

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T O N O M A D E M E X I C O

---

F A C U L T A D D E Q U I M I C A

ANALISIS GENETICO DE PLASMIDOS  
DETECTADOS EN ENTEROBACTERIAS

T E S I S  
Que para obtener el Titulo de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
p r e s e n t a:  
MARISOL LOPEZ LOPEZ

México, D.F.

1 9 7 7



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.

Tesis 1977  
M-~~228~~ 239  
ECHA \_\_\_\_\_  
PREC \_\_\_\_\_  
• \_\_\_\_\_



QUIMICA

J U R A D O A S I G N A D O :

PRESIDENTE: NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA  
VOCAL: LEONOR MARTINEZ SOTO  
SECRETARIO: ELDA PENICHE QUINTANA  
1er SUPLENTE: VICTORIA VALLES SANCHEZ  
2do SUPLENTE: GERARDO KONO YAIKO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, UNAM

SUSTENTANTE: MARISOL LOPEZ LOPEZ

ASESOR DEL TEMA: ELDA PENICHE QUINTANA  
SUPERVISOR TECNICO: GUILLERMO ALFARO MARTINEZ

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Guillermo Alfaro y al Dr. Romilio Espejo por su asesoría y estímulo en este trabajo.

Agradezco al Dr. Jaime Martuscelli la oportunidad que me brindó de trabajar en su laboratorio.

A MIS PADRES Y HERMANO

A MIS AMIGOS

PARA RAFAEL

## A B R E V I A T U R A S    U T I L I Z A D A S

Cys	■	cistefna
His	■	histidina
Thy	■	timina
Trp	■	triptofano
Lac	■	lactosa, utilización de . . .
ts	■	termosensible
Ap	=	ampicilina
Cm	■	cloranfenicol
Cef	■	cefalosporinas
Km	■	kanamicina
Sp	■	espectinomicina
Str , Sm	■	estreptomina
Tc	■	tetraciclina
Nal	■	ácido nalidfxico
ADN	■	ácido desoxirribonucleico
ARN	■	ácido ribonucleico
EDTA	=	ácido etilendiaminotetracético
EGE	■	elemento genético extracromosómico

## O B J E T I V O

Una epidemia severa de disentería, determinada por Shigella dysenteriae tipo 1, fué descrita en Centroamérica durante 1969 y 1970. Una característica importante del microorganismo responsable fue su resistencia a varios antibióticos, que se mostraron asociados en un patrón predominante, determinado por la presencia de un plásmido R (1).

En el período comprendido entre julio de 1970 y junio de 1971 hubo un brote epidémico de disentería en México (principalmente en Acapulco y en el sur del país). Los estudios realizados mostraron que el bacilo de Shiga responsable era portador de un plásmido R, que codifica para un fenotipo de resistencia semejante al descrito para las cepas resistentes de Centroamérica. Además, este plásmido R es capaz de ser transferido in vitro a cepas Escherichia coli K-12 (2).

Posteriormente, en 1972, se describió una epidemia de fiebre tifoidea que afectó la ciudad de México y estados vecinos. La mayoría de las cepas de Salmonella typhi aisladas tenían un plásmido R con un patrón de resistencia similar al de las cepas de Shigella dysenteriae tipo 1, tanto mexicanas como centroamericanas (3, 4, 5, 6).

El hecho de que las tres epidemias descritas estuvieran localizadas en áreas geográficas relativamente cercanas y, además, tuvieron lugar en períodos de tiempo también cercanos, sugirieron inicialmente que podría existir una relación entre ellas. Varios estudios de tipo epidemiológico fueron diseñados con el objeto de aclarar esta posible relación; sin embargo, estas investigaciones se basaron en una serie de suposiciones poco fundamentadas, tales como: atribuir propiedades de virulencia, no demostradas, a los plásmidos R y, consecuentemente, derivar la generación de las epidemias a cepas bacterianas portadoras de ellos. Tal vez, lo más conveniente sería considerarlos como una complicación.

En base a lo anterior se consideró importante analizar, con más detalle, los elementos genéticos extracromosómicos involucrados. Además, se estudiaron plásmidos R aislados de cepas de Salmonella typhimurium por razones que se darán más adelante ( ver RESULTADOS).

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

Un tipo particular de información genética no codificada por el cromosoma bacteriano está determinada por la presencia de moléculas de ADN denominadas elementos genéticos extracromosómicos o plásmidos ( 7 ). Estas moléculas son físicamente independientes, pero requieren de productos codificados por el cromosoma para duplicar ( 8, 9 ). Existen plásmidos capaces de integrarse en el cromosoma de la bacteria, que son duplicados pasivamente; plásmidos de este tipo reciben el nombre de episomas ( 7 ).

Evidencias de la autonomía de los plásmidosCuración

La pérdida espontánea de plásmidos en la población bacteriana es, frecuentemente, baja pero puede ser incrementada por la acción de una serie de sustancias por ejemplo, los colorantes de acridina (10), el bromuro de etidio (11), la rifampicina (12), el lauril sulfato de sodio (13), etc. o por ayuno de timina (14). Esta pérdida o curación del plásmido se correlaciona con el hecho de estar en forma autónoma en el citoplasma de la célula y, además, sugiere que la replicación del EGE esté controlada por un replicón distinto al del cromosoma bacteriano. En algunos casos, la curación de un plásmido no es detectable y esto no ha podido ser explicado satisfactoriamente.

Los mecanismos involucrados en el fenómeno de curación son complejos y no han sido totalmente elucidados. El hecho de que los colorantes de acridina y el bromuro de etidio sean moléculas planas, capaces de intercalarse entre las bases del ADN, ha sugerido que esta interacción sea una parte importante en el mecanismo de curación del plásmido (15). Es importante hacer notar que el plásmido no se destruye en el proceso sino que su replicación está inhibida, por lo tanto, se hereda en forma unilinear y se diluye con el tiempo de la población bacteriana.

En el caso de la rifampicina se ha observado que actúa a nivel de la ARN polimerasa. Mutantes resistentes a este antibiótico presentan la enzima con una subunidad alterada a la cual no puede unirse la rifampicina (12). Básicamente, se han propuesto dos hipótesis que expliquen el mecanismo de curación con rifampicina: (a) la rifampicina inhibe selectivamente la replicación del ADN del plásmido en comparación con el del cromosoma, al actuar sobre la síntesis de una proteína específica en la replicación del primero; (b) la replicación del plásmido requiere la presencia de una molécula de ARN, cuya síntesis es sensible a la acción de la rifampicina (16). La primera hipótesis se basa en la observación de que algunos genes del plásmido F son inhibidos preferentemente por este antibiótico (16). Evidencia sugestiva de la segunda hipótesis se encuentra en los estudios realizados con el plásmido Col E1, principalmente. En ellos se ha demostrado que la replicación de Col E1 requiere de la síntesis de ADN, y que ésta es sensible a la acción

de ribonucleasa, álcali y rifampicina (17).

El ayuno de timina causa la curación de algunos plásmidos y aunque el mecanismo se desconoce, se ha sugerido que pudiera estar relacionado con la acción de una nucleasa (14). La eliminación de plásmidos por efecto de una sustancia detergente, como el lauril sulfato de sodio, ha sido también descrita (13). Como en el caso anterior, se desconoce el modo de acción pero en la hipótesis propuesta está involucrada la asociación del ADN a la membrana celular.

#### Evidencia genética

Evidencia adicional sugestiva de la autonomía de los plásmidos con respecto al cromosoma ha sido obtenida con el aislamiento de mutantes que afectan específicamente el mantenimiento o la duplicación de los mismos.

Las mutaciones pueden estar a nivel cromosómico o a nivel del plásmido mismo. El primer tipo de mutantes ha sido descrito en cepas de Escherichia coli K-12, mapean en varias regiones del cromosoma y muestran cierta especificidad (8, 18, 19, 20, 21). Muchas de estas mutantes son condicionales (ts) y se expresan únicamente a una temperatura determinada. Ejemplos de estas mutantes son ts112 (18) y polA (8) que afectan selectivamente a Flac o a ColE1, respectivamente.

Mutantes a nivel del plásmido han sido también descritas en Flac (22), en Col VBtrp (23) y en Rts1 (24).

#### Evidencia molecular

La naturaleza molecular y las propiedades fisicoquímicas de los plásmidos han sido tema de numerosas investigaciones. El análisis del ADN de estas moléculas ha mostrado la existencia de dos tipos de estructuras circulares. Una de ellas está covalentemente cerrada en ambas cadenas y tiene una configuración superenrollada; el otro tipo de molécula presenta una cadena sin sellar y la otra unida covalentemente (25, 26, 27). Existe evidencia que apoya la existencia in vivo de los plásmidos como moléculas covalentemente cerradas y, por lo tanto, no se deben a un artefacto del método de aislamiento (28).

La configuración superenrollada causa que la molécula sea compacta y, por lo tanto, tenga una viscosidad intrínseca menor y ofrezca una mayor resistencia a romperse, (25). Consecuentemente, la molécula superenrollada sedimenta más rápido que el círculo abierto correspondiente y éste, a su vez, sedimenta más rápido que la forma lineal si se analizan en un gradiente de sacarosa neutro (29).

Si la lisis celular se lleva a cabo bajo condiciones moderadas, es posible aislar moléculas de ADN de plásmido superenrolladas asociadas a una molécula de proteína, en lo que se conoce como complejo de relajación. Este ADN puede convertirse a la forma abierta o relajada por tratamiento o condiciones que

afecten proteínas como son el lauril sulfato de sodio, proteasas o álcali ( pH 12.5) (25).

Los estudios de ADN de plásmido han sido posibles gracias al diseño de varios métodos, que permiten aislarlo del resto de los componentes celulares una vez lisada la célula huésped. Uno de los métodos más utilizados es la ultracentrifugación en cloruro de cesio, en presencia de bromuro de etidio. La densidad de flotación del ADN disminuye en proporción con la cantidad de colorante que se intercale; más moléculas de bromuro de etidio se unen a la forma abierta que a la superenrollada y esto permite su separación diferencial (26).

Una vez aislado el ADN del plásmido se puede determinar su peso molecular en base a su coeficiente de sedimentación en gradientes neutros de sacarosa o por medición en el microscopio electrónico (26).

#### Incompatibilidad

Uno de los criterios más utilizados en la clasificación de los plásmidos es el de incompatibilidad. Se entiende por incompatibilidad la incapacidad de dos plásmidos distintos para coexistir establemente en una misma célula huésped (7). Estudios de incompatibilidad entre varios plásmidos han permitido clasificarlos en distintos grupos, de tal manera que plásmidos incompatibles pertenecen al mismo grupo (30). Los resultados obtenidos por hibridación de ADN, han mostrado que existe una gran homología entre plásmi

dos pertenecientes a un grupo de incompatibilidad; esto ha sugerido que existe un origen evolutivo común de los EGE implicados ( 31, 32) .

El mecanismo propuesto para el fenómeno de incompatibilidad es, básicamente, el siguiente: se considera que un plásmido para replicarse requiere unirse a un sitio específico de la membrana celular, el cual es compartido por plásmidos incompatibles; esto ocasiona una competencia entre ellos (25, 27) . Este modelo se base en la hipótesis del replicón (33) la cual propone que un elemento genético, como un plásmido o un cromosoma bacteriano, constituye una unidad independiente de replicación (replicón), que requiere unirse a un sitio específico en la membrana para su duplicación. Existe evidencia de esta asociación del ADN a la membrana celular, tanto de Bacillus subtilis (34) como en Escherichia coli (35) . Además, los modelos de replicación propuestos consideran al ADN fijo a la membrana celular, durante un período de tiempo (36) .

### Información asociada con plásmidos

La conjugación bacteriana se define como un proceso de intercambio genético entre bacterias, dependiente del contacto celular, en el cual el material genético se transfiere de un organismo (el donador) a otro ( el recipiente ). El organismo donador es aquel portador de un plásmido capaz de promover la transferencia de material genético a un organismo recipiente adecuado (7).

El proceso de conjugación bacteriana ha sido dividido, en forma teórica, en varias etapas (37):

Formación específica del par.- La frecuencia de colisión entre el organismo donador y el recipiente depende de la densidad celular, y de la viscosidad y temperatura del medio. Para la formación específica del par se requiere la presencia de pili conjugativo que es codificado por el plásmido de la célula donadora.

Formación efectiva del par.- Este paso involucra el establecimiento de un puente conjugativo a través del cual se pueda transferir el material genético. Aquí, existe una hipótesis que propone que el ADN se transfiere a través del pili donador (38); sin embargo, esto no ha sido comprobado. Otro punto de vista sugiere la contracción del pili donador para acercar ambas células, seguida de la síntesis de una sustancia que une las membranas celulares de ambos organismos, entre los sitios de unión del pili a la célula recipiente y el "agujero" restante en la célula donadora después de una contracción completa (37).

Transferencia del ADN.- El ADN del plásmido se encuentra en forma circular dentro de la célula pero durante la conjugación sólo se transfiere una de las cadenas con el extremo 5' en el origen, del donador al recipiente. Tanto la cadena de ADN que permanece en el donador, como la que se transfiere al recipiente, se duplican para formar la cadena doble (39).

Un plásmido conjugativo es aquel capaz de promover conjugación bacteriana (7). Los plásmidos conjugativos se clasifican de acuerdo al tipo de pili donador que codifican ( 26, 39, 40):

- (a) plásmidos "como F".- codifican para la síntesis de pili F, que es capaz de adsorber fagos icosaédricos (f1, QB, MS2) y filamentosos ( fd ).
- (b) plásmidos "como I".- codifican para la síntesis de pili I, que no tiene los sitios receptores para fagos específicos de F sino para fagos específicos de I como son If1, If2, etc.
- (c) plásmidos del grupo N.- sintetizan pili capaz de adsorber al fago Ike.

La mayoría de los plásmidos conjugativos tienen determinantes que inhiben su propia fertilidad y esto tiene como consecuencia que se transfieran a una frecuencia muy baja. Sin embargo, existen mutantes "derreprimidas" (drd) de estos plásmidos y plásmidos conjugativos de tipo agreste ( el plásmido F, entre ellos) que carecen de este tipo de inhibición y que, por lo tanto, se transfieren a alta frecuencia y muestran

una gran sensibilidad a bacteriófagos específicos de donador (41).

Existe una clase de plásmidos denominados fin<sup>+</sup> que inhiben su propia transferencia y la del plásmido F, cuando están en la misma célula; a diferencia de los plásmidos designados fin<sup>-</sup> que inhiben su propia transferencia pero no la del plásmido F (42, 43). El fenómeno de la inhibición de la transferencia del plásmido F es complejo, los sistemas propuestos actúan a nivel del operón de transferencia sin interferir con otros genes (44). Uno de los modelos propuestos es el sistema FinOP, en el cual está involucrado la interacción de, al menos, dos componentes. Un componente inhibidor es codificado por el gene finO y parece ser funcionalmente idéntico para la mayoría de los plásmidos fin<sup>+</sup>. El gene finP codifica otro producto inhibidor que aparentemente es específico del plásmido que lo porta. El producto finO del plásmido inhibidor reacciona con su propio producto P y con el del plásmido F, en este último caso se forma un componente que previene la función del gene traJ cuyo producto se requiere para la expresión del operón de transferencia (45, 46).

El hecho de que existan varios sistemas capaces de inhibir la transferencia del plásmido F sugiere que esto aporte una ventaja selectiva al plásmido coexistente.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

MATERIALESCEPAS BACTERIANAS

Las características generales de las cepas bacterianas utilizadas se describen en la Tabla I. Las cepas de Salmonella typhimurium grupo B fueron aisladas en el Hospital de Infectología del Centro Médico " La Raza " (I.M.S.S.) a partir de muestras clínicas de heces, orina o sangre. Los cultivos fueron caracterizados posteriormente por pruebas bioquímicas y tipificados por reacciones de aglutinación con los sueros específicos.

Las cepas B201 y B204 son derivados  $Str^r$  y  $Nal^r$ , respectivamente, de B21 obtenidas en el laboratorio de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las cepas de Salmonella typhi fueron obtenidas del Dr. Alfaro, JM1348 y JM1373 son derivados  $Nal^r$  y  $Str^r$ , respectivamente, de JM1300. Las cepas de Escherichia coli K-12, JC3272 y JC6256 (la cepa progenitora de JM1452 y JM1456) han sido descritas anteriormente (47).

BACTERIOFAGOS

El bacteriófago R17 fué obtenido del Dr. N. Willetts y el bacteriófago Ifl del Dr. E.S. Anderson. Los lisados fágicos se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por J.H. Miller (48).

PLASMIDOS

Estos se describen en la Tabla II.

Flac, Col V2, Col VB, R100-1, R1-19, ColIB drd, R64-11, pSC 101 y Col E1 han sido descritos previamente (49, 50, 51, 52, 53, 54). R27 fué obtenido de la Dra. N. Datta vfa el Dr. J. Kupersztoch. Los derivados homogénicos de R1-19, PCU 502 y pCU 504, fueron construidos in vitro y pertenecen a la colección del laboratorio. Los plásmidos R, pCU 1, pCU 4, y PCU 8, provienen de Salmonella typhi (Alfaro, manuscrito en preparación).

T A B L A I  
C E P A S B A C T E R I A N A S

Bacterias	Cepa	Plásmido	Marcadores genéticos relevantes							
			Cys	His	Lys	Thy	Trp	Lac	Nal	Str
<u>Escherichia coli</u> K-12*	JC3272		+	-	-	+	-	-	S	R
	JC6256		+	+	+	+	-	-	S	S
	JM1452		+	+	+	-	-	-	S	R
	JM1456		+	+	+	-	-	-	R	S
<u>Salmonella typhi</u> **	JM1348		-	+	+	+	+	-	R	S
	JM1373		-	+	+	+	+	-	S	R
	JM1300		-	+	+	+	+	-	S	S
	JM1301	pCU1	-	+	+	+	+	-	S	S
<u>Salmonella typhimurium</u> **	B 3	pCU252	+	+	+	+	+	-	S	S
	B 15	pCU251	+	+	+	+	+	-	S	S
	B 21		+	+	+	+	+	-	S	S
	B 201		+	+	+	+	+	-	S	R
	B 204		+	+	+	+	+	-	R	S

\* La nomenclatura es la recomendada por Bachmam, Low and Taylor (1976) (55)

\*\* De acuerdo a las recomendaciones de Sanderson (1972) (56)

T A B L A II  
P L A S M I D O S

PLASMIDO	FENOTIPO	REFERENCIA
Flac	Lac <sup>+</sup> Tra	49
Col V2	Cva	50
Col VB	Cba - Cva	50
Col Ib <u>drd</u>	Cib	50
Col E1	Ce 1	50
R1-19	Cm Sm Sp Su Ap Km Tra	51
pCU 502	Cm <sup>s</sup> Sm <sup>s</sup> Sp <sup>s</sup> Su <sup>s</sup> Ap <sup>s</sup>	Derivado homogénico de R1-19
pCU 504	Cm <sup>s</sup> Sm <sup>s</sup> Sp <sup>s</sup> Su <sup>s</sup> Ap <sup>s</sup> Km <sup>s</sup>	" " " " "
R100-1	Cm Sm Sp Su Tc Tra	N. Datta vía J. Kuperztoch
R27	Tc Tra	53
R64-11	Sm Tc Tra	54
pSC 101	Tc	Este laboratorio
pCU 1	Cm Sm Sp Tc Tra	derivado homogénico de pCU1
pCU 8	Cm <sup>s</sup> Sm <sup>s</sup> Sp <sup>s</sup>	Este laboratorio
pCU 4	Tc Tra	

MEDIOS DE CULTIVO

## I - MEDIOS COMPLETOS

## (a) Medio Luria

Bactotripton (DIFCO)	10 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	10 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar con NaOH 2.5 N á pH 7.0	

## (b) Medio Fry

Extracto de carne (DIFCO)	10 g
Bactopeptona (DIFCO)	5 g
Cloruro de sodio ( J.T. Baker )	10 g
Agua destilada	1000 ml

## (c) Medio Mac Conkey

Agar base Mac Conkey (DIFCO)	40 g
Agua destilada	1000 ml

## II - MEDIOS MINIMOS

Todos están basados en la fórmula del medio mínimo	M9
NH <sub>4</sub> Cl ( J.T. Baker)	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (J.T. Baker)	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (J.T. Baker)	6 g
NaCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (General Chemical Division)	0.25 mg/ml concentración final
Agua desionizada	1000 ml

## ADICIONES

(1) Azúcares (Glucosa o Lactosa de J.T. Baker)

(a) Para el medio mínimo se agrega a una concentración final de 0.2%

(b) Para el medio Mac Conkey se agrega a una concentración final de 0.1%

(2) L-aminoácidos (todos son de Sigma Chem. Co.)

Para el medio mínimo se agregan a una concentración final de 20 µg/ml, excepto en el caso de cistefina que se adiciona a una concentración final de 50 µg/ml.

(3) Bases ( Timina de Sigma Chem. Co.)

(a) Para el medio Luria se agrega a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

(b) Para el medio mínimo se agrega a una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

(4) Vitaminas (Vitamina B 1 de Matheson Coleman and Bell)

Para el medio mínimo se agrega a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

(5) Antibióticos

Para cualquier medio las concentraciones finales son las siguientes:

Acido Nalidíxico ( Sigma Chem. Co.) : 6 ó 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Ampicilina ( Bayer de México ) : 25 ó 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Cloranfenicol (Sigma Chem. Co.) : 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Estreptomina ( Sigma Chem. Co.) : 50, 100 ó 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Espectinomicina ( The Upjohn Co.) : 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Kanamicina ( Bristol Myers de México ) : 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Rifampicina ( Lepetit de México ) : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tetraciclina ( Cyanamid de México ) : 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

(6) Bactoagar ( DIFCO)

(a) El medio Luria y el medio mínimo van adicionados de 2% final de Bactoagar, siempre que se requieran en estado sólido. En el caso del medio Fry se añade al 1.4% final.

#### AGAR BLANDO O DE SUPERFICIE

Bactoagar (DIFCO)	0.7 g
Cloruro de Sodio (J.T. Baker)	0.8 g
Caldo Luria	30 ml
Agua desionizada	100 ml

La adición del caldo Luria al agar blando es importante para evitar cambios bruscos al sembrar de medios completos a medios mínimos (57).

Todos los medios se esterilizan 30 min. en autoclave á 22 lb. de presión y 121°C. Los azúcares, aminoácidos, bases, vitaminas y antibióticos se preparan en solución, se esterilizan por filtración en Millipore (0.45 $\mu$ ) y se añaden a los medios previamente esterilizados.

#### AMORTIGUADORES

(1) Amortiguador TE

0.1 M Trizma Base (Sigma Chem. Co.)

0.001 M Ac. etilendiaminotetracético, sal tetrasódica (Sigma Chem. Co.)

Ajustar a pH 8.0 con ácido acético glacial.

(2) Amortiguador TEA

0.05 M Trizma Base (Sigma Chem. Co.)

0.02 M Acetato de sodio (J.T. Baker)

0.002 M Ac. etilendiaminotetracético, sal disódica. (Sigma Chem. Co.)

0.018 M Cloruro de sodio (J.T. Baker)

Ajustar á pH 8.05 con ácido acético glacial.

#### REACTIVOS

Agarosa para electroforesis (Sigma Che, Co.)

Azul de bromofenol (Matheson Coleman and Bell)

Bromuro de etidio (Calbiochem)

Glicerol (J.T. Baker)

Lisozima (Worthington Biochemical Corp.)

Lauril sulfato de sodio (Sigma Chem. Co.)

Multidiscos de sensibilidad a antibióticos (BIOCLIN)

## M E T O D O S

En todos los casos se hacen cultivos frescos en caldo Luria de la cepa recientemente purificada.

### Análisis de sensibilidad a antibióticos

Para determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas a una serie de antibióticos se llevó a cabo el siguiente protocolo. Se siembra, con agar blando fundido, 0.1 ml del cultivo de la cepa en estudio en una caja de medio Luria sin antibióticos y se coloca encima de la capa de bacterias un multidisco de sensibilidad a antibióticos (BIOCLIN). Se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12-16 hs. y se observa el patrón de resistencia ó sensibilidad a los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (  $30\mu\text{g/ml}$  ), cloranfenicol (  $30\mu\text{g/ml}$  ), kanamicina (  $30\mu\text{g/ml}$  ) y tetraciclina (  $10\mu\text{g/ml}$  ). Para otros antibióticos como ampicilina (  $25\mu\text{g/ml}$  ), espectinomicina (  $25\mu\text{g/ml}$  ) ó estreptomycinina (  $50\mu\text{g/ml}$  ) se siembra el cultivo en cajas con medio Luria adicionado del antibiótico correspondiente y se analiza después de incubar 12 hs. a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Aislamiento de mutantes

Cepas mutantes resistentes a estreptomycinina se obtuvieron sembrando 0.2 ml del cultivo de una cepa sensible en una caja de medio Luria con  $100\mu\text{g/ml}$  de estreptomycinina. De aquí una de las clonas resistentes se aisló y se purificó dos veces.

Mutantes espontáneas resistentes altos niveles de ácido nalidíxico se obtuvieron de acuerdo al siguiente esquema: en un primer paso la cepa sensible se sembró en cajas de medio Luria con  $6\mu\text{g/ml}$  de ác. nalidíxico. Las colonias resultantes fueron purificadas y a partir de una colonia resistente á  $6\mu\text{g/ml}$  de ác. nalidíxico, se hizo un cultivo del cual se sembró en cajas de medio Luria con  $40\mu\text{g/ml}$  de ác. - nalidíxico, se hizo un cultivo del cual se sembró en cajas de medio Luria con  $40\mu\text{g/ml}$  de ác. nalidíxico. La cepa fue purificada dos veces.

### C u r a c i ó n

La inhibición selectiva de la duolicación de un plásmido se puede obtener con rifampicina (58). En general, un cultivo fresco se diluye a una concentración final de 1000-10 000 células/ml en caldo Luria y se añade rifampicina a una concentración final de  $10\mu\text{g/ml}$ . El tubo se incuba en la obscuridad á  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación violenta durante 20 hs. Posteriormente, se siembra en cajas de medio Luria para obtener colonias aisladas que se analizan por duplicación en cajas de medio selectivo (59). La frecuencia de curación se expresa como por ciento de células que han perdido el plásmido. En todos los experimentos se incluyó como control negativo a la cepa incubada en caldo Luria sin rifampicina, y como control positivo a la mis - ma cepa bacteriana portadora de un plásmido curable conocido.

C o n s t r u c c i ó n d e c e p a s p o r t a d o r a s d e p l á s m i d o s

Cepas bacterianas, portadoras de uno o más elementos genéticos extracromosómicos, fueron construidas con conjugación bacteriana. El protocolo general consistió en mezclar 0.1 ml del cultivo de la cepa donadora con 0.1 ml de la cepa recipiente en 1.0 ml de caldo Luria; la mezcla de conjugación fué incubada á 30°C ó 37°C, según el caso. Después de incubación nocturna se sembraron las diluciones apropiadas en cajas con medio selectivo. En todos los casos la cepa donadora y recipiente se marcaron diferencialmente para poder contraseleccionar a la cepa donadora.

Los resultantes transconjugantes partadores de plásmidos R fueron seleccionados utilizando uno de los siguientes marcadores de resistencia: (a) Cm<sup>r</sup>: R1-19, pCU504, R100-1, pCU251, pCU401, pCU402, pCU1; (b) Amp<sup>r</sup>: pCU252; (c) Tc<sup>r</sup>: R64-11, pCU 4, pCU 8, R27.

Cuando la cepa era portadora de un plásmido colicinogénico ésta fue identificada por picadura o por el método de doble capa (60). Las cepas portadoras de Flac fueron seleccionadas en cajas de medio mínimo con lactosa como fuente de carbono.

Sensibilidad a bacteriófagos específicos de donador

La identificación de cepas bacterianas sensibles o resistentes a bacteriófagos específicos de donador fue investigada en cajas con medio Fry. En todos los casos los cultivos fueron frescos y habían sido previamente purificados para asegurarse que por lo menos, el 99% de las células eran portadoras de uno ó más plásmidos.

El protocolo general fue el siguiente: 0.2 ml del cultivo de la cepa en estudio se mezcla con 3.0 ml de agar blando fundido y se siembran en una caja con medio Fry. Una vez solidificada la capa de agar se añade 0.01 ml de un lisado fágico de alto título y se incuba a 42° C durante 12 h. Las cajas se analizan para la presencia de zonas de lisis.

### Conjugación Bacteriana

Para determinar la capacidad donadora de cepas portadoras de plásmidos conjugativos el procedimiento general fue el siguiente: se inoculan 10 ml de caldo Luria con un cultivo fresco de la cepa donadora ó de la cepa recipiente y se incuban con agitación a 37° C hasta alcanzar una concentración aproximada de  $2-4 \times 10^8$  células/ml, determinada por lectura en un colorímetro fotoeléctrico Klett-Summerson, y por cuenta viable. Es recomendable que la cepa donadora se use inmediatamente, la cepa recipiente puede mantenerse en hielo durante 60-90 min. La mezcla de conjugación se hace en matraces Erlenmeyer de 50 ml en la siguiente proporción: 0.5 ml del cultivo de la cepa donadora y 4.5 ml del cultivo de la cepa recipiente, y se incuba durante 30 min. a 37° C. La conjugación se interrumpe por agitación violenta en Vórtex, se diluye apropiadamente en medio M9 base y se siembra, por duplicado, en el medio selectivo usando agar blando fundido. Como control se siembra, por separado, las cepas donadora y recipiente en el medio selectivo.

Se determina también el por ciento de bacterias donadoras por duplicación en cajas de medio Luria adicionadas del antibiótico correspondiente.

La eficiencia de transferencia se calcula como el número de transconjugantes por 100 donadores.

### Incompatibilidad

El análisis de incompatibilidad entre plásmidos se hizo de acuerdo al siguiente protocolo general. Se construyeron derivados de JM 1456 y de JC 3272, portadores de uno de los plásmidos en estudio o de un plásmido de grupo de incompatibilidad definido (Tabla II). En todos los casos las conjugaciones fueron recíprocas usando JM 1456 como donador y JC 3272 como recipiente, y el plásmido seleccionado fue aquel portado con el donador. Los transconjugantes fueron analizados para la presencia de los dos plásmidos por duplicación en cajas apropiadas. Cuando el plásmido donador desplaza al plásmido residente o no se puede establecer en la cepa recipiente se dice que ambos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad.

### Obtención de ADN de plásmido

- (1) Inocular 0.1 ml de cultivo de la cepa en estudio en 10 ml de caldo Luria e incubar, con agitación á 37° C, hasta que llegue a fase logarítmica tardía (aproximadamente 80-90 unidades Klett- Summer son).

- (2) Centrifugar el cultivo durante 10 min. á 5 000 rpm.
- (3) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 ml de amortiguador TE.
- (4) Centrifugar durante 10 min. á 5 000 rpm.
- (5) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 0.25 ml de amortiguador TE.
- (6) Los siguientes pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente y agitando muy suavemente:
  - (a) agregar 0.025 ml de lisozima ( 10 mg/ml en amortiguador TE) y dejar actuar por 10 min.,
  - (b) agregar 0.025 ml de EDTA (0.1 M, pH 8) y dejar actuar por 5 min.,
  - (c) agregar 0.040 ml de lauril sulfato de sodio al 10% y dejar actuar por 10 min.,
  - (d) agregar 0.065 ml de NaOH 1 M y dejar actuar por 10 min.,
  - (e) agregar 0.065 ml de solución neutralizadora ( 0.2M Trizma base y 1.8M Trizma HCl) e incubar 4 hs. en baño de agua a una temperatura de 40° C.
- (7) Después de este tiempo el lisado se congela durante toda la noche á - 20° C.
- (8) Se descongela el lisado a temperatura ambiente y se separa el agregado mucoso de la solución clara restante la cual se corre en electroforesis en gel de agarosa.

#### Explicación del método

El método general, descrito anteriormente, para el aislamiento de ADN de plásmido se basa en que

más del 50% de éste se encuentra en la bacteria como una doble hélice circular y covalentemente cerrada.

Esta forma es más resistente a la acción del alcali que el ADN cromasómico lo que permite denaturar este último sin afectar irreversiblemente al primero, a un pH de 12-13. Posteriormente las muestras se neutralizan, el ADN cromasómico al renaturar forma grandes agregados ( a las concentraciones utilizadas) que constituyen un pseudoprecipitado gelatinoso, por razones no entendidas, dejando una solución clara que contiene el ADN circular y cerrado del plásmido. Esta solución es analizada posteriormente por electroforesis en geles de agarosa para separar el ADN del "detritus" celular y los plásmidos mismos en el caso de que existan dos o más de distinto peso molecular. Los geles se tratan con bromuro de etidio que permite detectar hasta 20 mg de ADN

#### Electroforesis en geles de agarosa

- (1) Preparar agarosa 0.08% en amortiguador TEA y fundirla en baño de agua hirviendo.
- (2) Geles de 9 cm de longitud fueron preparados en tubos de vidrio de 11 x 0.5 cm con el extremo inferior envuelto en papel Parafilm-M. Es importante que la superficie en que se coloca la muestra sea uniforme, lo cual se logra después de seccionar el gel con una hoja de bisturí. Posteriormente se substituye el papel Parafilm-M por un cuadro de gasa que se sujeta con un anillo de tubo látex del diámetro apropiado.

- (3) Se colocan los tubos en una cámara de electroforesis, de tal manera que el extremo superior del gel sea aquel de borde liso, y se llena con amortiguador TEA.
- (4) A la muestra de solución clara, resultante del lisado celular, se le agregan unas gotas de bromofenol en glicerol (0.1 ml de una solución saturada de bromofenol en agua por cada 5 ml de glicerol) de manera que adquiere un color azul oscuro.
- (5) De la mezcla anterior se colocan 50  $\mu$ l por gel y se corren á 40 Voltios durante 4-5 horas (tiempo aproximado en que sale el colorante del gel).
- (6) Los geles se retiran y se tiñen individualmente en una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml durante 30 min. a temperatura ambiente.
- (7) Posteriormente se analizan con luz ultravioleta y se fotografían (en caso necesario) usando un filtro rojo y una película Tri-X pan, blanco y negro de 400 asa; el tiempo de exposición es de 10-15 segundos.

## R E S U L T A D O S

I - Clasificación de las cepas de Salmonella typhimuriumClasificación por patrones de resistencia

El análisis de sensibilidad a antibióticos de ciento seis cepas de Salmonella typhimurium permitió la conformación de catorce grupos en base a sus patrones de resistencia. El análisis de estos grupos se describe en la Tabla III. Es conveniente mencionar que esta clasificación es arbitraria y no obedece a ningún criterio taxonómico preestablecido.

Los patrones de resistencia encontrados fueron complejos y no permiten utilizarlos como un buen criterio de clasificación de cepas bacterianas. Aproximadamente un tercio de éstas fueron resistentes a un solo antibiótico, mientras que el resto mostró diversas asociaciones. Una observación interesante fue que la resistencia a ampicilina, solo o asociada con otros antibióticos, fue la más frecuente en cuanto al número de cepas aisladas. Por otro lado, la existencia de un número importante de cepas multisensibles sugiere que los marcadores de resistencia a antibióticos no es una característica obligada en Salmonella typhimurium

Búsqueda de marcadores cromosómicos

Otro criterio de clasificación consistió en la detección de otros posibles marcadores genéticos que

podieran facilitar una correlación filogenética entre las cepas de Salmonella typhimurium. Este tipo de análisis se basó en que, aproximadamente, el 90% de las cepas de Salmonella typhi aisladas en el mismo hospital, entre 1973 y 1975, eran auxótrofas (Alfaro, comunicación personal).

Las cepas bacterianas fueron estudiadas en dos tipos de medio mínimo: el primero adicionado únicamente con glucosa, y el otro con glucosa y casaminoácidos. Cualquier auxótrofo para aminoácidos debería crecer en el segundo tipo de medio, mientras que las cepas protótrofas deberían crecer en los dos. Los resultados de estos experimentos mostraron que el 100% de las cepas eran protótrofas. Obviamente, el hecho de que carezcan de algún requerimiento nutritivo no puede ser tomado como evidencia de una relación genética directa entre ellas.

## II - Características genéticas y moleculares de los plásmidos R estudiados

Criterios de selección de las cepas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Shigella dysenteriae tipo 1

De las cepas de Salmonella typhimurium se seleccionaron aquellas representativas de los grupos I, II y VIII. La cepa del grupo I (B21) era importante para el aislamiento posterior de mutantes  $\text{Nal}^r$  y  $\text{Str}^r$ , utilizadas en experimentos de conjugación. El grupo II (B3) se escogió porque ampicilina es el antibiótico

de elección, después del cloranfenicol, en el tratamiento de fiebre tifoidea. El grupo VIII (B15) se eligió por tener un patrón de resistencia semejante al descrito como preponderante en la epidemia de fiebre tifoidea en México en 1972-73, y en la epidemia de disentería bacilar que tuvo lugar en Centroamérica durante 1969 y 1970.

Dos cepas de Shigella dysenteriae tipo 1 (obtenidas del Dr. Leonardo Mata) aisladas en Guatemala durante la epidemia, eran portadoras de un plásmido R con un patrón similar al descrito para las cepas mexicanas de Salmonella typhi. Estos plásmidos R fueron transferidos a la cepa de Escherichia coli JM 1456 para su uso posterior; las cepas originales se perdieron durante su almacenamiento.

## T A B L A III

CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE Salmonella typhimurium DE ACUERDO A SU PATRON DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

GRUPO	PATRON DE RESISTENCIA	NUMERO DE CEPAS
I	multisensible	25
II	Ap	11
III	ApKm	38
IV	ApKmSmTc	7
V	ApSmTc	5
VI	ApCmKmSmTc	5
VII	ApCmSmTc	11
VIII	CmSmTc	3
IX	CmKmSmTc	5
X	Cef	1
XI	ApCefCmSmTc	1
XII	ApCefCmKmSmTc	1
XIII	Tc	2
XIV	Km	1

Además, se seleccionaron cepas de Salmonella typhi aisladas durante la epidemia en México con un patrón de resistencia semejante al encontrado en las cepas de Salmonella typhimurium del grupo VIII, y en las cepas de Shigella dysenteriae tipo 1.

Demostración indirecta de la existencia de plásmidos R en Salmonella typhimurium

En este grupo de experimentos se utilizaron dos diferentes métodos: (a) transferencia de los marcadores de resistencia del huésped original a la cepa de Escherichia coli K-12 JM 1456, y (b) el tratamiento de estos derivados con tetrampicina con objeto de detectar la inhibición selectiva de posibles plásmidos, estimado por la pérdida de marcas de resistencia.

El primer paso consistió en construir derivados de JM 1456 resistentes a ampicilina o a cloranfenicol, como se describe en Materiales y Métodos. La selección fué para  $Ap^r$  ó  $Cm^r$ , respectivamente, y el donador fue contraseleccionado con ácido nalidíxico. En el caso particular de los derivados  $Cm$ , este marcador se encontró consistentemente asociado con la resistencia a  $SmSpTc$ . La adquisición de esta información, tanto en el caso de  $Cm$  como en el de  $Ap$ , fue estable después de varios ciclos de purificación de la cepa.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de curación del derivado  $(CmSmSpTc)^r$  de - -

JM 1456 fueron los siguientes: en el primer paso el 1% de las colonias analizadas fue Tc<sup>S</sup>, pero retenían los otros marcadores de resistencia. Un tratamiento subsecuente con rifampicina permitió aislar, con una frecuencia de 4%, colonias que habían perdido todos los marcadores de resistencia. Los datos anteriores sugieren que la resistencia a CmSmSpTc está asociada con la presencia de uno ó más plásmidos R.

Una situación diferente se observó en el caso del derivado Ap<sup>r</sup> de JM 1456 ya que en varios experimentos de curación no se pudo detectar la pérdida de este marcador. Para ello existen, al menos, dos explicaciones : (1) el método utilizado no es el indicado para demostrar la independencia cromosómica de la marca de resistencia, o (b) la información genética de la resistencia está covalentemente unida al cromosoma bacteriano.

#### Análisis molecular de los plásmidos en estudio

El análisis de ADN de plásmido por electroforesis en geles de agarosa permite demostrar en forma concluyente su estado autónomo y, además, tener un valor aproximado del peso molecular del mismo; ambos puntos eran importantes en el desarrollo de este trabajo. Todos los experimentos se hicieron usando Escherichia coli K-12 como huésped de cada uno de los plásmidos y, además, se utilizó una cepa control sin elemento genético extracromosómico.

TABLA IV CURVA ESTANDAR CON PLASMIDOS CONOCIDOS

---

Plásmidos	Migración relativa	Peso molecular (dal)	Referencia
<u>Flac</u>	0.45	$135 \times 10^6$	61
Col V2	0.53	$94 \times 10^6$	61
R1-19	0.55	$65 \times 10^6$	27
pCU504	0.62	$50 \times 10^6$	27
pSC101	1.40	$5.8 \times 10^6$	61
Col E1	2.0	$4.2 \times 10^6$	61

TABLA V CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS R DE SALMONELLA TYPHI, SALMONELLA TYPHIMURIUM Y SHIGELLA DYSENTERIAE TIPO 1 EN ESCHERICHIA COLI K-12 .

Plásmido	Fenotipo <sup>a</sup>	Migración relativa	Peso molecular aprox. (dal)
pCU1	CmSmSpTcTra	0.43	135 x 10 <sup>6</sup>
pCU251	CmSmSpTcTra	0.45	135 x 10 <sup>6</sup>
pCu253	Tc <sup>S</sup>	N.H. <sup>b</sup>	-----
pCU252	ApTra	0.80	20 x 10 <sup>6</sup>
pCU401	CmSmSpTcTra	0.54	65 x 10 <sup>6</sup>
pCu403	Tc <sup>S</sup>	N.H. <sup>b</sup>	-----
pCU404	Cm <sup>S</sup> Sm <sup>S</sup> Sp <sup>S</sup>	N.H. <sup>b</sup>	-----
pCU402	CmSmSpTcTra	0.54	65 x 10 <sup>6</sup>
pCU405	Tc <sup>S</sup>	N.H. <sup>b</sup>	-----

a) De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Novick et. al. (1976)(7)

b) No hecho

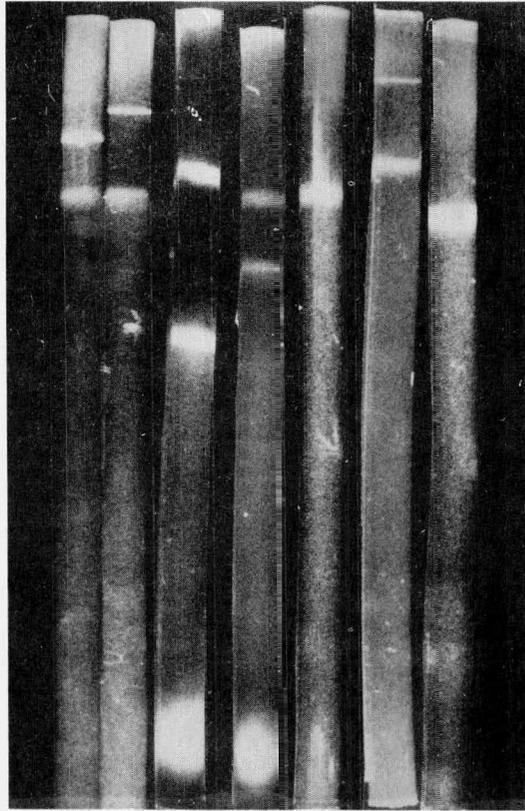


FIGURA 1: Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. En todos los geles la migración fue de la parte superior (polo negativo) a la parte inferior (polo positivo). De izquierda a derecha los geles corresponden a cepas portadoras de pCU504, Col V2, Col E1, pSC101, R1-19 ó Flac . El último gel es la cepa control sin plásmido.

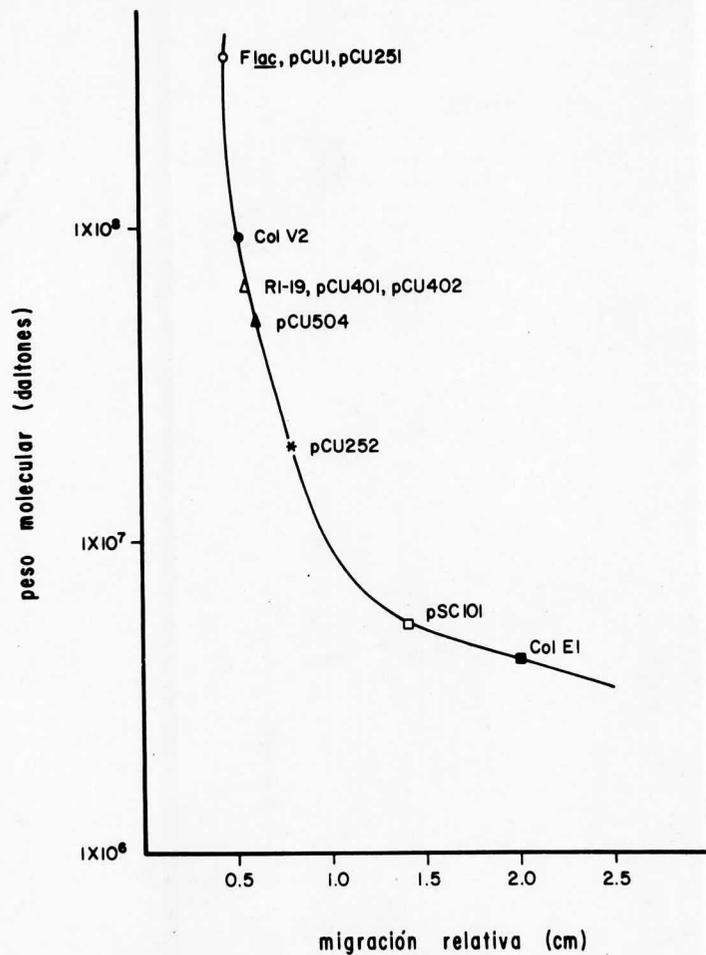


FIGURA 2: Migración relativa de ADN circular en geles de agarosa al 0,8% de plásmidos de peso molecular conocido y de aquellos utilizados en este trabajo

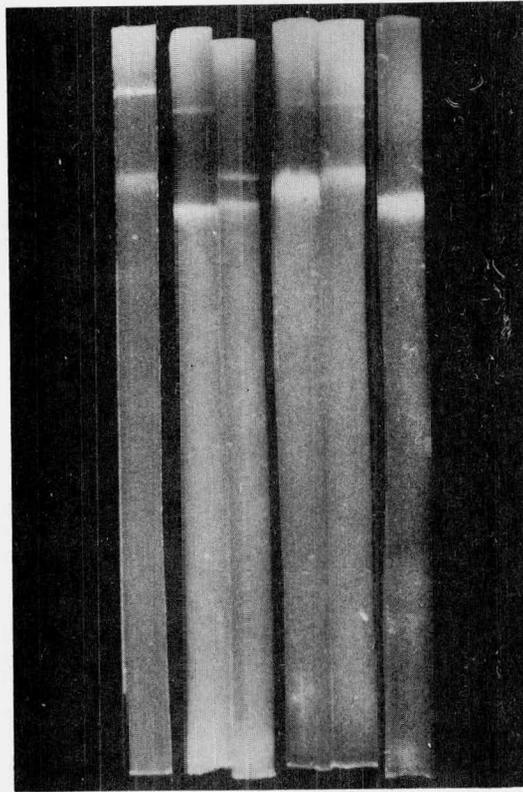


FIGURA 3: Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. En todos los geles la migración fue de la parte superior (polo negativo) a la parte inferior (polo positivo). De izquierda a derecha los geles corresponden a cepas portadoras de pCU1, pCU251, pCU252, pCU401 ó pCU402. El último gel es la cepa control sin plásmido.

En la primera etapa de este análisis se elaboró una curva estándar con plásmidos conocidos, y se construyó una gráfica de peso molecular vs. migración relativa. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla IV y en las Figuras 1 y 3. La migración relativa se expresa en centímetros y es el cociente entre la distancia que recorre la banda de ADN del plásmido y la banda de ADN cromosómico; ésta última resulta ser un buen marcador interno puesto que es homogénea en todos los geles analizados. Sin embargo, tiene la desventaja de enmascarar bandas de ADN con una migración similar.

Una vez construída la curva estándar, las cepas de Escherichia coli K-12 portadoras de los plásmidos en estudio fueron investigadas usando el mismo método. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V y en las Figuras 2 y 3. Los valores se consideran aproximados porque la resolución del gel es limitante para pesos moleculares elevados.

Los datos sugieren que los plásmidos identificados en Salmonella typhi y en Salmonella typhimurium del grupo VIII tienen un peso molecular similar, además de conferir el mismo patrón de resistencia (CmSmSpTc). Los plásmidos provenientes de Shigella dysenteriae tipo 1 tienen un peso molecular distinto a los anteriores, pero semejante entre ellos. Estos experimentos permitieron, además, demostrar que la resistencia a ampicilina en la cepa de Salmonella typhimurium grupo II estaba asociada con la presencia de un plásmido.

En base a estos resultados, se puede concluir que los patrones de resistencia identificados están determinados por plásmidos R. Una vez confirmado esto, los derivados homogénicos obtenidos anteriormente, por tratamiento con rifampicina, fueron designados también con un número de serie y se describen detalladamente en la Tabla V. Es conveniente mencionar que no se hicieron geles de los derivados homogénicos construidos in vitro porque en la cepa parental solo se observó una banda de plásmido; esto sugiere que el cambio en el patrón de resistencia sea consecuencia de una delección que abarque uno o más genes de resistencia pero no involucra genes de transferencia ni propiedades de incompatibilidad ( ver más adelante).

#### Eficiencia de transferencia

Los plásmidos pCU251, pCU252, pCU401 y pCU402 son capaces de promover conjugación bacteriana. Esto fue demostrado en cruzas bacterianas no cuantitativas hechas al construir derivados de JM 1456.

Los experimentos que se describen a continuación están basados en la determinación más precisa de la eficiencia de transferencia de cada uno de ellos. Además, esta determinación fue investigada utilizando diferentes huéspedes bacterianos con objeto de detectar posibles variaciones en su capacidad donadora, que pudiera revelar datos de interés epidemiológico. En todos los casos se llevaron a cabo los experimentos de conjugación bacteriana de acuerdo a Materiales y Métodos.

TABLA VI

FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R EN DIFERENTES HUESPEDES BACTERIANOS A 30°C y 37°C

DONADOR	EGE	RECIPIENTE	% TRANSFERENCIA	
			30°C	37°C
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU1	<u>Escherichia coli</u> K-12	$3 \times 10^{-1}$	$< 1 \times 10^{-6}$
<u>Salmonella typhi</u>	"	<u>Salmonella typhi</u>	$3 \times 10^{-1}$	$< 1 \times 10^{-6}$
<u>Salmonella typhimurium</u>	"	<u>Salmonella typhimurium</u>	$2 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^{-6}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU251	<u>Escherichia coli</u> K-12	2.0	$< 1 \times 10^{-5}$
<u>Salmonella typhi</u>	"	<u>Salmonella typhi</u>	$2 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-6}$
<u>Salmonella typhimurium</u>	"	<u>Salmonella typhimurium</u>	$8 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-5}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU252	<u>Escherichia coli</u> K-12	$9 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-3}$
<u>Salmonella typhi</u>	"	<u>Salmonella typhi</u>	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$
<u>Salmonella typhimurium</u>	"	<u>Salmonella typhimurium</u>	$2 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-3}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU401	<u>Escherichia coli</u> K-12	$< 1 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
<u>Salmonella typhi</u>	"	<u>Salmonella typhi</u>	$< 3 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-5}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU402	<u>Escherichia coli</u> K-12	$< 1 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
<u>Salmonella typhi</u>	"	<u>Salmonella typhi</u>	$< 2 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-5}$

La Tabla VI muestra la eficiencia de transferencia de pCU1, pCU251, pCU252, pCU401 y pCU402 en conjugaciones intergenéricas a diferente temperatura de incubación. Es interesante el hecho de que pCU1 y pCU251 sólo transfirieron en forma eficiente cuando la temperatura de incubación fué de 30° C durante todo el experimento. Este efecto es independiente del huésped utilizado, lo cual lo hace altamente sugestivo de que el plásmido, y no el cromosoma bacteriano, sea el responsable. No se puede explicar como debido a una incapacidad del plásmido para duplicarse á 37° C, puesto que la progenie resultante de cultivar células donadoras, por varias generaciones a esta temperatura, continua siendo R<sup>+</sup>. En los otros plásmidos analizados (pCU252, pCU401 y pCU402) no se observa este efecto de la temperatura sobre la eficiencia de transferencia.

Asociando los datos obtenidos en electroforesis en gel de agarosa y en estos experimentos de conjugación, se sugiere que pCU1 y pCU251 están genéticamente relacionados. Por el contrario, pCU252, pCU401 y pCU402 aparentemente pertenecen a otros grupos de plásmidos.

#### Experimentos de complementación

Con objeto de determinar si el efecto observado á 37° C, en pCU1 y pCU251, podía ser corregido por otros sistemas de transferencia, como los característicos de ColVB y de ColIbdrd, cepas portadoras de uno de los plásmidos problema y uno de los plásmidos conocidos fueron construidas de acuerdo a Mate-

riales y Métodos. Cepas dobles de este tipo fueron estables después de varios ciclos de purificación, y en ninguno de los casos se observó inhibición del sistema de transferencia (estimado por sensibilidad a bacteriófagos específicos de donador) de ColVB o de ColIbdrd.

En este tipo de experimentos los transconjugantes se seleccionaron para el plásmido problema, la cotransferencia o transferencia del plásmido coexistente no fue investigada. Los resultados se muestran en la Tabla VII. Se puede observar que aún cuando la eficiencia de transferencia mejoró notablemente á - 37°C, no se alcanzaron los valores obtenidos á 30°C para el plásmido problema solo. Además, la cifras resultantes fueron muy similares independientemente de los plásmidos utilizados y, por lo tanto, no permiten una correlación con alguno de los sistemas de transferencia.

T A B L A VII      EXPERIMENTOS DE COMPLEMENTACION

DONADOR	EGE	RECIPIENTE	% TRANSFERENCIA 37°C
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU1/Col VB	<u>Escherichia coli</u> K-12	$2 \times 10^{-4}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU1/Col <u>Ibdrd</u>	<u>Escherichia coli</u> K-12	$2 \times 10^{-4}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU251/Col VB	<u>Escherichia coli</u> K-12	$1 \times 10^{-3}$
<u>Escherichia coli</u> K-12	pCU251/Col <u>Ibdrd</u>	<u>Escherichia coli</u> K-12	$2 \times 10^{-3}$

### Incompatibilidad

Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando cepas de Escherichia coli K-12 : JC 3272 como huésped, y JM 1456 como donador.

Incompatibilidad con plásmidos del grupo H: en un primer grupo de experimentos los derivados construidos in vitro pCU253, pCU403 ó pCU405 (ver TABLA V para derivación) se investigaron con pCU8 ó R27 en cruza recíprocas. El raciocinio fue que los plásmidos de Salmonella typhi son, predominantemente, del grupo H (Alfaro, comunicación personal) y R27 es un plásmido testigo para este grupo.

Los resultados mostraron que únicamente pCU253 fue incompatible tanto con pCU8 como con R27. Esto puede interpretarse como una evidencia adicional de que pCU1 y pCU251 están íntimamente relacionados. Resultados semejantes que definen a los plásmidos R de Salmonella typhimurium y de Shigella dysenteriae tipo 1 como miembros de dos grupos de incompatibilidad diferentes, se obtuvieron con pCU404 y pCU253 puesto que estos plásmidos son compatibles. Los datos obtenidos coinciden con observaciones previas (62).

Por último, se hicieron estudios de incompatibilidad entre los plásmidos R de Shigella dysenteriae tipo 1 utilizando para ello pCU404 y pCU405. Los resultados indican que ambos plásmidos están relacionados, ya que fueron incompatibles.

Otro plásmido en estudio fue pCU252, el cual no fue posible identificarlo en ningún grupo de incompatibilidad puesto que fue capaz de coexistir con todos los plásmidos estudiados.

Es posible concluir que los plásmidos R, con un patrón de resistencia caracterizado por CmSmSpTc, identificados en cepas mexicanas de Salmonella está genéticamente relacionados.

## D I S C U S I O N

La falta de estudios sistemáticos en el campo de la salud en México, dificulta tener un buen estimado de la frecuencia de diversas enfermedades. Además, la multiplicidad de instituciones no permite que la información sea integrada y, en ocasiones, difiere considerablemente. Por esta razón, en este trabajo se ha pretendido contribuir a un plan general para el estudio de salmonelosis en nuestro país, en colaboración con el Centro Nacional de Referencia de Salmonella typhi por fagotipo ( Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). La importancia de este estudio reside en que la salmonelosis en general produce aproximadamente una tasa de mortalidad de  $7.9 \times 10^5$  habitantes (63).

En una primera etapa se analizaron ciento seis cepas de Salmonella typhimurium con objeto de detectar sus patrones de resistencia. Los resultados de este análisis mostraron trece patrones de resistencia caracterizados, cada uno de ellos, por diversas asociaciones de resistencia a antibióticos (TABLA III). Cepas bacterianas resistentes a ampicilina, sola o asociada con la resistencia a otros antibióticos, se aislaron con mayor frecuencia. Esto es importante ya que uno de los antibióticos de elección en el tratamiento de la enfermedad es la ampicilina. De las cepas multiresistentes aquellas que mostraron resistencia a CmSmSpTc (grupo VIII) fueron interesantes ya que una asociación similar fue descrita para Salmonella typhi durante y después de la epidemia que afectó la parte central del territorio mexicano.

El número limitado de cepas no permite determinar la frecuencia de salmonelosis por Salmonella typhimurium, pero podría ser representativa de la frecuencia de cepas resistentes a antibióticos y de los diversos patrones de resistencia que pudieran ser detectados en un estudio más prolongado. Llama la atención que, a diferencia de Salmonella typhi, las cepas de Salmonella typhimurium mostraron una mayor complejidad en cuanto a resistencia a antibióticos. (Alfaro, en preparación).

Otra diferencia importante con las cepas de Salmonella typhi estudiadas en este laboratorio (Alfaro, en preparación), fue que no se detectaron marcadores cromosómicos que permitieran establecer una relación genética entre las distintas cepas de Salmonella typhimurium.

La posibilidad de que la resistencia a antibióticos, en Salmonella typhimurium de los grupos II y VIII, estuviera codificada por plásmidos R se investigó por diversos métodos: curación con rifampicina, capacidad de promover conjugación bacteriana a Escherichia coli K-12 y en base a sus características moleculares en electroforesis en geles de agarosa.

Para el análisis molecular de estas cepas se construyó, inicialmente, una curva estándar con plásmidos caracterizados previamente (TABLA IV). Los resultados de estos experimentos confirmaron la existencia de un EGE en cada una de las cepas estudiadas, que fueron designados como pCU251 (grupo VIII) y pCU252 (grupo II). Estos EGE no sólo difieren en la modificación fenotípica que confieren al huésped, sino

también en sus pesos moleculares (TABLA V). Otra diferencia detectada entre estos plásmidos fue la incapacidad para inhibir la duplicación de pCU252 con rifampicina; sin embargo, su independencia del cromosoma quedó demostrada por electroforesis en geles de agarosa.

Con objeto de establecer la existencia de una posible relación genética entre pCU251 y otros plásmidos, fenotípicamente indistinguibles, tales como pCU 1 (Salmonella typhi) y pCU401 ó pCU402 (Shigella dysenteriae tipo 1) estos EGE se estudiaron comparativamente usando los siguientes criterios: análisis cuantitativo de la eficiencia de transferencia a diferentes temperaturas, en base a sus características de incompatibilidad y molecularmente. Esto era importante ya que epidemias de disentería bacilar o fiebre tifoidea causadas por bacterias multiresistentes han sido descritas en años recientes (1, 2, 3, 4, 5, y 6).

Este tipo de estudio mostró que tanto pCU 1 como pCU251 son diferentes de pCU401 y pCU402. Los datos coinciden con observaciones previas (62, 64) que sugirieron, además, que no había una correlación entre las epidemias descritas en Centroamérica y en México. Por otro lado pCU1 y pCU251 son prácticamente indistinguibles de acuerdo a los criterios utilizados: los dos tienen un peso molecular elevado ( $> 100$  Mdal), pertenecen al grupo de incompatibilidad H y son ts para transferencia. Un resumen de los datos obtenidos en estos experimentos se presenta en la TABLA VIII. Es conveniente mencionar, que plásmidos R con características similares han sido descritos en el sureste de Asia (65, 66). No existe, a la fecha,

ninguna explicación satisfactoria para la extensa distribución geográfica de estos plásmidos.

Estudios de complementación de pCU1 y pCU251 no permitieron relacionar estos plásmidos R con otros EGE bien caracterizados. En todos los casos, el nivel de transferencia fue menor que el obtenido á 30°C, aunque superan el obtenido á 37°C con cepas portadoras únicamente del plásmido problema (TABLA VII). Estos resultados sugieren que (a) pCU1 ó pCU251 no intercambian productos con el plásmido coexistente y, (b) el incremento en la eficiencia de transferencia podría ser debido a recombinación entre los plásmidos o a movilización de pCU1 ó pCU251 por el plásmido coexistente.

Otro plásmido en estudio fue pCU252, el cual fue seleccionado por conferir resistencia a ampicilina. En ninguno de los experimentos, en que fue utilizado, se encontró una relación con pCU1 ó pCU251, pCU401 ó pCU402, por lo tanto, es posible sugerir que se trata de un EGE diferente.

Es posible concluir, que la existencia de plásmidos con un mismo patrón de resistencia no es suficiente como criterio de clasificación de EGE o para sugerir una posible interacción entre epidemias. Sin embargo, la semejanza entre pCU1 y pCU251 puede ser interpretada como evidencia sugestiva de la diseminación de plásmidos R entre la población bacteriana, en la naturaleza y/o dentro de hospitales, ya que ambos provienen de cepas aisladas de muestras clínicas.

## T A B L A VIII

HUESPED ORIGINAL	EGE	PM (dal)	TRANSFERENCIA	INCOMPATIBILIDAD
<u>Salmonella typhi</u>	pCU1	$135 \times 10^6$	<u>ts</u>	Grupo H
<u>Salmonella typhimurium</u>	pCU251	$135 \times 10^6$	<u>ts</u>	Grupo H
<u>Shigella dysenteriae</u> tipo 1	pCU401	$65 \times 10^6$	agreste	N.D.
<u>Shigella dysenteriae</u> tipo 1	pCU402	$65 \times 10^6$	agreste	N.D.

## R E S U M E N

Elementos genéticos extracromosómicos identificados en distintos grupos de enterobacterias y en diversas áreas geográficas fueron estudiados para establecer una posible relación filogenética. Los plásmidos R: pCU1 (Salmonella typhi), pCU251 (Salmonella typhimurium) y pCU401 ó pCU402 (Shigella dysenteriae tipo 1) confieren el mismo patrón de resistencia a antibióticos (CmSmSpTc) y, por lo tanto, son fenotípicamente indistinguibles. Otros plásmidos como pCU4 (Salmonella typhi) y pCU252 (Salmonella typhimurium) codifican para la resistencia a tetraciclina y a ampicilina, respectivamente. El estudio genético comparativo de estos plásmidos fue diseñado con el objeto de obtener mayor información sobre cada uno de ellos y, de esta manera, tratar de detectar un origen común. En todos los casos, cepas portadoras de cada uno de los plásmidos R fueron estudiados de acuerdo a los siguientes criterios : ( a ) experimentos de curación, ( b ) características moleculares, ( c ) características de incompatibilidad y, ( d ) capacidad de inhibir los sistemas de transferencia de plásmidos conocidos.

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

- (1) Farrar, E.W. y M. Eidson (1971) " R Factors in Strains of Shigella dysenteriae type 1 Isolated in the Westwern Hemisphere during 1969-1970". J. Infect. Dis. 124 No.3: 327-329.
- (2) Olarte, J., Varela, G. y E. Galindo (1971). "Infección por Shigella dysenteriae 1 (Bacilo de Shiga) en México ". Bol. Med. Hosp. Infant. Vol. XXVIII No. 6 : 605-612.
- (3) Gangarosa, J.E., Bennett, J.V., Wyatt, C., Pierce, P.E., Olarte, J., Mendoza-Hernández, P., Vázquez, V. y D. Bessudo. (1972). "From the Center for Disease Control". J. Infect. Dis. 126 N2: 215-218.
- (4) Bessudo, D., Olarte, J., Mendoza-Hernández, P., Galindo, E., Carrillo, J., Gutiérrez Trujillo, G. y J. Kumate. (1973). "Aislamiento de S. typhi resistentes a altas concentraciones de cloranfenicol". Bol. Ofic. Sanit. Panamer. Vol. LXIV No. 1: 1-6.
- (5) Olarte, J. y E. Galindo. (1973). "Salmonella typhi resistant to Chloramphenicol, Ampicillin, and Other Antimicrobial Agents: Strains Isolated During and Extensive Typhoid Fever Epidemic in Mexico". Antimicrob. Ag. Chemother. 4 No. 6: 597-601
- (6) Mendoza-Hernández, P., Terminel-Valenzuela, M. y L. Ruiz-Maya. (1974). "Experiencias bacteriológicas, clínicas y terapéuticas en 1 676 casos de fiebre tifoidea". Gac. Med. Mex. 108 No. 1: 85-91.
- (7) Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss III, R., Datta, N. y S. Falkow. (1976). "Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids: a Proposal". Bacteriol. Rev. 40 No. 1: 168-189.
- (8) Kingsbury, D.T. y D.R. Helinski. (1970). " DNA polymerase as a requirement for the maintenance of the bacterial plasmid colicinogenic factor E1". Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1538-1544.

- (9) Goebel, W. (1972). "Replication of the DNA of the colicinogenic factor E1 (Col E1) at the restriction temperature in a DNA replication mutant thermosensitive for DNA polymerase III". *Nature New Biol.* 237: 67-70.
- (10) Hirota, Y. (1960). "The effect of acridine dyes on matying type factors in Escherichia coli". *Genetics.* 46: 57-64.
- (11) Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M.R. y Y.A. Chabbert. (1969). "Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacteria and Staphylococci". *J. Gen. Microbiol* 54: 417.
- (12) Wehrli, W. Y M. Staehelin. (1971). "Actions of the Rifamycins". *Bacteriol. Rev.* 35 : 290-309.
- (13) Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo , N. y S. Nakamura. (1968). "Effective Elimination of Drug Resistance and Sex Factors in Escherichia coli by Sodium Dodecyl Sulfate". *J. Bacteriol.* 95 : 1078-1089.
- (14) Birks, J.H. Y R.J. Pinney. (1975). "Correlation Between Thymineless Elimination and Absence of hspII (EcoRII) Specificity in N-Group Factors". *J. Bacteriol.* 121No. 3: 1208-1210.
- (15) Waring, M. (1970). "Variations of the Supercoils in Closed Circular DNA by Binding of Antibiotics and Drugs: Evidence for Molecular Models Involving Intercalation". *J. Mol. Biol.* 54: 247-279.
- (16) Riva, S., Fietta, A., Berti, M., Silvestri, L.G. y E. Romero. (1973). "Relationships Between Curing of the F Episome by Rifampicin and by Acridine Orange in Escherichia coli". *Antimicrob. Ag. Chemother.* 3 : 456-462.
- (17) Blair, D.G., Sherratt, D.J., Clewell, D.B. y D.R. Helinski. (1972). "Isolation of Supercoiled Colicinogenic Factor E1 DNA Sensitive to Ribonuclease and Alkali". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 69 : 2518-2522.

- (18) Hirota, Y., Ryter, A. y F. Jacob. (1968). "Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the process of DNA replication and cellular division". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33: 677.
- (19) Hohn, B. Y D. Korn. (1970). "Mutants of *Escherichia coli* that are unable to maintain an F-factor at high temperature". X Congr. Microbiol. México, 5.
- (20) Kingsbury, D.T. y D.R. Helinski. (1973). "Temperature-sensitive mutants for the replication of plasmids in *Escherichia coli*. I. Isolation and Specificity of Host and Plasmid Mutations". Genetics. 74 : 1-16.
- (21) Kingsbury, D.T. y D.R. Helinski. (1973). "Temperature-sensitive mutanta for the replication of plasmids in *Escherichia coli*. II. Properties of Host and Plasmid Mutations". Genetics. 74: 17-31
- (22) Cuzin, F. Y F. Jacob. (1967). "Mutations de l'episome F d'*Escherichia coli* K-12. Mutants á repli cation thermosensible". Ann. Inst. Pasteur. 112 : 397-418.
- (23) Koyama, A.H., Wada, C., Nagata, T. Y T. Yura. (1975). "Indirect selection for plasmid mutants : isolation of Col VB<sub>trp</sub> mutants defective in self = manteinance in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 122 : 73-79.
- (24) Terawaki, Y., Takayasu, H. Y T. Akiba. (1967). "Thermosensitive replication of a Kanamycin re - sistance factor". J. Bacteriol. 94 : 687.
- (25) Helinski, D.R. Y D.B. Clewell. (1971). "Circular DNA". Ann. Rev. Biochem. 40 : 899 - 942
- (26) Clowes, R.C. (1972). "Molecular Structure of Bacterial Plasmids". Bacteriol, Rev. 36 No. 3:361-405
- (27) Helinski, D.R. (1973). "Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R-factors". Ann. Rev. Microbiol. 27 : 437-470.

- (28) Freifelder, D., Folkmanis, A. Y. I. Kirchner. (1971). "Studies on Escherichia coli sex factors : evidence that covalent circles exist w ithin cells and the genral problem of isolation of covalent circles". J. Bacteriol. 105 : 722-727.
- (29) Vinograd, T., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. Y P. Laipis. (1965). "The twisted circular form of polyoma viral DNA". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53 : 1104-1111.
- (30) Grindley, N.D.F., Grindley, J.N. Y E.S. Anderson. (1972). "R factors compatibility groups". Mol. Gen. Genet. 119 : 287.
- (31) Guerry, P. Y S. Falkow. (1971). "Polynucleotide sequence relationships among some bacterial plasmids". J. Bacteriol. 107 : 372-374.
- (32) Grindley, N.D.F., Humpreys, G.O. Y E.S. Anderson. (1973). "Molecular studies of R-factor compa tibility groups". J. Bacteriol. 115 : 387-398.
- (33) Jacob, F., Brenner, S. Y F. Cuzin. (1963). "On the regulation of DNA replication in bacteria". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 : 239-348.
- (34) Sueoka, N. Y N.G. Quinn. (1968). "Membrane attachment fo the chromosome replication origin in Bacillus subtilis". Cold Spring Harbor Quant. Biol. 28: 329-348.
- (35) Fielding, P. y C.F. Fox. (1970). "Evidence for stable attachment of DNA to membrane at the replica tion origin of Escherichia Coli ". Biophys. Biochem. Res. Commun. 41: 157.
- (36) Falkow, S. (1975). "Infectious Multiple Drug Resistance". Pion Limited, London.
- (37) Curtiss, R. (1969). "Bacterial Conjugation". Ann. Rev. Microbiol. 23 : 69-136.
- (38) Brinton, C.C. (1965). "The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in Gram-negative bacteria". Trans. N.Y. Acad. Sci. 27 : 1003

- (39) Willetts, N. (1972). "The genetics of transmissible plasmids". *Ann.Rev.Gen.* 6: 257-268.
- (40) Ottow, J.C.G. (1975). "Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili". *Ann. Rev. Microbiol.* 29 : 79.
- (41) Edwards, S. Y C.G. Meynell. (1968). " A general method for isolating derepressed bacterial sex factors". *Nature.* 219 : 869.
- (42) Meynell, E. Y N. Datta. (1966). "The relationship of resistance transfer factors to the F factor of Escherichia coli K-12". *Genet. Res.* 7: 134-140.
- (43) Willetts, N.S. Y D.J. Finnegan. (1970). "Characteristics of Escherichia coli K-12 strains carrying both an F prime and an R factor". *Genet. Res., Camb.* 16 : 113-122.
- (44) Helmuth, R. Y M. Achtman. (1975). "Operon structure of DNA transfer cistrons on the F sex factor". *Nature.* 257 : 652-656.
- (45) Finnegan, D.J. Y N.S. Willetts. (1973). "The site of action of the F transfer inhibitor". *Mol.Gen. Genet.* 123 : 307.
- (46) Gasson, M.J. Y N.S. Willetts. (1975). "Five control Systems Preventing Transfer of Escherichia Coli K-12 Sex Factor F". *J. Bacteriol.* 122 No. 2 : 518-525.
- (47) Achtman, M., Willetts, N. Y A.J. Clark. (1971). "Beginning a Genetic Analysis of Conjugational Transfer Determined by the F factor in Escherichia coli by Isolation and Characterization of Transfer-Deficient Mutants". *J. Bacteriol.* 106 No. 2: 529-538.
- (48) Miller, J.H. (1972). "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor, N.Y. U.S.A
- (49) Jacob, F. Y E.A. Adelberg. (1959). "Transfert de caractères génétiques par incorporation au facteur sexuel d'Escherichia coli ". *Comp. Rend. Acad. Sci.* 249 : 189.
- (50) Hardy, K.G. (1975). "Colicinogeny and Related Phenomena". *Bacteriol Rev.* 39: 464-515.

- (51) Cohen, S.N. y C.A. Miller. (1969). "Multiple molecular species of circular R-factor DNA isolated from Escherichia coli". Nature. 224 : 1273-1277.
- (52) Sugino, Y. y Y. Hirota. (1962). "Conjugal fertility associated with resistance factor R in Escherichia coli". J. Bacteriol. 84 : 902. 910.
- (53) Vapnek, D., Lipman, M.B. y W. Rupp. (1971). "Physical properties and mechanisms of transfer of R-factors in Escherichia coli". J. Bacteriol. 108 : 508-514.
- (54) Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. y R.B. Helling. (1973). "Construction of biologically functional bacterial plasmid in vitro". Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 70 : 3240.
- (55) Bachmann, B.J., Brooks Low, K. y A.L. Taylor. (1976). "Recalibrated Linkage Map of Escherichia coli K-12". Bacteriol. Rev. 40 No. 1: 116-167.
- (56) Sanderson, K.E. (1972). "Linkage Map of Salmonella typhimurium. Edition IV". Bacteriol. Rev. 36 No. 4: 558-586.
- (57) Gross, J.D. (1963). "The effect of unbalanced growth on recombination formation in E. coli". Genet. Res. 4 : 457.
- (58) Clewell, D.B. y B.G. Evenchik. (1973). "Effects of rifampin, streptolydigin and actinomycin D on the replication of Col E1 plasmid DNA in Escherichia coli". J. Mol. Biol. 75 : 503.
- (59) Clark, A.J. y D. Margulies. (1965). "Isolation and characterization of recombination deficient mutants of Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 53 : 451.
- (60) Monk, M. y R.C. Clowes. (1964). "Transfer of colicin I factor in E. coli K-12 and its interaction with the F fertility factor". J. Gen. Microbiol. 36 : 361-384.
- (61) Kornberg, A. (1974). "DNA Synthesis". W.H. Freeman and Company. U.S.A.

- (62) Datta, N. y J. Olarte. (1974). "R. Factors in Strains of Salmonella typhi and Shigella dysenteriae I Isolated During Epidemics in Mexico: Classification by Compatibility". Antimicrob. Ag. Chemother. 5 : 310-317.
- (63) De la Loza, S., Cura, V.J. y M.L. Rodríguez. (1975). "Las condiciones de la salud en México en 1973". Salud Pùb. Mex. Epoca V. Vol. XVII. No. 5 : 627-655.
- (64) Thorne, M.G. y W.E. Farrar. (1973). "Genetic properties of R-factors associated with epidemic strains of Shigella dysenteriae type 1 from Central America and Salmonella typhi from Mexico". J. Infect. Dis. 128 No. 1: 132-136.
- (65) SALMONELLA SURVEILLANCE. "Group H Resistance Factors in Southern Asia". (1974). WHO Wkly Epidem. Rec., No. 29 : 245-246.
- (66) SALMONELLA SURVEILLANCE. "Chloramphenicol-resistant Salmonella typhi in Viet-Nam (Rep. of) and Thailand". WHO Wkly Epidem. Rec., No. 35 : 295-297.