiótico, pero una vez que el tratamiento ha sido aplicado en dicha población de bacterias, todas aquellas células que sean sensibles morirán de manera que inicialmente muy pocas células resistentes podrán proliferar pero eventualmente, estas conformarán toda una nueva población resistente al antibiótico.

Las mutaciones son el resultado de errores en el procesos de replicación del ADN; Suelen involucrar delección, sustitución o adición de uno o unos cuantos pares de bases, lo que ocasiona una alteración en la composición de los aminoácidos de un producto en particular. Este tipo de errores son al azar y espontáneos; ocurren constantemente en todos los genes de la célula y son independientes de la presencia o ausencia de un antibiótico en particular.

La mayoría de las resistencia producidas por mutaciones, resultan en alteraciones de la permeabilidad o alteración del sitio de acción de una antibiótico específico, pero algunas ocasionan la producción de enzimas inactivantes.

Resistencia Transmisibile.

Este tipo de resistencia ocurre cuando genes que confieren resistencia antibiótica son transferidos de una célula resistente a una sensible. La transferencia y dispersión exponencial de genes de resistencia a través de poblaciones bacterianas previamente sensibles resulta ser un mecanismo de resistencia adquirida, mucho más eficiente que el desarrollo de resistencia por mutación (Towner 1995b).

Existen tres mecanismos por los que se puede transferir información genética de una célula a otra:

1. Transformación, que involucra la lisis de una célula y la liberación de su ADN en el medio. Bajo ciertas circunstancias, parte de este ADN puede ser adquirido por otra bacteria.
2. Transducción; se da por la incorporación accidental de ADN bacterial, ya sea del cromosoma o de un plásmido, en un bacteriófago. Entonces, el fago actúa como vector y transfiere el ADN a la siguiente célula que infecta.
3. Conjugación, que implica el contacto físico de dos bacterias. Las células se adhieren una a otra y el ADN pasa unidireccionalmente de una célula, denominada como donador, a la otra, denominada como recipiente. Esto depende de la capacidad del receptor para recibir y de que el ADN transferido pueda mantenerse y expresarse en el nuevo huésped.

Una sola mutación individual o una transferencia pueden, si se presentan las condiciones de selección apropiadas, llevar a remplazar una población sensible por una resistente (Towner 1995a).

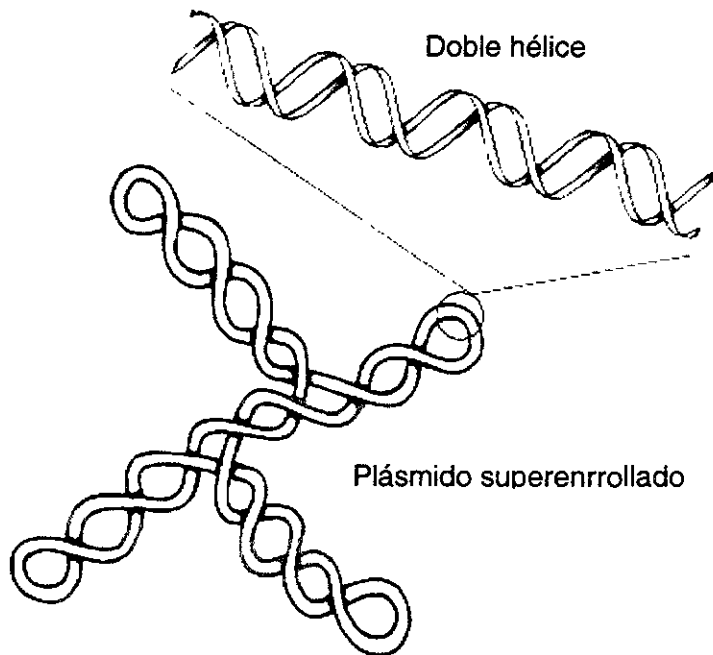
LOS PLÁSMIDOS

Como se mencionó anteriormente, los plásmidos son determinantes hereditarios extracromosomales. La mayoría de ellos están constituidos por moléculas de ADN circular; esto se debe a que a diferencia de la estructura lineal de la doble hélice del ADN de las células eucariotas, en los plásmidos los extremos de la hélice se encuentran unidos (Fig. 2).

Una preparación de ADN plasmídico comúnmente contiene en su mayoría al plásmido en su forma circular covalentemente cerrada o superenrollada (CCC). Con frecuencia también se presenta una pequeña cantidad de la forma circular relajada (OC), lo cual suele incrementarse con el tamaño de los plásmidos. Cuando la preparación envejece, la proporción de la forma OC aumenta, y en algunos casos incluso llega a aparecer la forma lineal. Estas variantes presentan el problema de tener diferentes movilidades electroforéticas, así que el mismo plásmido podría aparecer en un gel como tres bandas muy separadas. El orden en que se mueven las distintas formas suele ir en el siguiente orden: la OC como la más lenta, seguida por la lineal y la CCC siendo la más rápida, aunque bajo ciertas condiciones la forma lineal y CCC pueden correr juntas (Grinstead y Bennet 1988). Entre los años 1950's y 1960's se descubrió que los plásmidos eran responsables de la rápida dispersión de la resistencia múltiple a antibióticos.

Además de la resistencia antibiótica, los plásmidos pueden codificar una gran variedad de funciones (Tabla 1) que no son esenciales para la supervivencia del hospedero, pero que incrementan las posibilidades de dispersión de la bacteria en la que se encuentran al aumentar su capacidad de adaptación a diferentes ambientes (Summers 1996).

Figura 2. Plásmido.



Los plásmidos son elementos autónomos que han alcanzado su independencia tomando el control sobre su forma de producción y distribución. En términos biológicos, estos son los procesos de replicación, herencia y diseminación, esenciales para la supervivencia de todos los plásmidos.

Para que un plásmido persista en una población de células en crecimiento, su tasa de replicación debe coincidir o superar la tasa de división de su huésped; es decir, de las células en las que se encuentra. A esto se le conoce como número de copia. Sin embargo, para los plásmidos cuyo número de copia es bajo, existe una función adicional para asegurar su persistencia dentro de la población, que consiste en la distribución de los plásmidos en el momento de la división celular en un proceso análogo a la distribución de los cromosomas durante la mitosis en las células eucariontes; a este proceso se le conoce como partición activa. Aunado a estos mecanismos se encuentra la transferencia horizontal de plásmidos de una célula a otra (Summers 1996).

Es de esperarse que en una población de bacterias que contienen plásmidos, se produzcan ocasionalmente bacterias sin plásmidos como resultado de errores en el proceso de replicación del plásmido o en la partición de las células hijas. Estas bacterias sobrevivirán si el plásmido perdido no codifica funciones vitales para su crecimiento bajo las condiciones ambientales en las que se encuentre, dichas funciones solo podrán ser recuperadas adquiriendo el plásmido de una fuente externa (Stanisich 1988).

Tabla 1. Algunas de las propiedades determinadas por plásmidos.

Propiedades de resistencia a	Propiedades metabólicas
Antibióticos	Producción de antibiótico y bacteriocina
Aniones	Metabolismo de carbohidratos simples
Radiaciones	Metabolismo de compuestos de carbono complejos y compuestos halogenados
Cationes de metales pesados	Metabolismo de proteínas
Agentes intercalantes	Fijación de nitrógeno
Fagos y bacteriocinas	
Propiedades que contribuyen a la patogenicidad o simbiosis	Propiedades para la replicación y el mantenimiento
Producción de toxinas	Sensibilidad a agentes de "curing"
Transporte de hierro	Incompatibilidad
Antígenos de colonización	Número de copia
Producción de cápsulas	Rango de huéspedes
Propiedades de conjugación	Otras propiedades
Inhibición de la fertilidad	Formación de vacuola gaseosa
Respuesta a e inhibición de feromonas	Variación Opaca/ traslucida de colonias

Los plásmidos juegan un importante papel en la adaptación bacteriana a condiciones de estrés ambiental o producido por el hombre. La rápida diseminación de genes que producen resistencia antibiótica en la población bacteriana como consecuencia del uso intensivo de antibióticos puede atribuirse en parte a la transferencia horizontal de plásmidos capaces de ser transferidos y mantenerse estables en un amplio número de bacterias (Götz *et al.* 1996).

La preocupación que existe en torno a las consecuencias de la aplicación indiscriminada de antibióticos radica principalmente en tres factores: primero, el rápido aumento de la producción en la industria de la acuicultura, observado a partir de la década de los 80's incluyendo el cultivo de salmones en Europa y América, el camarón peneido en Asia y parte de Sur América, y el bagre en los Estados Unidos. Todos estos segmentos de la industria dependen en algún grado del uso de agentes antibacterianos y su utilización se ha incrementado a la par de la producción.

Segundo, los sistemas en acuicultura frecuentemente carecen o cuentan con un mínimo tratamiento del efluente de agua por lo que los residuos antibacterianos son transportados a los alrededores de las granjas.

Finalmente, la falta de estudios sobre los efectos de los antibióticos a contribuido al uso de estos sin la regulación necesaria, especialmente en los países en desarrollo (Weston 1996).

El uso de un antibiótico puede incrementar los niveles de resistencia, no sólo a ese antibiótico en específico, sino también a otros, aún cuando sus mecanismos de acción

antibacteriana sean muy distintos (Wood *et al.* 1986). Esto puede ser atribuido en algunos casos a la producción de plásmidos que codifiquen resistencia múltiple, que en algunos casos implican la expulsión del antibiótico (Brazil *et al.* 1986).

El uso extensivo de antibióticos como aditivos en el alimento, o administrados directamente en los estanques en granjas de peces, para prevenir y tratar enfermedades, ha dado como resultado el incremento de las bacterias resistentes a distintos antibióticos, así como la presencia de plásmidos (Hayashi *et al.* 1982; Supriyadi *et al.* 1992; Weston 1996). Muchos investigadores han reportado el aumento de patógenos resistentes a raíz de la adopción y amplia dispersión del uso de los antibióticos en la industria de la acuicultura (Hastings y McKay 1987; Aoki *et al.* 1990; Meier *et al.* 1992; Richards *et al.* 1992; van den Bogaard y Stobberingh 2000).

La evidencia de que la selección por resistencia a antibióticos ocurre como resultado del uso de antibióticos para el control de enfermedades bacterianas en poblaciones de peces cultivados es clara (Alderman y Hastings 1998), un ejemplo de esto es el experimento realizado por Herwig *et al.* 1997), en el que se reportó el incremento en el número de bacterias resistentes a la oxitetraciclina, romet 30 y amoxicilina en el sedimento cercano a jaulas de cultivo de salmón tratado con alimento medicado. El mismo resultado se ha reportado para oxitetraciclina por otros investigadores en granjas de Noruega y Finlandia (Samuelsen *et al.* 1992; Bjorklund *et al.* 1991).

Se han detectado plásmidos que además de conferir resistencia a un amplio espectro de β -lactamasas, codifican frecuentemente resistencia múltiple a aminoglicósidos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim y otros antibióticos, lo cual limita severamente el uso de terapias alternativas; por esta razón es necesario realizar extensas pruebas de susceptibilidad antibiótica antes de aplicar una terapia determinada (Essack 2000).

Existen diversos reportes de bacterias resistentes a distintos antibióticos en el ser humano, incluyendo microorganismos que afectan también animales utilizados para el consumo alimenticio humano. Un ejemplo de esto son las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de pacientes en Albania y Italia, resistentes a la estreptomina, sulfatiazol, tetraciclina y trimetoprim. Tanto las cepas aisladas en Italia como en Albania presentaron el mismo perfil plasmídico y se demostró que su resistencia a los antibióticos se debía a un plásmido de 91.2 kb que pudo ser transferido a *Escherichia coli* (Falbo *et al.* 1999).

PLÁSMIDOS EN BACTERIAS DE IMPORTANCIA ACUÍCOLA

En Indonesia se han reportado cepas de *Vibrio harveyi* aisladas de camarones peneidos enfermos, con resistencia antibiótica múltiple a ampicilina, tetraciclina, amoxicilina y estreptomina, en cultivos de camarón (Abraham *et al.* 1997) y cepas de *Vibrio* aisladas tanto de camarones adultos como larvas resistentes a oxitetraciclina,

estreptomicina y eritromicina (Angka 1997). Así mismo, se han encontrado cepas resistentes a eritromicina, penicilina, ampicilina, kanamicina, cefalexina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, nitrofurantoína oxitetraciclina y cloranfenicol, entre otros, aisladas de camarones en India (Bhattacharya *et al.* 2000; Jawahar *et al.* 1997), y cepas de *Vibrios* resistentes a oxitetraciclina en camarones cultivados en Tailandia (Chanratchakool *et al.* 1995).

La resistencia antibiótica mediada por plásmidos ha sido identificada en bacterias patógenas de peces, incluyendo *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pasteurella piscicida* (Aoki 1988; citado en Alderman y Hastings 1998). Masuyoshi *et al.* (1988) y Zhao *et al.* (1992), reportan plásmidos aislados de cepas de *Vibrio anguillarum* que confieren resistencia a cloranfenicol, kanamicina, sulfamonometoxina, estreptomicina, tetraciclina y trimetoprim, los plásmidos fueron transferidos a *E. coli*, misma que expresó igual resistencia a los antibióticos. Aoki y Kitao (1981) detectaron plásmidos transferibles con resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, sulfamonometoxina, estreptomicina, y kanamicina en cepas de *Edwardsiella tarda* aisladas de anguila, tilapia y bagre cultivados en Japón, mediante la transferencia y expresión de esta resistencia en *E. coli* por experimentos de conjugación. En ninguno de estos estudios se menciona el peso molecular de los plásmidos.

Se han encontrado plásmidos transferibles en *A. salmonicida*, codificando resistencia a cloranfenicol, sulfonamida y estreptomicina en Japón y a combinaciones de sulfonamida, estreptomicina, trimetoprim y/o tetraciclina en Irlanda. El tamaño de los plásmidos varió entre 44.08 y 51.68 kb (Aoki 1997; citado en Alderman y Hastings 1998). Así mismo, Sandaa y Enger (1996), reportaron un plásmido de 38 kb que codifica resistencia a oxitetraciclina, trimetoprim y sulfadiazina, el cual fue transferido por conjugación no sólo a otros miembros de la misma familia (Vibrionaceae) sino que también a miembros de otras familias Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae, e incluso a una bacteria Gram-positiva como *Lactobacillus sp.* También se han encontrado plásmidos codificando resistencia a ampicilina y tetraciclina en *A. hydrophila*, aislada de tilapias en Malasia (Son *et al.* 1997), en este estudio fue posible transferir dicha resistencia a una cepa de *Escherichia coli* por medio de experimentos de conjugación, en los que se transfirieron dos plásmidos de 6.2 y 63.4 kb.

Adams *et al.* (1998), en un estudio realizado en Escocia con cepas de *A. salmonicida* aisladas de salmones cultivados, determinaron la presencia de plásmidos de alto peso molecular (aproximadamente 23.3 kb) que codifican resistencia a oxitetraciclina y que transfirieron esta resistencia a *E. coli* en experimentos de conjugación.

"CURING" DE LOS PLÁSMIDOS

Cuando se trata de probar que una característica como la resistencia a agentes antibacteriales, producción de antibióticos o habilidades metabólicas es codificada por

un plásmido, la bacteria puede ser tratada con agentes que producen el "curing" es decir la pérdida de dicho plásmido. Sin embargo, no existe un agente de "curing" efectivo para todos los casos por lo que los experimentos de este tipo se hacen a prueba y error (Stanisich 1988).

Los compuestos intercalantes, como las acridinas y el bromuro de etidio son los más empleados por que han sido encontrados como efectivos contra plásmidos en una amplia variedad de géneros (Stanisich 1988). Osmanagaoglu *et al.* (2000), aplicaron un tratamiento con bromuro de etidio en concentraciones de 3-25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en el caldo de cultivo a una cepa de *Pediococcus acidilactici* para probar si su capacidad de producir una bacteriocina se debía a la presencia de un plásmido de 9.1 kb. El tratamiento produjo la pérdida del plásmido, y con él la pérdida de la producción de la bacteriocina, comprobando de esta forma que esa propiedad era codificada por el plásmido.

Se incubaron cepas de *Aeromonas salmonicida* con 4 a 6 plásmidos entre 4.3 y 8.1 kb y *Vibrio anguillarum* con un plásmido de 47 kb, resistentes a oxitetraciclina y estreptomycinina respectivamente, en caldo de soya tripticaseína adicionado con 0.1 mg ml^{-1} de bromuro de etidio. En ambos casos se observó la pérdida de los plásmidos pero no de la resistencia, sugiriendo que los plásmidos no determinaban la resistencia a los antibióticos en las cepas estudiadas (Giles *et al.* 1995).

PERFIL PLASMÍDICO

El contenido de plásmidos en bacterias patógenas, o perfil plasmídico, se ha usado como herramienta para distinguir subgrupos dentro de una misma especie en estudios epidemiológicos. La naturaleza variable de los plásmidos como parte móvil del ADN bacteriano representa la clave para el uso de los perfiles plasmídicos en el mapeo epidemiológico de enfermedades infecciosas (Sorum *et al.* 2000). La variación en el contenido plasmídico entre cepas ocurre con frecuencia, pero dicha variación entre grupos clonales ocurrirá de tal forma en que, aún cuando se haya perdido o ganado un plásmido, sea posible reconocer la conexión con el grupo original (Sorum *et al.* 2000).

De acuerdo con Sorum *et al.* (1988), la única característica que hace posible diferenciar claramente entre cepas de *Vibrio salmonicida*, agente causal de la vibriosis de agua fría en los salmónidos, es su perfil plasmídico. En 1993, en un trabajo del mismo autor, se distinguen cinco perfiles plasmídicos como los más comunes entre 15 cepas de *V. salmonicida* aisladas en Noruega, Islas Shetland, Islas Faroe y Canadá. Todas las cepas presentaron un plásmido de 31.9 kb; además, los perfiles consistieron en plásmidos de 4.3, 5.2, 8.4 y 92.7 kb (Sorum *et al.* 1993). Nielsen *et al.* (1993), realizaron un estudio similar con 124 cepas de *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* obtenidas de Dinamarca, Noruega, Escocia y Norte América. Todas las cepas contuvieron al menos un plásmido grande variando en tamaño entre 60 y 150 kb, y todas presentaron dos plásmidos de bajo peso molecular de 5.2 y 5.4 kb. Sin embargo,

el autor considera que el perfil plasmídico tiene un valor limitado como marcador epidemiológico para *A. salmonicida ssp salmonicida* debido a la homogeneidad que se encuentra entre los perfiles plasmídicos en las zonas geográficas que han sido estudiadas.

Así mismo, Sorum *et al.* (2000), concluye que el perfil plasmídico es útil en estudios epidemiológicos cuando se trata de infecciones originadas por cepas de *A. salmonicida ssp* atípicas; estas incluyen las subespecies *achromogenes*, *masoucida* y *smithia*. En este estudio se incluyó un total de 113 cepas aisladas de peces en Noruega, Canadá, Dinamarca, Finlandia, Islandia y Suecia, además de algunas cepas tipo, de estas, un total de 95 cepas fueron divididas en 7 grupos de acuerdo con su perfil plasmídico.

METODOLOGÍA

La formulación tanto de medios como buffers (amortiguadores) se encuentra detallada en el apéndice.

MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

Todos los medios de cultivo bacteriológicos se prepararon con una concentración final del 2.5 % de NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania, Alemania) a excepción de los utilizados para *Escherichia coli* que se prepararon de acuerdo con las indicaciones normales de cada medio.

OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de bacterias usadas en esta tesis nos fueron proporcionadas por la Colección de Microorganismos de Importancia Acuícola del CIAD/Unidad Mazatlán. Las cepas se encuentran criopreservadas a -70 °C según la metodología de Gherna (1994). Cada una de las cepas se recuperó del ultracongelador inoculando una cuenta de vidrio en 3 ml de caldo Luria-Bertani (LB) en tubos de ensaye, e incubando a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, a partir del caldo se inocularon tubos con agar inclinado, los cuales fueron incubados por 24 h a 30 °C y finalmente cubiertos con aceite mineral estéril para su conservación a temperatura ambiente y utilización de las cepas para las distintas pruebas. Todas las cepas aquí utilizadas se encuentran identificadas como pertenecientes al género *Vibrio* por la colección del CIAD y no fueron identificadas a nivel de especie en este estudio por ser parte de los objetivos del mismo.

ANTIBIOGRAMAS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA (BAUER ET AL. 1966).

La susceptibilidad de los diferentes microorganismos a los antibióticos puede determinarse por el método de difusión en agar, el cual derivó del método empleado en la estimación de la penicilina en el plasma. El principio del método consiste en el uso de una concentración constante de un antibiótico en un reservorio que se coloca sobre la placa de agar utilizada para el cultivo del microorganismo en cuestión. La susceptibilidad del organismo al antibiótico se manifiesta por una zona clara de inhibición alrededor del reservorio. El diámetro de la zona de inhibición es proporcional a la susceptibilidad del organismo en cuestión. Para su aplicación se desarrollaron

procedimientos estandarizados por la Organización Mundial de la Salud (Acar *et al.* 1986).

1. Se prepararon placas con agar Mueller-Hinton (MH; Difco, Detroit, E. U. A.) y se dejaron secar durante 24 h a una temperatura de 40 °C.
2. Cada cepa se sembró en una placa de agar de soya tripticaseína (TSA; Difco, Detroit, E. U. A.) y se incubó a 30 °C durante 24 h.
3. A partir del crecimiento obtenido en la placa de TSA, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 2.5 % estéril, para obtener una concentración semejante a 0.5 McFarland.¹
4. Se tomó el inóculo con un hisopo de algodón estéril y se sembró en un placa de agar MH, deslizando el hisopo por toda la caja, dejando reposar un mínimo de 3 y un máximo de 15 min.
5. A continuación se colocaron los sensidiscos de los distintos antibióticos utilizando pinzas estériles.
6. La placa se incubó durante 24 h a 30 °C.
7. Se midieron los halos de inhibición, clasificando las cepas de acuerdo con el resultado (Tabla 2).

Para el presente estudio se utilizaron multidiscos para bacterias Gram-negativas (Sanofi, México) para 12 antibióticos, y sensidiscos preparados en el laboratorio para oxitetraciclina (Sigma, San Louis, E. U. A.), florfenicol y enrofloxacin (Tabla 2), de acuerdo con la siguiente metodología (Hindler 1992):

1. Se utilizaron discos de papel estériles (Oxoid, Ontario, Canadá).
2. Se prepararon 1.0 ml de solución de cada antibiótico en tubos de ensaye, utilizando solución salina al 2.5 % previamente esterilizada y se agregaron 1.5 mg de oxitetraciclina o florfenicol y 0.25 mg de enrofloxacin. En el caso de la oxitetraciclina se usó buffer de fosfatos para disolver el antibiótico. Para mezclar la solución se utilizó un vortex.
3. A cada disco se le agregaron 20 µl de la solución del antibiótico.
4. Los discos se dejaron secar próximos a un mechero antes de ser aplicados.

¹ 0.5 McFarland corresponde a una concentración de $\times 10^8$ células ml^{-1} (Hindler 1992)

Tabla 2. Antibióticos empleados en esta tesis; límites de sensibilidad de la bacteria, de acuerdo con el diámetro del halo de inhibición en mm. Basado en Barry *et al.* 1985 y Code of federal regulations 1980.

Antibiótico	Abrev.	Sitio de Acción	Conc. µg	S	I	R
Amikacina	AK		30	≥ 17	15-16	≤ 14
Ampicilina	AM	Pared celular	10	≥ 14	12-13	≤ 11
Carbenicilina	CB	Pared celular	100	≥ 23	18-22	≤ 17
Cefalotina	CF	Pared celular	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefotaxima	CXT	Pared celular	30	≥ 23	15-22	≤ 14
Cetriaxona	CRO		30	≥ 21	14-20	≤ 13
Netilmicina	NET		30	≥ 15	13-14	≤ 12
Pefloxacina	PEF		5	≥ 23	15-22	≤ 14
Trimetroprim-Sulfametoxazol	SXT	Metabolismo	25	≥ 16	11-15	≤ 10
Cloramfenicol	CL	Ribosomas	30	≥ 18	13-17	≤ 12
Gentamicina	GE	Ribosomas	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Oxitetraciclina	OXT	Ribosomas	30	≥ 19	15-18	≤ 14
Florfenicol	FL	Ribosomas	30	≥ 21	17-20	≤ 16
Nitrofurantroína	NF	ADN	300	≥ 17	15-16	≤ 14
Enrofloxacin	ENR	ADN	5	≥ 21	16-20	≤ 15

MÉTODOS MOLECULARES

EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.

Durante la realización de este trabajo se utilizaron tres kits de extracción de plásmidos de proveedores diferentes: Qiagen tip20 (Valencia, California, E. U. A.), Promega Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification System (Madison, Wisconsin, E. U. A.) y Bio-Rad Quantum Prep (Hercules, California, E. U. A.). En todos los casos, los principios y procedimientos son los mismos.

La extracción de los plásmidos consistió en una lisis alcalina de las células bacterianas con una solución de NaOH/SDS en presencia de ARNasa (Birnboim y Doly 1979; Birnboim 1983), o de proteinasa K. El SDS rompe la capa de fosfolípidos y componentes proteínicos de la membrana celular, produciendo la lisis y liberación del contenido celular. El NaOH, desnaturaliza el ADN cromosomal y plasmídico, así como las proteínas.

La lisis se neutraliza por la adición de acetato de potasio ácido. La alta concentración de sales provoca la precipitación del SDS y de esta manera, las proteínas desnaturizadas, el ADN cromosomal y los desechos celulares quedan atrapados en el complejo de sal y detergente. El ADN plasmídico, siendo más pequeño y covalentemente cerrado, se renaturaliza y permanece en solución. El precipitado se remueve por centrifugación, y el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico se transfiere a un filtro, en donde las condiciones de salinidad y pH, junto con la selectividad de la resina utilizada en este, hacen que el plásmido quede atrapado, mientras que los demás componentes como RNA degradado y algunos desechos celulares que pudieran haber quedado en el sobrenadante son lavados del filtro. Finalmente el contenido de sales es removido y el ADN plasmídico es eluido ya sea en buffer TE o agua libre de endonucleasas.

En todos los pasos, la centrifugación fue a máxima velocidad (14,000 x g aproximadamente 12,138 rpm) en una ultra centrífuga con rotor para tubos eppendorf (Haereus, biofuge primo R, E. U. A.).

1. Cada cepa se sembró en estrías en placas de agar LB e incubó a 30 °C durante 24 h.
2. Se tomó una sola colonia con asa esterilizada del cultivo en placa y se inoculó siguiendo la técnica propuesta por Kado y Liu (1981) en caldo LB incubando durante 24 h a 30 °C.
3. Se transfirieron 1.5 ml del cultivo a un microtubo y se centrifugó durante 30 s; se decantó el sobrenadante.
4. El botón o pellet se resuspendió en la cantidad y solución proporcionada por el kit de acuerdo a sus instrucciones.
5. A continuación se añadió la solución de lisis, mezclando suavemente invirtiendo el microtubo varias veces.
6. Se añadió la solución de neutralización mezclando gentilmente. Se tuvo cuidado de no utilizar vortex en este y el paso anterior para evitar la mezcla de ADN plasmídico con ADN genómico.
7. Los desechos celulares fueron concentrados durante 5 min en la centrífuga.
8. El sobrenadante fue transferido a un filtro en un nuevo microtubo y centrifugado por 30 s.
9. Después de remover el filtro y descartar el líquido filtrado del fondo del tubo, se añadió el buffer de lavado y se centrifugó por 30 s.
10. De nuevo se repitió el paso anterior pero esta vez se centrifugó por 2 min.
11. Finalmente, el filtro fue colocado en un microtubo nuevo y el ADN se eluyó con 50 µl de agua libre de endonucleasas y centrifugado durante 1 min.

ELECTROFORESIS

El uso básico de la electroforesis consiste en separar moléculas de ácido nucleico por su tamaño. Esencialmente, un gel que contiene un buffer forma una red de moléculas a

través de la cual los ácidos nucleicos son conducidos por un campo eléctrico. A los pHs utilizados, la carga de la molécula de ADN resulta de la carga negativa de los grupos fosfato; por tanto, la fuerza de atracción hacia la terminal positiva será directamente proporcional al número de grupos fosfatos en la molécula y por ende a su tamaño (Howe 1995).

Una preparación de ADN plasmídico puede contener un mismo plásmido en una variedad de formas. La migración de los plásmidos en un gel está determinada tanto por el tamaño como por su estructura física. Los plásmidos superenrollados se mueven más rápido, debido a su estructura compacta, la estructura circular relajada y la lineal se mueven más lento por que experimentan una mayor resistencia al pasar a través del gel (Summers 1996).

1. Se prepararon 30 ml de gel de agarosa al 1 %, fundiendo la agarosa en buffer TBE (Tris-borato/EDTA) en el horno de micro-ondas, hasta comenzar la ebullición.
2. Una vez que la mezcla estaba tibia, se añadieron 30 μ l de bromuro de etidio, obteniendo una concentración final de 0.5 μ g ml⁻¹.
3. El gel se cargó con una mezcla de 7 μ l de muestra y 3 μ l de buffer de carga, preparada sobre la superficie de un papel parafilm (American National Can, Menasha, Wisconsin, E. U. A.).
4. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal, aplicando un voltaje de aproximadamente 80 V durante 1 h con 15 min para permitir la migración de los plásmidos a través del gel.
5. Al finalizar la corrida, el gel se colocó sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (302 nm, UVP 3,527, E. U. A.) donde se observaron y fotografiaron las bandas de los plásmidos (*f* 16-22, 1 s). Se utilizó una cámara fotográfica (Polaroid Gel Cam, modelo H34-EI, Janesville, Wisconsin, E. U. A.) con película Polaroid (Polapan 667 , Querétaro, México).
6. Una vez identificada la presencia de plásmidos, éstos fueron caracterizados por su peso molecular al comparar con el marcador de peso molecular Marker III (0.12-21.2 kb; λ ADN digerido con Eco RI y Hind III) de Boehringer Mannheim, Alemania.

“CURING” DE PLÁSMIDOS

La eliminación del plásmido de una bacteria (“curing”) es la mejor manera de probar la relación entre cierta expresión de origen genético y su presencia en un plásmido. Ya que el “curing” causa la pérdida del plásmido, la o las características codificadas por este no serán expresadas por las células que hayan sido “curadas”. La reintroducción del plásmido debe, por lo tanto, ser acompañada por la recuperación de la característica que este codifica (Crosa *et al.* 1994).

Los agentes utilizados en el “curing” de plásmidos son efectivos sólo para algunos de ellos, y su respuesta es generalmente impredecible. Al no existir un agente de “curing” efectivo para todos los casos los experimentos de “curing” se hacen a prueba y error. En la mayoría de los casos el o los mecanismos involucrados en el “curing” son desconocidos (Stanisich 1988). Uno de estos mecanismos es la interferencia directa con la replicación del plásmido como en el caso de las acridinas o el bromuro de etidio (Hohn y Kohn 1969; Wechsler y Kline 1980; citados en Stanisich 1988).

Alternativamente, los agentes pueden interferir con el crecimiento de la bacteria que lleva el plásmido, permitiendo de esta manera que predominen las que no lo tienen, debido a errores en el proceso de replicación o partición. Esto ocurre en algunos casos con las acridinas, dodecil sulfato de sodio y urea (Tomoeda, *et al.* 1968; Yoshikawa 1971; Salisbury *et al.* 1972; citados en Stanisich 1988).

En este estudio, para provocar la pérdida del o los plásmido(s), se probaron tres agentes químicos distintos, sobre la base de lo recomendado por Crosa *et al.* (1994). Estos fueron: naranja de acridina, bromuro de etidio y dodecil sulfato de sodio (SDS), (Sigma Chemical, San Louis, E. U. A.).

Los tres tratamientos se aplicaron por triplicado a tres cepas para evaluar su eficacia y elegir uno. A continuación se describe en que consistió cada uno.

Cada cepa fue inoculada en caldo LB e incubada 24 h a 30 °C. El medio LB utilizado en todos los procedimientos se preparó con 2.5 % de NaCl.

◆ Dodecilsulfato de sodio (SDS)

1. Se prepararon tubos de ensaye con 2 ml de caldo LB al 10 % de SDS.
2. Dichos tubos, fueron inoculados con 200 µl de cultivo e incubados a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 24 h.

◆ Naranja de Acridina

1. Se prepararon tubos de ensaye con 2 ml de caldo LB a concentraciones de: 50, 100 y 200 µg ml⁻¹ de naranja de acridina.
2. Los tubos se inocularon con 200 µl de cultivo e incubados a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 24 h.

◆ Bromuro de Etidio

1. Se prepararon tubos de ensaye con 2 ml de caldo LB a concentraciones de: 50, 100 y 200 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio.
2. Los tubos fueron inoculados con 200 µl de cultivo e incubados a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 24 h.

- ◆ Después de cada tratamiento, se hicieron diluciones en serie de cada réplica en solución salina estéril; se sembró en placas de agar LB y se incubó a 30 °C durante 24 h.

- ◆ A continuación se seleccionaron 5 colonias de cada tratamiento, provenientes de la concentración más alta, y se les hicieron antibiogramas por duplicado para los antibióticos a los cuales presentaban resistencia. Al mismo tiempo, se realizaron antibiogramas de cada cepa sin tratamiento, a modo de control para comparar los cambios de resistencia.
- ◆ Finalmente se seleccionó una colonia de cada tratamiento, de acuerdo con los resultados de los antibiogramas, a la que se hizo extracción de ADN y electroforesis para confirmar la pérdida o permanencia del plásmido en la bacteria.

Con base en los resultados obtenidos en estas pruebas, se optó por aplicar el tratamiento a base de bromuro de etidio a una concentración de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ para las cepas restantes con algunas modificaciones:

1. Después de la incubación en LB con bromuro de etidio (paso 2), las células se centrifugaron a 4,000 rpm (2,218 x g) durante 1 min.
2. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de solución salina al 2.5 %, y se volvió a centrifugar a 4,000 rpm (2,218 x g) durante 1 min.
3. Se repitió el paso anterior dos veces más, con el fin de diluir la concentración de bromuro de etidio aún existente en el pellet bacteriano.
4. Se hicieron diluciones y se sembró en placas de agar LB que se incubaron a 30 °C durante 24 h.
5. Se seleccionaron cinco colonias de cada cepa; cada colonia fue resuspendida en 1 ml de NaCl al 2.5 %.
6. A partir de esta suspensión, se inoculó una placa de agar Mueller-Hinton y se hicieron los antibiogramas para los antibióticos a los que presentaba resistencia, por duplicado y se incubó 24 h a 30 °C.
7. Finalmente se midieron los halos y se seleccionaron aquellos que presentaban cambios con respecto a los controles, para realizar la extracción de ADN plasmídico. En los casos en los que no hubo cambio en el diámetro de los halos se escogió una de las colonias al azar para la extracción.
8. Para la extracción, se sembró por estría en agar LB a partir de la suspensión bacteriana para obtener colonias aisladas para la inoculación del caldo LB.

Posteriormente se hizo una tercera modificación a la técnica, que se aplicó a las cuatro cepas que presentaban un mayor cambio en sus halos de inhibición y que habían perdido su(s) plásmido(s). La finalidad fue aumentar el número de colonias seleccionadas, con las que se probara el antibiótico o antibióticos a los que presentaban resistencia, para de esta manera tener más probabilidades de obtener una colonia que hubiera perdido su(s) plásmido(s), en el caso de que no en todas las células sometidas al tratamiento se lograra el "curing". También fue necesario repetir el "curing" con estas cepas, debido a que no habían sido conservadas y por tanto no se contaba con ellas para la siguiente etapa del estudio.

Antes de someter a las cepas seleccionadas al tratamiento con bromuro de etidio, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, por sus siglas en inglés)

de cada cepa con sus antibióticos correspondientes para determinar la concentración de antibiótico a ser aplicado en cada caso.

El cambio consistió en que:

1. Se prepararon placas de 96 micropozos con 100 μ l de LB con la concentración adecuada del antibiótico.
2. Cada micropozo fue inoculado con 50 μ l de las suspensiones bacteriana obtenidas al resuspender cada colonia seleccionada en 1 ml de solución salina, como se mencionó antes.
3. En esta ocasión se seleccionaron 13 colonias de cada cepa y cada una de ellas se probó con el o los antibióticos correspondientes a su resistencia.
4. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h, al término de las cuales se realizó su lectura, de acuerdo con su turbidez.
5. Se seleccionaron aquellas colonias que no presentaban crecimiento, o en las que éste era mínimo; es decir, menos turbias, comparándolas con los controles. Los controles consistieron en: la cepa sin tratamiento como control positivo y como control negativo, el medio sin inóculo.
6. A partir de los resultados obtenidos en las placas, se seleccionaron cinco colonias de cada cepa a las que se hicieron antibiogramas como se explicó en el procedimiento anterior, así como la extracción de ADN plasmídico y electroforesis.

TRANSFORMACIÓN

La transformación es el proceso mediante el cual una célula puede tomar y expresar ADN exógeno. Los puntos cruciales en este proceso son la adquisición de competencia (el potencial de ser transformada), la unión del ADN a la superficie celular, toma e integración cromosomal o recirculación de la molécula transformadora (Summers 1996).

Preparación de células competentes (Sambrook *et al.* 1989).

La única cepa que perdió su resistencia a un antibiótico después de perder su plásmido fue HL60, la cual se sembró en estrías en una placa de agar LB al 2.5 % de NaCl e incubó a 30 °C por 24 h.

1. Se inoculó una colonia en 100 ml de LB en un matraz de 250 ml e incubó a 30 °C por 3 h, con agitación constante a 300 rpm.
2. El cultivo se distribuyó en dos tubos estériles de propileno de 50 ml, previamente enfriados en hielo. El cultivo se enfrió dejando los tubos en hielo durante 10 min.
3. A continuación las células se recuperaron centrifugando a 4,000 rpm (2,218 x g) durante 10 min a 4°C.
4. El medio fue decantado y el tubo colocado en posición invertida por espacio de 1 min para drenar las trazas de medio que hubieran quedado.

5. Cada pellet se resuspendió en 10.0 ml de CaCl₂ 0.1M, previamente enfriado en hielo.
6. En seguida, se recuperaron las células centrifugando a 4,000 rpm (2,218 x g). Se decantó el líquido y los tubos se invirtieron durante 1 min.
7. Los pellets se resuspendieron en 2.0 ml de CaCl 0.1M previamente enfriado en hielo.
8. La suspensión se distribuyó en tubos Eppendorf estériles, a razón de 50 µl por microtubo, una parte fue almacenada a -70 °C y al mismo tiempo se procedió a realizar la transformación de las células competentes.

Transformación de células competentes (Sambrook et al. 1989).

Además de las células competentes de HL60sp preparadas en el laboratorio, también se llevó a cabo la transformación de células competentes comerciales de *Escherichia coli* DH5α (GIBCO, California, E. U. A.).

En ambos casos se probó hacer la transformación con el plásmido extraído de HL60 con y sin reacción de ligación, a manera de prevención, en caso de que el plásmido no se encontrara en forma circular; también se hicieron transformaciones utilizando el plásmido comercial puc19 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts).

1. A cada 50 µl de células competentes, se añadieron 5.0 µl, ya fuera de plásmido solo, de reacción de ligación o de puc19 . Los tubos se conservaron siempre en hielo.
2. Se agitó brevemente y se incubó en hielo por 30 min.
3. La mezcla se sometió a un shock térmico mediante la incubación a 37 °C por 20 s.
4. Se añadieron 2.0 ml de medio SOC y se incubaron a 37 °C las preparaciones con DH5α y a 30 °C aquellas hechas con HL60; en ambos casos los cultivos se mantuvieron en agitación a 240 rpm por 1 h.
5. Los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm (2,218 x g). Enseguida, se descartó el sobrenadante y el pellet se disolvió en el líquido residual.
6. Finalmente se sembró en placas de LB con y sin antibiótico (con concentraciones de 500, 1,000 y 1,500 µg de cefalotina); se incubaron a 30 y 37 °C 24 h, HL60sp y DH5α respectivamente.
7. Se llevó a cabo la extracción de ADN para cada concentración, tanto de HL60sp como de DH5α .

RESULTADOS

PROCEDENCIA DE LAS CEPAS

De las 100 cepas utilizadas, 17 fueron aisladas de organismos aparentemente sanos y 83 de organismos que presentaban alguna lesión o afección. Del total de las cepas, 93 correspondieron a organismos juveniles, 5 a ejemplares reproductores y 2 a larvas (Fig. 3).

Las cepas se colectaron de organismos cultivados en los estados de: Sinaloa (57 de la región sur 19 de la región norte y 7 de la región central), Nayarit (15), Sonora (1). También se incluyó una cepa proveniente de Japón (Fig. 4).

Las bacterias estudiadas se aislaron de hemolinfa de camarón (HL), hepatopáncreas (HP), macerado de estómago con hepatopáncreas (CE), lesiones (LE), exoesqueleto (EX), estómago (ST), gónadas de reproductores (RE) y larvas con síndrome de bolitas (PB). En la figura 5 se muestran los porcentajes correspondientes a cada uno de estos.

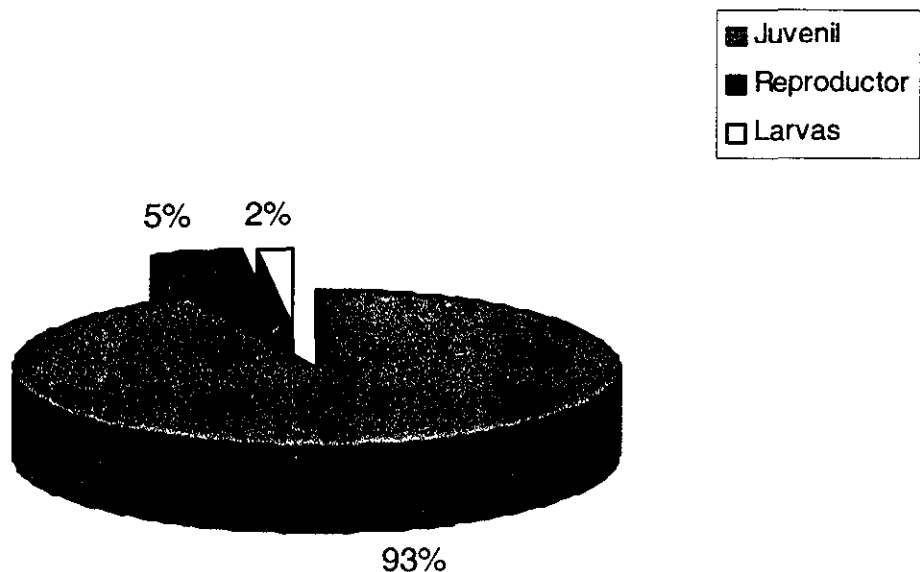


Figura 3. Camarones peneidos de los que se aislaron las cepas bacterianas (porcentaje).

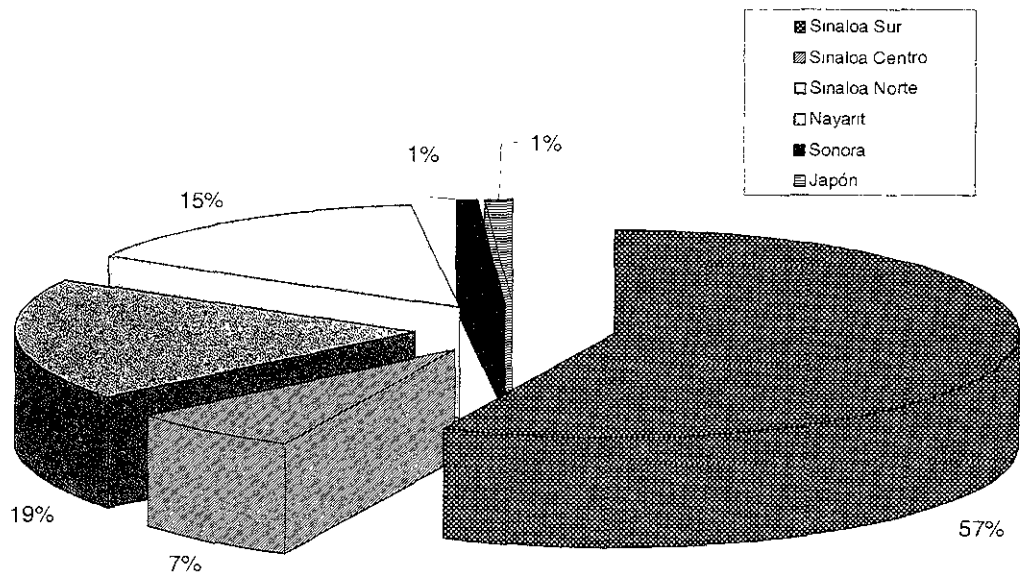


Figura 4. Procedencia de las cepas utilizadas en esta tesis según su región de origen.

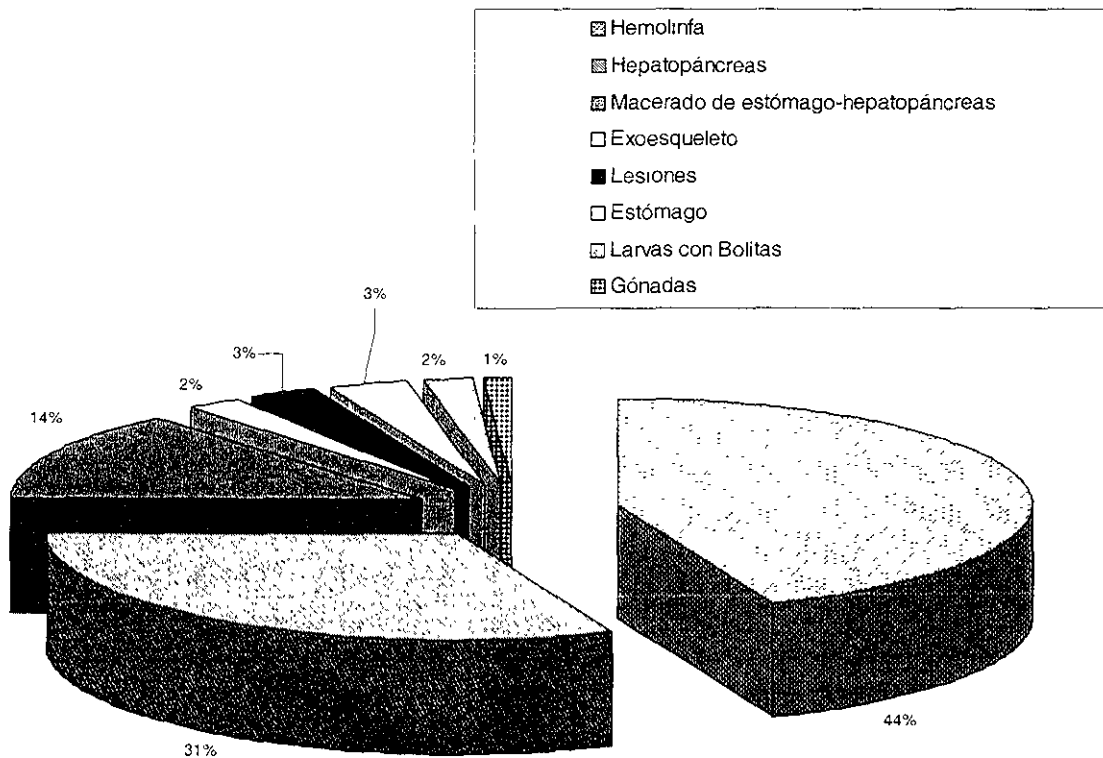


Figura 5. Procedencia de las cepas de acuerdo a la parte del organismo del que fueron aisladas.

SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS.

La sensibilidad de las cepas bacterianas analizadas presentó resultados variables (Tabla 3). El 83% de las cepas analizadas presentó resistencia a uno o más de los antibióticos probados.

En la figura 6 se muestra la sensibilidad de las cepas analizadas, en porcentaje, a cada uno de los antibióticos. Cabe destacar que ninguna de las cepas estudiadas fue resistente a enrofloxacin (ENR) para el que se observó un 95% de sensibilidad y 5% de sensibilidad intermedia, florfenicol (FL) con 98% de sensibilidad y 2% de sensibilidad intermedia o ceftriaxona (CRO) que presentó 93% de sensibilidad y 7% de sensibilidad intermedia. Además de estos se observó una alta sensibilidad con netilmicina (NET) 99%, cloranfenicol (CL) 94%, gentamicina (GE) 94% y trimetropim-sulfametoxazol (SXT) 93%.

Las sensibilidades intermedias más elevadas fueron para la pefloxacina (PEF) 53%, seguida por la amikacina (AK) y oxitetraciclina (OTC) con 36% y 25% respectivamente. Sólo 12 de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos y sólo una fue resistente a 8 de los 15 antibióticos probados. La mayor parte de las cepas fue resistente a la carbencilina (CB) y ampicilina (AM), 69% y 67% respectivamente.

Los diámetros de los halos de inhibición más amplios se obtuvieron con enrofloxacin (Promedio 28.64 mm, Max. 52.00, Min. 18.50, n=100, S.D. 5.54, Fig. 7) y los más pequeños se observaron con ampicilina (Promedio 12.03 mm, Max. 30.00, Min. 6.00, n=100, S.D. 7.22).

Los porcentajes de resistencia más altos en las cepas aisladas de organismos enfermos fueron: carbencilina (71.08%) y ampicilina (68.67%). Las sensibilidades más altas se presentaron con: netilmicina (100%), florfenicol (97.59%) y gentamicina (96.39%) (Fig. 8).

En las cepas aisladas de organismos sanos, los porcentajes de resistencia más altos se observaron con oxitetraciclina (58.82%), ampicilina y carbencilina (52.94%), y las mayores sensibilidades se registraron para el florfenicol y ceftriaxona, alcanzando el 100% en ambos casos (Fig. 9).

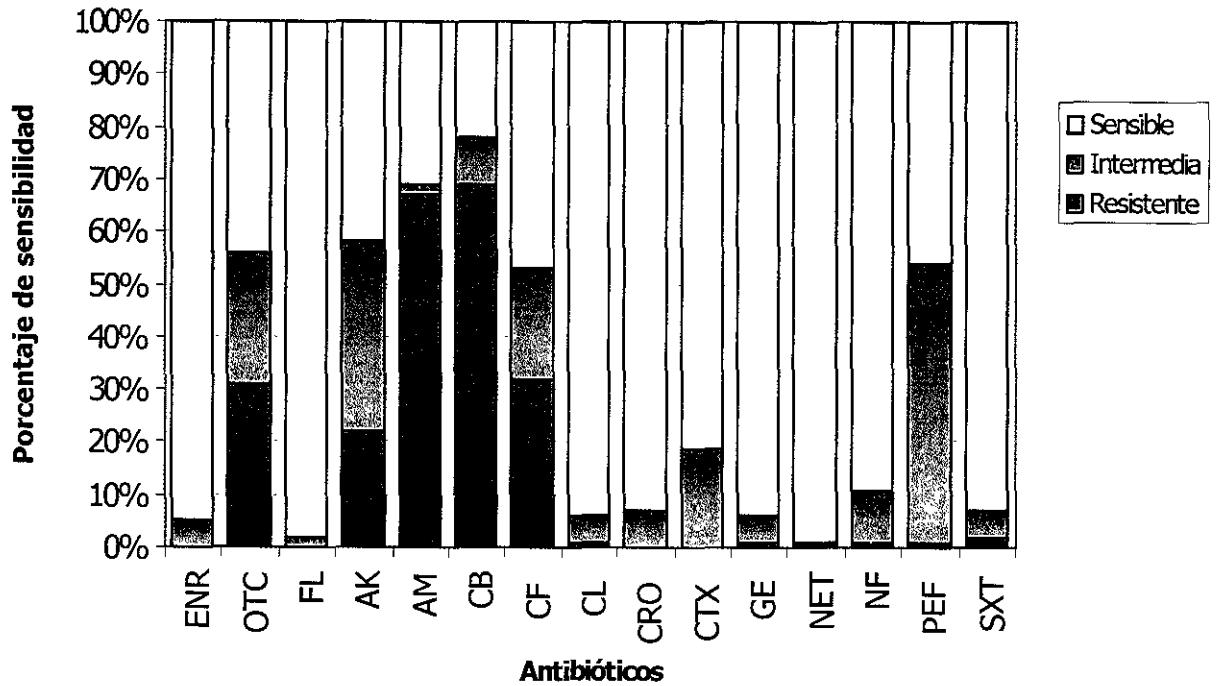


Figura 6. Porcentaje de cepas bacterianas de acuerdo a su sensibilidad a cada antibiótico.

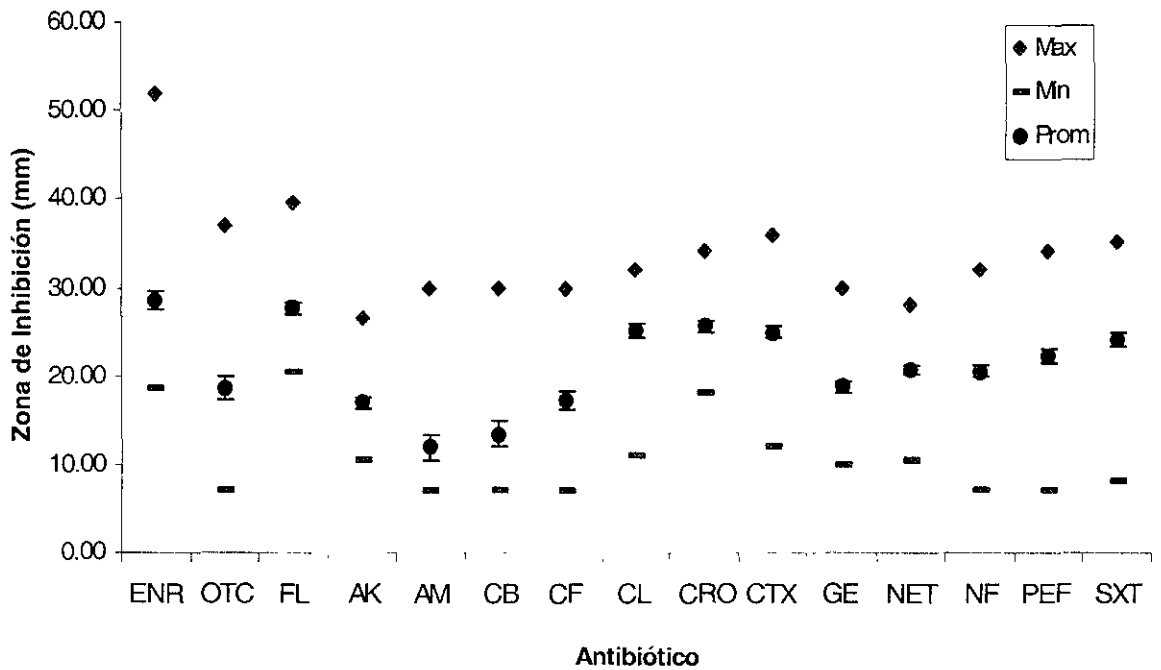


Figura 7. Zona de inhibición promedio de las cepas para los distintos antibióticos aplicados, el intervalo de confianza del 95%. Así como los valores máximos y mínimos.

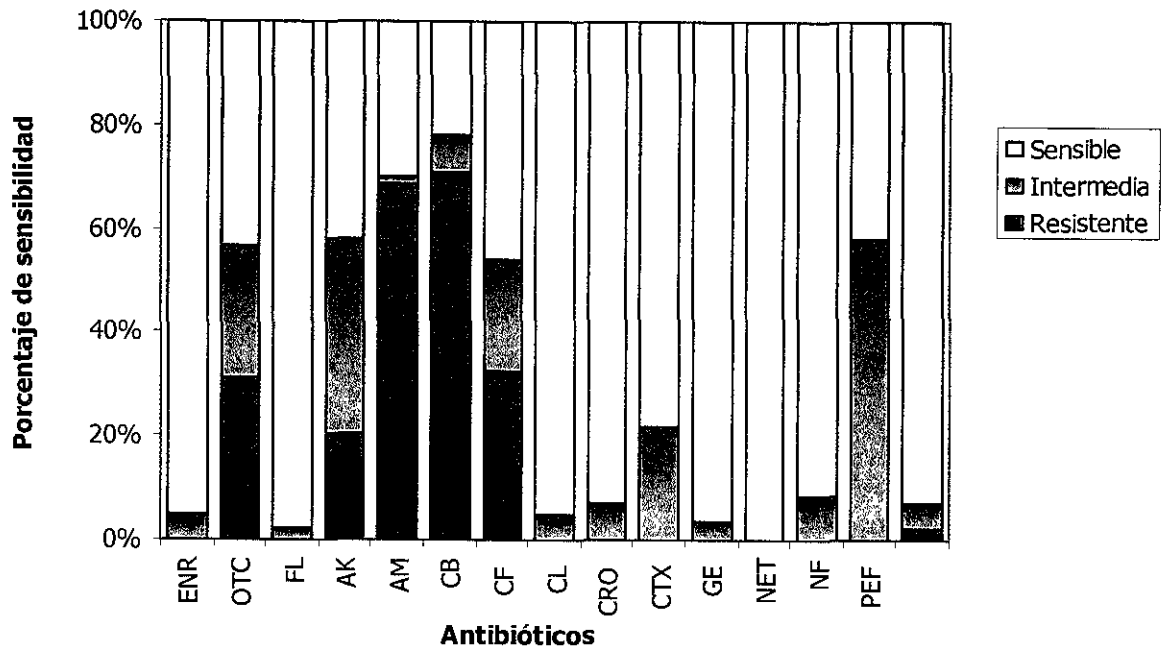


Figura 8. Susceptibilidad de las cepas aisladas de organismos enfermos a los antibióticos probados.

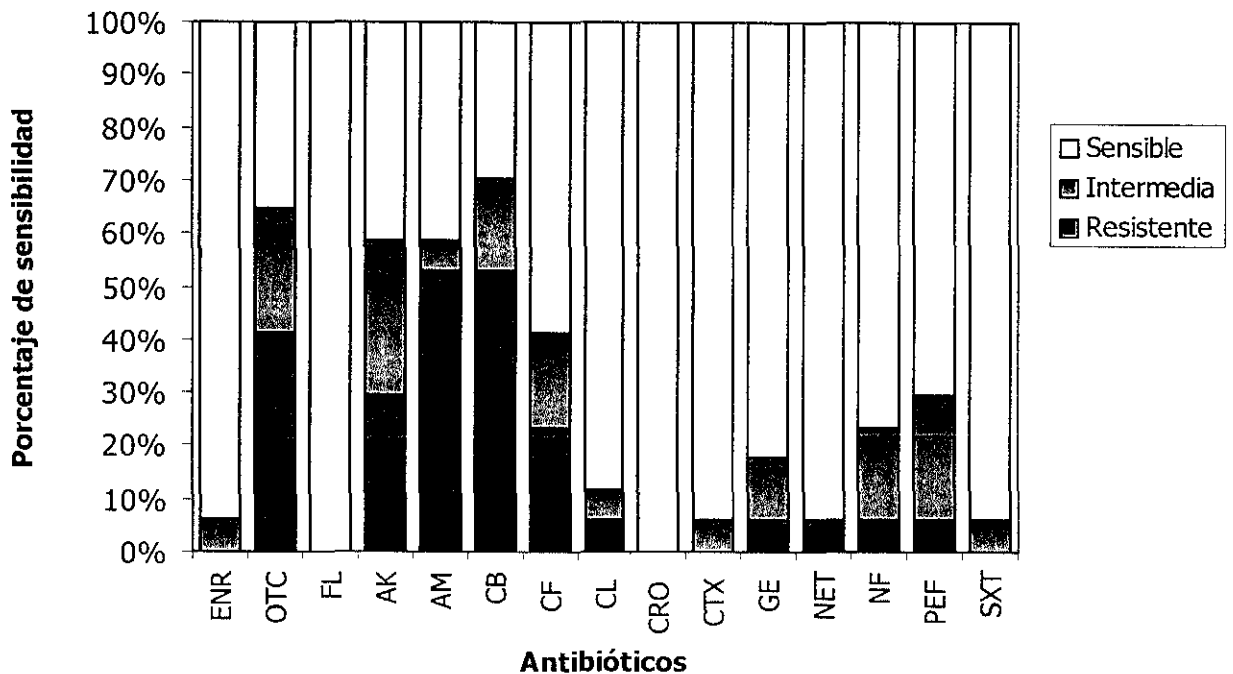


Figura 9. Sensibilidad de las cepas aisladas de organismos sanos a los antibióticos.

PRESENCIA DE PLÁSMIDOS.

Se analizó la presencia o ausencia de plásmidos para el 30% de las cepas, para lo cual se escogieron al azar cepas con resistencia a uno o varios antibióticos, así como algunas cepas sensibles a todos los antibióticos. Esto con el fin de aumentar las posibilidades de encontrar algún plásmido que confiriera resistencia a uno o más antibióticos.

De las 30 cepas analizadas, 25 (83%) resultaron contener uno o más plásmidos (Tabla 5; Fotos 1, 2, 3); 13 de ellas presentan un solo plásmido de aproximadamente 21 kb pares de bases (pb), 1 con un plásmido de 37,436 pb, 1 con un plásmido de 12,816 pb, 1 con uno de 23 kb, 2 contienen 2 bandas de 21 kb y 84 kb, 1 presenta 2 bandas de 21 kb y 83 kb, 1 tiene 2 bandas de 21 y de 0.8 kb, 1 contiene 3 bandas de 21, 3 y 0.8 kb, otra 3 de 21, 6 y 3 kb y una más 3 de 21, 2 y 1, finalmente una cepa presentó 6 bandas de 84, 54, 37, 26, 21 y 6 kb.

“CURING” DE PLÁSMIDOS.

En las pruebas preliminares para la eliminación de los plásmidos se utilizaron las cepas HL2, HL33 y HL61 (Foto 4). La tabla 4 muestra los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos aplicados. En el caso del naranja de acridina sólo fue posible hacer extracción para la concentración de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, ya que fue la única en la que presentaron crecimiento y fue suficiente para provocar la pérdida de los plásmidos en todas las cepas. Ninguna de las cepas perdió los plásmidos con el tratamiento a base de SDS al 10%. Sólo HL2 perdió sus plásmidos con la concentración de bromuro de etidio de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que las 3 cepas los perdieron con la concentración de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$.

A partir de los resultados anteriores se escogió el tratamiento de bromuro de etidio a la concentración de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, ya que si bien todas las cepas perdieron sus plásmidos con el naranja de acridina a la concentración de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ los residuos no pueden ser desechados de una manera segura para la salud. Sin embargo, a pesar de que el bromuro de etidio, al igual que el naranja de acridina, es un compuesto cancerígeno y mutagénico de alto riesgo, existe una forma de neutralizarlo (Apéndice I) de tal manera que puede ser desechado sin riesgos.

Dicho tratamiento se aplicó a todas las cepas en que se encontraron plásmidos y que presentaban resistencia a uno o más antibióticos. Se trató un total de 21 cepas, de las cuales 7 perdieron sus plásmidos: HL2, HL33, HL51, HL60, HL61, HL108 y HP43 (Tabla 5; Fotos 5, 6, 7, 8). Las 17 cepas que no perdieron su contenido plasmídico varían tanto en su perfil plasmídico como en su resistencia a los antibióticos entre sí.

Todas, a excepción de HL2, presentaron cambios en su sensibilidad a los antibióticos; de estas se seleccionaron aquellas cuyo cambio fue mayor: HL33, HL51, HL60 y HP43

(Tabla 6), para estas cepas se determinó la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos a los que eran resistentes (Tabla 7).

Finalmente, después de aplicar el tratamiento de “curing” a las 4 cepas, se seleccionaron 13 colonias de cada cepa, que fueron probadas con la concentración correspondiente de antibiótico como se explicó anteriormente en la metodología. De las 13 colonias, se seleccionaron las 5 de cada cepa que no presentaron o presentaron menor crecimiento. En los antibiogramas aplicados a éstas, sólo se observó un cambio en una colonia de la cepa HL60 que pasó de ser resistente a cefalotina a ser sensible (Foto 9).

Las extracciones y electroforesis realizadas a las 4 cepas mostraron que la única cepa que perdió su plásmido fue HL60, con la que se llevaron a cabo las pruebas de competencia y transformación (Foto 10).

Se logró hacer competente a la cepa HL60sp (sin plásmido), así como transformarla con el plásmido que contenía la misma cepa originalmente que codifica para resistencia a cefalotina y de la misma manera se consiguió transformar células competentes de DH5 α (Gibco, California, E. U. A.) con el mismo plásmido.

En ambos casos se observó la expresión del plásmido, es decir la manifestación de la resistencia a cefalotina, al darse el crecimiento de las bacterias en LB agar preparado con el antibiótico y la presencia de éste en las células se corroboró por medio de electroforesis (Foto 11). Estos procedimientos se llevaron a cabo en dos ocasiones, ambas con éxito.

Tabla 3. Antibiogramas de las cepas analizadas, diámetro en mm y su equivalente de acuerdo a la tabla de sensibilidad: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R).

Organismo	Procedencia	Cepa	AK	AM	CB	CF	CXT	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	ENR	OXT	FL
Juvenil	Sinaloa Sur	CE1	S	R	R	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	I
			18.0	7.0	7.0	16.5	24.5	21.0	26.0	21.0	20.0	16.5	20.5	25.5	25.5	14.0	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE3	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
			15.0	7.0	7.0	15.0	26.0	25.0	26.0	17.5	18.5	17.0	19.0	18.0	28.5	15.5	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE4	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
			16.5	7.0	7.0	22.0	26.0	27.5	30.0	19.5	23.5	19.0	20.5	22.5	26.5	13.2	29.5
Juvenil	Sinaloa Sur	CE5	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			14.0	7.0	16.0	16.0	25.0	25.5	25.0	17.5	18.5	17.5	19.5	20.0	29.5	14.2	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE6	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S
			15.0	7.0	15.5	18.5	23.0	24.5	28.0	18.0	20.0	16.5	20.0	26.5	24.5	14.0	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE8	I	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	I	I	I
			15.0	7.0	16.0	17.5	25.5	26.0	27.0	18.0	20.0	18.0	19.5	25.5	24.0	14.5	28.5
Juvenil	Sinaloa Sur	CE9	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
			13.5	7.0	7.0	20.0	26.0	26.5	28.0	20.0	19.5	19.0	20.0	30.5	7.0	32.0	
Juvenil	Sinaloa Sur	CE10	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			15.0	7.0	16.0	20.0	24.5	25.0	28.0	18.0	20.0	19.5	19.5	25.5	26.0	15.5	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE11	I	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			16.0	7.0	16.5	17.0	23.5	24.0	27.5	19.5	19.5	19.0	20.0	26.0	26.5	16.5	29.5
Juvenil	Sinaloa Sur	CE12	I	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			15.5	7.0	16.5	17.0	27.0	27.5	25.0	19.0	18.0	17.0	19.5	23.5	25.0	15.5	30.5
Juvenil	Sinaloa Sur	CE13	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			15.5	7.0	7.0	18.0	25.0	23.5	27.5	19.0	19.0	17.5	19.0	24.5	26.5	14.5	29.8
Juvenil	Sinaloa Sur	CE14	I	R	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S
			16.0	7.0	16.5	18.5	25.5	26.0	26.0	20.0	20.0	16.0	19.5	20.5	24.5	16.3	30.5
Juvenil	Sinaloa Sur	CE15	I	R	R	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	I	S
			16.0	7.0	7.0	17.5	27.5	28.5	27.5	19.5	20.0	16.5	19.0	26.0	29.0	15.5	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	CE16	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
			13.5	7.0	7.0	18.0	25.0	23.0	25.0	16.5	21.5	17.0	18.0	25.5	28.5	14.0	29.5
Juvenil	Sinaloa Sur	EX1	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
			18.8	7.0	7.5	11.3	20.3	24.8	29.0	20.0	20.2	23.0	22.6	30.4	18.5	23.0	25.0
Juvenil	Sinaloa Sur	EX2	I	R	R	I	I	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			16.0	7.0	7.5	15.5	22.5	23.0	26.0	19.5	22.0	20.0	20.0	29.0	28.5	15.5	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL2	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			15.5	7.0	11.5	17.0	26.0	29.0	27.0	19.0	20.0	20.0	25.5	25.0	27.5	22.0	26.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HL3	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			15.5	25.0	26.5	23.0	30.0	30.0	25.0	18.5	22.5	17.5	30.0	29.0	35.5	14.5	25.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL25	I	R	R	R	I	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S
			16.5	7.0	9.0	12.0	28.0	20.0	22.0	28.0	19.0	19.0	18.5	22.0	22.0	25.0	30.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL29	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			15.2	7.5	7.5	14.4	23.8	27.6	16.9	16.0	17.8	16.9	24.0	13.9	20.0	28.0	23.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL30	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
			18.0	7.0	7.0	17.0	25.0	22.0	30.0	18.0	21.0	18.0	23.0	25.0	32.5	25.0	26.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL32	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			12.0	10.0	16.0	21.0	26.0	30.0	23.0	16.0	18.0	19.5	26.0	23.0	27.0	29.0	32.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL33	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
			15.5	7.0	7.0	29.5	28.0	25.0	29.0	19.0	21.0	22.0	20.0	26.0	27.0	23.5	22.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	26.0	32.0	34.5
Juvenil	Sinaloa Norte	HL35	I	R	R	R	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
			16.0	7.0	7.0	14.0	20.5	22.5	26.0	17.5	19.0	20.5	19.0	24.0	21.5	30.0	28.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL36	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			26.5	7.0	7.0	17.5	26.0	22.0	29.0	17.0	22.0	23.5	25.0	26.0	19.5	24.0	
Juvenil	Sinaloa Norte	HL37	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
			14.0	7.0	7.0	19.0	26.0	25.0	30.0	21.0	23.0	21.0	22.5	24.0	26.0	24.0	29.0

Amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CXT), ceftriaxona (CRO), cloramfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoína (NF), pefloxacina (PEF), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), florfenicol (FL)

Tabla 3. Antibiogramas de las cepas analizadas, diámetro en mm y su equivalente de acuerdo a la tabla de sensibilidad: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R).

Organismo	Procedencia	Cepa	AK	AM	CB	CF	CXT	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	ENR	OXT	FL
Juvenil	Sinaloa Norte	HL38	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			16.0	7.0	7.0	14.0	22.5	22.0	22.0	17.0	19.0	20.0	18.0	20.0	22.5	22.8	23.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL39	I	R	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	
			15.5	7.0	7.0	17.0	22.0	22.5	24.5	19.0	18.0	19.0	21.5	18.0	27.5	14.0	30.5
Juvenil	Sinaloa Norte	HL40	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			16.0	7.0	7.0	13.5	23.0	22.0	25.5	17.0	20.0	19.5	19.0	18.0	25.0	27.0	29.0
Juvenil	Nayarit	HL41	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	40.0	37.0	30.0
Juvenil	Nayarit	HL42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			17.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	21.0	25.0	25.0	25.0	25.0	29.0	23.0	33.0
Juvenil	Nayarit	HL44	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			14.0	20.0	13.0	22.0	25.0	25.0	24.0	17.0	18.0	25.0	25.0	30.0	36.0	30.5	30.0
Juvenil	Nayarit	HL45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	20.0	23.0	19.0	25.0	30.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	29.0	28.8	28.5
Juvenil	Nayarit	HL46	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	11.0	25.0	34.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	42.0	29.5	39.5
Juvenil	Nayarit	HL48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	27.0	28.0	30.5
Juvenil	Nayarit	HL49	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			12.0	20.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	27.0	21.0	31.0
Juvenil	Nayarit	HL50	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	41.0	27.3	27.0
Juvenil	Nayarit	HL51	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			19.0	7.0	7.0	7.0	25.0	20.5	19.0	27.0	25.0	22.5	24.5	26.0	30.0	15.0	31.0
Juvenil	Nayarit	HL52	S	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
			18.0	10.0	11.0	14.0	36.0	32.0	30.0	16.0	24.0	24.0	34.0	35.0	36.0	16.0	23.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HL53	S	R	S	I	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
			16.0	10.0	7.0	11.0	20.0	26.0	27.0	16.0	21.0	21.0	29.0	30.0	35.0	14.5	23.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL54	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	
			18.0	7.0	7.0	7.0	30.0	25.0	30.0	21.0	20.0	24.0	20.0	30.0	25.0	11.0	29.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HL55	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			20.0	7.0	13.0	9.0	26.0	30.0	30.0	20.0	20.0	20.0	21.0	27.0	22.5	8.5	27.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HL56	S	R	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S		I	S
			18.0	7.0	7.0	7.0	15.0	18.0	22.5	23.0	24.0	23.0	23.5	26.0	24.0	27.0	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL57	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
			18.0	7.0	7.0	7.0	20.0	25.0	30.0	16.0	19.0	24.0	20.0	22.0	20.0	19.0	29.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL58	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
			16.0	7.0	12.0	9.0	23.0	30.0	30.0	16.0	20.0	25.0	20.0	25.0	20.0	21.0	27.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			18.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	16.0	16.0	32.0	24.0	30.0	29.5	24.0	28.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HL60	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			21.0	18.5	14.5	7.0	25.5	24.5	27.0	23.0	20.5	29.0	19.0	27.0	35.0	19.5	28.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HL61	R	R	R	R	I	S	I	I	S	R	I	I	S	I	S
			13.0	7.0	7.0	7.0	18.0	23.0	14.0	14.0	17.0	15.0	17.0	13.0	28.0	17.0	27.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL77	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
			13.0	23.0	20.0	21.0	25.0	25.0	22.0	16.0	20.0	22.0	27.0	26.0	23.5	15.5	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL86	R	R	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
			23.0	22.0	26.0	22.0	30.0	29.0	23.0	20.0	21.0	25.0	25.0	29.0	36.0	15.5	29.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HL97	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	22.0	23.0	21.5	25.0	30.5	23.0	19.0	25.0	21.0	28.5	26.0	30.0	15.8	32.5
Juvenil	Sinaloa Norte	HL105	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			16.0	7.0	7.0	13.0	21.0	21.0	25.0	16.0	20.0	19.5	17.0	26.5	23.5	22.0	21.0
Juvenil	Sinaloa Centro	HL106	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
			16.0	7.0	17.5	18.0	27.0	25.0	25.0	18.0	19.0	20.5	26.0	27.0	27.5	16.5	26.0
Juvenil	Sinaloa Centro	HL107	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			12.5	7.0	7.0	15.0	23.5	22.0	27.0	18.0	18.0	18.0	16.5	24.0	23.0	24.8	27.0
Juvenil	Sinaloa Centro	HL108	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			17.0	7.0	7.0	14.0	25.0	26.5	27.0	18.0	20.0	23.0	22.0	23.5	24.0	23.5	25.0
Juvenil	Sinaloa Centro	HL109	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			18.5	7.0	7.0	26.0	22.0	24.0	27.5	17.0	20.0	20.0	21.0	24.0	28.0	23.0	24.0

Amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CXT), ceftriaxona (CRO), cloramfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoina (NF), pefloxacin (PEF), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), florfenicol (FL)

Tabla 3. Antibiogramas de las cepas analizadas, diámetro en mm y su equivalente de acuerdo a la tabla de sensibilidad: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R).

Organismo	Procedencia	Cepa	AK	AM	CB	CF	CXT	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	ENR	OXT	FL
Juvenil	Sinaloa Centro	HL110	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
			17.0	13.0	7.0	18.5	24.5	25.5	28.0	20.5	21.5	21.0	21.5	26.0	24.5	24.8	29.5
Juvenil	Sinaloa Centro	HL111	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	S
			17.5	7.0	17.5	16.0	26.0	23.0	28.0	19.0	21.0	21.5	22.5	10.0	26.0	14.0	22.8
Juvenil	Nayant	HL112	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	19.0	23.0	18.5	25.0	29.0	23.0	23.5	25.0	26.0	26.0	25.0	32.0	29.5	33.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	28.0	23.0	26.0	25.0	26.0	28.5	29.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP17	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			19.0	7.0	7.0	8.0	30.0	31.0	32.0	19.0	21.0	16.0	21.0	26.0	26.5	17.0	27.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP22	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			24.5	7.0	7.0	11.5	23.0	27.0	26.0	18.0	19.0	17.5	15.0	24.5	24.0	13.0	28.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP26	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I
			12.0	10.0	24.0	18.0	32.0	26.0	11.0	10.0	10.5	7.0	7.0	18.0	52.0	14.0	24.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP27	I	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			15.0	12.0	7.0	17.0	23.0	28.0	27.0	16.0	18.0	18.0	24.0	26.0	28.5	16.0	27.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP28	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			17.0	7.0	7.0	19.0	28.0	28.0	26.0	18.0	22.0	20.0	25.0	24.0	23.0	17.0	27.8
Juvenil	Sinaloa Sur	HP34	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			18.0	7.0	12.0	20.0	20.0	30.0	26.0	20.0	22.0	20.0	26.0	25.0	27.0	11.5	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP35	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S	S	S	S
			14.0	7.0	7.0	9.0	25.0	27.0	30.0	14.0	20.0	17.0	16.0	26.0	24.0	20.0	23.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HP37	I	R	R	R	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			16.0	7.0	7.0	12.5	22.0	20.0	25.0	15.0	19.0	20.0	18.0	25.0	27.5	11.0	23.0
Juvenil	Nayant	HP40	S	R	S	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S
			15.0	7.0	7.0	16.5	27.0	27.0	32.0	15.5	19.5	19.0	19.0	28.0	22.5	12.0	25.0
Juvenil	Nayant	HP41	I	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
			15.0	7.0	7.0	17.0	28.0	27.0	28.0	15.0	19.5	18.0	20.0	27.0	25.0	13.5	25.3
Juvenil	Nayant	HP42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	38.0	10.5	30.5
Juvenil	Nayant	HP43	S	R	R	R	I	S	I	S	S	R	I	I	S	R	S
			17.0	7.0	11.0	7.0	22.0	27.0	14.0	19.0	20.0	15.0	20.0	12.0	22.0	23.0	27.5
Juvenil	Sinaloa Norte	HP44	I	R	R	R	I	S	I	S	S	S	I	I	S	S	S
			15.0	7.0	7.0	7.0	19.0	23.0	13.0	18.0	20.0	24.0	17.0	13.0	23.5	22.3	20.8
Juvenil	Sinaloa Norte	HP45	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	I
			14.0	7.0	7.0	13.0	20.0	20.0	23.0	17.0	19.5	19.0	17.5	19.0	25.5	11.0	20.5
Juvenil	Sinaloa Norte	HP46	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			15.0	7.0	7.0	12.5	22.0	25.0	26.0	19.0	19.0	18.0	16.0	27.0	26.5	11.0	23.0
Juvenil	Sinaloa Norte	HP47	R	R	R	R	I	I	S	S	S	I	I	S	I	I	S
			14.0	7.0	7.0	14.0	20.0	18.0	24.5	15.0	17.0	16.0	16.5	23.0	20.0	15.5	28.0
Reproductor	Sinaloa Sur	HP50	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			14.0	26.0	30.0	22.0	30.0	26.0	30.0	16.0	22.0	20.5	27.0	27.0	36.5	15.5	29.5
Reproductor	Sinaloa Sur	HP51	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S
			15.5	11.0	12.0	19.0	30.0	32.0	27.0	15.0	18.0	22.0	27.0	25.0	36.0	20.0	26.0
Reproductor	Sinaloa Sur	HP52	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			16.0	7.0	7.0	17.5	28.0	25.0	30.0	19.0	22.0	20.0	21.0	28.0	33.0	13.0	30.0
Reproductor	Sinaloa Sur	HP55	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	
			10.5	17.5	21.0	18.0	25.5	26.0	24.5	13.0	16.5	20.0	24.0	27.0	33.5	15.0	27.5
Juvenil	Sinaloa Centro	HP56	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			16.0	7.0	8.0	22.0	27.0	26.0	30.0	18.0	20.0	20.0	22.0	15.0	26.5	13.5	29.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP61	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			20.0	19.0	18.0	22.5	25.0	31.0	23.0	23.0	22.0	23.0	24.0	25.0	34.5	15.0	32.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP63	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			12.0	7.0	12.0	28.0	30.0	25.0	24.0	18.0	25.0	23.0	25.0	28.0	35.5	7.0	25.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP64	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
			18.0	7.0	7.0	14.0	26.0	25.0	30.0	19.0	22.0	22.0	22.0	26.0	27.5	14.0	24.5
Juvenil	Sinaloa Sur	HP72	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			14.0	20.0	22.0	21.0	26.0	26.0	26.0	16.0	16.0	20.0	24.5	27.0	33.0	14.0	23.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP73	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			12.0	7.0	7.0	24.0	24.0	30.0	25.5	16.0	22.0	26.0	30.0	26.0	34.5	7.0	28.5

Amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CXT), ceftriaxona (CRO), cloramfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoína (NF), pefloxacina (PEF), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), florfenicol (FL)

Tabla 3. Antibiogramas de las cepas analizadas, diámetro en mm y su equivalente de acuerdo a la tabla de sensibilidad: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R).

Organismo	Procedencia	Cepa	AK	AM	CB	CF	CXT	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	ENR	OXT	FL
Juvenil	Sinaloa Sur	HP74	R	S	I	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	I	S
			13.0	19.5	19.0	17.0	23.0	20.0	25.0	13.0	15.0	17.0	28.0	24.0	34.5	17.0	26.0
Juvenil	Sinaloa Sur	HP76	S	R	R	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
			18.0	7.0	7.0	16.0	22.0	22.0	28.0	19.0	20.5	21.0	21.0	22.0	32.0	19.0	26.8
Juvenil	Sinaloa Sur	HP100	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
			14.0	19.0	19.0	18.0	24.0	24.0	24.0	17.0	16.0	18.0	23.0	25.5	34.0	14.5	29.0
Juvenil	Sinaloa Norte	LE1	I	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
			16.0	7.0	7.0	12.0	25.0	27.0	25.0	19.0	22.0	17.0	20.0	26.0	27.5	17.5	22.5
Juvenil	Sinaloa Norte	LE3	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			16.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	16.0	25.0	21.0	25.0	25.0	28.0	34.0	35.0
Juvenil	Sinaloa Norte	LE4	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S
			16.0	17.0	22.0	18.0	26.0	27.0	30.0	20.0	17.0	22.0	22.0	20.0	30.0	30.0	25.3
Reproductor	Sonora	RE2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S
			18.0	7.0	7.0	7.0	32.0	30.0	24.5	30.0	24.0	22.0	24.0	30.0	30.0	15.0	33.0
Juvenil	Sinaloa Sur	ST5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	37.5	25.0	28.0
Juvenil	Sinaloa Sur	ST11	R	S	I	S	S	S	S	I	S	I	I	S	I	S	I
			13.0	16.0	20.0	18.0	25.0	27.0	22.0	14.0	16.0	15.0	17.0	22.0	29.0	24.5	25.0
Juvenil	Sinaloa Sur	ST15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	23.0	25.0	25.0	25.0	23.0	23.0	25.0	25.0	25.0	25.0	32.0	23.5	30.0
Larvas	Sinaloa Sur	PB3a	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
			24.0	16.0	25.6	16.8	28.2	29.1	13.4	25.0	23.3	19.0	25.5	21.7	31.0	10.0	27.0
Larvas	Sinaloa Sur	PB5	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
			17.0	9.4	22.1	13.0	24.3	25.2	19.1	17.7	21.2	18.4	23.7	8.0	27.0	18.5	21.5
Juvenil	Japón	V penocida	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			23.0	25.0	24.0	22.0	27.0	25.0	26.0	23.0	25.0	26.0	25.0	24.0	35.0	32.0	33.5

Amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CXT), ceftriaxona (CRO), cloramfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoína (NF), pefloxacina (PEF), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), florfenicol (FL)

Tabla 4. Tratamientos preliminares para el "curing" de plásmidos. Las concentraciones [] se dan en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Cepa	Resistencia	Plásmido(s)	Tamaño(bp)	Tratamiento	Pérdida del Plásmido
HL2	AM, CB	2	21226 819	SDS 10%	NO
				NA [50]	NO
				BE [50]	SI
				BE [200]	SI
HL33	AM, CB	1	21226	SDS 10%	NO
				NA [50]	SI
				BE [50]	NO
				BE [200]	SI
HL61	AK, AM, CB, CF	1	21226	SDS 10%	NO
				NA [50]	SI
				BE [50]	NO
				BE [200]	SI

SDS= sodio lauril sulfato, NA= naranja de acridina, BE= bromuro de etidio.

Tabla 5. Contenido de plásmidos en las cepas analizadas, así como la pérdida o conservación de estos después del tratamiento de "curing" con bromuro de etido a una concentración de 200 µg ml⁻¹. Sensible significa que lo es a todos los antibióticos usados

Cepa	Resistencia	Plásmido(s)	Tamaño(bp)	Pérdida de Plásmido(s)
EX2	AM, CB	2	84299 21226	NO
HL2	AM, CB	2	21226 819	SI
HL25	AM, CB, CF	1	21226	NO
HL33	AM, CB	1	21226	SI
HL36	AM, CB	1	21226	NO
HL41	SENSIBLE	1	21226	----
HL42	SENSIBLE	1	12816	----
HL45	SENSIBLE	0	----	----
HL48	SENSIBLE	1	23575	----
HL51	AM, CB, CF	1	21226	SI
HL57	AM, CB, CF	1	21226	NO
HL60	CB, CF	1	21226	SI
HL61	AK, AM, CB, CF	1	21226	SI
HL105	AM, CB, CF	1	21226	NO
HL107	AK, AM, CB	1	21226	NO
HL108	AM, CB, CF	3	21226 3261 819	SI
HL109	AM, CB	1	37436	NO
HP17	AM, CB	1	21226	NO
HP26	OXT, AK, AM, CL, GE, NET, NF, PEF	0	----	----
HP27	CB	3	21226 6259 3550	NO
HP28	AM, CB	3	21226 2132 1074	NO
HP37	OXT, AM, CB, CF	0	----	----
HP41	AM, CB, OXT	2	84299 21226	NO
HP42	OXT	2	37436 21226	NO
HP43	AM, CB, CF	2	83373 21226	SI
HP45	OXT, AK, AM, CB, CF	0	----	----
HP55	AK	0	----	----
HP76	AM, CB	1	21226	NO
LE1	AM, CB, CF	1	21226	NO
PB3a	OXT	6	84299 54566 37436 26851 21226 6353	NO

AM= ampicilina, AK= amikacina, CB= carbencilina, CF= cefalotina, O= oxitetraciclina, CL= cloramfenicol, GE= gentamicina, NET= netilmicina, NF= nitrofurantoina, PEF= pefloxacina.
EX= exoesqueleto, HL= hemolinfa, HP= hepatopáncreas, LE= lesión, PB= postlarvas con síndrome de bolitas.
Las cepas sensibles y aquellas que no presentaron plásmidos no fueron sometidas a "curing" (---).

Tabla 6. Sensibilidad de las cepas con plásmidos antes y después del tratamiento de “curing” para cada uno de los antibióticos a los que presentó resistencia. Zona de inhibición en mm y su equivalencia de acuerdo a la tabla de sensibilidad. Las cepas que presentaron cambios en su sensibilidad se presentan en negritas.

CEPA	Después del Tratamiento							
	Control		Min		Max		Prom mm	SD
	Halo mm	Sensibilidad	Halo mm	Sensibilidad	Halo mm	Sensibilidad		
EX2(AM)	8.0	R	7.0	R	11.0	R	8.60	1.52
EX2(CB)	7.0	R	7.0	R	9.0	R	8.00	1.00
HL2(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL2(CB)	9.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL25(AM)	7.0	R	7.0	R	10.0	R	7.60	1.34
HL25(CB)	8.0	R	8.0	R	12.0	R	9.20	1.79
HL25(CF)	11.0	R	16.0	I	18.0	S	17.00	1.00
HL33(AM)	7.0	R	8.0	R	12.0	I	10.40	2.61
HL33(CB)	7.0	R	7.0	R	12.0	R	9.40	1.95
HL36(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL36(CB)	7.0	R	7.0	R	10.0	R	9.40	1.34
HL51(AM)	11.0	R	11.0	R	17.0	S	14.80	2.28
HL51(CB)	13.0	R	19.0	I	27.0	S	11.78	3.44
HL51(CF)	7.0	R	7.0	R	8.0	R	7.80	0.45
HL57(AM)	7.0	R	7.0	R	10.0	R	7.60	1.34
HL57(CB)	7.0	R	11.0	R	15.0	R	12.80	1.64
HL57(CF)	9.0	R	17.0	I	19.0	S	18.00	1.00
HL60(CB)	14.0	R	17.0	R	22.0	I	20.60	2.07
HL60(CF)	7.0	R	14.0	R	18.0	S	15.60	1.08
HL61(AM)	7.0	R	12.0	I	14.0	S	13.20	0.84
HL61(CB)	10.0	R	11.0	R	14.0	R	12.80	1.10
HL61(AK)	7.0	R	7.0	R	8.0	R	7.20	0.45
HL61(CF)	14.0	R	14.0	R	13.0	R	13.60	0.55
HL105(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL105(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL105(CF)	11.0	R	10.0	R	11.0	R	10.60	0.55
HL107(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL107(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL107(AK)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL108(AM)	7.0	R	7.0	R	10.0	R	8.60	1.52
HL108(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HL108(CF)	12.0	R	14.0	R	16.0	I	15.00	0.71
HL109(AM)	9.0	R	8.0	R	9.0	R	8.80	0.45
HL109(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00

Tabla 6. Sensibilidad de las cepas con plásmidos antes y después del tratamiento de "curing" para cada uno de los antibióticos a los que presentó resistencia. Zona de inhibición en mm y su equivalencia de acuerdo a la tabla de sensibilidad. Las cepas que presentaron cambios en su sensibilidad se presentan en negritas.

CEPA	Control		Después del Tratamiento					
			Min		Max		Prom mm	SD
	Halo mm	Sensibilidad	Halo mm	Sensibilidad	Halo mm	Sensibilidad		
HP17(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HP17(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HP17(CF)	8.0	R	8.0	R	10.0	R	8.40	0.89
HP27(CB)	12.0	R	13.0	R	16.0	R	15.20	1.30
HP28(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HP28(CB)	13.0	R	13.0	R	15.0	R	14.00	1.00
HP41(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HP41(CB)	16.0	R	15.0	R	17.0	R	15.80	1.10
HP42(OXT)	10.0	R	10.0	R	11.0	R	10.5	0.45
HP43(AM)	7.0	R	8.0	R	10.0	R	9.40	0.89
HP43(CB)	16.0	R	13.0	R	18.0	I	16.00	2.00
HP43(CF)	7.0	R	7.0	R	11.0	R	9.00	1.41
HP76(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
HP76(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
LE1(AM)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
LE1(CB)	7.0	R	7.0	R	7.0	R	7.00	0.00
LE1(CF)	14.0	R	14.0	R	15.0	I	14.80	0.45
PB3a(OXT)	12.0	R	10.0	R	12.0	R	11.00	1.15

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de las cepas seleccionadas.

Cepa	Ampicilina (AM)	Carbencilina (CB)	Cefalotina (CF)
HL33	3000	6000	
HL51	3000	2000	3000
HL60		222	3000
HP43	180	2000	110

HL60 no es resistente a ampicilina y HL33 no lo es para cefalotina por lo que no se les practico MIC para estos antibióticos.

Foto 1. Plásmidos extraídos de las cepas seleccionadas. Carril 1: HL41, 2: HP26, 3: HP55, 4: HP37, 5: HL61, 6: HP43, 7: Cepa de referencia *E. coli* V517, 8: Cepa de referencia TP116, 9: Cepa de referencia *V. Anguillarum*, 10: Marcador de peso molecular Marker III (Boehringer, Mannheim, Alemania).

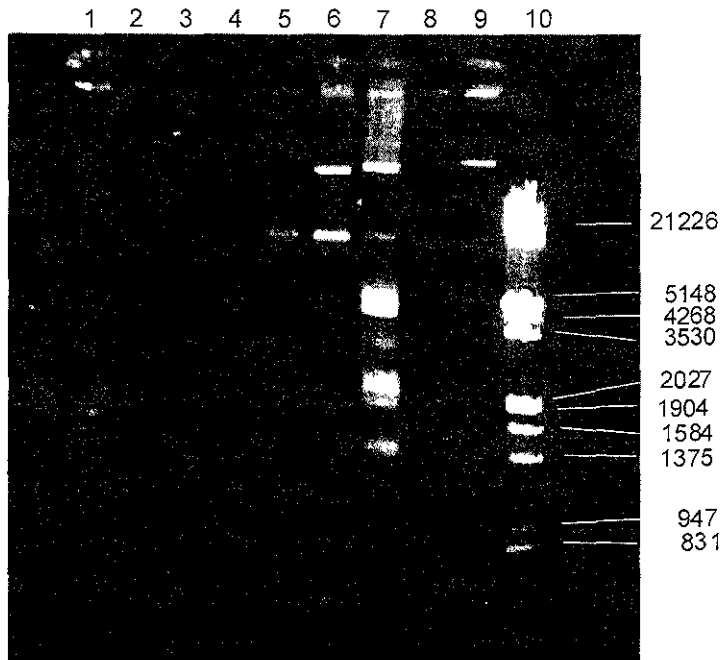


Foto 2. Plásmidos extraídos de las cepas seleccionadas. Carril 1: PB3a, 2: HL2, 3: HP41, 4: HP42, 5: HL108, 6: HL109, 7: EX2, 8: HL33, 9: HL36, 10: Cepa de referencia *V. anguillarum*, 11: Cepa de referencia *E. coli* V517, 12: Marcador de peso molecular Marker III (Boehringer, Mannheim, Alemania).

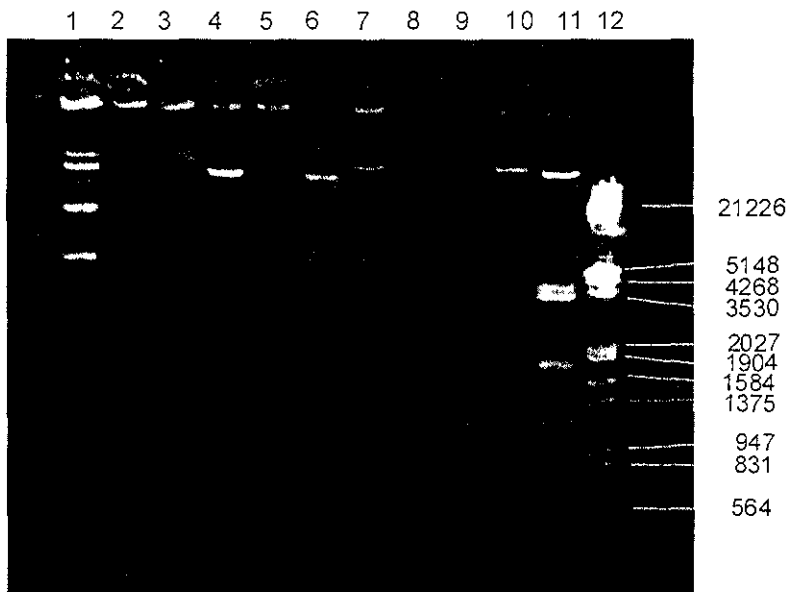


Foto 3. Extracciones realizadas a las cepas en los tratamientos preliminares de "curing". Carril 1: HL2*, 2: HL33*, 3: HL61*, 4: HL2', 5: HL33', 6: HL61', 7: HL33 (SDS), 8: HL2, 9: HL33, 10: HL61. *Cepas tratadas con bromuro de etidio, 'Cepas tratadas con naranja de acridina, HL33 (SDS) fue la única cepa que creció con SDS, carriles 8,9 y 10 cepas sin tratamiento.

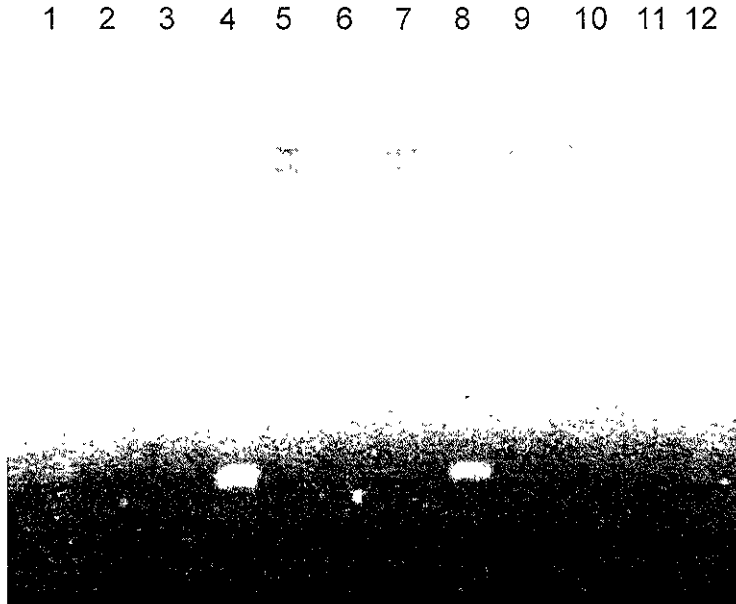


Foto 4. Extracciones realizadas a las cepas tratadas con bromuro de etidio. Carril 1: HL25', 2: HL25*, 3: HP17', 4: HP17*, 5: HP27', 6: HP27*, 7: Marcador de peso molecular Marker III (Boehringer, Mannheim, Alemania). 'Cepas sin tratamiento, *Cepas tratadas.

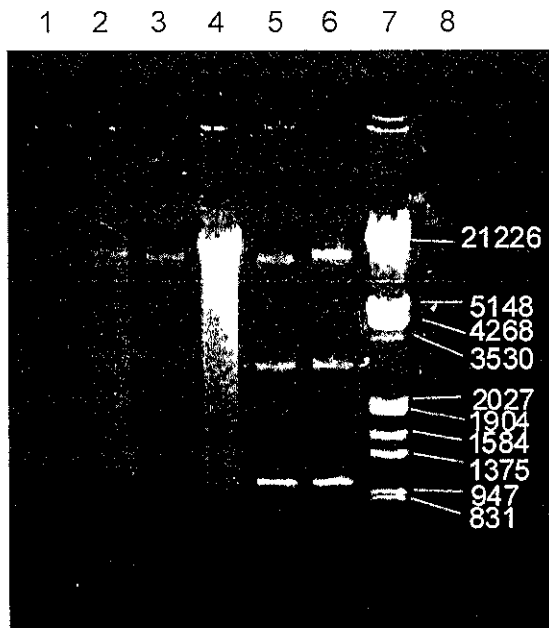


Foto 5. Extracciones realizadas a las cepas tratadas con bromuro de etidio. Carril 1: HL25 , 2:HL41, 3: HL51, 4: HL57, 5: HL60, 6: HL105, 7: HL107, 8: HP27, 9: HP28, 10: HP76, 11: LE1, 12: Marcador de peso molecular Marker III (Boehringer, Mannheim, Alemania).

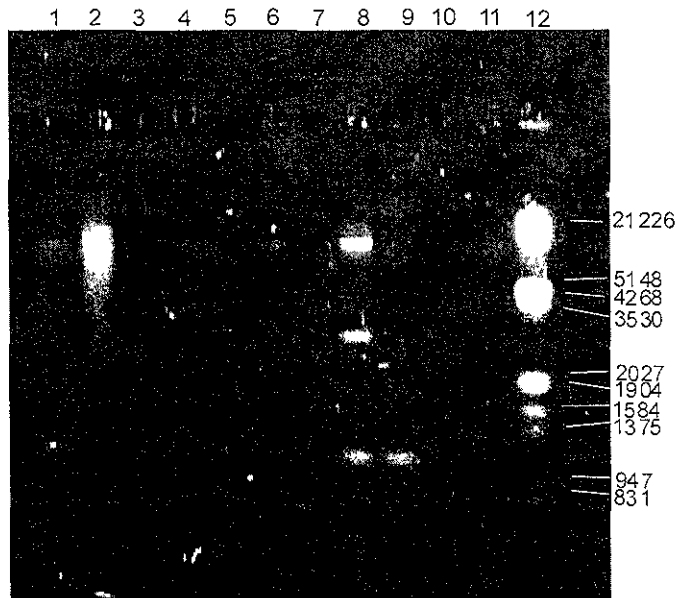
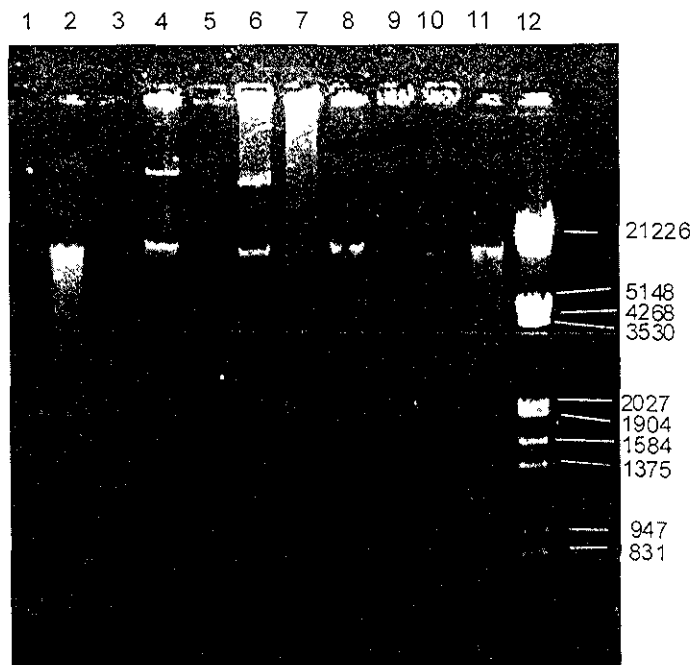


Foto 6. Extracciones realizadas a las cepas tratadas con bromuro de etidio. Carril 1: HL33, 2: HL36, 3: HP27, 4: HP41, 5: HL108, 6: HP42,7: HP43, 8: EX2, 9: HL61, 10: HL41, 11: HL109, 12: Marcador de peso molecular Marker III (Boehringer, Mannheim, Alemania).



DISCUSIÓN

La mayoría de las cepas estudiadas presentaron resistencia a uno o más antibióticos utilizados en medicina humana, especialmente a carbencilina (69%), ampicilina (67%) y cefalotina (32%), mientras que para los antibióticos empleados en camaronicultura (enrofloxacin, florfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina) sólo se observaron cepas resistentes a cloranfenicol (1%) y oxitetraciclina (31%), éstos también usados en medicina humana y veterinaria. Esto también se ha observado en estudios sobre cepas de *Vibrio* aisladas de camarón en Indonesia, India y Tailandia, así como en cepas de *Aeromonas*, *Vibrio* y *Edwardsella* aisladas de peces, donde se ha visto resistencia a ampicilina, penicilina, kanamicina, tetraciclina, eritromicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, estreptomina y sulfamonometoxina entre otros (Abraham *et al.* 1997; Angka 1997; Bhattacharya *et al.* 2000; Jawahar *et al.* 1997; Chanratchakool *et al.* 1995; Masuyoshi *et al.* 1988; Zhao *et al.* 1991; Aoki 1997; Son *et al.* 1997 y Adams *et al.* 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, la carbencilina, ampicilina y cefalotina pertenecen a la familia de los β -lactamatos cuyo mecanismo de acción consiste en impedir que la pared celular sea constituida normalmente; en cambio, el florfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina, son antibacterianos que inhiben la síntesis de proteínas y el enrofloxacin inhibe la síntesis del ADN. Lo encontrado en este estudio indica que los genes que codifican la resistencia a los β -lactamatos, está ampliamente distribuido entre las cepas aquí utilizadas y que probablemente, dicha resistencia se deba a la producción de β -lactamasas, mientras que los mecanismos de acción del enrofloxacin, florfenicol y cloranfenicol resultan ser más efectivos, a excepción de la oxitetraciclina.

Tan sólo una de las cepas sometidas a "curing" en el presente estudio demostró ser resistente a cefalotina debido a la presencia de un plásmido, mientras que la permanencia de la resistencia a distintos antibióticos por las demás cepas que perdieron su(s) plásmido(s) podría resultar de genes del cromosoma de las bacterias.

En pruebas realizadas con diversos antibióticos sobre su toxicidad y seguridad en el cultivo de larvas de camarón llevadas a cabo por Rodney *et al.* (1992), se observó que los antibióticos con mayor potencial para ser utilizados en cultivo larvario fueron la oxitetraciclina, cloranfenicol, enrofloxacin, florfenicol y romet. Esto coincide con lo encontrado en este estudio, ya que el enrofloxacin, florfenicol y cloranfenicol mostraron ser los antibióticos más eficaces en contra de las cepas seleccionadas. Los resultados obtenidos en esta evaluación también concuerdan con los encontrados por Mohney *et al.* (1992), en los que se realizaron pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC) con varios antibióticos en 13 cepas de bacterias Gram negativas. Ellos encontraron que el enrofloxacin, el florfenicol y el cloranfenicol son los antibióticos más efectivos.

De igual manera, Rodney y colaboradores (1992) considera a la oxitetraciclina como un antibiótico que aún puede ser útil en el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, su eficacia disminuye constantemente debido a la aparición de cepas resistentes a este, lo que también podemos apreciar en la figura 4, donde la oxitetraciclina presenta un 44% de cepas sensibles 25% de cepas con sensibilidad intermedia y 31% de cepas resistentes.

Como se mencionó anteriormente, los plásmidos pueden presentarse en distintas formas dentro de una misma preparación, por lo que un mismo plásmido podría ser observado como varias bandas en el gel. Sorum (2000) encontró variaciones en el perfil plasmídico de varias cepas de *A. salmonicida ssp salmonicida* que presentaban de 1 a 4 bandas que iban de 79 a 159.6 kb, en repetidas extracciones, cultivadas en distintas condiciones. La hibridación ADN-ADN sugería la presencia de un solo plásmido de que podía presentarse en 4 formas. Una posibilidad alternativa sería la presencia de 4 plásmidos, cada uno compartiendo secuencias en común, pero que de manera individual no siempre se replicaran lo suficiente para que sus bandas alcanzaran a apreciarse visualmente. En este trabajo se encontraron ocho cepas que presentaron más de una banda (Tabla 5); de acuerdo con lo anterior, estas bandas podrían representar distintas formas de un mismo plásmido o bien ser cada una de ellas un plásmido diferente. Ya que la información obtenida en este estudio no es suficiente para discriminar entre una posibilidad y otra, se reportan los tamaños de todas las bandas, dejando pendiente la confirmación.

En un estudio realizado por Sorum *et al.* (1993) con 15 cepas de *Vibrio salmonicida* aisladas en Noruega, las Islas Shetland, Islas Faroe y Canadá, se distinguieron 5 perfiles plasmídicos como los más comunes. Todas presentaron un plásmido de 31.9 kb; además los perfiles incluyeron plásmidos de 4.3, 5.2, 8.4 y 92.7 kb. En general, el tamaño de los plásmidos encontrados en este estudio fue mucho mayor, predominando aquellos entre los 21.2 a 84.3 kb.

De las 25 cepas que presentaron plásmidos 21 de ellas contienen un plásmido de 21.2 kb; en 13 (52%) de estas, es el único plásmido presente, siendo así el perfil dominante. En total es posible distinguir 12 perfiles distintos en que se repiten algunas bandas, 3 cepas contienen una banda de 84.3 kb, 3 una de 37.4 kb, y 2 más una de 0.8 kb (Tabla 5). Un total de 11 cepas, de las 25 con plásmidos, provinieron de Sinaloa sur, 4 de Sinaloa norte, 3 de Sinaloa centro y 7 de Nayarit, por lo que al parecer el plásmido de 21.2 kb se encuentra ampliamente distribuido entre las cepas de *Vibrio* en camarón cultivado y no existe una gran variación en cuanto a los perfiles tomando en cuenta que varían las regiones, así como las especies.

El tamaño de los plásmidos que codifican resistencia a uno o más antibióticos reportados en la literatura es muy variable y frecuentemente omitido. Falbo *et al.* (1999) reportan un plásmido de 91.2 kb aislado de cepas de *Vibrio cholerae*, Sanda y Eger (1996) encontraron un plásmido de 38 kb codificando resistencia a oxitetraciclina, trimetoprim y sulfadiazina en cepas de *Vibrio*, Son *et al.* (1997) hablan de dos plásmidos de 6.2 y 63.4 kb que codifican ampicilina y tetraciclina en cepas de *Aeromonas hydrophila*, Aoki (1997) reporta plásmidos que van de 44.08 a 51.68 kb, con resistencia al cloranfenicol, sulfonamida y estreptomina en Japón, y combinaciones de sulfonamida, estreptomina, trimetoprim y /o tetraciclina en Irlanda, en cepas de *A. salmonicida*. En este estudio, se encontró un plásmido de 21.2 kb en la cepa HL60, tentativamente identificada como *Vibrio parahaemolyticus* que codifica resistencia a cefalotina. La cefalotina es un antibiótico de la clase de las cefalosporinas, que

pertenecen a la familia de los β -lactamatos, por lo que la resistencia de HL60 debe ser por la producción de algún tipo de β -lactamasa. No se encontraron reportes sobre plásmidos codificando resistencia a este antibiótico; sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a β -lactamatos está bien documentada (Abraham *et al.* 1997; Bhattacharya *et al.* 2000; Jawahar *et al.* 1997; Essack 2000).

Como se ha dicho, el “curing” y la transferencia de un plásmido de una cepa a otra son formas de probar si un plásmido codifica o no cierta característica en una bacteria. En un estudio realizado por Osmanagaoglu *et al.* (2000) se consiguió el “curing” de un plásmido aplicando concentraciones de 3 a 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio en una cepa de *Pediococcus acidilactici*. Así mismo Giles *et al.* (1995) utilizaron concentraciones de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio provocando la pérdida de plásmidos en cepas de *A. salmonicida* y *Vibrio anguillarum*. En el presente trabajo se aplicaron concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, siendo la más efectiva la de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La diferencia entre las concentraciones aplicadas en los distintos estudios se debe a que no es posible estandarizar el tratamiento, ya que las bacterias responden de distinta manera ante este tipo de agentes, no sólo por tratarse de distintas especies, sino que la respuesta varía según la cepa; razón por la cual los tratamientos de “curing” se hacen a prueba y error. Esta dificultad quedó claramente representada con la pérdida de los plásmidos en sólo 7 (28%) de las 25 cepas tratadas.

La transferencia de un plásmido de una bacteria a otra puede hacerse mediante experimentos de conjugación, cultivando juntas a la cepa donadora y a la recipiente, o por la transformación de células competentes con el plásmido deseado. Se han transformado células de *Escherichia coli* con plásmidos aislados de cepas de *Vibrio anguillarum* que confieren resistencia al cloranfenicol, kanamicina, sulfamonometoxina, estreptomina, tetraciclina y trimetoprim, con la expresión de dicha resistencia en las bacterias transformadas (Masuyoshi *et al.* 1988 y Zhao *et al.* 1991). Así mismo, en un estudio realizado por Son *et al.* (1997) transfirieron plásmidos con resistencia a la ampicilina y tetraciclina de *A. hydrophila* a *E. coli* en experimentos de conjugación. También por medio de experimentos de conjugación, Adams *et al.* (1998), transfirieron plásmidos con resistencia a la oxitetraciclina a *E. coli*. En este estudio, por primera vez, se realizó la transformación de células competentes de *E. coli*, así como de células competentes de HL60sp (sin su plásmido) con un plásmido silvestre extraído de una cepa aislada de un camarón enfermo en México, el plásmido extraído de HL60, observándose la expresión tanto en *E. coli* como en HL60sp de la resistencia a la cefalotina.

Sandaa y Enger (1996) transfirieron por conjugación un plásmido aislado de *A. salmonicida* con resistencia a la oxitetraciclina, trimetoprim y sulfadiazina, tanto a miembros de la familia Vibrionaceae como a miembros de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae, e incluso a una bacteria Gram-positiva, *Lactobacillus sp.* La existencia de plásmidos capaces de ser transferidos a bacterias de otras familias, así como el que pudieran existir plásmidos en bacterias relacionadas con animales consumidos por el hombre, que además de contar con esta característica codificaran resistencia a antibióticos utilizados en el cuidado de la salud humana es

muy importante. Si tomamos en cuenta la interacción reportada por Witte (2000), Caprioli *et al.* (2000) y Rhodes *et al.* (2000), entre los ambientes humanos y de acuicultura, con la posible transmisión de bacterias resistentes de animales a humanos esto daría como resultado la diseminación de la resistencia codificada por vectores como los plásmidos entre patógenos de animales a patógenos de humanos.

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen con información de gran utilidad sobre la eficiencia de distintos antibióticos, además de que al parecer es el primer estudio realizado sobre la susceptibilidad de bacterias aisladas de camarones cultivados en México, lo cual nos permite conocer un poco sobre la situación de algunos de los antibióticos más utilizados actualmente en la camaronicultura en nuestro país. Así mismo, provee una visión sobre la susceptibilidad o resistencia de las bacterias aisladas de camarones enfermos. Esto podría servir como base para un monitoreo de la población bacteriana en animales enfermos, con el fin de vigilar la aparición de cepas resistentes y ayudar a utilizar de una mejor manera los antibióticos.

También es importante resaltar que no se cuenta con publicaciones sobre el perfil plasmídico de cepas de *Vibrios* aisladas de camarones en México, ni estudios que traten de relacionar la presencia de plásmidos con la resistencia antibiótica presentada por estas cepas.

Finalmente, la información aquí presentada puede ser útil para futuras investigaciones sobre la resistencia antibiótica de vibrios aislados de camarón en cultivo y su origen a nivel genético, así como para la caracterización de este tipo de cepas por su perfil plasmídico.

CONCLUSIONES

1. Un alto porcentaje de las cepas estudiadas fue resistente a uno o más antibióticos. Los antibióticos más efectivos fueron enrofloxacin, florfenicol y ceftriaxona, ya que ninguna cepa presentó resistencia a ellos. Los antibióticos a los que se observó mayor resistencia fueron la carbencilina, ampicilina y cefalotina.
2. Del 30% de cepas en que se analizó la presencia/ausencia de plásmidos 24 de ellas contienen de 1 a 6 bandas, distinguiéndose 12 perfiles distintos. El perfil predominante (52%) fue el de un plásmido de aproximadamente 21 kb.
3. Se logró la eliminación del o los plásmidos en el 28% de las cepas tratadas con bromuro de etidio a una concentración de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$.
4. Se observó la pérdida de la resistencia a cefalotina, antibiótico perteneciente a la familia de los β -lactamatos en la cepa HL60 después de haber perdido su único plásmido.
5. Tanto HL60 sin plásmido como las células competentes de *E. coli* DH5 α , pudieron transformarse con éxito con el plásmido de HL60, observándose la expresión de la resistencia a cefalotina en ambas cepas.

PRODUCCIÓN

1. Se publicó el artículo: A. Roque, A. Molina-Aja, C. Bolán-Mejía and B. Gomez-Gil. 2001. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico, International Journal of Antimicrobial Agents 17(5): 383-387.
2. Se presentó el poster: B. Gomez-Gil, Roque A, Soto-Rodríguez S, Molina-Aja A, Bolán-Mejía C. y Guerra-Flores AL. 2000. Caracterización de bacterias potencialmente patógenas con incidencia sobre los mecanismos de patogenicidad en camarones penéidos. Fase I: aislamiento y caracterización de bacterias aisladas de camarón. 1er. congreso de responsables de proyectos de investigación en ciencias biológicas. Acapulco, México 14-17 Marzo.

PERSPECTIVAS

Se recomienda llevar a cabo la caracterización de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción, con el fin de dilucidar, en el caso de aquellas cepas que contienen más de una banda, de cuántos plásmidos se trata. Así mismo, sería recomendable el caracterizar los plásmidos de acuerdo con su grupo de incompatibilidad, lo cual permite clasificarlos, independientemente de si codifican o no algún tipo de resistencia.

Ya que el "curing" con bromuro de etidio no resultó ser efectivo al 100%, se podría probar con otras técnicas como temperatura o electroporación. O bien, en lugar de tratar de eliminar el plásmido de las cepas, hacer experimentos de conjugación para ver si es factible la transferencia de los plásmidos de esta manera, así como su resistencia. Ello también nos daría una idea más próxima a la realidad en cuanto a si estos plásmidos son capaces de transferirse de una bacteria a otra en el medio ambiente.

En cuanto al plásmido de HL60, sería interesante determinar si produce una β -lactamasa y si es así de qué tipo se trata, así como localizar y secuenciar el gen que confiere la resistencia en este plásmido y realizar experimentos de conjugación tanto con *E. coli* como con *Vibrios* que no contengan plásmidos y no sean resistentes a la cefalotina.

LITERATURA CITADA

- Abraham, T. J., R. Manley, R. Palaniappan y K. Dhevendaran. 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. *J. Aquacult. Trop.* 12:1-8.
- Acar, J. F. y F. W. Goldstein. 1986. Disk susceptibility test, p. 27-63. *En* V. Lorian, (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Williams. Nueva York.
- Adams, C. A., B. Austin, P. G. Meaden y D. McIntosh. 1998. Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. Nov. 4194-4201.
- Alderman, D. J. y C. Michel. 1992. Chemotherapy in aquaculture today, p. 3-22. *En* C. M. Michel y D. J. Alderman (ed.), *Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality*. Paris.
- Alderman, D. J. y T. S. Hastings. 1998. Antibiotic use en aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*. 33:139-155.
- Amyes, S. G. B. y C. G. Gemell 1997. Antibiotic resistance. *J. Med. Microbiol.* 46:436-470.
- Angka, S. L. 1997. Antibiotic sensitivity and pathogenicity of *Aeromonas* y *Vibrio* isolates in Indonesia, p. 339-347. *En* T. W. Flegel and I. H. MacRae (ed.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila.
- Aoki, T. y T. Kitao. 1981. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from culture ponds. *Fish Pathology*. 15:277-281.
- Aoki, T. 1988. Drug-resistant plasmids from fish pathogens. *Microbiological Sciences*. 5:219-223.
- Aoki, T., K. Takami y T. Kitao. 1990. Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. Isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 8:171-177.
- Aoki, T. 1997. Resistance plasmids and the risk of transfer, p. 433-440. *En* E. M. Bernoth (ed), *Frunculosis. Multidisciplinary Fish Disease Research*. Londres.

- Austin, B. y D. A. Austin. 1985a. A review of bacterial pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 58:483-487.
- Austin, B. 1995b. Vibrionaceae representatives as pathogens of penaeid shrimps, p. 189-192. *In: J. Calderón y P. Sorgeloos (ed.), Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.* Ecuador.
- Baquero, F. y J. Blázquez. 1997. The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations, p. 93-111. *In: D. J. Chadwick y J. Goode (ed.), Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread.* Ciba Foundation Symposium 207.
- Bastarrachea, F. 1998. On the origin of plasmid-borne, extended-spectrum, antibiotic resistance mutation in bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:379-387.
- Barry, A. L., C. Thornsberry. 1985. Susceptibility test diffusion test procedures, p. 978-987. *In: E. Lennette (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed.* American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *American Journal of Clinical Pathology.* 36:493-496.
- Bell, T. A. y D. V. Lightner. 1987. An outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatments. *Vet. Hum. Toxicol.* 29:36-43.
- Bell, T. A. y D. V. Lightner. 1992. Chemotherapy in aquaculture today: current practices in shrimp culture available treatments and their efficacy, p. 45-57. *In: C. Michel y D. J. Alderman (ed.), Chemotherapy in Aquaculture. From Theory to Reality.* Office International de Epizooties. París.
- Bhattacharya, M., P. Choudhury y R. Kumar. 2000. Antibiotic and metal-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimps. *Microbial Drug Resistance.* 2(6):171-172.
- Birnboim, H. C. y J. Doly 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1522.
- Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100: 243-255.

- Bjorklund, H. V., C. M. I. Rabergh, y G. Bylund. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetraciline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. 97: 85-96.
- Brazil, G., D. Curley, F. Gannon y P. Smith. 1986. Persistence and acquisition of antibiotic resistance plasmids in *Aeromonas salmonicida*, p. 107-112. *In*: S. B. Levy y R. P. Novick (ed.), *Antibiotic resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*. Cold Springs Harbor, Nueva York.
- Brown, J. 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture*. 20(2):34-43.
- Brubaker, R. R. 1985. Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:21-50.
- Caprioli, A., L. Busani, J. L. Martel y R. Helmuth. 2000. Monitoring of resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14:295-301.
- Chanratchakool, P., M. Pearson, C. Limsuwan y R. J. Roberts. 1995. Oxytetracycline sensitivity of *Virbio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases*. 18:79-82.
- Code of Federal Regulations. 1980. vol. 21. p 706-707. Estados Unidos de Norteamérica.
- Crosa, J. H., M. E. Tolmasky, L. A. Actis y S. Falkow. 1994. Plasmids, p. 366-385. *In*: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood y N. R. Krieg (ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Davies, J. y D. I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annual Review of Microbiology*. 32:469-518.
- Essack, S. Y. 2000. Treatment options for extended-spectrum β -lactamase-producers. *FEMS Microbiology Letters*. 190:181-184.
- Falbo, V., A. Carattoli, F. Tosini, C. Pezzella, A. Dionisi y I. Luzzi. 1999. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class 1 integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Marzo: 693-696.
- Figueras, E. 2000. Problemática actual de los patógenos que inciden en los sistemas acuícolas, p. 189-201. *In*: M. Bonilla (ed.), *III Simposium Internacional de Acuicultura*. México..

- Food and Agriculture Organization. 1989. Yearbook of fisheries statistics- Catches and landings. Food and Agriculture Organization, United Nations, Roma, Italia.
- Gherna, L. R. 1994. Culture Preservation, p. 278-292. *In*: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood y N. R. Krieg (ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Giles, J. S., H. Hariharan, y S. Heaney. 1995. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Can. J. Microbiol.* 41:209-216.
- Giono, C.S. 1983. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología.* 3(7):325-329.
- Gómez-Gil, B., M. L. Tron, A. Roque, J. F. Turnbull, V. Inglis y F. A. L. Guerra. 1998a. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 163:1-9.
- Gómez-Gil, B., Ma. A. Herrera-Vega, A. F. Abreu-Grobois y A. Roque. 1998b. Bioencapsulation of two strains of *Vibrio* spp. In *Artemia nauplii*. *Applied Environmental Microbiology.* 64(6):2318-2322.
- Götz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschäpe, J. VanElsas y K. Smalla. 1996. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* Julio:2621-2628.
- Greenwood, D. 1995a. Inhibitors of bacterial cell wall synthesis, p. 13-31. *In*: D. Greenwood (ed.), *Antimicrobial chemotherapy*. Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Greenwood, D. 1995b. Inhibitors of bacterial protein synthesis, p. 32-48. *In*: D. Greenwood (ed.), *Antimicrobial chemotherapy*. Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Greenwood, D. 1995c. Synthetic antibacterial agents and miscellaneous antibiotics, p. 49-61. *In*: D. Greenwood (ed.), *Antimicrobial chemotherapy*. Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Greenwood, D. 2000. Detection of antibiotic resistance in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 14:303-306.

- Grinius, L.L. y E. B. Goldberg. 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J Biol Chem ER*. 269:29998-30004.
- Grinsted, J. y P. M. Bennet. 1988. Preparation and electrophoresis of plasmid DNA, p. 129-142. *In: J. Grinsted y P.M. Bennett (ed.), Methods in Microbiology*. Academic Press. Londres.
- Guo, F., J. Huynh, G. I. Dmitrienko, T. Viswanatha y A. J. Clarke. 1999. The role of the non-conserved residue at position 104 of class A β -lactamases in susceptibility to mechanism-based inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1431:132-147.
- Hastings, T. S. y A. MacKay. 1987. Resistance of *Aeromonas salmonicida* to oxolinic acid. *Aquaculture*. 60:133-141.
- Hayashi, F., Y. Araki, K. Harada y S. Mitsuhashi. 1982. Epidemiological studies of drug resistance strains in cultured fish and water. *Bulletin of Japanese Society of Science and Fisheries*. 48:1023-1026.
- Herwig, R. P. y J. P. Gray. 1997. Microbial response to antibacterial treatment in marine microcosms. *Aquaculture*. 152:139-154.
- Hindler, J. 1992. Antimicrobial susceptibility testing, p. 5.1-5.19. *En: H. D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society of Microbiology. Washington, D. C.
- Howe, C. 1995. Gene cloning and manipulation. Cambridge Press. USA. 210 p.
- Isenberg, H. D. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology, Washington. 2468 p.
- Jawahar, T., R. Manley, R. Palaniappan y K. Dhevendaran. 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. *J. Aqua. Trop*. 12(1):1-8.
- Kado, C. y S. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*. 145:1365-1373.
- Kitts, D. D., C. W. Y. Yu, R. G. Aoyama, H. M. Burt. y K. M. McErlane. 1992. Oxytetracycline degradation in thermally processed farmed salmon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40:1977-1981.

- Lavilla-Pitogo, C. R. 1995. Bacterial diseases of penaeid shrimps: an asian view. *En* M. Shariff, J. R. Arthur, R. P. Subasinghe (ed.), Diseases in Asian Aquaculture II. Asian Fisheries Society.
- Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol. Rev.* 32:403-430.
- Levy, S. 1994. Balancing the drug resistance equation. *Trends Microb.* 2:341-342.
- Lightner, D. V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns, p. 8-127. *In*: C. J. Sindermann y D. V. Lightner (ed.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquacultured. Elsevier, Amsterdam.
- Lightner, D. V. 1991. Vibrio disease of penaeid shrimp, p. 43-49 *En* C. J. Sindermann y D. V. Lightner (ed.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Elsevier. Estados Unidos de Norteamérica.
- Lightner, D. V., T. A. Bell, R. M. Redman, L. L. Mohny, J. M. Natividad, A. Rukyani, y A. Poernomo. 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific, p. 57-80. *In*: M. Shariff, R. P. Subasinghe y J. R. Arthur (ed.), Diseases in Asian Aquaculture I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Mann, J. y M. J. Crabbe. 1996. Bacterial and Antibacterial Agents. Spektrum Academic Publishers. Estados Unidos de Norteamérica. 74 p.
- Masuyoshi, S., T. Okubo, I. Matsuhiasa y S. Mitsuhashi. 1988. Purification and some properties of a chloramphenicol acetyltransferase mediated by plasmids from *Vibrio anguillarum*. *J. Biochem.* 104:131-135.
- Medeiros, A. A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 24:19-45.
- Meier, W., M. Schmitt y T. Wahli. 1992. Resistance to antibiotics used in the treatment of freshwater fish during a 20 year period (1979-1988) in Switzerland, p. 141-150. *In*: C. M. Michel y D. J. Alderman (ed.), Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizooties. Paris.
- Merck. 1986. The Merck Veterinary Manual. Merck y Co., Inc. 6th ed. Estados Unidos de Norteamérica. 1677 p.
- Meyer, F. P. y R. A. Schnick. 1988. A review of chemicals used for the control of fish diseases. *Reviews in Aquatic Science.* 1:693-710.

- Moats, W. A. 1988. Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates: a review. *Journal of Food Protection*. 51:491-497.
- Mohney, L. L., T. Bell y D. V. Lichtner. 1992. Shrimp antimicrobial testing I. In vitro susceptibility of thirteen Gram-negative bacteria to twelve antimicrobials. *Journal of Aquatic Animal Health*. 4:257-261.
- Nielsen, B., J. E. Olsen y J. L. Larsen. 1993. Plasmid profiling as an epidemiological marker within *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 15:129-135.
- Osmanagaoglu, O., Y. Beyatli y U. Gündüz*. 2000. Cloning and expresión of a plasmid-linked pediocin determinat trait of *Pediococcus acidilactici* F. *J. Basic Microbiol*. 40 (1):41-49.
- O'Sullivan, J. 1990. Enzymatic and microbial transformation of antibiotics and steroids, p. 295-323. *In: W. M. Fogarty y C. T. Kelly (ed.), Microbial Enzymes and Biotechnology 2ND Edition*. Elsevier Science Publishers. Nueva York.
- Park, E., D. V. Lightner, y D. Park. 1994. Antimicrobials in shrimp aquaculture in the United States: regulatory status and safety concerns. *Reviews of Enviromental Contamination and Toxicology: Vol. 138:1-17*. Springer-Verlag. Nueva York.
- Petrosino, J., C. Cantu y T. Palzkill. 1998. β -Lactamases: protein evolution in real time. Elsevier Science Ltd.
- Pitout, J. D. D., C. C. Sanders y E. Sanders. 1997. Antimicrobial resistance with focus on β -Lactam resistance in Gram-negative bacilli. *The American Journal of Medicine*. 103:51-59.
- Plumb, J. A. 1995. Chemotherapy vs. vaccination: a reality for Asian aquaculture, p. 43-53. *In: M. Shariff, J. R. Arthur y R. P. Subasighe (ed.), Diseases in Asian Aquaculture II. Proceedings of the Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Tailandia.
- Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, P. Smith y R. W. Pickup. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology*. 9(66):3883-3890.

- Unzueta, M. L. 2000. Problemas patológicos en camarones peneidos de importancia comercial en las américas, p. 207-222. *In*: M. Bonilla (ed.), III Simposium Internacional de Acuicultura. México.
- van den Bogaard, A. y E. E. Stobbering. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14:327-335.
- Weston, D. P. 1996. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture, p. 140-164. *En* D. J Baird, M. C. M. Beveridge, L. A. Kelly y J. F. Muir (ed.), *Aquaculture and water resource management*. California, E. U. A..
- Witte, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14:321-325.
- Woo, N. Y. S., J. M. L. Ling y K. M. Lo. 1995. Pathogenic *Vibrio* spp. In the sea bream, *Sparus sarba*. *Journal of Sun Yatsen University Supp*. 3:192-193.
- Wood, S., R. McCashion y W. Lynch. 1986. Multiple low-level resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 23:475-483.
- Wu, H. B. y J. P. Pan. 1997. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of *Seriolla dumerilli* in marine cage culture. *Journal of Fisheries China*. 21:171-174.
- Yndestad, M. 1992. Public health aspects of residues in animal products: fundamental considerations, p. 494-510. *In*: C. M. Michel y D. J. Alderman (ed.), *Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality*. Office International des Epizooties. Paris.
- Young, H. K., N. L. Sarada y S. G. B. Amyes. 1989. Antibiotic resistance in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Medicine and Higiene*. 83:38-41.
- Zhao, J., E. Kim, T. Kobayashi y T. Aoki. 1992. Drug resistance of *Vibrio anguillarum* isolated from ayu between 1989 and 1991. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58 (8):1523-1527.

APÉNDICE

Medio Luria-Bertani (LB, Sambrook 1989)

- Agua Destilada 950.0 ml
- Bacto-triptona (Difco, Detroit, E. U. A.) 10.0 g
- Extracto de levadura (Bioxon, México) 5.0 g
- NaCl (Merk, Darmstadt, Alemania, Alemania) 10.0 g

1. Disolver y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N (Merk, Darmstadt, Alemania, Alemania) o HCl 1 N. (JT Baker, Xalostoc, México, México)
2. Aforar a 1 l con agua destilada y esterilizar 15 min a 121 °C.

Agar Luria-Bertani (LB, Sambrook 1989)

- Agua Destilada 950.0 ml
- Bacto-triptona (Difco, Detroit, E. U. A.) 10.0 g
- Extracto de levadura (Bioxon, México) 5.0 g
- NaCl (Merk, Darmstadt, Alemania) 10.0 g
- Agar Bacteriológico (Bioxon, México) 15.0 g

1. Disolver y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N (Merk, Darmstadt, Alemania) o HCl 1 N. (JT Baker, Xalostoc, México).
2. Aforar a 1 l con agua destilada y esterilizar 15 min a 121 °C.

Medio SOC (Sambrook 1989)

- Agua destilada 950.0 ml
- Bacto-triptona (Difco, Detroit, E. U. A.) 20.0 g
- Extracto de levadura (Bioxon, México) 5.0 g
- NaCl (Merk, Darmstadt, Alemania) 0.5 g

1. Disolver y añadir 10 ml de KCl (Merk, Darmstadt, Alemania) 250 mM. Ajustar el pH a 7.0 NaOH 5 N (Merk, Darmstadt, Alemania) o HCl 1 N. (JT Baker, Xalostoc, México, México). Llevar a 1 l con agua destilada y esterilizar como en el medio anterior.
2. Permitir que se enfríe y agregar 20 ml de la solución de glucosa.

Solución de Glucosa

- Glucosa (Difco, Detroit, E. U. A.) 18.0 g
- Agua destilada 90.0 ml

1. Disolver y llevar a 100 ml.
2. Esterilizar mediante filtración con microfiltro de 0.22 μ .

Agar de Soya Trypticaseína (TSA, Difco, Detroit, E. U. A.)

- Agua destilada 1000.0 ml
- Caseína 15.0 g
- Extracto de Soya 5.0 g
- Agar 15.0 g

1. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, suspender 30.0 g de medio en 1.0 l de agua.
2. Calentar a punto de ebullición y a continuación esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Agar de Mueller Hinton (MH, Difco, Detroit, E. U. A.)

- Extracto de carne 30.0 g
- Hidrollizado ácido de caseína 17.5 g
- Almidón 1.5 g
- Agar 15.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

1. Preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante, suspender 37.0 g de medio en 1.0 l de agua.
2. Calentar a punto de ebullición y a continuación esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Descontaminación de Bromuro de Etidio (Sambrook 1989)

- Agua destilada
 - 0.5 M KMnO_4 (Productos Químicos de Monterrey)
 - 2.5 N HCl (Sigma, San Louis, E. U. A.)
 - 2.5 N NaOH (Merk, Darmstadt, Alemania).
1. Añadir suficiente agua para reducir la concentración de bromuro de etidio a menos de 0.5 mg ml^{-1} .
 2. Agregar 1 volumen igual al que se está descontaminando de 0.5 M KMnO_4 . Mezclar con cuidado y añadir 1 volumen de 2.5 N HCL. Mezclar cuidadosamente y permitir que la solución repose durante varias horas a temperatura ambiente.

3. Añadir 1 volumen de 2.5 N NaOH. Mezclar cuidadosamente y desechar la solución.

Nota: El KMnO_4 es irritante y explosivo, por lo que las soluciones que lo contengan deben manejarse en dentro de una campana de extracción.

Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8 (Isenberg 1992)

Solución stock A (0.2 M)

- Agua destilada
- K_2HPO_4 (Faga-Lab, Mazatlán) 9.128 g

1. Disolver en matríz volumétrico aforando a 200 ml y esterilizar 15 min a 121 °C

Solución stock B (0.2 M)

- Agua destilada
- KH_2PO_4 (Faga-Lab, Mazatlán) 2.72 g

1. Disolver en matríz volumétrico y aforar a 100 ml. Esterilizar 15 min a 121 °C.

Solución de Trabajo (0.1 M)

1. Mezclar 2.65 ml de la solución A con 47.35 ml de la solución B y llevar a 100 ml.
2. Ajustar el pH con NaOH 1 N o H_3PO_4 0.1 M.

Buffer TBE 10x (Sambrook 1989)

- Agua destilada 750.0 ml
- Tris base (Sigma, San Louis, E. U. A.) 108.0 g
- Ácido bórico (Sigma, San. Louis) 55.0 g
- EDTA (Sigma, San. Louis) 9.5 g

1. Ajustar el pH a 8.3 con NaOH 5 N (Merk, Darmstadt, Alemania) o HCl 1 N. (JT Baker, Xalostoc, México).
2. Filtrar y ajustar el volumen a 1.0 l.

Buffer de Carga (Sambrook 1989)

- Agua destilada
- Azul de bromofenol (Sigma, San Louis, E. U. A.) 0.06 g
- Glicerol (Productos Químicos de Monterrey) 7.5 ml

1. Aforar a 25.0 ml con agua destilada.