

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**  
**COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**“Método de Marcación Genética de Plásmidos de  
*Escherichia coli*”**

**Ana Lucía Freire Vélez**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención  
del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 21 de mayo de 2012

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**“Método de Marcación Genética de Plásmidos de *Escherichia coli*”**

**Ana Lucía Freire Vélez**

Gabriel Trueba Piedrahita, DMV, M.Sc., PhD .....

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres Proaño, Ph. D. ....

Coordinadora de Carrera y Miembro del Comité de Tesis

Verónica Barragán, M. Sc. ....

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, M.Sc., Ph.D .....  
.....

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, Mayo de 2012

**© Derechos de Autor**

Ana Lucía Freire Vélez

2012

## **DEDICATORIA**

A mi familia por siempre haberme impulsado a seguir,  
a pesar de que las cosas no salían como esperaba,  
pero sobretodo por las fuerzas y el cariño de todos los días.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores por los conocimientos impartidos, especialmente a Gabriel y Vero que estuvieron pendientes y abiertos ante cualquier duda.

A todas las personas que forman parte del Instituto de Microbiología por el apoyo, conocimiento y días de trabajo compartidos.

A mi familia y amigos por siempre darme la fuerza y entender lo que implicaba realizar este trabajo.

## RESUMEN

*Escherichia coli* forma parte de la microbiota intestinal de los animales de sangre caliente, y es el principal anaerobio facultativo que reside en el colon humano. Esta especie ha evolucionado hacia distintos patotipos (ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, ExPEC, EAEC) que involucran la adquisición de islas de patogenicidad que pueden ser transportadas por plásmidos mediante transferencia horizontal. La posibilidad de evolución constante de los patotipos de *E. coli* explicaría en gran medida la enorme diversidad de clones de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en regiones geográficas definidas.

En el presente proyecto se desarrolló un método para marcar por medio de conjugación, plásmidos de ETEC con el transposón Tn5. Para ello se seleccionó mutantes de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico y ciprofloxacina, que sirvieron como marcadores en la selección de los transconjugados. A continuación, por medio de conjugación, se creó una biblioteca de mutantes de ETEC utilizando el transposón Tn5. La primera conjugación se realizó entre: *Escherichia coli* HB101 resistente a kanamicina (transposón Tn5) con ETEC (gen de patogenicidad LT) resistente al ácido nalidíxico. Para la segunda conjugación, se partió del Conjugado #1 (ETEC resistente al ácido nalidíxico + Tn5) y se lo conjugó con *E. coli* K12 resistente a ciprofloxacina. Finalmente se llevó a cabo la confirmación molecular, mediante amplificación por PCR tanto del gen LT, como del gen de resistencia a la kanamicina (KM).

Mediante conjugación se logró marcar un plásmido de ETEC desconocido con el transposón Tn5. Sin embargo dicho plásmido no contiene el gen de patogenicidad (LT), por lo cual no se logró identificar a mutantes de ETEC con la capacidad de transferir horizontalmente al Tn5. La transferencia del Tn5 a distintas cepas de *Escherichia coli* (ETEC, K12) se confirmó mediante la amplificación por PCR del gen de resistencia a la kanamicina. La presente investigación buscó determinar si existe transferencia horizontal de plásmidos de patogenicidad de ETEC a otros linajes de *E. coli*.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is part of the intestinal microbiota of warm-blooded animals, and is the primary facultative anaerobe that resides in the human colon. This species has evolved into different pathotypes (ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, ExPEC, EAEC) involving the acquisition of pathogenicity islands that can be transferred horizontally by plasmids. The possibility of constant evolution of *E. coli* pathotypes largely explains the enormous diversity of clones of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in defined geographic regions.

This project developed a method to tag ETEC plasmids with the Tn5 transposon, by conjugation. We selected mutants of *E. coli* resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin, which served as markers for the selection of transconjugants. Then, by conjugation, we created a library of ETEC mutants using the Tn5 transposon. The first conjugation was made between: *Escherichia coli* HB101 resistant to kanamycin (Tn5 transposon) and ETEC (LT pathogenicity gene) resistant to nalidixic acid. The second conjugation involved the Conjugate # 1 (nalidixic acid-resistant ETEC + Tn5) which were conjugated with *E. coli* K12 resistant to ciprofloxacin. Finally the molecular confirmation was conducted by PCR amplification of both the LT gene, and the kanamycin resistance gene (KM).

Through conjugation it was possible to tag an unknown ETEC plasmid with the Tn5 transposon. However the tagged plasmid didn't contain the pathogenicity gene (LT), thus the attempt to identify ETEC mutants with the ability to transfer horizontally the Tn5 failed. The Tn5 transfer to different *Escherichia coli* strains (ETEC, K12) was confirmed by PCR amplification of the kanamycin resistance gene. The present research investigated the existence of traceable horizontal transfer of plasmids containing pathogenicity genes from ETEC to other *E. coli* lineages.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN _____	1
1.1	Plásmidos _____	2
1.2	Conjugación bacteriana. _____	3
1.3	Transposones _____	5
1.3.1	Transposón Tn5 _____	6
1.4	Factores de Virulencia _____	7
1.5	Resistencia a antibióticos en bacterias. _____	8
1.6	Patotipos de <i>Escherichia coli</i> _____	9
1.6.1	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) _____	10
2.	JUSTIFICACIÓN _____	11
3.	ÁREA DE ESTUDIO _____	12
4.	OBJETIVOS _____	13
4.1	Objetivo General _____	13
4.2	Objetivos Específicos _____	13
5.	MATERIALES _____	14
5.1	Cepas bacterianas iniciales _____	14
5.2	Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas _____	15
5.3	Comprobación de patrones de resistencia _____	15
5.4	Soluciones para inducción de resistencia a antibióticos _____	16
5.5	Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva _____	17
5.6	Transferencia del transposón Tn5 mediante Conjugación _____	17
5.7	Conservación de cepas (Congelamiento - 20° C) _____	18
5.8	Extracción de ADN _____	19
5.9	PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a la kanamicina) _____	19
5.10	PCR confirmatorio para el gen "LT" _____	20
5.11	Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) _____	20
5.12	Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos de ETEC _____	22

6. MÉTODOS	24
6.1 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas	24
6.2 Comprobación de patrones de resistencia	25
6.3 Selección de mutantes resistentes a antibióticos	26
6.3.1 Selección de mutantes resistentes al ácido nalidíxico ( <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica)	26
6.3.2 Selección de mutantes resistentes a la ciprofloxacina ( <i>Escherichia coli</i> K12)	27
6.4 Fase preparativa previa a las Conjugaciones	29
6.5 Transferencia del transposón Tn5 mediante Conjugación	29
6.5.1 CONJUGACIÓN 1: <i>Escherichia coli</i> HB101 y <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	30
6.5.2 CONJUGACIÓN 2: Conjugado #1 (ETEC + Tn5) y <i>Escherichia coli</i> K12	31
6.6 Conservación de cepas (Congelamiento -20°C)	33
6.7 Extracción de ADN	34
6.8 PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a la kanamicina)	35
6.9 PCR confirmatorio para el gen "LT"	36
6.10 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%)	37
6.11 Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos de ETEC	37
6.11.1 Suspensión celular y bloques (plugs)	38
6.11.2 Lavado de los bloques	39
6.11.3 Electroforesis en gel de agarosa (0.7%)	39
7. RESULTADOS	40
7.1 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas	40
7.2 Comprobación de patrones de resistencia	41
7.3 Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva	41
7.3.1 Selección de mutantes resistentes al ácido nalidíxico ( <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica)	41
7.3.2 Selección de mutantes resistentes a la ciprofloxacina ( <i>Escherichia coli</i> K12)	42
7.4 Fase preparativa previa a Conjugaciones	43
7.5 Transferencia del Transposón Tn5 mediante Conjugación	44

7.5.1	CONJUGACIÓN 1: <i>Escherichia coli</i> HB101 y <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica _____	44
7.5.2	CONJUGACIÓN 2: Conjugado #1 (ETEC + Tn5) y <i>Escherichia coli</i> K12 _____	44
7.6	PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a kanamicina) _____	45
7.7	Transferencia del plásmido con el gen LT _____	45
7.8	Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos _____	46
8.	DISCUSIÓN _____	46
8.1	Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva _____	46
8.2	Marcación de plásmidos con Tn5 _____	48
8.3	Identificación y Tipificación de cepas bacterianas _____	49
9.	CONCLUSIONES _____	50
10.	RECOMENDACIONES _____	51
11.	BIBLIOGRAFÍA _____	53
12.	FIGURAS _____	57
13.	TABLAS _____	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura del transposón Tn5.....	57
Figura 2	Mecanismo de transposición del Tn5.....	57
Figura 3	Mecanismos de Adquisición de Información Genética .....	58
Figura 4	Modo de acción de las toxinas LT y ST de ETEC.....	59
Figura 5	Estriación de inóculo líquido en forma de cuadrícula .....	59
Figura 6	Esquema de la Metodología seguida para la Fase #2 (Conjugación #1).....	60
Figura 7	Esquema de la Metodología seguida para la Fase #3 (Conjugación #2).....	61
Figura 8	Distintos Metabolismos de cepas de <i>E. coli</i> en Agar MacConkey Lactosa .....	61
Figura 9	Diferentes patrones de <i>E. coli</i> visualizados en Agar Chromocult.....	62
Figura 10	Comparación de <i>E. coli</i> K12 previo y posterior al tratamiento con ciprofloxacina .....	62
Figura 11	Contaminación con Levaduras del Conjugado #2.....	63
Figura 12	Amplificación del Gen de resistencia a la kanamicina (Gradiente).....	63
Figura 13	Amplificación de los Conjugados #1 y #2 (Gen LT).....	64
Figura 14	Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos.....	64
Figura 15	Amplificación del gen LT para pools de aislados del Conjugado #2.....	65

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Concentración de reactivos utilizados para PCR del gen KM .....	66
Tabla 2	Concentración de reactivos utilizados para PCR del gen LT .....	66
Tabla 3	Pruebas bioquímicas confirmatorias para <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ST) .....	67
Tabla 4	Pruebas bioquímicas confirmatorias para <i>E. coli</i> K12 .....	68
Tabla 5	Pruebas bioquímicas confirmatorias para <i>E. coli</i> HB101 .....	69
Tabla 6	Pruebas bioquímicas confirmatorias para <i>E. coli</i> enterotoxigénica (LT) .....	70
Tabla 7	Mediciones de los halos de inhibición (Antibiograma Inicial) .....	71
Tabla 8	Patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> (Antibiograma Inicial).....	72
Tabla 9	Medición de los halos de inhibición (Antibiograma Completo) .....	73
Tabla 10	Patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> (Antibiograma Inicial).....	74
Tabla 11	Recuperación de mutantes resistentes al ácido nalidíxico para ETEC (Ensayo #1) .....	75
Tabla 12	Mutantes de ETEC resistentes al ácido nalidíxico (ST) Ensayo #2.....	75
Tabla 13	Selección de mutantes de <i>E. coli</i> K12 resistentes a ciprofloxacina .....	76
Tabla 14	Pruebas de susceptibilidad para ciprofloxacina (Antibiograma) .....	77
Tabla 15	Antibiograma confirmatorio de Cepas Iniciales .....	78
Tabla 16	Patrones de susceptibilidad y resistencia requeridos en las cepas Iniciales para experimentos de Conjugación .....	79
Tabla 17	Conteo de UFC del Conjugado #1 a las 24 y 48h.....	79
Tabla 18	Antibiograma del Conjugado #1 .....	80
Tabla 19	Conteo de UFC del Conjugado #2 (24 y 48h).....	80

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias y las arqueas son los organismos vivos más antiguos de nuestro planeta y es por ello que a lo largo de su existencia han desarrollado mecanismos y formas de adaptación que les permitan sobrevivir (Madigan, et al., 2004). La evolución por medio de la selección natural es un proceso en el cual los individuos adquieren ventajas adaptativas sobre su competencia, de manera que los más aptos logran subsistir y por ende generan una descendencia (Annika, 2005).

Las bacterias existentes en la actualidad son muy diferentes a sus antepasados, pues han ido mutando y adquiriendo genes que las han hecho capaces de prosperar en las condiciones actuales. Los cambios más notables comprenden el surgimiento de nuevos patotipos, un ejemplo muy claro de esto es *E. coli* que presenta 6 patotipos (ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, ExPEC, EAEC), los cuales contienen distintos factores de virulencia causantes de diversas enfermedades (Johnson & Nolan, 2009).

Existen dos formas principales de variación genética en microorganismos: la transferencia horizontal de genes y las mutaciones (Annika, 2005). La adquisición de genes de resistencia a antibióticos por medio de transferencia horizontal; así como también por mutaciones puntuales ha causado grandes problemas en lo que respecta a la microbiología clínica, pues poco a poco las bacterias se han hecho inmunes a agentes tóxicos utilizados para combatirlos (Russel, 2004).

Gran parte de la patogenicidad y resistencia a antibióticos es causada por mecanismos de transferencia horizontal de genes (conjugación, transformación, transducción) (Eisenberg, et al., 2011). Los plásmidos son considerados vehículos que llevan consigo estos genes, los cuales son transferidos principalmente por conjugación (Osborn & Boltner, 2002). La conjugación bacteriana, es un proceso mediante el cual se da la transferencia de información genética entre dos células que se encuentran en contacto directo. El material genético que generalmente se transfiere es plasmídico y ocasionalmente ADN cromosomal (Madigan, et al., 2004). Dentro de los plásmidos se puede encontrar transposones, que son elementos genéticos móviles, que pueden ser transportados de una célula a otra mediante plásmidos o por mecanismos conjugativos intrínsecos (Peters & Craig, 2001). Los transposones pueden llevar dentro de su secuencia genes que den cierta ventaja adaptativa como la resistencia a antibióticos o factores que potencien su patogenicidad (Bennet, 2008).

## **1.1 Plásmidos**

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que a diferencia de los fagos no tienen una forma extracelular. Son moléculas de ADN de doble cadena que forman un círculo, aunque también existen plásmidos lineales, cuya replicación es independiente a la del cromosoma bacteriano. Su configuración puede estar superenrollada, de manera que sea más compacta en el interior de la célula (Madigan, et al., 2004).

Existen distintos tipos de plásmidos, entre los de mayor importancia están los plásmidos que portan genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Johnson & Nolan, 2009). Los plásmidos asociados a virulencia pueden llevar consigo

genes que codifican para toxinas, adhesinas y otros factores que potencien el carácter invasivo o destructivo de la bacteria (Hamood, et al., 1986). Se ha visto también que estos genes con funciones específicas logran potenciar la adaptación bacteriana en sus respectivos nichos (Actis, et al., 1999).

Los plásmidos conjugativos son relativamente pequeños, su tamaño fluctúa desde los 30kb hasta sobrepasar los 100kb. Sin embargo, solamente de 20 a 30kb son necesarios para abarcar los genes que codifican las funciones conjugativas. En bacterias Gram positivas estos plásmidos tienden a ser más pequeños que en las Gram negativas debido a los distintos mecanismos de conjugación, los cuales requieren menos información (Bennet, 2008).

Un factor muy importante en la movilización de plásmidos es el Factor R, más conocido como “Factor de Resistencia”. A pesar de tratarse de un factor implicado en la resistencia bacteriana a ciertos antibióticos, se ha comprobado que su presencia genera una mayor aptitud en las bacterias que lo portan. Esto se debe a que potencia la transmisión de plásmidos que contengan tanto genes de resistencia a antibióticos como otros genes que posean factores de virulencia o ambos (Murray, et al., 1983).

## **1.2 Conjugación bacteriana.**

La conjugación bacteriana, es un proceso mediante el cual se da la transferencia de información genética entre dos células que se encuentran en contacto directo. Este es un proceso codificado dentro de un plásmido conjugativo, que tiene la capacidad de transferir una copia de su ADN a otra

célula. El material genético que generalmente se transfiere es plasmídico y ocasionalmente ADN cromosomal (Madigan, et al., 2004).

Para que se dé la conjugación es necesaria una célula receptora y una donadora. Por convención se ha llamado a la receptora como “hembra” y a la donadora como “macho.” Son los machos quienes contienen los plásmidos poseedores de genes para la síntesis del pili sexual, que están contenidos en la región *tra* (Madigan, et al., 2004).

La transferencia de ADN por medio de conjugación sigue el modelo de replicación por círculo rodante. Uno de los mecanismos de conjugación mejor entendidos es el del plásmido F de *E. coli*. Este mecanismo de conjugación tiene varios pasos:

1. Atracción entre las dos bacterias.
2. Síntesis de pili desde la célula donadora mediante la síntesis de las proteínas TraN y TraG.
3. Unión del pili a la célula receptora.
4. Retracción del pili unido a la bacteria receptora.
5. Estabilización de ambas bacterias.
6. Formación de un poro en las membranas de las bacterias mediada por TraD.
7. Transmisión de una señal generada por TraM para la unión del poro con TraY.
8. TraY1 genera un corte en una de las cadenas del plásmido a ser transferido (en el sitio *oriT*).

9. Tras transfere una de las cadenas del ADN plasmídico desde la donadora hacia la receptora.
10. Replicación simultánea de la otra cadena del plásmido en la donadora (ADN polimerasa III).
11. Síntesis de la cadena complementaria en la célula receptora (ADN polimerasa III).
12. Fin de la transferencia y separación de las células (Moat, et al., 2002).

### 1.3 Transposones

Los transposones son elementos genéticos móviles, que pueden ser transportados de una célula a otra mediante plásmidos o por mecanismos conjugativos intrínsecos. Se les conoce como genes saltarines debido a que son pedazos de ADN con capacidad de transferencia de un lugar a otro gracias a una enzima conocida como transposasa. Se encuentran en considerable proporción en todas las especies estudiadas. Por ejemplo en humanos se ha visto que aproximadamente el 35% de su genoma está formado por estas secuencias (Peters & Craig, 2001), y en el caso de plantas como *Arabidopsis thaliana* aproximadamente el 50% del genoma son elementos transponibles (Hollistera, et al., 2011). En bacterias se han encontrado en: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides*, *Neisseria*, *Vibrio cholerae*, entre otros (Moat, et al., 2002).

En algunos casos los transposones pueden llevar dentro de su secuencia genes que les den cierta ventaja adaptativa como la resistencia a antibióticos o factores que potencien su patogenicidad. Tienen la capacidad de moverse

intramolecular e intracelularmente. No requieren homología de ADN entre el elemento transponible y el sitio de inserción; sin embargo hay muchas veces en las que el transposón muestra una preferencia por una secuencia específica (Bennet, 2008).

### 1.3.1 Transposón Tn5

El transposón Tn5 es de origen procariota y su tamaño es de 5.8kbp. En la Figura 1 podemos ver la estructura del transposón Tn5 (Vaezslami, et al., 2007), el mismo que consiste en dos terminales invertidos IS50L e IS50R, que codifican para genes de resistencia a antibióticos como la kanamicina (*kan*), bleomicina (*ble*) y estreptomycin (*str*). El terminal IS50R contiene el gen de la transposasa (*tnp*), proteína capaz de catalizar la transposición de Tn5. Por otro lado, tenemos el terminal IS50, que se encuentra flanqueado por dos secuencias (19pb): OE (Secuencia Exterior) y la IE (Secuencia Interior), reconocidas por la transposasa durante los procesos de transposición (Bennet, 2008).

El Tn5 tiene su propio mecanismo de transposición, el cual está basado en una técnica de “Corte y Pegado” que se muestra en la Figura 2. Para el inicio de este mecanismo, 2 transposasas (Tnp’s) son adheridas a la región ES del extremo IS50. La región catalítica de cada extremo en presencia de magnesio corta el ADN y el Tn5 se libera. El Tn5 es escindido de la molécula como una estructura circular unida por medio de las Tnp’s. Luego esta estructura circular se dirige hacia el ADN blanco, donde nuevamente en presencia de magnesio las Tnp’s logran romper las hebras de ADN e insertar al Tn5. Esto es posible debido a que la región 3’-OH del transposón se encuentra activada y genera ataques nucleofílicos a la cadena blanco. Una vez que el Tn5 ha sido insertado en la

cadena blanco las Tnp's salen, dejando un espacio de 9bp que es más tarde reparado por medio de duplicación (Vaezslami, et al., 2007).

## 1.4 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia son aquellos relacionados a la patogenicidad de una bacteria en su hospedador y pueden contribuir con su supervivencia en medios hostiles. Estos factores pueden ser expresados en mayor o menor intensidad dependiendo de las condiciones ambientales y señales bacterianas generadas. Tienen dos orígenes: pueden ser propios de cierta especie bacteriana o pueden ser adquiridos mediante islas de patogenicidad o genes transferidos en plásmidos por medio de conjugación (Moat, et al., 2002).

*Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)* contiene ciertos plásmidos que portan genes que codifican para factores de virulencia como las enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST), factores de colonización como las fimbrias (CFA) y adhesinas (F4 y F18) (Actis, et al., 1999). Sin estos factores las ETEC perderían su patogenicidad, lo cual reduciría su adaptabilidad para ser diseminadas a otros individuos y esto resultaría en una menor capacidad de competencia frente a otros microorganismos (Hamood, et al., 1986).

Los plásmidos portan módulos genéticos conocidos como islas genómicas que pueden ser trasladadas independientemente hacia otros plásmidos e incluso hacia otras bacterias. La característica que les permite a estos módulos ser movilizados es la presencia de secuencias de inserción flanqueantes. Estas secuencias confieren elasticidad a los plásmidos, ya que mediante inserciones y

deleciones se logrará un remodelamiento de los mismos (Johnson & Nolan, 2009).

## 1.5 Resistencia a antibióticos en bacterias.

La resistencia a antibióticos es la capacidad de las bacterias de resistir la acción bactericida o bacteriostática de dichos medicamentos. Este fenómeno data de hace 50 años cuando se evidenció la primera bacteria resistente a estreptomicina. Actualmente se cuenta con cientos de bacterias resistentes que han dejado a muchos antibióticos sin actividad antimicrobiana. La resistencia a antibióticos puede ser atribuida a mutaciones puntuales en genes bacterianos o a la transferencia horizontal de genes (Annika, 2005).

El uso masivo, la interrupción de tratamientos y la automedicación son los principales factores que contribuyen a que las bacterias adquieran resistencia. En la actualidad debido al mal uso de antibióticos han surgido bacterias resistentes que solamente dentro de la Unión Europea matan alrededor de 25000 personas al año debido a infecciones mediadas por bacterias resistentes (World-Health-Organization, 2011).

Ciertos antibióticos son producidos naturalmente y todas las especies productoras de agentes antimicrobianos (*Allium sativum* (Seong Wei & Musa, 2008), *Allium cepa*, *Zingiber officinale* (Azu & Onyeagba, 2007), *Streptomyces*, *Penicillium* (ArgenBio, 2007)) colaboran con un reservorio enorme de genes a los cuales se puede atribuir en parte el origen de la resistencia a antibióticos. Esto se puede dar debido a la capacidad de los elementos transponibles o de la maquinaria de conjugación para transferir genes.

## 1.6 Patotipos de *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* patógenas han sido clasificadas en 6 en diferentes patotipos en base a la enfermedad que puedan causar y sus factores de virulencia. Estos 6 patotipos (ETEC, EAEC, EIEC, EHEC, EPEC, ExPEC) comparten una característica y es que todos contienen sus factores de virulencia asociados a plásmidos (Johnson & Nolan, 2009).

EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) es también causa de diarrea de viajero y su factor de virulencia primario que codifica para un factor de adherencia está asociado al plásmido *pAA*. Este patotipo contiene también genes de toxinas como *pet* y *east1*. EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva) contiene un plásmido *pINV* que codifica su habilidad de invadir la mucosa del colon, para ello utiliza varios genes como: *virB*, *mxiEab*, *ipaADCB*, entre otros. EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica) causa colitis hemorrágica y el síndrome urémico-hemolítico en humanos. A pesar de factores de virulencia como la toxina shiga que se encuentra codificada en el cromosoma bacteriano, existen otros genes de virulencia que están en plásmidos (*pO157*) como: *ehx*, *etpC*, *etpO*, *espC* y *ehx*. EPEC (*Escherichia coli* enteropatogénica) es causante de diarrea aguda y persistente, su adherencia al epitelio es atribuida a un plásmido (*EAF*) que contiene factores de adherencia. Otros plásmidos importantes en la virulencia de estas bacterias son: *pMAR7*, *pMAR2* y *pB171*. ExPEC (*Escherichia coli* patogénica extraintestinal), contiene plásmidos que codifican una colicina (*ColV*) que es causante de enfermedad extraintestinal. Otro plásmido de importancia es *Vir*, que contiene el factor de necrotización citotóxica (*CNF*) (Johnson & Nolan, 2009).

### 1.6.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es la mayor causante de diarrea de viajero debido a su colonización del intestino delgado y posterior secreción de toxinas. Produce 2 enterotoxinas: Termolábil (LT) y Termoestable (ST), además de factores de colonización como: *CFs*, *EtpA*, *Tia*, *TibA* y *CylA*. La acción conjunta de estos elementos da a las ETEC su poder infeccioso. Los síntomas que presenta son muy parecidos a los del cólera debido a la similitud entre LT y CT (toxina del cólera) tanto fisiológica, estructural y antigénicamente; además de tener el mismo modo de acción (Croxen & Finlay, 2010).

Los genes que codifican para LT y ST están contenidos en plásmidos como se puede ver en la Figura 3. En ETEC se ha comprobado la existencia de 1 a 6 plásmidos de virulencia por bacteria (Bertin, 1992) y entre los más conocidos como portadores de dichos genes tenemos: *pCoo* (*pCS1*) portador de LT y ST1b, *pJY11* portador de LT y ST1a y el *pTRA1* que es capaz de movilizar a los plásmidos *pCoo* y *pJY11* (Croxen & Finlay, 2010).

En la Figura 4 se puede evidenciar los distintos modos de acción de las toxinas ST y LT (Kaper, et al., 2004). La toxina ST genera una inducción del GMP cíclico y disrupción en el intercambio de iones. La toxina LT por otro lado, además de la inducción de AMP cíclico y disrupción del intercambio de iones; puede inhibir la generación de péptidos antimicrobianos (Croxen & Finlay, 2010).

En el presente proyecto se buscó desarrollar un método para marcar plásmidos de virulencia en ETEC. Para ello se seleccionó mutantes de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico y ciprofloxacina, que sirvieron como marcadores en la selección de los transconjugados. Mediante conjugaciones se creó una

biblioteca de mutantes de ETEC utilizando el transposón Tn5. Las cepas a ser conjugadas fueron: *Escherichia coli* HB101 que porta dentro de su plásmido *pRK340* al transposón Tn5 que contiene el gen de resistencia a la kanamicina, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) resistente al ácido nalidíxico y portadora del gen de patogenicidad LT dentro de un plásmido y finalmente *Escherichia coli* K12 resistente a ciprofloxacina. Una vez realizado el proceso de conjugación se confirmó el paso del transposón Tn5, mediante la amplificación del gen de resistencia a la kanamicina. La inserción del transposón Tn5 en el plásmido que porta al gen LT, se investigó mediante la amplificación del gen LT (gen que codifica para la toxina termolábil de ETEC). Finalmente se intentó verificar la presencia de plásmidos presentes tanto en las cepas iniciales (*E. coli* K12, ETEC y HB101), así como en los Conjugados #1 y #2. Para ello, se realizó una electroforesis de las células lisadas atrapadas en bloques de agarosa.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, la posibilidad de evolución constante de patotipos de *E. coli* explicaría en gran medida la enorme diversidad de clones de ETEC que se encuentran en regiones geográficas definidas. La frecuente transferencia horizontal de plásmidos de patogenicidad en ETEC aumentaría la posibilidad de aparición constante de nuevas cepas patógenas y obligaría a generar nuevas herramientas para el estudio de la epidemiología molecular. El presente proyecto pretende generar un método de marcación de plásmidos de virulencia que permita evaluar la frecuencia con la que estos plásmidos se transfieren de una célula de *E. coli* a otra.

Se desconoce si existen procesos adicionales (mutaciones cromosómicas) que llevan a una *E. coli* a adquirir el fenotipo patógeno. La enorme diversidad de cepas de ETEC haría sospechar que estos patotipos están evolucionando todo el tiempo, lo que coincidiría con su capacidad de movilización (conjugación) que tendría este plásmido de patogenicidad en presencia de otros plásmidos conjugativos. (Murray, et al., 1983).

En la actualidad se llevan a cabo proyectos para el estudio epidemiológico de la prevalencia de enfermedades diarreicas generadas por cepas virulentas de *E. coli* en comunidades de la costa ecuatoriana (Proyecto EcoDess). Estos estudios están limitados a determinar la presencia o ausencia de genes que codifican para enterotoxinas causantes de enfermedad. Es por ello que mediante el presente proyecto, al lograr marcar plásmidos de virulencia, se podrá determinar la frecuencia con la que estos plásmidos son transferidos. Adicionalmente, la capacidad de conjugación de estos plásmidos de virulencia podría ser muy importante a la hora de identificar cepas responsables de brotes epidémicos. La capacidad de transferencia de este plásmido podría explicar la enorme diversidad de cepas de *E. coli* que portan estos plásmidos de virulencia.

### **3. ÁREA DE ESTUDIO**

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, en el Campus de Cumbayá.

Las cepas utilizadas fueron obtenidas del Cepario del Proyecto EcoDess (Región de Borbón - Ecuador), del Cepario del Instituto de Microbiología de la

Universidad San Francisco de Quito y del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Tennessee “Center for the Health Sciences”.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

- Desarrollar un nuevo método para marcar plásmidos de virulencia de una *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) por medio del transposón Tn5 que contiene el gen de resistencia a la kanamicina.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Generar cepas de *E. coli* resistentes a distintos antibióticos por medio de presión selectiva, de manera que la resistencia generada sirva como un marcador en experimentos de conjugación.
- Crear una biblioteca de mutantes obtenidos por inserción del Tn5 usando una cepa ETEC.
- Identificar mutantes ETEC capaces de transferir horizontalmente al transposón Tn5.
- Identificar a los transconjugados que contengan al Tn5 y genes de patogenicidad de ETEC.

## 5. MATERIALES

### 5.1 Cepas bacterianas iniciales

- *Escherichia coli* K12 (sensible a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y kanamicina)

Cepa a ser sometida a presión selectiva para adquirir resistencia a la ciprofloxacina. Obtenida del Cepario del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

- *Escherichia coli* HB101 (resistente a la kanamicina)

Cepa que posee el plásmido *pRK340* (plásmido conjugativo con un replicón termolábil a los 40°C) (Keen, et al., 1985). Este plásmido contiene el transposón Tn5 que a su vez tiene adherido a su estructura el gen de resistencia a la kanamicina. Fue obtenida gracias a la colaboración del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Tennessee “Center for the Health Sciences”.

- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (sensible a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y kanamicina)

Cepa a ser sometida a presión selectiva para adquirir resistencia al ácido nalidíxico. Obtenida del Cepario del Proyecto EcoDess, proveniente de una muestra de *Escherichia coli* patógena (Comunidades de la Costa Ecuatoriana - Región de Borbón).

## 5.2 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas

- *Escherichia coli* enterotoxigénica con gen LT (10 cepas)
- *Escherichia coli* enterotoxigénica con gen ST (4 cepas)
- *Escherichia coli* HB101 (5 cepas)
- *Escherichia coli* K12 (4 cepas)
- Microscopio Electrónico Leica 134952X
- Cloruro de sodio (Merck) para solución salina [0,9%]
- BD Difco™ Bacto Agar
- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- Becton-Dickinson BBL MacConkey II Agar
- ChromoCult® Coliform Agar
- Becton-Dickinson BBL Urea Agar Base
- Becton-Dickinson BBL Simmons Citrate Agar
- Becton-Dickinson BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)
- Becton-Dickinson BBL™ SIM Medium
- Reactivo de Kovacs (Merck)
- Incubadora MEMMERT B40 (37°C)

## 5.3 Comprobación de patrones de resistencia

- BD Difco™ Mueller Hinton Agar

- Cultivo bacteriano puro en fase logarítmica (18 – 24h, 37°C)
- Cloruro de sodio (Merck) para solución salina [0,9%]
- Estándar de turbidez de la escala Mc. Farland BBL [0,5]
- Incubadora MEMMERT B40 (37°C)
- Discos de antibiótico (Becton Dickinson BBL):
 

Kanamicina (K) 30ug	Ácido Nalidíxico (NA) 30ug
Rifampicina (RA) 5ug	Estreptomicina (S) 300ug
Tetraciclina (TE) 30ug	Gentamicina (GM) 10ug
Ampicilina (AM) 10ug	Cefotaxime (CXT) 30ug
Cefalotin (C) 30ug	Cloroamfenicol (C) 30ug
Ciprofloxacina (CIP) 5ug	Enrofloxacina (ENO) 5ug
Sulfisoxazol (G) 0,25ug	Trimetoprim-Sulfametoxazole (SXT)
Amoxicilina – Ácido Clavulánico (AMC)	

#### 5.4 Soluciones para inducción de resistencia a antibióticos

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) [1N]. Merck
- Solución de kanamicina GIBCO [25mg/mL]. Diluida en agua destilada estéril.

- Solución de ácido nalidíxico FisherBiotech [10mg/mL]. Diluida en NaOH [0,1N].
- Solución de ciprofloxacina La Santé [1mg/mL]. Diluida en NaOH [0,5N].
- Congeladora WHIRPOOL WRB101
- Vortex Mixer SMENSMAURO LAB MIXER

## **5.5 Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva**

- Cultivo bacteriano puro en fase logarítmica (18 – 24h, 37°C)
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) [1N]. Merck
- Solución de ácido nalidíxico FisherBiotech [10mg/mL]. Diluida en NaOH [0,1N].
- Solución de ciprofloxacina La Santé [1mg/mL]. Diluida en NaOH [0,5N].
- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- BD Difco™ Bacto Agar
- Incubadora MEMMERT B40 (37°C)

## **5.6 Transferencia del transposón Tn5 mediante Conjugación**

- *Escherichia coli* enterotoxigénica con gen LT (resistente a ácido nalidíxico)
- *Escherichia coli* HB101 (resistente a kanamicina)
- *Escherichia coli* K12 (resistente a ciprofloxacina)
- Frascos Erlenmeyer [500mL]

- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- BD Difco™ Bacto Agar
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) [1N]. Merck
- Solución de kanamicina GIBCO [25mg/mL]. Diluida en agua destilada estéril.
- Solución de ácido nalidíxico FisherBiotech [10mg/mL]. Diluida en NaOH [0,1N].
- Solución de ciprofloxacina La Santé [1mg/mL]. Diluida en NaOH [0,5N].
- Agar Nutritivo + ciprofloxacina [3ug/mL]
- Agar Nutritivo + ácido nalidíxico [25ug/mL]
- Agar Nutritivo + kanamicina [30ug/mL]
- AN + kanamicina [30ug/mL] + ácido nalidíxico [25ug/mL]
- AN + kanamicina [30ug/mL] + ciprofloxacina [3ug/mL]
- Tubos Falcon (50mL)
- Incubadora MEMMERT B40 (37°C)
- Incubadora LAB LINE (43°C)
- Centrífuga Clínica (Tubos Falcon) INTERNATIONAL EQUIPMENT COMPANY

## **5.7 Conservación de cepas (Congelamiento - 20° C)**

- Cultivo bacteriano puro en fase logarítmica (18 – 24h, 37°C)

- Brain Heart Infusion Broth (suplementado con Glicerol 20%), Becton-Dickinson BBL™
- Congeladora WHIRPOOL WRB101
- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- BD Difco™ Bacto Agar
- Incubadora MEMMERT B40 (37°C)
- Congeladora WHIRPOOL WRB101

## **5.8 Extracción de ADN**

- Cultivo bacteriano puro en fase logarítmica (18 – 24h, 37°C)
- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- BD Difco™ Bacto Agar
- Cocina eléctrica HACEB (2 puestos)
- Congeladora WHIRPOOL WRB101

## **5.9 PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a la kanamicina)**

- H<sub>2</sub>O para PCR (GIBCO Invitrogen)
- Buffer [10x]. Concentración Final:[1x] (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> [50mM].Concentración Final: [1.5mM] (Invitrogen)
- dNTP´s [10mM/nucleótido].Concentración Final: [200uM] (Invitrogen)
- Primer KM1 ( FW 5´ GGACAAGGGAAAACGCAA 3´ ) [10um]

Concentración Final:[0,4uM] (CLC Main Workbench)

- Primer KM2 ( RW 5´ AAGGTGAGATGACAGGAGA 3´ ) [10um]

Concentración Final:[0,4uM] (CLC Main Workbench)

- Taq Polimerasa [5U]. Concentración final: [1Unidad/rxn] (Invitrogen)
- Muestras de ADN [2,5uL]
- Termociclador BIOMETRA T-PERSONAL
- Tubos Eppendorf para PCR

### **5.10 PCR confirmatorio para el gen “LT”**

- H<sub>2</sub>O para PCR (GIBCO Invitrogen)
- Buffer de Reacción [5x]. Concentración final: [1x] (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> [25uM]. Concentración final: [1 uM] (Invitrogen)
- dNTP´s [10uM]. Concentración final: [200uM] (Invitrogen)
- Primer LT1 ( ET – LT1, 5´ GCGACAAATTATACCGTGCT 3´ ) [1uM].

Concentración final: [0.08uM]

- Primer LT2 ( ET – LT2, 5´ CCGAATTCTGTTATATATGT 3´ ) [1uM].

Concentración final: [0.08uM]

- Taq Polimerasa [2,5U] (Promega)
- Muestras de ADN [2,5uL]
- Termociclador BIOMETRA T-PERSONAL

### **5.11 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%)**

- Solución de EDTA [0.5M] pH8.
  - 93.05g de Na<sub>2</sub>EDTA.H<sub>2</sub>O (Invitrogen)
  - 400mL de agua destilada estéril
  - 50mL de NaOH [10N] (Merck)
- Solución TBE (Tris Borato EDTA) 5x
  - 54g de TRIS Base (Promega)
  - 27.5g de ácido bórico (Acros Organics)
  - 20mL de EDTA pH8 [0.5M]
  - 1000mL agua destilada estéril
- Gel de agarosa al 1.5%
  - Agarosa (BIO-RAD)
  - TBE [5X]. Concentración final [1x]
  - Bromuro de etidio [1uL/150mL]
  - Microondas Panasonic USP 4,942,516
- Electroforesis
  - Cámara de Electroforesis C.B.S Scientific CO.
  - Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio
  - TBE [1X]
  - Muestras (Producto de PCR)
  - Ladder de 100pb Invitrogen
  - Fuente de poder FISHER SCIENTIFIC FB300 BLANCA
  - Transiluminador: CAJA OBSCURA KODAK EDAS 290

- Cámara Digital Kodak DC290 DC290ZOOM

## **5.12 Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos de ETEC**

- Cultivo bacteriano en fase logarítmica (37°C, 24h)
- BD Difco™ Tryptic Soy Broth
- BD Difco™ Bacto Agar
- Solución de Suspensión Celular CSB (estéril)
- Solución de Lisis CLB (estéril)
- Agarosa BioRAD® certificada para PFGE
- TE estéril (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8)
- Baño María (Agitación) SHEL LAB
- Microondas Panasonic USP 4,942,516
- Tubos Falcon (50mL)
- Agarosa (electroforesis) (BIO-RAD)
- Cámara de electroforesis (C.B.S Scientific CO.)
- Transiluminador: CAJA OBSCURA KODAK EDAS 290
- Cámara Kodak DC290 DC290ZOOM
- Fuente de Poder FISHER SCIENTIFIC FB300 BLANCA
- Solución de Suspensión Celular CSB (Cell Suspension Buffer)
  - Tris [1M], pH8 (Concentración final: 100mM)

- EDTA [0.5M], pH8 (Concentración final: 100mM)
- Solución Tris-EDTA (TE)
  - Tris [1M], pH8 (Concentración final: 10mM)
  - EDTA [0.5M], pH8 (Concentración final: 1mM)
- Agarosa (1%) para plugs o bloques en TE
  - Agarosa BioRAD® Certificada para PFGE
  - TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8)
  - SDS (20%), precalentado a 50°C (Concentración final: SDS 1%) (SIGMA)
- Solución de Lisis Celular CLB (Cell Lysis Buffer)
  - Tris [1M], pH8 (Concentración final: 50mM)
  - EDTA [0.5M], pH8 (Concentración final: 50mM)
  - Sarcosyl al 10% (Concentración final: 1% Sarcosyl) (SIGMA)
  - Proteinasa K [20mg/mL] (Invitrogen)
- TAE (Tris – Acetato – EDTA) Buffer 5X
  - EDTA [0.5M], pH8
  - Tris Base (Promega)
  - Ácido acético glacial (Merck)

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas

Se seleccionó 23 cepas bacterianas: 14 cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de pacientes de la región norte del país (Borbón), de las cuales 10 contenían el gen LT dentro de un plásmido bacteriano y 4 contenían el gen ST. Se obtuvo 5 variantes de *Escherichia coli* HB101; que provinieron de una sola cepa inicial donada por la Universidad de Tennessee (Keen, et al., 1985). Finalmente se adquirió 4 cepas de *Escherichia coli* K12 obtenidas del Cepario de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Todas las cepas fueron sometidas a pruebas de caracterización bioquímica para *Escherichia coli*. Se verificó su morfología, para luego seguir con las pruebas bioquímicas de rutina. Entre estas pruebas se incluyó la siembra en: Agar MacConkey Lactosa (Becton-Dickinson BBL), Agar ChromoCult® para Coliformes (Merck), Agar Urea de Christensen (Becton-Dickinson BBL), Agar Citrato de Simmons (Becton-Dickinson BBL), Agar Triple Sugar Iron (TSI) (Becton-Dickinson BBL) y Medio Semisólido SIM (Becton-Dickinson BBL).

El metabolismo característico de *Escherichia coli* que se buscó con las pruebas antes mencionadas comprende: fermentación de lactosa (Becton-Dickinson, 2006), ausencia de actividad ureasa (Becton-Dickinson, 2007), ausencia de actividad citrasa y citrato permeasa (Becton-Dickinson, 2011), motilidad variable, presencia de triptofanasa, ausencia de producción de H<sub>2</sub>S (Becton-Dickinson, 2011), consumo de glucosa y lactosa (Becton-Dickinson,

2003), presencia de la enzima  $\beta$ -D glucoronidasa (Merck-Millipore, 2008). En base a las reacciones mencionadas se seleccionó a las cepas que cumplieron con los patrones de metabolismo establecidos para *Escherichia coli*.

## 6.2 Comprobación de patrones de resistencia

Todas las cepas seleccionadas fueron sometidas a una verificación de sus patrones de susceptibilidad a antibióticos. Se realizó la comprobación de estos patrones por medio de antibiogramas de difusión por disco en Agar Mueller Hinton, siguiendo la técnica de Kirby Bauer (Becton-Dickinson, 2006).

Las cepas congeladas fueron cultivadas en Agar Nutritivo (AN) y se las incubó a 37°C por 24 horas. Se verificó que el cultivo esté puro y que existan colonias aisladas obtenidas por la técnica de estriación. Se tomó de 1 a 3 unidades formadoras de colonia (UFC) con un hisopo de algodón y se las disolvió en solución salina [0.9%] hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala de Mc. Farland. Luego se estrió en Agar Mueller Hinton formando cuadrantes de 60° para lograr uniformidad en el cultivo. Finalmente se colocó de manera equidistante los discos de antibiótico y se incubó a 37°C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición formados alrededor de cada disco de antibiótico (Becton-Dickinson, 2007).

En un principio, se propuso inducir resistencia al ácido nalidíxico y rifampicina, para lo cual en el antibiograma se incluyeron discos de: ácido nalidíxico, rifampicina, kanamicina, estreptomina y tetraciclina. Se eligió la kanamicina, estreptomina y tetraciclina debido a que la cepa HB101 contiene dichos genes de resistencia (Keen, et al., 1985).

Debido a que los resultados no fueron los esperados se decidió ampliar el antibiograma para determinar que antibiótico sería el más adecuado para la inducción de resistencia a *Escherichia coli* K12 como un marcador necesario en los experimentos. Se realizó un antibiograma completo que comprendió 12 antibióticos: trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), gentamicina (GM), estreptomina (S), ampicilina (AM), amoxicilina – ácido clavulánico (AMC), cefotaxime (CXT), cefalotin (CE), cloroamfenicol(C), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENO), tetraciclina (TE), sulfisoxazol (G).

### **6.3 Selección de mutantes resistentes a antibióticos**

En esta fase se marcó cepas bacterianas por medio de mutaciones que resulten en fenotipos resistentes a antibióticos, los cuales ayudaron a seleccionar posteriormente los conjugados.

#### **6.3.1 Selección de mutantes resistentes al ácido nalidíxico (*Escherichia coli* enterotoxigénica)**

De las 14 cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ST y LT) que fueron sometidas a antibiogramas, se seleccionó 4 para la inducción de resistencia a ácido nalidíxico: E5, E6, ST1, ST4. E5 y E6 contienen el gen LT, mientras que ST1 y ST4 que contienen el gen de patogenicidad ST.

Se descongeló y sembró en AN las cepas a ser utilizadas (E5, E6, ST1, ST4) y se las cultivó por 24h a 37°C. Se tomó 1 UFC de cada cepa y se inoculó 100mL de Caldo Nutritivo (CN), permitiendo su crecimiento por 24h a 37°C. A cada uno de los 4 cultivos se adicionó 100mL de CN fresco y antibiótico hasta

llegar a una concentración de [25ug/mL]. Se mantuvo el cultivo por 24h a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se tomó con una micropipeta 100uL de cada cultivo y se inoculó 2 cajas de AN + ácido nalidíxico [25ug/mL]. Se estrió con un asa de platino para esparcir el inóculo, de manera que forme una cuadrícula, como se puede apreciar en la Figura 5 (Niemira, 2005).

El experimento funcionó para E4 y E5. Se tomó 5 UFC de cada caja, se las sometió a pruebas bioquímicas y una vez caracterizadas como *E. coli*, se las almacenó a -20°C hasta su posterior uso. Se repitió el experimento para las cepas ST con un mayor número de réplicas. Se inocularon 10 cajas: 5 con ST1 y 5 con ST4. Se tomó dos colonias por caja, seleccionando un total de 20 UFC, las mismas que fueron sometidas a pruebas bioquímicas. En base al metabolismo observado, se conservó 10 aislados de ST resistentes al ácido nalidíxico.

### **6.3.2 Selección de mutantes resistentes a la ciprofloxacina (*Escherichia coli* K12)**

Se intentó generar mutantes utilizando el método ya mencionado (presión selectiva a altas concentraciones de antibiótico), pero no se obtuvo resultados favorables. De manera que se partió del MIC (Minimal Inhibitory Concentration) y se adicionó consecutivamente concentraciones mayores de antibiótico, para obtener una resistencia progresiva a la ciprofloxacina (Kohanski, et al., 2010). Se partió de [0.10ug/mL] basándonos en el MIC *para E. coli* que es de [0.06ug/mL] (Vila, et al., 1994).

Primero, se descongeló y sembró a *E coli* K12 (Cepario de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito) en AN (37°C, por 24h). Se tomó 1 UFC

aislada y se la sembró en 100mL de CN (37°C, por 24h). Luego se adicionó 100mL de CN y [0.10ug/mL] de ciprofloxacina para el volumen final de 200mL (37°C, por 24h). Se repitió el paso anterior, pero esta vez se adicionó la solución de antibiótico de manera que se llegue a una concentración final de [0.25ug/mL] de ciprofloxacina (37°C, por 24h). Una vez alcanzada la concentración de [0.25ug/mL], se procedió a sembrar en placas de AN + [0.25ug/mL] ciprofloxacina (37°C, por 24h). Se mantuvo el cultivo sin suplemento extra de antibiótico durante un día en caso de que no haya crecimiento en la placa. Se sembró nuevamente un inóculo de 100uL (48 horas del aditamento de la concentración final de antibiótico).

Diariamente se adicionó al cultivo bacteriano [0.125ug/mL] de ciprofloxacina y CN de manera que la concentración final sea el doble del anterior (0.25; 0.5; 1 y así sucesivamente). Este protocolo se repitió hasta alcanzar la concentración de [3.5ug/mL] de ciprofloxacina en el medio CN. A esta concentración ninguna de las demás bacterias referentes a los experimentos pudo proliferar.

Se nombró a cada caja de AN + ciprofloxacina en orden alfabético (A– Z), siendo “A” la caja sometida a menor concentración de antibiótico. De cada caja de AN + ciprofloxacina se tomaron de 2 a 3 UFC, llamadas G1, G2 y G3, a las que se realizó una tinción Gram. En caso de tratarse de bacilos gram negativos se procedió a sembrarlas en Chromocult. Si el resultado eran colonias moradas o colonias turquesas e indol positivas, se realizó el resto de pruebas bioquímicas (en los Agares: TSI, SIM, CITRATO, UREA, MKL). Una vez comprobado que se trate de una cepa de *E. coli*, se procedió a congelarla (-20°C).

## 6.4 Fase preparativa previa a las Conjugaciones

Esta fase se la realizó como medida de precaución para verificar que las características de las cepas iniciales no hayan variado o se hayan perdido. Adicionalmente se la llevó a cabo para poder escoger aquellas cepas que cumplan con los requerimientos establecidos para los experimentos (sensibilidad o resistencia a un determinado antibiótico, así como presencia o ausencia de genes de patogenicidad).

Se realizó pruebas bioquímicas para todas las cepas iniciales (*ETEC*, *HB101*, *E. coli K12* resistente a ciprofloxacina, *ETEC* resistente a ácido nalidíxico). Luego se hizo un antibiograma de las mismas (estreptomicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, ciprofloxacina, y kanamicina). Una vez comprobados los patrones de resistencia, se determinó la presencia de los genes de patogenicidad: LT y ST mediante PCR.

## 6.5 Transferencia del transposón Tn5 mediante Conjugación

Una vez realizada la selección de cepas bacterianas se procedió con las conjugaciones que permitirán el paso del transposón Tn5 mediante plásmidos conjugativos. Las conjugaciones 1 y 2 constituyeron respectivamente las fases #2 y #3 del Proyecto (Figura 6 y 7). Se siguió el protocolo de Keen, et al. 1985 con dos modificaciones. Se incubó a 37°C en lugar de 30°C y se utilizó cepas de *E. coli* para todos los experimentos en lugar de cepas de *Legionella pneumophila*.

### 6.5.1 CONJUGACIÓN 1: *Escherichia coli* HB101 y *Escherichia coli* enterotoxigénica

La primera conjugación correspondiente a la Fase #2 del proyecto, se realizó entre *Escherichia coli* HB101 resistente a la kanamicina (donadora) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (E5bA3) resistente al ácido nalidíxico (receptora). Se buscaba obtener una biblioteca de *Escherichia coli* enterotoxigénica que haya adquirido el transposón Tn5 en diferentes partes de su genoma. Se esperaba que uno de estos transposones se haya insertado en el plásmido de virulencia de ETEC.

Se sembró a *ETEC* (resistente al ácido nalidíxico) E5bA3 y HB101 (resistente a kanamicina) en AN (24 horas a 37°C). Se subcultivó a *ETEC* en AN + ácido nalidíxico [25ug/mL], y a HB101 en AN + kanamicina [30ug/mL], para asegurarnos que las bacterias a conjugar sean resistentes a sus respectivos antibióticos. Luego se tomó 1 UFC de *ETEC* de la siembra en AN + ácido nalidíxico [25ug/mL], y se inoculó en 100mL de CN. Se incubó por 24 horas a 37°C. Por otro lado, se tomó 1 UFC de HB101 de la siembra en AN + kanamicina [30ug/mL] y se inoculó 100mL de CN. Se incubó por 24 horas a 37°C.

Una vez obtenidas las dos cepas en fase logarítmica (en caldo nutritivo), se realizó la **Conjugación #1** al mezclar los dos cultivos en un mismo frasco. Se incubó por 24 horas a 37°C, teniendo sumo cuidado y evitando cualquier tipo de movimiento del cultivo, para evitar el rompimiento del pili y por consiguiente una interrupción de la conjugación.

Para comprobar si se dio la conjugación, se realizó un primer muestreo donde se inoculó 100uL del CN con el **Conjugado #1** en 5 placas de AN +

kanamicina [30ug/mL] + ácido nalidíxico [25ug/mL]. Se incubó por 24 horas a 43°C. En este punto solo fue de interés ver presencia o ausencia de colonias.

Una vez comprobado el éxito de la primera conjugación se procedió a adicionar medio de cultivo fresco (200mL de CN) al **Conjugado #1**, hasta llegar al doble del volumen inicial que era de 200mL. A su vez se suplementó kanamicina [30ug/mL] y ácido nalidíxico [25ug/mL] para el volumen total de 400mL y se incubó a 43°C. El propósito de este paso fue eliminar HB101 que contiene el plásmido termolábil *pRK340* y seleccionar solamente los conjugados que transfirieron el transposón Tn5 al genoma, o a otro plásmido.

Nuevamente se inoculó 100uL del cultivo con el **Conjugado #1** en 5 cajas petri con AN + kanamicina [30ug/mL] + ácido nalidíxico [25ug/mL]. Se estrió e incubó por 24 horas a 43°C. Transcurrido este tiempo se realizó un conteo de las UFC existentes. Para descartar la presencia de contaminantes se seleccionó 20 colonias que fueron sometidas a pruebas bioquímicas de caracterización para *E. coli*. Posteriormente se realizó un antibiograma confirmatorio y en base a los halos de resistencia obtenidos, se seleccionó a 10 clones con los halos de menor tamaño y se procedió a conservarlos en BHI + Glicerol (20%) a -20°C.

### 6.5.2 CONJUGACIÓN 2: Conjugado #1 (ETEC + Tn5) y *Escherichia coli* K12

En la Fase #3 se realizó la segunda conjugación entre: el **Conjugado #1** (donador): *ETEC* (resistente al ácido nalidíxico) + Tn5 (resistencia a la kanamicina) y *Escherichia coli* K12 resistente a la ciprofloxacina (receptora). Se espera obtener una *Escherichia coli* K12 resistente a la ciprofloxacina que haya

adquirido el transposón Tn5. Como ya se mencionó, este transposón puede a su vez haber adquirido el gen LT o no.

La **biblioteca de mutantes con Tn5 (producto de la Conjugación #1)** fue centrifugada a 2000 rpm (equivalente a 268 gravedades) por 15 minutos, para obtener un pellet bacteriano al fondo del envase y así eliminar el caldo nutritivo viejo. Luego se resuspendió el pellet en 100mL de CN fresco y se lo incubó por 24 horas a 37°C. Este paso fue necesario debido a que en presencia de antibiótico no se hubiera dado la **Conjugación #2**.

Se descongeló y sembró a *Escherichia coli* K12 (resistente a la ciprofloxacina) en AN y se la incubó por 24 horas a 37°C. Se tomó 1 UFC del cultivo y se estrió en AN + ciprofloxacina [3ug/mL] (24h a 37°C). Luego se tomó 1 UFC de la siembra en AN con ciprofloxacina y se la inoculó en 100mL de CN. Es importante que ambos cultivos en CN se encuentren en fase logarítmica al momento de su conjugación (cultivados a 37°C por un máximo de 24 horas).

Al tener los dos cultivos en fase logarítmica, se procedió a realizar la **Conjugación #2** al transferir el **Conjugado #1** al cultivo de *Escherichia coli* K12 (resistente a la ciprofloxacina). Se incubó por 24 horas a 37°C de manera similar a la primera conjugación.

Se realizó 2 muestreos. El primero tuvo lugar después de transcurrido el tiempo de conjugación (24h). Se inoculó 100uL del CN con el **Conjugado #2** en 5 placas de AN + kanamicina [30ug/mL] + ciprofloxacina [3ug/mL], se estrió e incubó por 24 horas a 37°C. Una vez comprobada la segunda conjugación se procedió a adicionar CN fresco al envase con el **Conjugado #2**, hasta llegar al

doble del volumen inicial que era de 200mL. Adicionalmente se suplementó kanamicina [30ug/mL] y ciprofloxacina [3ug/mL], para el volumen total de 400mL. Se incubó el cultivo con antibiótico por 24 horas a 37°C.

Para el segundo muestreo se tomó nuevamente 100uL del CN + **Conjugado #2** + antibiótico y se inoculó en 5 placas de AN + kanamicina [30ug/mL] + ciprofloxacina [3ug/mL]. El inóculo (100uL) fue estriado e incubado a 37°C por 24 horas. Transcurrido ese tiempo se realizó un conteo, si éste sobrepasaba las 300 UFC se lo considera como incontable.

Se conservó 10 UFC por placa (10 placas), las cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas de diferenciación bacteriana para confirmar que sean *Escherichia coli*. Se seleccionó 50 colonias y se realizó un antibiograma confirmatorio de resistencia. En base a los halos obtenidos, se conservó aquellas que presentaron mayor resistencia y se procedió a congelarlas en BHI + Glicerol (20%) a -20°C.

Adicionalmente se tomó de 20 a 25 UFC más de cada placa, y se las subcultivó en AN + kanamicina [30ug/mL] + ciprofloxacina [3ug/mL]. Estos cultivos fueron mantenidos en refrigeración.

## 6.6 Conservación de cepas (Congelamiento -20°C)

Se sembró en AN la cepa de interés (clon aislado del **Conjugado #1** o del **Conjugado #2**) y se la incubó por 24 horas a 37°C. Se verificó que se trate de un cultivo puro y por medio de estriación se aisló colonias. Se tomó una UFC y con la ayuda de un palillo o un hisopo se la sembró en un AN en pico de flauta. Se

incubó a 37°C por 24 horas. Una vez obtenido el cultivo en fase logarítmica, se adicionó 1 a 2mL de BHI + Glicerol (20%). Con la ayuda de un palillo largo se removió todo el cultivo bacteriano adherido al agar, hasta que el BHI se torne turbio. Con la ayuda de una micropipeta se extrajo el BHI con el cultivo y se lo colocó en un tubo de crioconservación. Se conservaron las cepas a – 20°C (EcoDess, 2004)

## **6.7 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se llevó a cabo por el método de “Ebullición y Congelamiento” o más conocido como “Frezze & Thaw” (Microbial SL, 2009). El cual consta de una corta ebullición (10 minutos) seguida de un congelamiento (12h a -20°C). Este método es efectivo en bacterias Gram negativas, cuya suspensión bacteriana supere la escala de Mc. Farland [1] (Rådström, et al., 2004).

Se sembró en AN las cepas congeladas y se las incubó a 37°C por 24 horas. Se alicuotó 300uL de agua destilada autoclavada en cada tubo eppendorf de 1.5mL. Con la ayuda de un palillo, se colocó en cada tubo aproximadamente el 70% de una UFC mediana (2mm de diámetro). Se colocó los tubos en agua hirviendo y se los mantuvo en ebullición por 10 minutos. Se dejó enfriar y se los congeló a – 20°C mínimo por una noche o hasta su uso en amplificación mediante PCR (EcoDess, 2004).

El ADN se mantiene como sobrenadante en el tubo y es estrictamente necesario someterlo a congelación previo a su uso en PCR. Se debe evitar mover

o agitar el tubo debido a que el ADN se puede mezclar con los restos celulares del fondo.

## **6.8 PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a la kanamicina)**

Este PCR fue destinado a la verificación de la presencia del gen de resistencia a la kanamicina, como prueba del paso del transposón Tn5 mediante conjugación. Para ello se utilizaron: 10 clones del **Conjugado #1**, 20 clones almacenados a -20°C pertenecientes al **Conjugado #2**, además de todas las cepas iniciales utilizadas: *E. coli* HB101, ETEC (E5bA3) resistente al ácido nalidíxico, *E. coli* K12 (BI) resistente a ciprofloxacina. Se tomó 2.5uL del sobrenadante de las muestras extraídas de ADN y se adicionó a un Master Mix con la composición expuesta en la Tabla 1. En el presente proyecto se utilizó el Kit de Invitrogen de Taq polimerasa.

La amplificación se logró en 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: temperatura de la tapa a 104°C y un precalentamiento por una sola ocasión a 94°C por 5 minutos. Denaturación a 94°C por un minuto. Alineamiento de primers a 60°C por 2 minutos. Extensión a 72°C por un minuto. Para estandarizar la temperatura de alineamiento, se utilizó un Termociclador de Gradiente Eppendorf donde se probó variaciones de temperatura desde lo 56°C hasta los 60°C. Se colocó 2 controles negativos: una reacción solo con agua de PCR y otra con una muestra de *E. coli* K12 que no contenga el gen LT. El tamaño del amplicón debió ser de 557 pares de bases (CLC Main Workbench, 2007).

## 6.9 PCR confirmatorio para el gen “LT”

Para buscar las cepas *E. coli* que recibieron el plásmido de ETEC marcado con Tn5 se procedió a buscar colonias resistentes a kanamicina y ciprofloxacina que sean positivas para el gen LT mediante PCR. Se realizó 2 tipos de PCR: uno en base a aislados individuales y otro en base a pools (conjunto) de 3 a 6 aislados. En el primer PCR, se amplificó muestras de los **Conjugados #1 y #2** y de las cepas iniciales para tener una referencia de los controles positivos (E5bA3, E5) y negativos (HB101 y K12) para el gen LT.

En el segundo PCR debido al alto número de muestras se realizó pools de 3 a 6 aislados para cada extracción. De manera que si un pool generaba un resultado positivo, se procedía a extraer nuevamente ADN de cada una de las cepas que conformaban a dicho pool y se las sometía nuevamente a PCR. Esto nos permitió reducir nuestro número de muestras de 287 a 59. Se tomó 2.5uL del sobrenadante de las muestras extraídas de ADN y se adicionó a un Master Mix con la composición expuesta en la Tabla 2.

La amplificación se logró en 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: temperatura de la tapa a 104°C y un precalentamiento por una sola ocasión a 94°C por 5 minutos. Denaturación a 94°C por un minuto. Alineamiento de primers a 56°C por 2 minutos. Extensión a 72°C por un minuto (Tornieporth, et al., 1995). Se colocó 2 controles negativos: una reacción solo con agua de PCR y otra con una muestra de *E. coli* K12 que no contenga el gen LT. El tamaño del amplicón que se debía obtener era de 708 pares de bases.

## **6.10 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%)**

Los protocolos seguidos para la elaboración de reactivos, así como para la electroforesis fueron tomados del Proyecto EcoDess llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Se diluyó la agarosa en TBE [1x] calentando la mezcla hasta obtener una solución transparente y homogénea, se dejó enfriar y se adicionó el bromuro de etidio. Una vez gelificada la agarosa se rellenó la cámara de electroforesis con TBE [1X] hasta cubrir los pocillos. En cada pocillo se colocó de 5 a 10uL de muestra. Una vez cargadas todas las muestras se conectó y calibró la fuente de poder, de manera que se tenga un voltaje de 70milivoltios (200 miliamperios). Se dejó correr por una hora, tiempo en el cual se puede visualizar claramente la banda de interés (708pb para el gen LT o 557pb para el gen de resistencia a la kanamicina). Se utilizó un Ladder (escala de peso molecular) de 100pb. Se visualizó las bandas mediante una fotografía tomada en una caja oscura (luz UV) con una cámara Kodak DC290.

## **6.11 Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos de ETEC**

La electroforesis de campo pulsado parte de un cultivo bacteriano en fase logarítmica. Para ello, se descongeló y sembró las cepas bacterianas congeladas en Agar Nutritivo (AN), por el método de estriación de manera que se obtengan colonias aisladas y se las incubó por 24 horas a 37°C.

### 6.11.1 Suspensión celular y bloques (plugs)

Se fundió la agarosa para los plugs (bloques) en el microondas. Se equilibró la mezcla al introducirla en el Baño María previamente calentado a 54°C. Por otro lado, se dispensó 2mL de solución de suspensión celular en tubos eppendorf. Se tomó una muestra del cultivo bacteriano con un hisopo estéril y se lo colocó en los tubos con la solución de suspensión celular, hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.63 \text{ OD} \pm 0.02$  a 610nm. Fue importante mantener esta concentración bacteriana, debido a que un exceso de cultivo no dejaría actuar apropiadamente a la proteinasa K y consecuentemente habría problemas al visualizar las bandas.

Luego se transfirió 200uL de la suspensión celular a un nuevo tubo y se añadió 10uL de proteinasa K [20mg/mL] y 10uL de SDS (20%). Se agitó los tubos de manera que la proteinasa K entre en acción. Una vez realizado este paso, se añadió 200uL de la agarosa que se encontraba en el Baño María. Se mezcló por pipeteo lentamente evitando la formación de burbujas y se dispensó inmediatamente en los moldes. Se dejó polimerizar los bloques durante 10 minutos a 4°C.

Una vez polimerizados los bloques se procedió a retirarlos cuidadosamente de los moldes. Los bloques pertenecientes a un mismo cultivo bacteriano se colocaron en un tubo falcon que contenía la solución de lisis y proteinasa K. Los bloques se mantuvieron sumergidos en esta solución todo el tiempo para evitar su deshidratación. Se cerró fuertemente los tubos y se los incubó en el Baño María a 54°C, con agitación (150 a 200rpm) durante toda la noche.

### **6.11.2 Lavado de los bloques**

Se precalentó el TE y el agua destilada estéril en el Baño María a 50°C. Se eliminó la solución de lisis de los tubos y se añadió 25mL de agua destilada estéril precalentada. Se colocó los tubos en el Baño María con agitación (100rpm) durante 15 minutos. Se repitió este paso de 2 a 3 veces más cambiando el agua destilada estéril. Una vez finalizados los lavados con agua, se procedió a realizar los lavados con TE. Siguiendo el mismo protocolo se realizó 5 lavados con TE precalentado a 50°C. Los bloques fueron preservados en TE estéril a 4°C y se los puede conservar hasta 6 meses.

### **6.11.3 Electroforesis en gel de agarosa (0.7%)**

A diferencia de una electroforesis normal, donde se introduce en los pocillos el producto de PCR, en este caso se introdujeron pedazos de plugs (bloques) en el gel de agarosa (0,7%) (Kado & Liu, 1981). Cuidadosamente se cortó con un cubreobjetos o un bisturí secciones de 2mm de plugs (bloques) en cajas petri estériles. Se introdujo los plugs (bloques) con la ayuda de las paletas de madera en los pocillos del gel polimerizado. Se selló con agarosa líquida (55°C) los pocillos y se dejó gelificar. En lugar de utilizar Buffer TBE, se utilizó TAE [1x] tanto para la elaboración del gel de agarosa como para rellenar la cámara de electroforesis. Una vez cargado el gel en la cámara, con los pocillos sellados y sumergido en TAE [1x], se conectó la cámara a la fuente de poder y se la calibró a un voltaje de 80 voltios y se dejó correr durante 1h20. Transcurrido ese tiempo se procedió a tomar la foto siguiendo el protocolo ya mencionado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas a ser utilizadas

El 96% de las cepas (ETEC, *E. coli* K12 y *E. coli* HB101) dieron un resultado positivo para *Escherichia coli* en base a las pruebas bioquímicas realizadas. De las 23 testeadas (14 ETEC, 4 *E. coli* K12 y 5 *E. coli* HB101) únicamente una no mostró el metabolismo propio de este bacilo Gram negativo. Para ver resultados individuales de cada cepa referirse a: Tabla 3 (*E. coli* enterotoxigénica (ST)), Tabla 4 (*E. coli* K12), Tabla 5 (*E. coli* HB101) y Tabla 6 (*E. coli* enterotoxigénica (LT)).

Se verificó su morfología (bacilos Gram negativos), para luego seguir con las pruebas bioquímicas de rutina. La siembra en Agar MacConkey Lactosa evidenció el carácter de las bacterias como fermentadoras (colonias rosadas: LAC +) o no fermentadoras de lactosa (colonias incoloras: LAC -). En el caso de las cepas de *E. coli* este patrón fue variable, lo cual se demostró en la Figura 8 donde se observa a *E. coli* HB101 y K12 como LAC -, mientras que ETEC (E5bA3) mostró un metabolismo de LAC + (Becton-Dickinson, 2006).

En Agar ChromoCult® para Coliformes, se buscó colonias moradas o azules (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido positivas o MUG +), generadas por la acción de la enzima  $\beta$ -D glucoronidasa. En el caso de *Escherichia coli* K12 (cepa modificada genéticamente para su uso en laboratorio), puede haber mutaciones que hayan alterado su patrón MUG positivo, y las bacterias podrían mostrar un tono azul pálido o turquesa, como se puede apreciar en la Figura 9. Para

asegurarnos de la identidad de bacterias con coloraciones variables como *E. coli* K12 (turquesa en lugar de azul o morado), se determinó la presencia de triptofanasa mediante la adición del Reactivo de Kovacs al cultivo, el cual generó Indol +. Esta prueba nos permitió corroborar que la cepa a ser utilizada era una *E. coli* (Merck-Millipore, 2008). Para todas las cepas de *E. coli* (ETEC, HB101, K12) se realizaron pruebas bioquímicas que ratificaron la correcta identificación de los aislados.

## **7.2 Comprobación de patrones de resistencia**

Se realizó la comprobación de patrones de resistencia de las 22 cepas positivas para *E. coli* por medio de antibiogramas, los cuales se encuentran descritos en las Tablas 7 y 8. *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Escherichia coli* HB101 fueron resistentes a la rifampicina, por lo cual se debió recurrir a una segunda opción para inducción de resistencia por medio de presión selectiva. En base al antibiograma completo (12 antibióticos) expuesto en las Tablas 9 y 10 se determinó que la ciprofloxacina era la más adecuada ya que mostró el índice más alto de sensibilidad en todas las cepas estudiadas.

## **7.3 Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva**

### **7.3.1 Selección de mutantes resistentes al ácido nalidíxico (*Escherichia coli* enterotoxigénica)**

El experimento fue exitoso pues se logró seleccionar mutantes resistentes al ácido nalidíxico. Para ello se utilizó las cepas E5b y E6b correspondientes a *E. coli* enterotoxigénica (LT), así como ST1 y ST4 correspondientes a *E. coli* enterotoxigénica (ST). Dichas cepas presentaron el patrón de susceptibilidad más adecuado, pues fueron sensibles a casi todos los antibióticos probados en el antibiograma completo: SXT, GM, S, AM, AMC, CXT, CF, C, CIP, ENO, TE, G, NA y K. La única resistencia encontrada en ST1 fue a CF, el resto de cepas mostraron completa susceptibilidad ante los antibióticos analizados.

Durante el primer ensayo se obtuvo 361 aislados de ETEC (LT) resistentes al ácido nalidíxico (Tabla 11), de los cuales se conservó 20 para su posterior uso. En el caso de ETEC (ST) hubo contaminación y se repitió el ensayo. En el segundo ensayo para ETEC (ST), se logró aislar mutantes resistentes al ácido nalidíxico, de los cuales se conservó 20 clones (Tabla 12).

### **7.3.2 Selección de mutantes resistentes a la ciprofloxacina (*Escherichia coli* K12)**

Se obtuvo 46 aislados de *E. coli* K12 resistentes a distintas concentraciones de ciprofloxacina (Tabla 13). De éstos, 22 fueron de interés pues su resistencia sobrepasó los [2 $\mu$ g/mL] de antibiótico. Los 22 aislados a los cuales se realizó un antibiograma generaron halos menores a 15mm que indican resistencia (Tabla 14). Se observó una progresiva disminución del diámetro de los halos conforme las bacterias crecían en medios con mayor concentración de ciprofloxacina (Figura 10).

Hubo un alto índice de contaminación debido a la manipulación del medio con el cultivo bacteriano. Los focos de contaminación se pudieron haber generado al momento de adicionar los antibióticos, o en la toma de muestras (para siembra en AN + ciprofloxacina). Este hecho obligó a la eliminación del cultivo (CN) cada cierto tiempo. Posteriormente se partía de un medio de cultivo fresco que contenga la cepa con mayor resistencia que haya sido recuperada hasta el momento.

#### **7.4 Fase preparativa previa a Conjugaciones**

En base a antibiogramas confirmatorios mostrados en la Tabla 15, se comprobó que los patrones de resistencia no variaron. Mediante PCR, se pudo confirmar la presencia del gen LT y ST tanto en las cepas iniciales: ETEC LT (E5 y E6) y ETEC ST (ST1 y ST4), así como en aquellas sometidas a resistencia (E5bA, E5bB, E6bA, E6bB, ST1 A-D, ST4 A-D). Se eligió la cepa de *E. coli* enterotoxigénica (LT) a ser utilizada en los experimentos de conjugación en base a la banda más clara, que fue la presentada por “E5bA3”.

Finalmente se puede decir que por medio de presión selectiva se pudo obtener las cepas resistentes tanto al ácido nalidíxico (*Escherichia coli* enterotoxigénica (E5bA3)), como a la ciprofloxacina (*E. coli* K12 BI resistente a [3,25ug/mL de ciprofloxacina]). Adicionalmente se comprobó los patrones de resistencia requeridos para *E. coli* HB101 (resistencia a kanamicina) (Tabla 16).

## 7.5 Transferencia del Transposón Tn5 mediante Conjugación

### 7.5.1 CONJUGACIÓN 1: *Escherichia coli* HB101 y *Escherichia coli* enterotoxigénica

En el primer muestreo “siembra inicial”, se obtuvo un total de 161 colonias a las 48 horas, con una media de 32.2 colonias por caja. Se vio un resultado parecido en el segundo muestreo “siembra post-antibiótico” 163 colonias a las 24 y 48 horas, donde se obtuvo una media de 36 colonias por caja (Tabla 17). Se recuperó 50 aislados, que fueron sometidos a pruebas bioquímicas. De éstos se conservó 11, a los cuales se realizó antibiogramas, para finalmente tener 7 ETEC resistentes a la kanamicina y al ácido nalidíxico (Tabla 18).

### 7.5.2 CONJUGACIÓN 2: Conjugado #1 (ETEC + Tn5) y *Escherichia coli* K12

En el primer muestreo a las 24 horas se registró un total de 588 UFC diminutas. A las 48 horas se pudo visualizar 2 tipos de colonias: colonias amarillentas redondas medianas características de *E. coli* y colonias blancas redondas pequeñas típicas de levaduras (Figura 11). De las 588 colonias contadas inicialmente, se distinguió 127 UFC como *E. coli* (colonias amarillentas redondas medianas), con una media de 25,4 colonias por caja (Tabla 19). Las 461 colonias restantes fueron levaduras.

En el segundo muestreo del **Conjugado #2** se colectó 180 UFC adicionales a las 127 correspondientes al primer muestreo. De esta manera se obtuvo un total de 307 clones de *Escherichia coli* K12 (resistente a la ciprofloxacina) que adquirieron el transposón Tn5 (resistencia a la kanamicina). Éstos fueron candidatos de haber adquirido el plásmido de ETEC que contenía el

gen de patogenicidad LT marcado con el Tn5. Se conservó 20 aislados a – 20°C, y el resto (287) fueron conservados en placas de AN + kanamicina [30ug/mL] + ciprofloxacina [3ug/mL], en refrigeración.

## 7.6 PCR confirmatorio para Tn5 (Gen de resistencia a kanamicina)

Las pruebas de PCR para detectar la presencia del transposón Tn5 fueron positivas en los 10 aislados del **Conjugado #1**, así como también en los 20 aislados del **Conjugado #2** que fueron probados. La amplificación realizada mostró la presencia del gen de resistencia a la kanamicina en: *E. coli* HB101 y en los **Conjugados #1 y #2**. Los controles negativos (*E. coli* K12 y *E. coli* enterotoxigénica E5bA3) fueron negativos. Estos resultados concordaron con los patrones de resistencia esperados para las muestras tanto iniciales como para los conjugados (Figura 12).

## 7.7 Transferencia del plásmido con el gen LT

Se realizó un PCR del gen LT para: las 4 cepas iniciales de *E. coli* (ETEC E5bA3, ETEC E5, HB101, K12 BI), 6 clones del **Conjugado #1** (C1- 26, 32, 40, 42, 46 y 49) y 20 aislados del **Conjugado #2** (C2 – 1, 3, 11, 25, 31, 35, 44, 45, A1, A4, A14, A18, A19, A24 y A29). Además se corrieron controles positivos pertenecientes a cepas de ETEC con el gen LT y un control negativo con agua. De 32 muestras analizadas, se logró amplificar solamente los controles positivos (E5bA3, E5) y las muestras del **Conjugado #1** (Figura 13). Mediante un segundo PCR se corrieron los 287 aislados restantes (de un total de 307 clones

recuperados) del **Conjugado #2**, del cual tampoco se obtuvo bandas positivas (708pb) (Figura 15). Las pruebas de PCR para el gen LT de ETEC fueron negativas en todos los aislados del **Conjugado #2**, pues no hubo amplificación.

## **7.8 Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos**

Este experimento destinado a observar los plásmidos presentes en las cepas de interés (transconjugadas y ETEC) fue negativo. Se pudo visualizar una sola banda perteneciente al cromosoma bacteriano. En ninguna de las muestras se vio la presencia de plásmidos evidenciados por una segunda banda (Figura 14).

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Selección de mutantes resistentes a antibióticos por presión selectiva**

Las mutaciones por presión selectiva se generan al someter a las bacterias a una concentración de antibiótico que es normalmente letal para ellas, de manera que deben mutar para sobrevivir. Dichas mutaciones bloquean la acción del antibiótico generando cepas resistentes (Annika, 2005). En la mayoría de casos estos mutantes se obtienen luego de un único experimento de selección. Sin embargo, en este estudio, al realizar la selección con ciprofloxacina se requirió la generación de mutantes resistentes a distintos niveles, los cuales fueron obtenidos mediante cultivo sometido a concentraciones progresivas de

antibiótico hasta llegar a bacterias capaces de crecer a concentraciones 3,5ug/mL de ciprofloxacina.

Un hecho notable encontrado en las cepas de HB101, es que a través de los distintos subcultivos realizados en algunos de los aislados se había perdido en su totalidad la resistencia a la estreptomicina y tetraciclina. Solo se recuperó una cepa resistente a la kanamicina: HB101e. Este es un caso de curación del plásmido debido a distintos subcultivos de la bacteria, así como también por no conservarla a -20°C en un medio con glicerol. La conservación de cepas recomendada varía entre -70°C a -20°C (Perry, 1998), pues a esta temperatura la frecuencia de rearrreglos del ADN plasmídico se reduce a menos del 1% (Brujin & Lupski, 1984). Al mantenerlas a temperaturas superiores se corre peligro que las bacterias en su afán de mantenerse viables, pierdan sus plásmidos o material genético que en ese momento solo representa una carga metabólica para ellas (Yoh, et al., 1991).

Otro hecho relevante fue la existencia de patrones de resistencia variables. Existieron cepas que crecieron en medio suplementado con antibiótico, pero aún así el antibiograma mostró halos indicativos de sensibilidad. Un ejemplo de esto tenemos en el **Conjugado #1** donde se encontró 3 cepas sensibles a la kanamicina: C1E3B3, C1E3C2, C1E3D4. Este hecho evidencia que no siempre los medios con antibiótico permiten aislar cepas con la misma intensidad de resistencia, pues el antibiótico en el medio puede no haberse distribuido en proporciones equitativas, permitiendo así el crecimiento de bacterias sensibles en ciertos lugares de la caja. En base a este tipo de errores se seleccionó un método estandarizado como son los antibiogramas de difusión por disco (Técnica de Kirby

Bauer). En este tipo de prueba se parte de una concentración determinada de bacterias (Mc. Farland [0,5]), las cuales son sembradas en un medio específico (Mueller Hinton), que tiene las características necesarias para generar halos de inhibición que pueden ser comparadas con referencias publicadas en el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Es por ello la importancia de los antibiogramas como generadores de un resultado más estandarizado y confiable (Becton-Dickinson, 2007).

## 8.2 Marcación de plásmidos con Tn5

Como resultado de la primera conjugación se obtuvieron cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica resistente al ácido nalidíxico, que adquirieron el transposón Tn5 que lleva consigo el gen de resistencia a la kanamicina. Este transposón pudo estar adherido tanto al cromosoma como a algún otro plásmido. Si el transposón se hubiera insertado al plásmido que contiene el gen LT y si este fuera conjugativo entonces se esperaría que cada vez que se conjugue el plásmido, la bacteria receptora gane resistencia a la kanamicina (plásmido marcado). Esto permitiría a futuro estudiar la frecuencia de transmisión de este plásmido hacia distintas cepas de *Escherichia coli* y se podría determinar si su paso a otras cepas que no son patógenas puede generar patogenicidad. De esta manera también se podría saber si el único factor determinante en la patogenicidad de *Escherichia coli* enterotoxigénica está dado por la presencia del plásmido que porta al gen LT, o si hay otros factores cromosomales que en conjunto le confieren patogenicidad.

Luego de la primera conjugación se recuperó cepas de ETEC que adquirieron el transposón Tn5 lo cual indicó que el primer paso de este experimento funcionó. A partir de la segunda conjugación se obtuvo cepas de *Escherichia coli* K12 (resistentes a ciprofloxacina) que adquirieron el transposón Tn5 (resistencia a la kanamicina) por conjugación, sin embargo estas cepas no contenían el gen LT. Se puede concluir que se logró marcar un plásmido conjugativo presente en la cepa original de ETEC.

Es posible que el Tn5 haya podido insertarse en plásmido que contiene a LT, pero quizá este plásmido no es conjugativo o tal vez tiene baja tasa de conjugación (Mitsuhashi, et al., 1977). A pesar de la gran cantidad de muestras analizadas (307), probablemente la tasa de transmisión del plásmido que contiene al gen LT hacia otras bacterias distintas a ETEC (*E. coli* K12) es incluso menor. En un estudio realizado por Sadayuki, et al., 2009 se encontró que la tasa de transmisión del plásmido que contenía al gen LT es baja (de  $10^{-9}$  a  $10^{-11}$  transconjugados por donador), lo que corrobora nuestros resultados.

Es posible también que el plásmido de ETEC requiera para su movilización la ayuda de otros plásmidos que no se encuentran presentes en las cepas de *E. coli* K12, sino solamente en otras *E. coli* enterotoxigénicas, o en otras bacterias patógenas (Murray, et al., 1983).

### **8.3 Identificación y Tipificación de cepas bacterianas**

A lo largo del Proyecto se hizo énfasis en la caracterización de cepas. Debido a que muchos de los procedimientos eran susceptibles a contaminación, fue de gran importancia establecer las principales características metabólicas de

las mismas. La utilización de pruebas bioquímicas permitió diferenciar entre las cepas pertenecientes a los experimentos de las contaminantes.

La única variante que se tuvo al momento de realizar las pruebas bioquímicas se la encontró en *Escherichia coli* K12. Debido a que esta es una cepa altamente manipulada y subcultivada, puede ser foco de mutaciones puntuales o inactivaciones de genes (Lederberg, 2004). En el caso particular de la *E. coli* K12 utilizada en los experimentos, se ve una inactivación del gen que codifica para la síntesis de  $\beta$ -D Glucoronidasa, pues esta presentó una coloración turquesa en lugar de ser azul o morada al ser cultivada en Chromocult. Normalmente *E. coli* cuenta con un patrón MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido) positivo, basado en la acción de la enzima ya mencionada (Merck-Millipore, 2008). Para la confirmación de esta cepa como una *E. coli* verdadera, se utilizó el Reactivo de Kovacs, el cual en contacto con la bacteria generó un anillo fucsia, indicativo de la producción de la triptofanasa, y por tanto la producción de Indol (Becton-Dickinson, 2011).

## 9. CONCLUSIONES

- a. Mediante el presente proyecto no se pudo detectar plásmidos de ETEC (con el gen LT) que mediante conjugación hayan sido marcados con Tn5 y sean capaces de movilizarse. Se logró marcar un plásmido desconocido de ETEC, pero este no contiene el gen de patogenicidad (Levin & Moran, 2011).

- b. La presencia de genes de resistencia a kanamicina en ambos conjugados, sugiere que es posible marcar plásmidos conjugativos de ETEC mediante Tn5.
- c. Se logró generar cepas de *E. coli* resistentes a distintos antibióticos (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) por medio de presión selectiva, los mismos que sirvieron de marcadores durante los experimentos de conjugación.
- d. Se creó una biblioteca de mutantes por medio de la adquisición del transposón Tn5 utilizando distintas cepas de *E. coli* (ETEC, K12, HB101).
- e. Se identificó mutantes de ETEC que fueron capaces de transferir horizontalmente (conjugación) el Tn5.
- f. Se vio la importancia de la caracterización de cepas de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas, de manera que no se aislen microorganismos contaminantes, sino solo las bacterias de interés.

## 10. RECOMENDACIONES

Para nuevos proyectos que sigan la línea de esta investigación, se debe partir de la caracterización genotípica de las cepas a ser utilizadas, así como también la de aquellas obtenidas a lo largo de los experimentos.

Se debe tener muy en cuenta los focos de contaminación que pueden existir en los experimentos tanto en la selección de mutantes resistentes como en las conjugaciones. Ya que, a pesar que se trabaja con cultivos iniciales puros, la manipulación de los medios y su exposición al ambiente puede introducir factores contaminantes que complican el desarrollo de los experimentos.

Utilizando los protocolos de laboratorio estandarizados en el presente proyecto, sería interesante marcar plásmidos que tengan otros genes de patogenicidad, por ejemplo el que contiene el gen ST (que codifica para la toxina termoestable). Incluso se puede probar con otras cepas bacterianas que tengan plásmidos con genes de interés.

Sería también interesante considerar la opción de marcar otros plásmidos de patogenicidad en diversas especies bacterianas, así como también lograr identificar los plásmidos a los cuales se adhiere el Tn5. Para ello se puede utilizar la técnica de Campo Pulsado la cual permitirá ver los diferentes plásmidos existentes en clones de una misma especie bacteriana y por consiguiente en transconjugados de interés.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Actis, L., Tomalsky, M. & Crosa, J., 1999. Bacterial Plasmids: Replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Frontiers in Bioscience*, pp. 43-62.

Annika, N., 2005. *Bacterial Adaptation to novel Selection Pressures*. Stockholm: s.n.

ArgenBio, 2007. *Microorganismos productores de antibióticos*. Buenos Aires: s.n.

Azu, N. & Onyeagba, R., 2007. Antimicrobial Properties Of Extracts Of *Allium cepa* (Onions) And *Zingiber officinale* (Ginger) On *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* And *Bacillus subtilis*. *The Internet Journal of Tropical Medicine*.

Becton-Dickinson, 2003. *BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)*, Heidelberg: s.n.

Becton-Dickinson, 2006. BBL Mueller Hinton II Agar. *BD Quality Control Procedures*.

Becton-Dickinson, 2006. *BD BBL MacConkey II Agar*, Maryland: s.n.

Becton-Dickinson, 2007. BBL Urea Agar Base. *BD*.

Becton-Dickinson, 2007. *BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs*, Maryland: s.n.

Becton-Dickinson, 2011. *BBL Simmons Citrate Agar*, Shannon: s.n.

Becton-Dickinson, 2011. *BBL™ SIM Medium*, Shannon: s.n.

Bennet, P., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, pp. 347-357.

Bertin, A., 1992. Plasmid content and localisation of the STaI (STaP) gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* with a non-radioactive polynucleotide gene probe. *Journal of Medical Microbiology*, pp. 141-147.

Brujin, d. & Lupski, 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids. *Gene*, pp. 131-149.

Croxen, M. & Finlay, B., 2010. Molecular Mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*.

EcoDess, 2004. *Protocolo de Crioconservación de Cepas*, Quito: s.n.

EcoDess, 2004. *Protocolo de Extracción de ADN por el Método de Ebullición*, Quito: s.n.

Eisenberg, J. y otros, 2011. In-roads to the spread of antibiotic resistance: regional patterns of microbial transmission in northern microbial transmission in northern. *Journal of The Royal Society Interface*.

Hamood, A., Sublett, R. & Parker, C., 1986. Plasmid-Mediated Changes in Virulence of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, pp. 476-483.

Hollistera, J. y otros, 2011. Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Pnas*, pp. 2322-2327.

Johnson, T. & Nolan, L., 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 750-774.

Kado & Liu, 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*, pp. 1365-1373.

Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, pp. 123-140.

Keen, M., Street, D. & Hoffman, P., 1985. Broad-Host-Range Plasmid pRK340 Delivers Tn5 into the *Legionella pneumophila* Chromosome. *Journal of Bacteriology*, pp. 1332-1335.

Kohanski, M., DePristo, M. & Collins, J., 2010. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Molecular Cell*, pp. 311-320.

Lederberg, J., 2004. *E. coli* K12. *Microbiology Today*, Volumen 31, p. 116.

Levin, H. & Moran, J., 2011. Dynamic Interactions between transposable elements and their hosts. *Nature*, pp. 615-627.

Levin, H. & Moran, J., 2011. Dynamic Interactions between transposable elements and their hosts. *NATURE*, pp. 615-627.

Madigan, Martinco & Parker, 2004. *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Prentice - Hall.

Merck-Millipore, 2008. *Chromocult® Coliform Agar*, Darmstadt: s.n.

Microbial SL, 2009. La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. *Newsletter Microbial*, Issue 3, pp. 1,2.

Mitsuhashi, S., Inoue, K. & Inoue, M., 1977. Nonconjugative Plasmids Encoding Sulfanilamide Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 418-422.

Moat, A., Foster, J. & Spector, M., 2002. *Microbial Physiology*. New York: Wiley-Liss.

Murray, B., Evans, D., Peñaranda, M. & Evans, D., 1983. CFA/I-ST Plasmids: Comparison of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of Serogroups 025, 063, 078, and 0128 and Mobilization from an R Factor-Containing Epidemic ETEC Isolate. *Journal of Bacteriology*, pp. 566-570.

Niemira, B., 2005. Nalidixic Acid Resistance Increases Sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 to Ionizing Radiation in Solution and on Green Leaf Lettuce. *Food Microbiology and Safety*, pp. 121-124.

Osborn, M. & Boltner, D., 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative and mobilizable transposons as mosaic continuum. *Plasmid*, pp. 202-212.

Perry, S., 1998. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. *Molecular Biotechnology*, pp. 59-64.

Peters, J. & Craig, N., 2001. Tn7: Smarter than we thought. *Nature*, pp. 806-814.

Rådström, P. y otros, 2004. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*, Volumen 26, pp. 133-146.

Russel, A. D., 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, p. 97-104.

Sadayuki, O. y otros, 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Research*, Volumen 16, p. 299-309.

Seong Wei, L. & Musa, N., 2008. Inhibition of *Edwardsiella tarda* and Other Fish Pathogens by *Allium sativum* L. (Alliaceae) Extract. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, pp. 692-696.

Tornieporth, N. y otros, 1995. Differentiation of Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Brazilian Children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1371-1374.

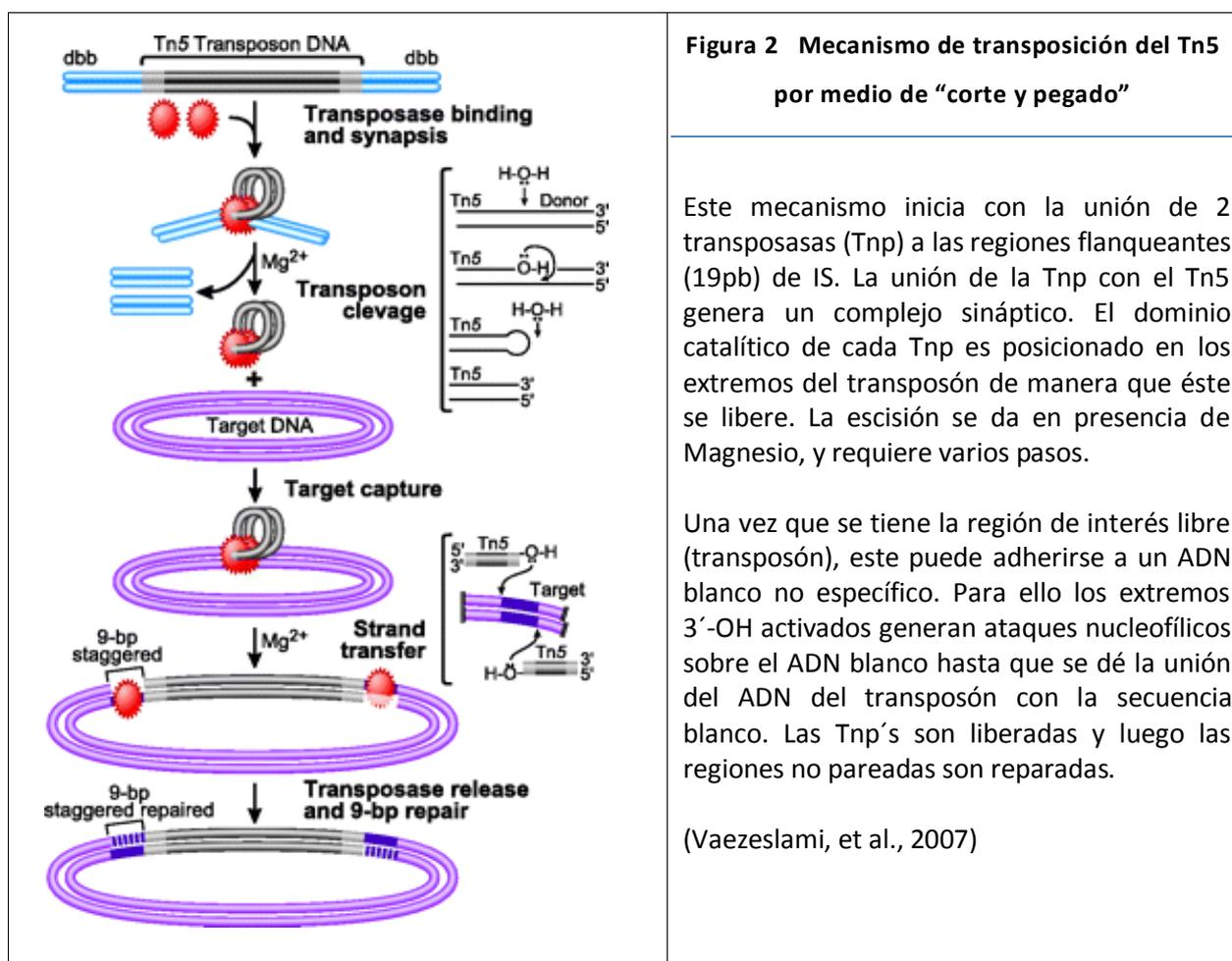
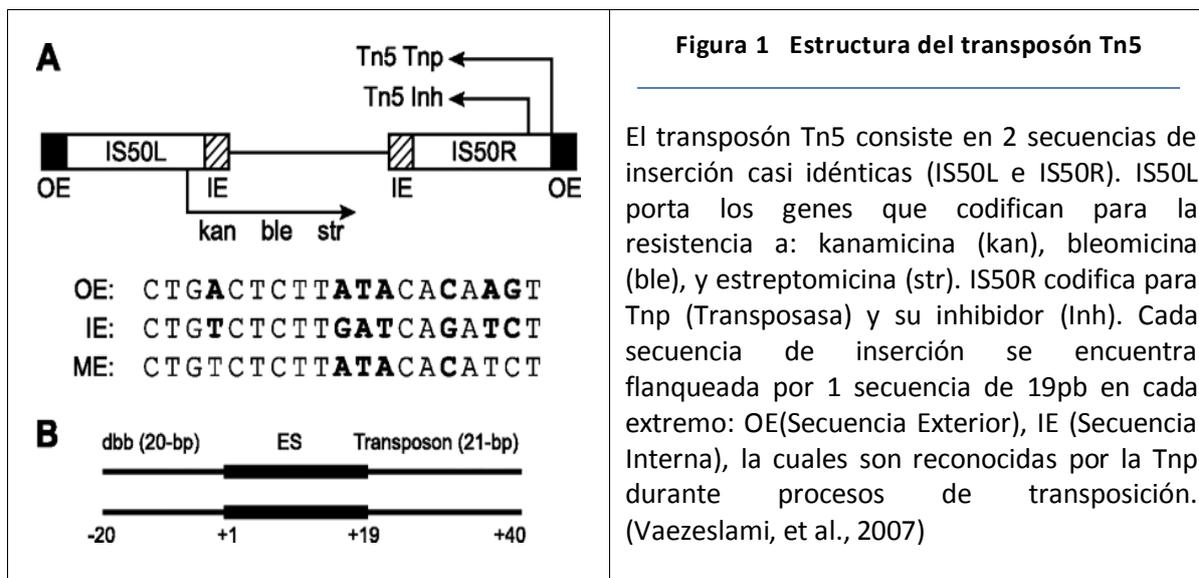
Vaezeslami, S., Sterling, R. & Reznikoff, W., 2007. Site-Directed Mutagenesis Studies of Tn5 Transposase Residues Involved in Synaptic Complex Formation. *Journal of Bacteriology*, p. 7436-7441.

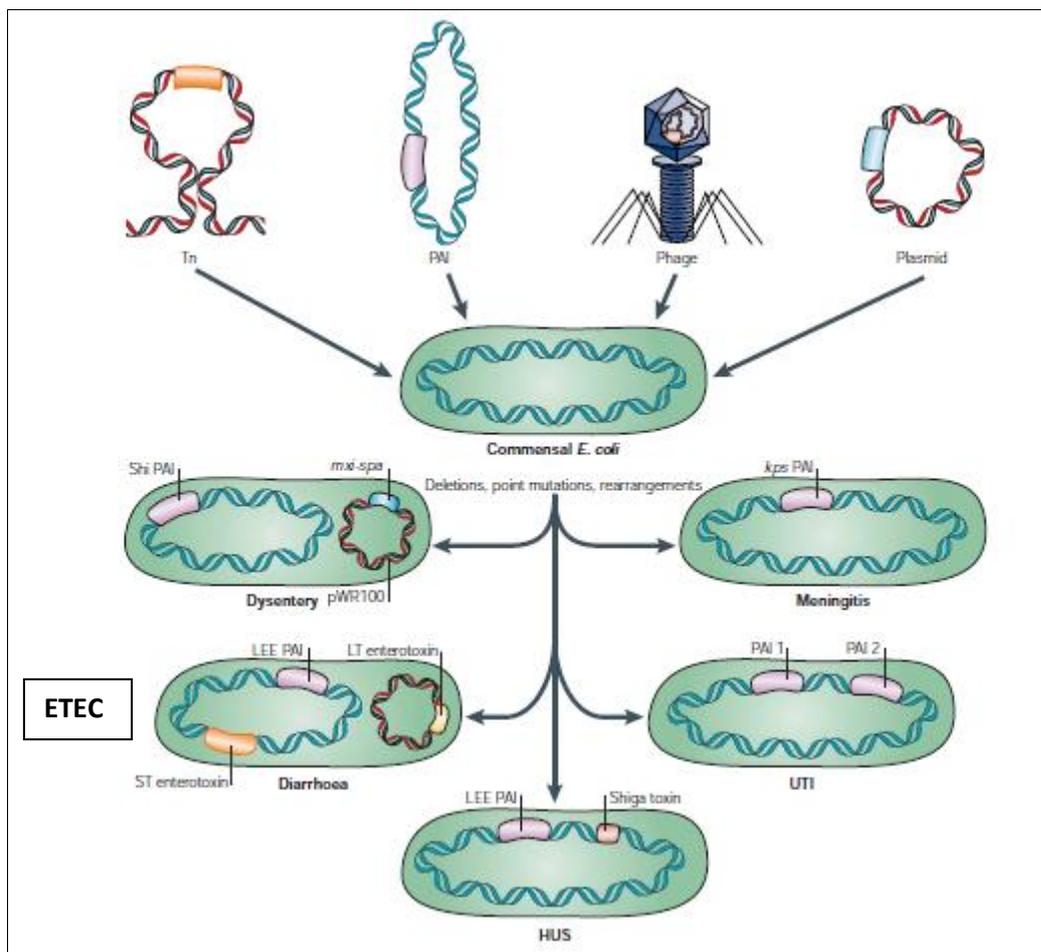
Vila, J. y otros, 1994. Association between Double Mutation in *gyrA* Gene of Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* and MIC's. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2477-2479.

World-Health-Organization, 2011. Antibiotic resistance: No action today, no cure tomorrow. *WHO*, 7 Abril.

Yoh, M., Narita, I., Honda, T. & Miwatani, T., 1991. Comparison of Preservation Methods for Enterotoxigenic *Escherichia coli* Producing Heat-Labile Enterotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2326-2328.

## 12. FIGURAS





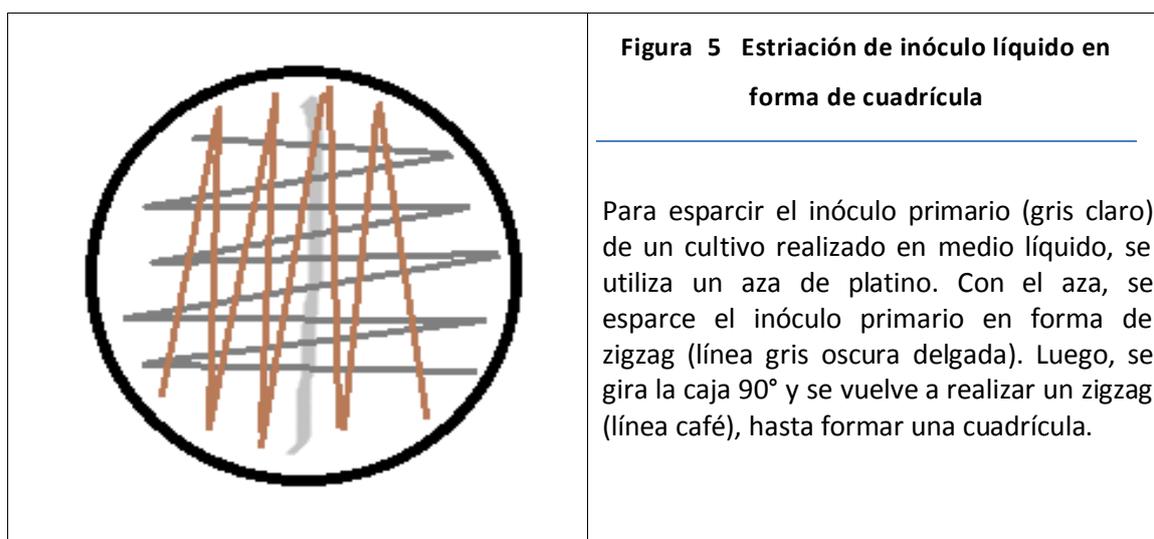
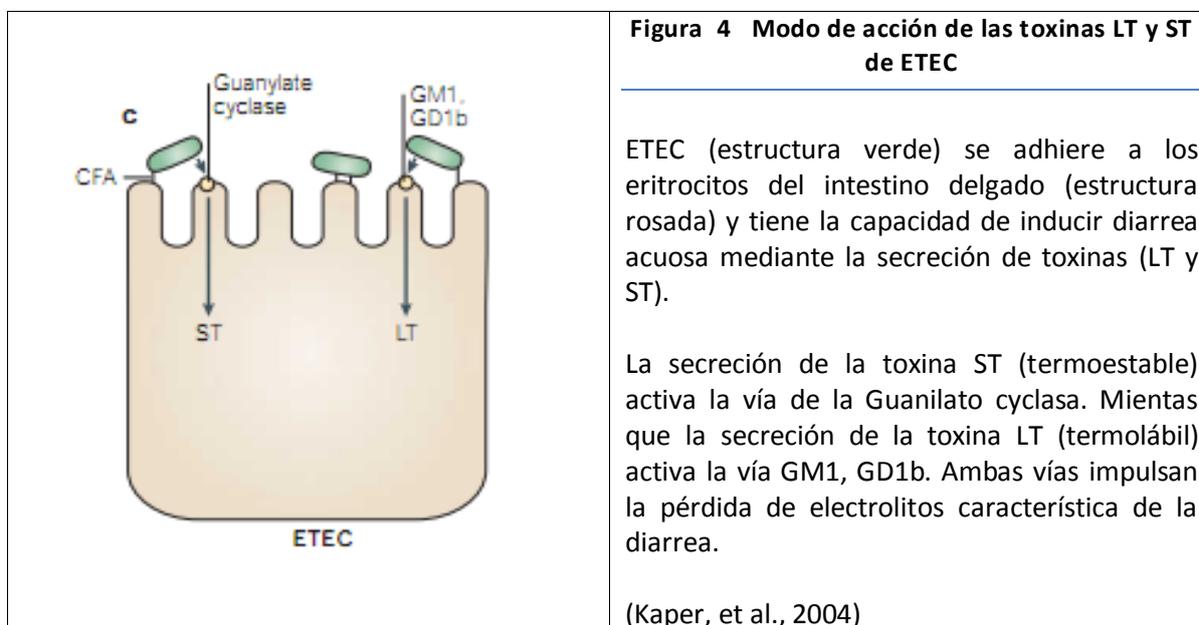
**Figura 3 Mecanismos de Adquisición de Información Genética**

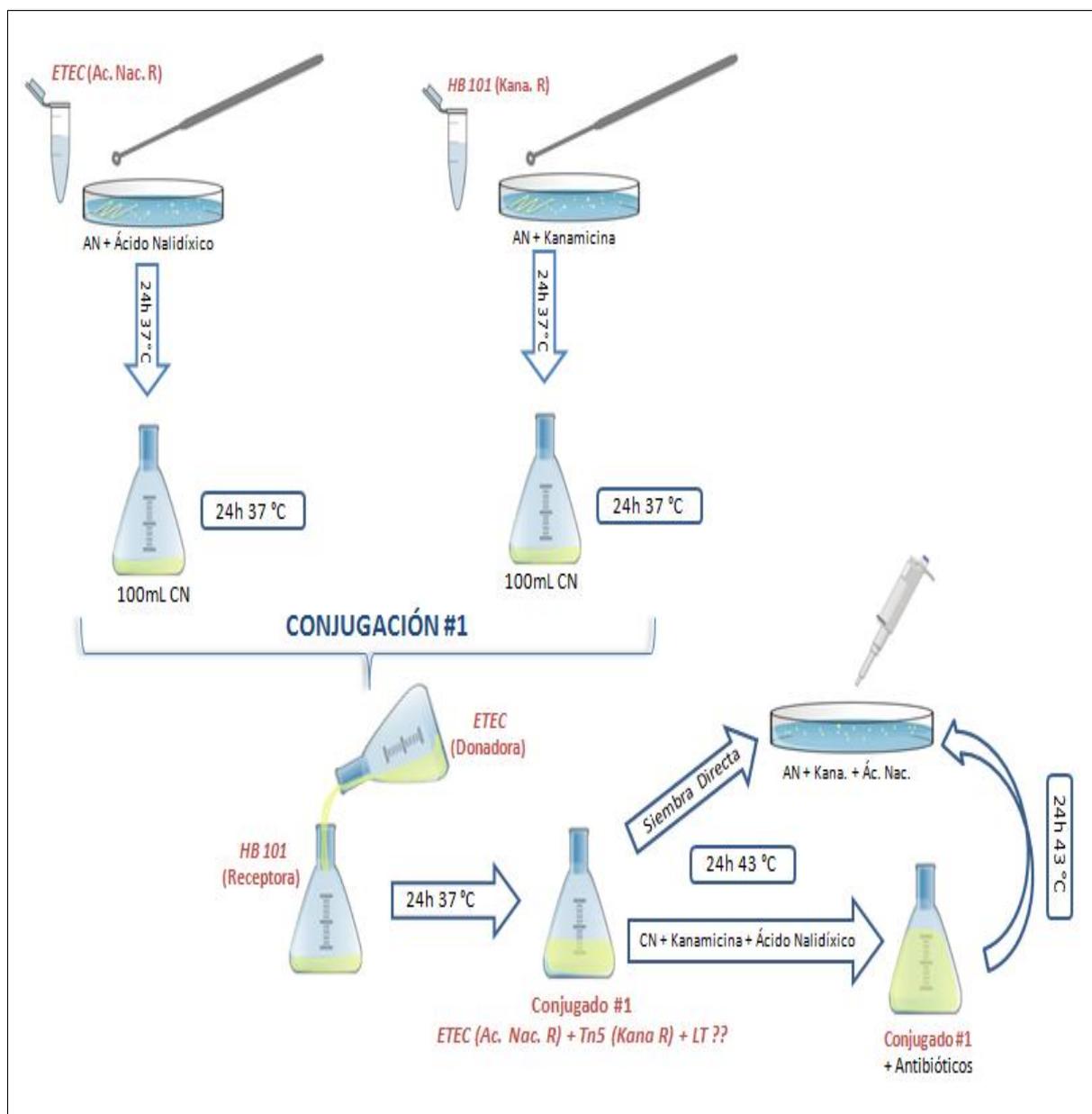
Los factores de virulencia de *Escherichia coli* pueden estar codificados por varios elementos genéticos móviles: Transposones (Tn), Plásmidos (Plasmid), Bacteriófagos (Phage), e Islas de Patogenicidad (PAI).

En la figura se muestra una *E. coli* comensal, que por medio de la adquisición de distintos factores de virulencia, deleciones, mutaciones puntuales o rearrreglos puede convertirse en una bacteria patógena. Una *E. coli* comensal que ha adquirido agentes de virulencia puede causar diarrea, disentería, meningitis, HUS, UTI.

En el caso particular de ETEC: el gen que codifica para LT (toxina termolábil) se encuentra dentro de un plásmido. Mientras tanto el gen que codifica para ST (toxina termoestable) está dentro de una Isla de Patogenicidad (PAI) que ha sido insertada en el cromosoma bacteriano. Ambas toxinas son causantes de diarrea en humanos.

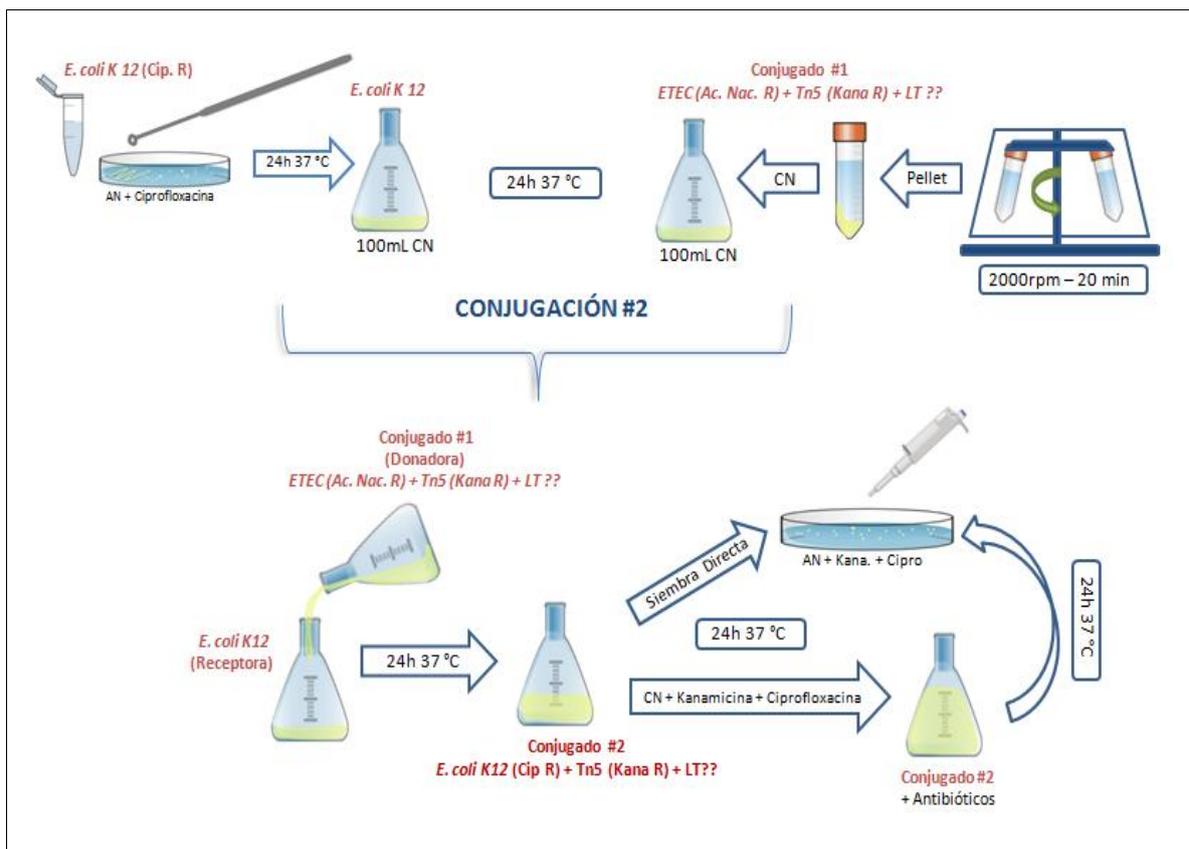
(Kaper, et al., 2004)





**Figura 6 Esquema de la Metodología seguida para la Fase #2 (Conjugación #1)**

Para la conjugación se parte de un cultivo puro en fase logarítmica (24h, 37°C). Se mezcla donadora y receptora y se incuban sin movimiento durante 24h, 37°C. Es importante determinar si la conjugación se llevó a cabo mediante la siembra en placas de AN suplementadas con kanamicina y ácido nalidixico. La incubación del conjugado a 43°C es indispensable, pues permite eliminar las células de la bacteria donadora (HB101).



**Figura 7 Esquema de la Metodología seguida para la Fase 3 (Conjugación #2)**

Se parte del Conjugado #1 (derecha), que debe ser centrifugado para eliminar el medio de cultivo con antibiótico. Posteriormente se lo incubó en medio de cultivo fresco (24h 37°C). Es necesario que tanto donadora (Conjugado #1) como receptora (*E. coli* K12 resistente a ciprofloxacina) se encuentren en fase logarítmica (24h 37°C) para la conjugación. Se mezcla donadora y receptora y se los deja reposar sin movimiento durante 24h a 37°C. Se selecciona los conjugados mediante su siembra en medio con kanamicina y ciprofloxacina.



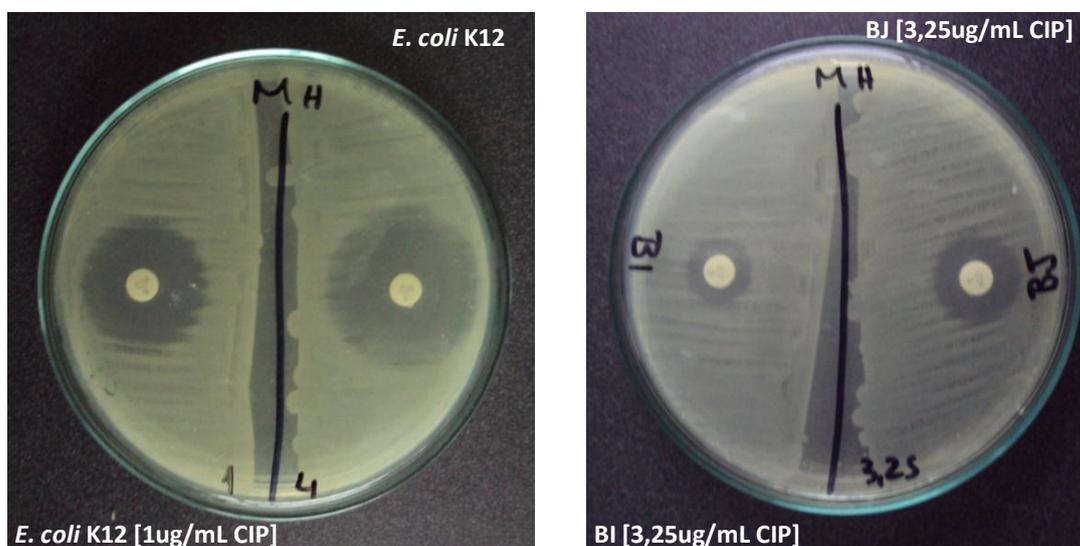
**Figura 8 Distintos Metabolismos de cepas de *E. coli* en Agar MacConkey Lactosa**

Las coloración rosada del cuadrante superior corresponde a una ETEC (E5bA3) fermentadora de lactosa. Los 2 cuadrantes (izquierda y derecha) pertenecen a distintos clones de *E. coli* HB101, que al igual que el cuadrante inferior (*E. coli* K12) no son capaces de fermentar la lactosa y consecuentemente sus colonias permanecen incoloras/amarillentas.



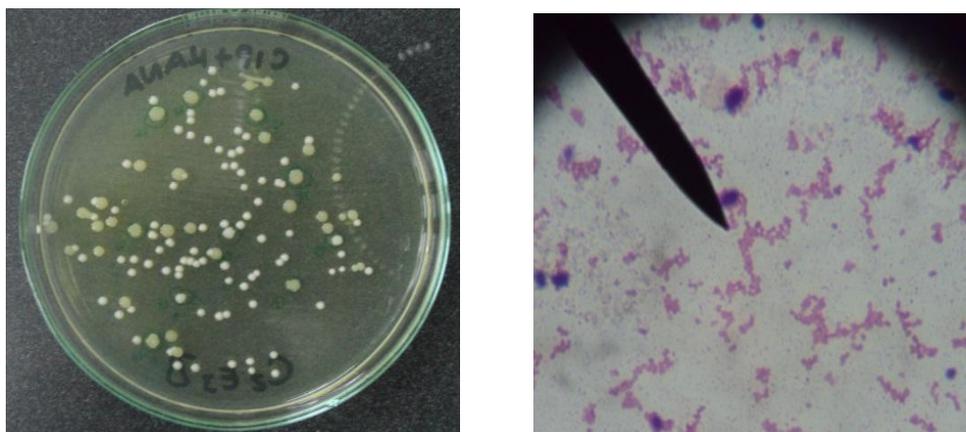
**Figura 9** Diferentes patrones de *E. coli* visualizados en Agar Chromocult

*E. coli* HB101 (derecha), muestra colonias MUG+ que adquieren su coloración azul o morada por acción de la  $\beta$ -D glucuronidasa. *E. coli* K12 (izquierda) pueden mostrar una coloración más tenue (azul pálido o turquesa) debido a la pérdida de esta enzima.



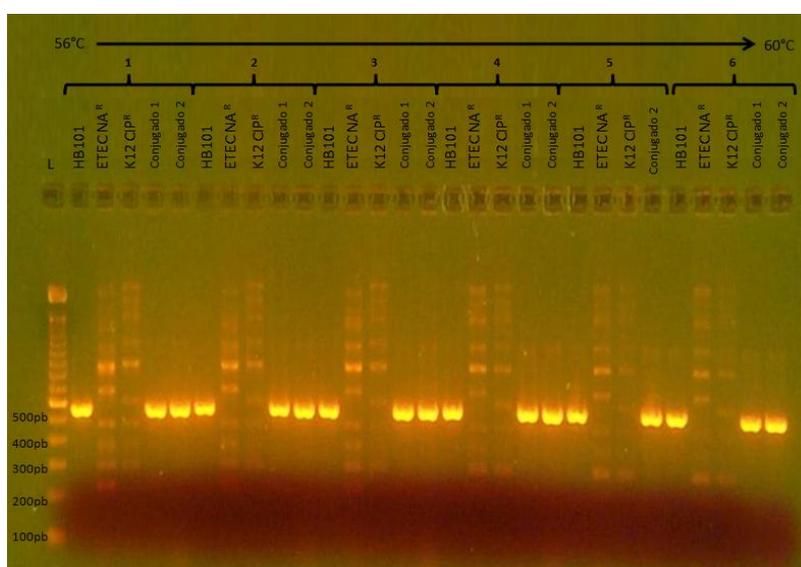
**Figura 10** Comparación de *E. coli* K12 previo y posterior al tratamiento con ciprofloxacina

En el panel superior izquierdo está la cepa inicial *E. coli* K12 (1), adyacente a ésta se encuentra la misma cepa (4) sometida a [1ug/mL CIP]. En el panel derecho se muestra a las cepas BI y BJ sometidas a [3.25ug/mL CIP], que muestran halos de 13 y 16mm respectivamente. Siglas utilizadas: MH (Mueller Hinton Agar), CIP (Ciprofloxacina), BI y BJ (*E. coli* K12 sometida a 3,25ug/mL de Ciprofloxacina).



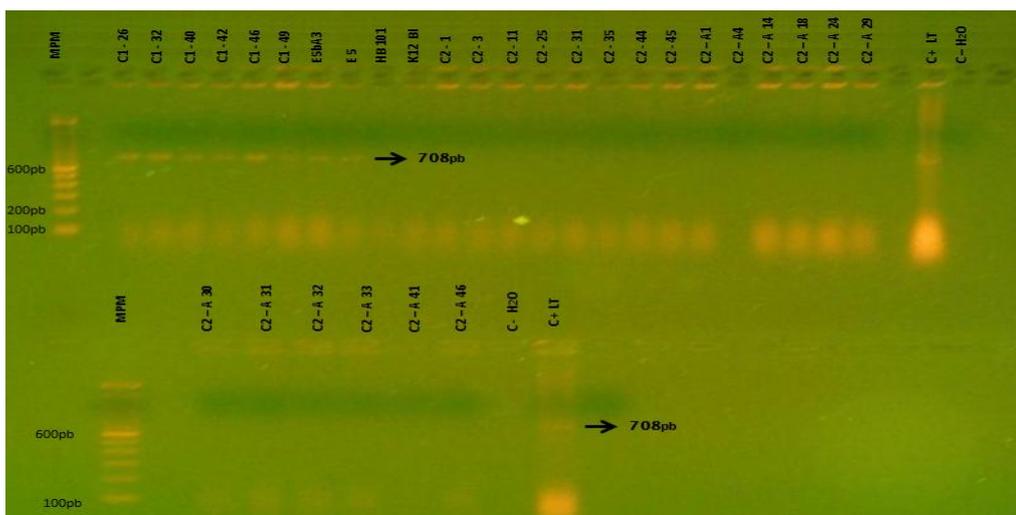
**Figura 11 Contaminación con Levaduras del Conjugado #2**

En el panel izquierdo se muestra una caja de AN + ciprofloxacina + kanamicina, con un inóculo del Conjugado #2. Hay 2 tipos de colonias: colonias medianas amarillentas que son características de *E. coli*, mientras que las blancas pequeñas son levaduras. En el panel derecho, se muestra una coloración Gram del Conjugado #2. Se puede ver la presencia de bacilos gram negativos (morfología de *E. coli*) y adicionalmente se ven estructuras más grandes moradas en forma de gotas (levaduras), indicativos de contaminación.



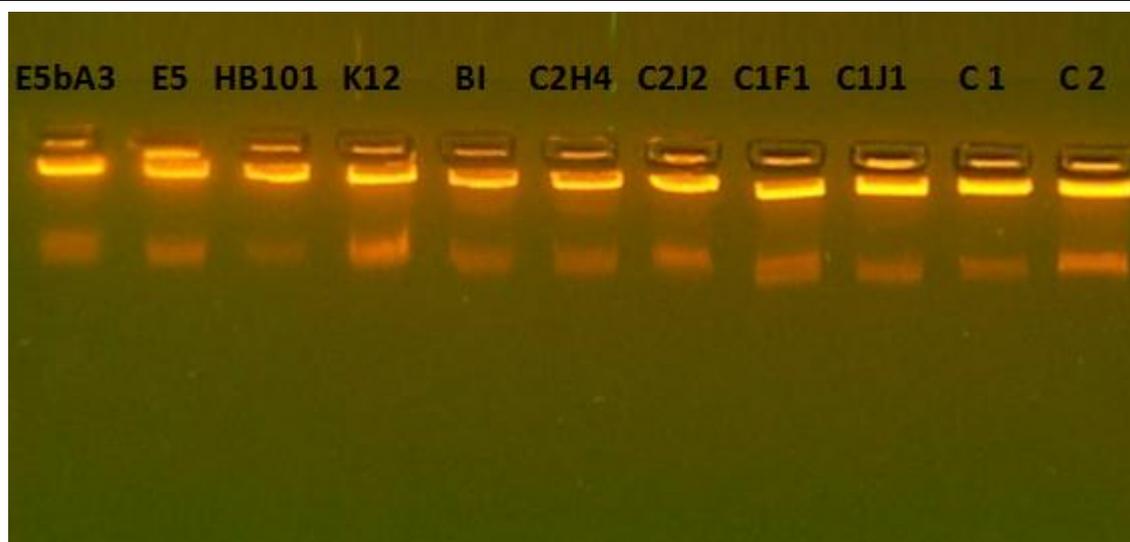
**Figura 12 Amplificación del Gen de resistencia a la kanamicina (Gradiente)**

Las muestras amplificadas mediante gradiente comprendieron temperaturas entre 56°C (izq.) y 60°C (der.), siendo 60°C aquella con menor inespecificidad. Se amplificó el gen de resistencia a la Kanamicina (KM) para las cepas iniciales: HB101, ETEC E5bA3 (NA<sup>R</sup>), K12 (CIP<sup>R</sup>), aislados del Conjugado #1, y del Conjugado #2. El amplicón fue de 557pb. Hubo amplificación para los Conjugados #1 y #2. No se observó bandas específicas para: ETEC E5bA3(NA<sup>R</sup>) y K12 (CIP<sup>R</sup>)



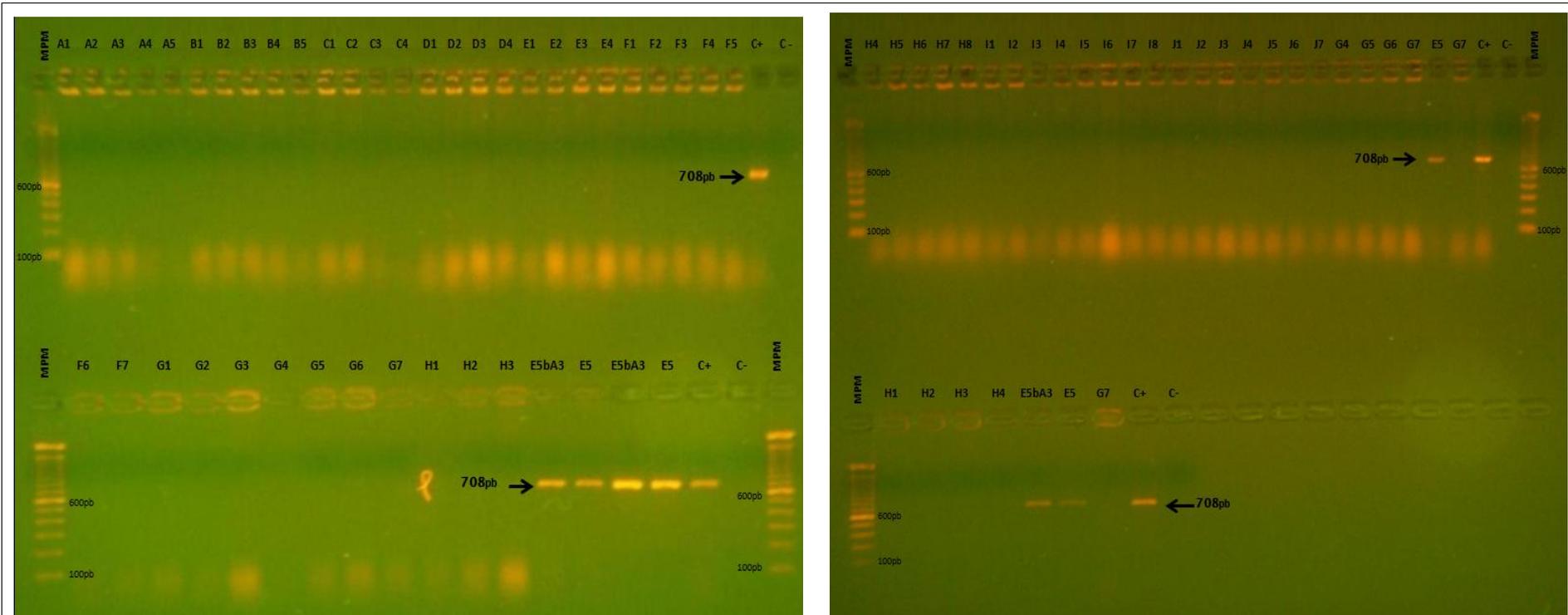
**Figura 13 Amplificación de los Conjugados #1 y #2 (Gen LT)**

Se amplificó: cepas iniciales de *E. coli* (ETEC E5bA3, ETEC E5, HB101, K12 BI), 6 muestras del Conjugado #1 (C1- 26, 32, 40, 42, 46 y 49), 20 muestras del Conjugado #2 (C2 – 1, 3, 11, 25, 31, 35, 44, 45, A1, A4, A14, A18, A19, A24 y A29), controles positivos pertenecientes a cepas de ETEC con el gen LT y un control negativo con agua. El amplicón para el gen LT fue de 708pb. No hubo amplificación para los Conjugados #2. Siglas utilizadas: MPM (Marcador de Peso Molecular), C+ (Control Positivo), C – (Control Negativo).



**Figura 14 Electroforesis de Campo Pulsado para observar plásmidos**

Las muestras corresponden a bloques de agarosa de suspensiones celulares de: E5bA3, E5, HB101, K12 BI, Conjugado #2 y Conjugado #1 corridos en un gel de agarosa [0,7%]. No se vio la presencia de 2 bandas (cromosoma y plásmido), solo se pudo ver la banda perteneciente al cromosoma bacteriano.



**Figura 15 Amplificación del gen LT para pools de aislados del Conjugado #2**

Se amplificó: las cepas iniciales de *E. coli* (ETEC E5bA3, ETEC E5), 287 clones del Conjugado #2 agrupados en pools bacterianos (3 a 6 clones cada uno), controles positivos pertenecientes a cepas de ETEC con el gen LT, y un control negativo con agua. El amplicón para el gen LT fue de 708pb. No hubo amplificación para los Conjugados #2. Siglas utilizadas: MPM (Marcador de Peso Molecular), C+ (Control Positivo), C – (Control Negativo).

### 13. TABLAS

<b>Tabla 1 Concentración de reactivos utilizados para PCR del gen KM</b>		
<b>REACTIVO</b>	<b>VOLÚMEN (µL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
H <sub>2</sub> O para PCR	17.55	-
Buffer de PCR [10x]	2.5	1x
MgCl <sub>2</sub> [50mM]	0.75	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs [10mM]	0.5	200 µM
Primer 1 [10 uM]	1	0.4 µM
Primer 2 [10uM]	1	0.4 µM
Taq polimerasa [5unidades/uL]	0.2	1 unidad/reacción
ADN	2.5	-
<b>VOLÚMEN TOTAL</b>	25	-
No se muestra la concentración de ADN de las muestras, pues no se realizó una cuantificación.		

<b>Tabla 2 Concentración de reactivos utilizados para PCR del gen LT</b>		
<b>REACTIVO</b>	<b>VOLÚMEN (µL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
H <sub>2</sub> O para PCR	11,4	-
Buffer de PCR [5x]	5	1 x
MgCl <sub>2</sub> [25uM]	1,5	1 uM
dNTPs [10uM]	0,5	200 uM
Primer 1 [1uM]	2	0,08 uM
Primer 2 [1uM]	2	0,08 uM
Taq polimerasa [5unidades/uL]	0,1	2,5 unidades/reacción
Muestra de ADN	2,5	-
<b>VOLÚMEN TOTAL</b>	25	-
No se muestra la concentración de ADN de las muestras, pues no se realizó una cuantificación.		

**Tabla 3 Pruebas bioquímicas confirmatorias para *E. coli* enterotoxigénica (ST)**

ETEC + ST	CEPA ORIGINAL	CEPA	GRAM	SIM			UREA			TSI				
				Crecim.	Mov.	Indol	Crecim.	Medio	=	Crecim.	Medio	Gas	H <sub>2</sub> S	=
ETEC + ST	051002402 ST H3 C3	ST 1	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	030424398 ST C3 C2 6	ST 2	BG-	Si	No	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	C551 151 4 ST L3	ST 3	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	051002402 ST C3 G3	ST 4	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	-	-	A/A

ETEC + ST	CEPA ORIGINAL	CEPA	MKL				CC			CITRATO			RESULTADO
			Crecim.	UFC	Medio	=	Crecim.	UFC	=	Crecim.	Medio	=	
ETEC + ST	051002402 ST H3 C3	ST 1	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
	030424398 ST C3 C2 6	ST 2	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
	C551 151 4 ST L3	ST 3	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
	051002402 ST C3 G3	ST 4	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>

Los nombres de las “cepas originales” corresponden a la identificación utilizada en el Cepario del Proyecto Ecodess; los nombres asignados (ST1, ST2, ST3 y ST4) se emplearon para facilitar su reconocimiento. Los medios empleados para las diferentes pruebas bioquímicas fueron: SIM, UREA, TSI, MKL, CC y CITRATO. El patrón de reconocimiento para *E. coli* enterotoxigénica (ST) incluye: morfología: bacilos Gram negativos, SIM: motilidad variable e Indol positivo, UREA: negativo, TSI: Pico amarillo/fondo amarillo, producción de gas, ausencia de H<sub>2</sub>S, MKL: LAC+, CC: MUG+, CITRATO: negativo

Siglas utilizadas: BG- (bacilos Gram negativos), Crecim. (crecimiento), Mov. (motilidad), = (resultado), + (positivo), - (negativo), A/A (pico amarillo/fondo amarillo), UFC (unidad formadora de colonia), LAC+ (consumo de lactosa), CC (Agar Chromocult), MUG+ (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido positivas), ST (gen de la toxina termoestable)

**Tabla 4 Pruebas bioquímicas confirmatorias para *E. coli* K12**

CEPA		GRAM	SIM			UREA			TSI				
			Crecim.	Mov.	Indol	Crecim.	Medio	=	Crecim.	Medio	Gas	H <sub>2</sub> S	=
K12	K12 WT	BG-	Si	No	+	Si	Fucsia	+	Si	Rojo/amar	+	-	K/A
	K12 Ac. Nac R	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	-	-	K/A
	K12 Cepario Clínica 1	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A
	K12 Cepario Clínica 2	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A

CEPA		Crecim.	MKL			Crecim.	CC		CITRATO			RESULTADO
			UFC	Medio	=		UFC	=	Crecim.	Medio	=	
K12	K12 WT	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Azul	+	?
	K12 Ac. Nac R	Si	Incoloras	Amarillo	LAC -	Si	Turquesa	MUG -	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
	K12 Cepario Clínica 1	Si	Incoloras	Amarillo	LAC -	Si	Turquesa	MUG -	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
	K12 Cepario Clínica 2	Si	Incoloras	Amarillo	LAC -	Si	Turquesa	MUG -	No	Verde	-	<i>E. coli</i>

Los medios empleados para las diferentes pruebas bioquímicas fueron: SIM, UREA, TSI, MKL, CC y CITRATO. El patrón de reconocimiento para *E. coli* K12 incluye: morfología: bacilos Gram negativos, SIM: motilidad variable e Indol positivo, UREA: negativo, TSI: pico rojo/fondo amarillo, producción de gas, ausencia de H<sub>2</sub>S, MKL: LAC-, CC: MUG+, CITRATO: negativo. La cepa K12 WT, no presentó características de *E. coli*, por lo cual fue descartada.

Siglas utilizadas: BG- (bacilos Gram negativos), Crecim. (crecimiento), Mov. (motilidad), = (resultado), + (positivo), - (negativo), K/A (pico rojo/fondo amarillo), UFC (unidad formadora de colonia), LAC- (sin consumo de lactosa), CC (Agar Chromocult), MUG+ (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido positivas).

Tabla 5 Pruebas bioquímicas confirmatorias para *E. coli* HB101

CEPA	GRAM	SIM			UREA			TSI				
		Crecim.	Mov.	Indol	Crecim.	Medio	=	Crecim.	Medio	Gas	H <sub>2</sub> S	=
HB101 Inicial	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A
HB101e	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A
HB101f	BG-	Si	No	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A
HB101 JC	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	-	-	K/A
HB101 b	BG-	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Rojo/amar	+	-	K/A

CEPA	MKL				CC			CITRATO			RESULTADO
	Crecim.	UFC	Medio	=	Crecim.	UFC	=	Crecim.	Medio	=	
HB101 Inicial	Si	Incolbras	Amarillo	LAC-	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
HB101e	Si	Incolbras	Amarillo	LAC-	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
HB101f	Si	Incolbras	Amarillo	LAC-	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
HB101 JC	Si	Incolbras	Amarillo	LAC-	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>
HB101 b	Si	Incolbras	Amarillo	LAC-	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	<i>E. coli</i>

Los medios empleados para las diferentes pruebas bioquímicas fueron: SIM, UREA, TSI, MKL, CC y CITRATO. El patrón de reconocimiento para *E. coli* HB101 incluye: morfología: bacilos Gram negativos, SIM: motilidad variable e Indol positivo, UREA: negativo, TSI: pico rojo/fondo amarillo, producción de gas, ausencia de H<sub>2</sub>S, MKL: LAC-, CC: MUG+, CITRATO: negativo. Siglas utilizadas: BG- (bacilos Gram negativos), Crecim. (crecimiento), Mov. (motilidad), = (resultado), + (positivo), - (negativo), K/A (pico rojo/fondo amarillo), UFC (unidad formadora de colonia), LAC- (sin consumo de lactosa), CC (Agar Chromocult), MUG+ (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido positivas).

Tabla 6 Pruebas bioquímicas confirmatorias para *E. coli* enterotoxigénica (LT)

		CEPA	GRAM	SIM			UREA			TSI				
				Crecim.	Mov.	Indol	Crecim.	Medio	=	Crecim.	Medio	Gas	H <sub>2</sub> S	=
ETEC + LT	14E C556	E1b	BG -	Si	No	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	14D C556	E2b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	14B C556	E3b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	14C 556	E4b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	-	-	A/A
	28-1 C655	E5b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	28-3 C655	E6b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	C2 C551 1031	E7b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	E2 C551 1033	E8b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
	F2 C551 1034	E9b	BG -	Si	No	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	-	-	A/A
	D2 C551 1032	E10b	BG -	Si	Si	+	Si	Amarillo	-	Si	Amarillo	+	-	A/A
ETEC + LT	14E C556	E1b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	14D C556	E2b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	14B C556	E3b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	14C 556	E4b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	28-1 C655	E5b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	28-3 C655	E6b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	C2 C551 1031	E7b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	E2 C551 1033	E8b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	F2 C551 1034	E9b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>
	D2 C551 1032	E10b	Si	Rosadas	Rosado	LAC +	Si	Moradas	MUG+	No	Verde	-	-	<i>E. coli</i>

Los nombres de las cepas originales corresponden a la identificación utilizada en el Cepario del Proyecto Ecodess; los nombres asignados (E1b, E2b, E3b, E4b, E5b, E6b, E7b, E8b, E9b y E10b) se emplearon para facilitar su reconocimiento. Los medios utilizados para las diferentes pruebas bioquímicas fueron: SIM, UREA, TSI, MKL, CC y CITRATO. El patrón de reconocimiento para *E. coli* Enterotoxigénica (LT) incluye: morfología: bacilos Gram negativos, SIM: motilidad variable e Indol positivo, UREA: negativo, TSI: pico amarillo/fondo amarillo, producción de gas, ausencia de H<sub>2</sub>S, MKL: LAC+, CC: MUG+, CITRATO: negativo. Siglas utilizadas: BG- (bacilos Gram negativos), Crecim. (crecimiento), Mov. (motilidad), = (resultado), + (positivo), - (negativo), A/A (pico amarillo/fondo amarillo), UFC (unidad formadora de colonia), LAC+ (consumo de lactosa), CC (Agar Chromocult), MUG+ (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido positivas).

Tabla 7 Mediciones de los halos de inhibición (Antibiograma Inicial)

		HALO DE RESISTENCIA (mm)						
	CEPA ORIGINAL	CAJA #	ANTIBIÓTICOS					
			NA	K	RA	TE	S	
HB101	HB101 (Inicial)		20	8	8	10	11	
	HB101e		23	8	12	15	14	
	HB101f		22	10	10	20	14	
	HB101 JC		21	11	16	11	18	
	HB101b		21	20	14	9	21	
ETEC + LT	14E C556	E1b	22	16	12	8	20	10
	14D C556	E2b	24	18	14	8	20	12
	14B C556	E3b	22	18	14	8	24	15
	14C 556	E4b	24	19	16	9	18	17
	28-1 C655	E5b	20	20	9		22	20
	28-3 C655	E6b	20	19	9		21	18
	C2 C551 1031	E7b	12	21	10	9	20	14
	E2 C551 1033	E8b	14	19	16	12	12	17
	F2 C551 1034	E9b	13	20	12	10	14	17
	D2 C551 1032	E10b	13	20	12	10	18	11
ETEC + ST	051002402 ST H3 C3	ST 1	24	22	12		20	14
	030424398 ST C3 C2 6	ST 2	24	21	12		18	17
	C551 151 4 ST L3	ST 3	24	0	10		22	15
	051002402 ST C3 G3	ST 4	25	22	13		16	18
K12	K12 WT		22	21	15		17	22
	K12 Cepario Clínica 1		20	18	13		15	22
	K12 Cepario Clínica 2		19	20	9		20	21

Se presentan las mediciones de los halos de susceptibilidad (mm) para los antibióticos iniciales probados (NA, K, RA, TE, S), para las 22 cepas de *E. coli* (HB101, ETEC LT, ETEC ST y K12).

Siglas utilizadas: NA (ácido nalidíxico), K (kanamicina), RA (rifampicina), TE (tetraciclina), S (estreptomina), ST (gen de la toxina termoestable), LT (gen de la toxina termolábil).

**Tabla 8 Patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas de *E. coli***  
(Antibiograma Inicial)

	CEPA ORIGINAL	CAJA #	ANTIBIÓTICOS TESIS					
			NA	K	RA	TE	S	
<b>HB101</b>	HB101		s	R	R	R	R	
	HB101e		S	R	R	R	1/2	
	HB101f		S	R	R	S	1/2	
	HB101JC		S	R	R	r	S	R
	HB101b		S	S	R	R	S	1/2
<b>ETEC + LT</b>	14E C556	E1b	S	1/2	R	R	S	R
	14D C556	E2b	S	s	R	R	S	R
	14B C556	E3b	S	s	R	R	S	S
	14C 556	E4b	S	s	r	R	S	S
	28-1 C655	E5b	s	S	R	S	S	
	28-3 C655	E6b	s	s	R	S	S	
	C2 C551 1031	E7b	r	S	R	R	S	1/2
	E2 C551 1033	E8b	1/2	s	r	R	R	S
	F2 C551 1034	E9b	r	S	R	R	R	S
	D2 C551 1032	E10b	r	S	R	R	S	R
<b>ETEC + ST</b>	051002402 ST H3 C3	ST 1	S	S	R	S	1/2	
	030424398 ST C3 C2 6	ST 2	S	S	R	S	S	
	C551 151 4 ST L3	ST 3	S	R	R	s	S	
	051002402 ST C3 G3	ST 4	S	S	R	1/2	S	
<b>K12</b>	K12 WT JUANCA		S	S	R	S	S	
	K12 Cepario Clínica 1		S	s	R	S	S	
	K12 Cepario Clínica 2		S	S	R	S	S	

Se presentan los resultados de los índices de resistencia o sensibilidad, para los antibióticos iniciales probados (NA, K, RA, TE, S), para las 22 cepas de *E. coli* (HB101, ETEC LT, ETEC ST y K12). Éstos fueron determinados en base a la medición de halos presentados en la Tabla 7.

Siglas utilizadas: NA (ácido nalidíxico), K (kanamicina), RA (rifampicina), TE (tetraciclina), S (estreptomocina), ST (gen de la toxina termoestable), LT (gen de la toxina termolábil). R (Resistente), S (Sensible), 1/2 (Intermedio).

Tabla 9 Medición de los halos de inhibición (Antibiograma Completo)

MEDICIÓN HALO DE RESISTENCIA ANTILOGRAMA COMPLETO															
CEPA ORIGINAL	CAJA #	ANTIBIÓTICOS ECODESS											INICIALES		
		SXT	GM	S	AM	AMC	CXT	CF	C	CIP	ENO	TE	G	NA	K
<b>HB101</b>	<b>HB101</b>	31,62	22,78	6,61	18,87	21,49	34,01	17,74	26,36	37,31	37,61	21,68	33,31	20	8
	<b>HB101e</b>	28,87	19,8	16,98	34,13	25,63	34,13	21,16	17,72	29,89	32,37	28,19	26,42	23	8
	<b>HB101f</b>	29,92	18,9	13,28	7,09	17,72	30,92	16,98	17,74	29,77	28,78	7,02	24,42	22	10
	<b>HB101 JC</b>	29,92	18,9	13,28	7,09	15,03	30,92	21,68	6,87	29,77	28,78	7,02	24,42	21	11
	<b>HB101b</b>	30,47	19,59	13,33	34,13	16,66	32,15	16,55	13,04	29,83	28,54	6,14	28,14	21	20
<b>ETEC + LT</b>	<b>14E C556</b>	30,47	19,59	13,33	7,03	16,66	32,15	16,55	7,04	29,83	28,54	6,14	28,14	22	16
	<b>14D C556</b>	29,68	19,11	13,51	7,13	16,28	29,62	15,52	6,36	28,07	29,37	6,95	26,5	24	18
	<b>14B C556</b>	29,43	19,34	13,41	7,22	14,9	30,52	15,19	6,7	30,58	29,2	6,09	28,44	22	18
	<b>14C 556</b>	29,92	18,9	13,28	7,09	15,03	30,92	16,98	6,87	29,77	28,78	7,02	24,42	24	19
	<b>28-1 C655</b>	28,83	19,4	16,89	22,77	25,63	34,13	21,16	28,19	29,89	32,37	24,05	26,42	20	20
	<b>28-3 C655</b>	28,64	19,61	16,58	22,45	24,81	33,54	19,14	25,39	33	32,34	22,07	25,2	20	19
	<b>C2 C551 1031</b>	6,85	18,94	6,74	6,94	14,91	30,62	14,1	24,86	20,22	19,1	6,32	6,32	12	21
	<b>E2 C551 1033</b>	6,22	19,63	13,87	7,63	15,94	29,89	14,24	25,53	24,03	19,8	7,54	6,91	14	19
	<b>F2 C551 1034</b>	7,08	18,35	13,7	7,48	16,27	29,99	13,23	23,71	23,38	19,27	8,02	6,59	13	20
	<b>D2 C551 1032</b>	6,6	17,38	10,35	16,19	6,27	28,26	13,54	6,85	22,73	16,63	6,95	6,95	13	20
<b>ETEC + ST</b>	<b>051002402 ST H3 C3</b>	29	21	18	23	25	35	21	26	33	31	23	19	24	22
	<b>030424398 ST C3 C2 6</b>	0	20	11	0	18	32	14	24	32	31	21	0	24	21
	<b>C551 151 4 ST L3</b>	0	21	0	0	21	34	16	0	33	32	0	0	24	0
	<b>051002402 ST C3 G3</b>	29	21	18	24	24	33	19	25	30	32	24	23	25	22
<b>K12</b>	<b>K12 WT JUANCA</b>	28,44	20	15,5	6,27	19,57	31,81	19,95	15,08	33,94	31	18,85	21,62	22	21
	<b>K12 Cepario Clínica 1</b>	24,2	19,23	14,73	7,13	21,41	31,78	17,54	17,45	28,19	27,57	18,52	26,58	20	18
	<b>K12 Cepario Clínica 2</b>	28,94	25,63	16,89	16,78	19,4	34,13	21,16	26,25	29,89	32,37	24,05	26,42	19	2

Se presentan las mediciones de los halos de susceptibilidad (mm) para los 12 antibióticos correspondientes al antibiograma completo (SXT, GM, S, AM, AMC, CXT, CF, C, CIP, ENO, TE, G), para las 22 cepas de *E. coli* (HB101, ETEC LT, ETEC ST y K12). Siglas utilizadas: SXT (trimetoprim-sulfametoxasole), GM (gentamicina), S (estreptomocina), AM (ampicilina), AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), CXT (cefotaxime), CF (cefalotin), C (cloramfenicol), CIP (ciprofloxacina), ENO (enrofloxacin), TE (tetraciclina), G (sulfisoxazol) ST (Gen de la toxina termoestable), LT (Gen de la toxina termolábil).

Tabla 10 Patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas de *E. coli* (Antibiograma Inicial)

		RESULTADOS FINALES ANTILOGRAMA COMPLETO																
CEPA ORIGINAL	CAJA #	ANTIBIÓTICOS ECODESS											INICIALES					
		SXT	GM	S	AM	AMC	CXT	CF	C	CIP	ENO	TE	G	NA	K			
HB101	HB101	S	S	R	s	S	S	s	S	S	S	S	S	S	S	S	s	R
	HB101e	S	S	S	1/2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	HB101f	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	HB101 JC	S	S	1/2	R	S	S	1/2	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R
	HB101b	S	S	1/2	S	S	S	S	1/2	S	S	R	S	S	S	S	S	S
ETEC + LT	14E C556	E1b	S	S	1/2	R	1/2	S	1/2	R	S	S	R	S	S	S	S	1/2
	14D C556	E2b	S	S	1/2	R	1/2	S	1/2	R	S	S	R	S	S	S	S	s
	14B C556	E3b	S	S	1/2	R	1/2	S	1/2	R	S	S	R	S	S	S	S	s
	14C 556	E4b	S	S	1/2	R	1/2	S	1/2	R	S	S	R	S	S	S	S	s
	28-1 C655	E5b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	s	S
	28-3 C655	E6b	S	S	S	S	S	S	s	S	S	S	S	S	S	S	s	s
	C2 C551 1031	E7b	R	S	R	R	1/2	S	r	S	s	S	R	R	S	S	r	S
	E2 C551 1033	E8b	R	S	1/2	R	1/2	S	r	S	S	S	R	R	S	S	1/2	s
	F2 C551 1034	E9b	R	S	1/2	R	1/2	S	r	S	S	S	R	R	S	S	r	S
D2 C551 1032	E10b	R	S	r	1/2	R	S	r	R	S	s	R	R	S	S	r	S	
ETEC + ST	051002402 ST H3 C3	ST 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	030424398 ST C3 C2 6	ST 2	R	S	r	R	s	S	r	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	C551 151 4 ST L3	ST 3	R	S	R	R	S	S	1/2	R	S	S	R	R	S	S	S	R
	051002402 ST C3 G3	ST 4	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K12	K12 WT JUANCA		S	S	s	S	R	S	s	1/2	S	S	s	S	S	S	S	S
	K12 Cepario Clínica 1		S	S	s	S	R	S	s	s	S	S	s	S	S	S	S	s
	K12 Cepario Clínica 2		S	S	S	S	1/2	S	S	S	S	s	s	S	S	S	S	S

Se presentan los resultados de los índices de resistencia o sensibilidad, para los 12 antibióticos correspondientes al antibiograma completo (SXT, GM, S, AM, AMC, CXT, CF, C, CIP, ENO, TE, G), para las 22 cepas de *E. coli*. Siglas utilizadas: SXT (trimetoprim-sulfametoxazole), GM (gentamicina), S (estreptomicina), AM (ampicilina), AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), CXT (cefotaxime), CF (cefalotin), C (cloramfenicol), CIP (ciprofloxacina), ENO (enrofloxacin), TE (tetraciclina), G (sulfisoxazol) ST (Gen de la toxina termoestable), LT (Gen de la toxina termolábil), R (Resistente), S (Sensible), 1/2 (Intermedio).

**Tabla 11 Recuperación de mutantes resistentes al ácido nalidíxico para ETEC (Ensayo #1)**

VARIANTE	CEPA	# UFC	CARACTERÍSTICAS
LT	E5 A	104	UFC medianas
	E5 B	113	UFC medianas
	E6 A	25	UFC medianas
	E6 B	119	UFC medianas y pequeñas
ST	ST 1 A	Incontables	Masa bacteriana (Contaminación)
	ST 1 B	Incontables	Masa bacteriana (Contaminación)
	ST 4 A	Incontables	Masa bacteriana (Contaminación)
	ST 4 B	Incontables	Masa bacteriana (Contaminación)

Se muestran los mutantes resistentes obtenidos luego de una selección en AN + ácido nalidíxico [25ug/mL]. Se utilizó cepas de ETEC con el gen LT (E5 y E6), y con el gen ST (ST1 y ST4).

Se obtuvo 361 clones resistentes de ETEC (LT), en las 4 cajas sembradas: E5A, E5B, E6A, E6B. Se descartó aquellas pertenecientes a ETEC (ST), debido a una contaminación de los cultivos (ST1A, ST1B, ST4A, ST4B).

**Tabla 12 Mutantes de ETEC resistentes al ácido nalidíxico (ST) Ensayo #2**

CEPA	CRECIMIENTO	# UFC
ST1 A	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST1 B	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST1 C	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST1 D	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST1 E	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST4 A	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST4 B	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST4 C	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST4 D	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)
ST4 E	SI	UFC Incontables ( > 300 UFC)

Ensayo #2 para selección de mutantes para cepas de ETEC (ST1 y ST4). Hubo crecimiento en las 10 cajas sembradas (5 con ST1 y 5 con ST4), con un crecimiento > 300 UFC/100uL. Todos los clones que crecieron en: ST1A, ST1B, ST1C, ST1D, ST1E, ST4A, ST4B, ST4C, ST4D y ST4E son mutantes resistentes al ácido nalidíxico.

Tabla 13 Selección de mutantes de *E. coli* K12 resistentes a ciprofloxacina

CEPA INICIAL	TRATAMIENTO	CEPAS RESISTENTES	CEPA INICIAL	TRATAMIENTO	CEPAS RESISTENTES
E. coli K12 (Cepario)	[0,25ug/mL]	A G3 0,25	Q G INI 1	[2 ug/mL]	AP G1 2
		F G1 0,25			AP G2 2
E. coli K12 (Cepario)	[0,5ug/mL]	H G 0,5			AQ G1 2
		I G1 0,5			AQ G2 2
A G3 0,25	[0,5ug/mL]	K G 0,5		[2,25 ug/mL]	AR G1 2,25
	[0,75ug/mL]	M G 0,75			AR G2 2,25
	[1 ug/mL]	N G 0,75			AS G1 2,25
Q G INI 1	[1,25 ug/mL]	Q G CC 1		[2,5 ug/mL]	AS G2 2,25
		Q G INI 1			AT G1 2,5
		AG G1 1,25			AT G2 2,5
		AG G2 1,25	AU G1 2,5		
	[1,5 ug/mL]	AH G1 1,25	[2,75 ug/mL]	AU G2 2,5	
		AH G2 1,25		BC G1 2,75	
		AI G1 1,5		BC1 G2 2,75	
		AI G2 1,5		BD G1 2,75	
		AJ G1 1,5		BD1 G1 2,75	
		AJ G2 1,5		BE G 3	
		AK G1 1,5		BF G 3	
		AK G2 1,5		BI G 3,25	
	[1,75 ug/mL]	AL G1 1,5	[3,25 ug/mL]	BJ G 3,25	
		AL G2 1,5		BM G 3,5	
AM G1 1,75		[3,5 ug/mL]		BN G 3,5	
AM G2 1,75					
AN G2 1,75					

Se muestran los mutantes resistentes de *E. coli* K12 obtenidos luego de una selección con diferentes concentraciones de ciprofloxacina (Desde [0,25ug/mL] hasta [3,5ug/mL]). La nomenclatura de las cajas está en orden alfabético, de la A – Z, luego AA- AZ y finalmente BA – BN (A es la menor y BN la mayor concentración de antibiótico). Las letras G, G1 y G2 muestran el número de aislado tomado de cada caja. En total se obtuvo 46 aislados con distintos niveles de resistencia.

**Tabla 14 Pruebas de susceptibilidad para ciprofloxacina (Antibiograma)**

CEPA	CONC.	HALO	RESULTADO
ST4 E	0	24	S
E6bB1	0	27	S
HB101 JC	0	40	S
HB101e	0	40	S
HB101f	0	38	S
E2	0	28	S
CIP A G3	0,25	24	S
I CIP G1	0,5	54	S
CIP M	0,75	25	S
CIP Q G INI	1	24	S
AH INI G2	1,5	18	1/2
AI INI G2	1,5	18	1/2
AM INI G1	1,75	18	1/2
AM CC G1	1,75	19	1/2
AP G2	2	14	R
AP G1	2	17	1/2
AQ CIP	2	17	1/2
AR G1	2,25	13	R
AS G1	2,25	13	R
AR G2	2,25	16	1/2
AU CIP G2	2,5	15	R
AT CIP G1	2,5	13	R
CIP AU G1	2,5	14	R
BA	2,75	15	R
BI	3,25	13	R
BJ	3,25	16	1/2
BK	3,25	14	R
BL	3,25	15	R
BM	3,5	16	1/2
BN	3,5	15	R
BO	3,5	14	R
BP	3,5	14	R

Antibiograma realizado para verificar la susceptibilidad a ciprofloxacina en los aislados sometidos a diferentes concentraciones del antibiótico. De los 46 aislados 22 fueron resistentes a concentraciones mayores o iguales a [2 $\mu$ g/mL], y presentaron halos de inhibición entre 15 y 18mm (panel inferior). El panel superior muestra las cepas iniciales como: *E. coli* HB101, ETEC ST4, ETEC E6 (LT).

Siglas utilizadas: CONC. (Concentración de ciprofloxacina a la que fue sometido el aislado), HALO (halo de inhibición presentado en milímetros), R (Resistente), 1/2 (Intermedio), S (Sensible).

Tabla 15 Antibiograma confirmatorio de Cepas Iniciales

#	CEPA	Estreptomina		Ac. Nec.		Tetraciclina		Ciprofloxacina		Kanamicina	
		Halo	R/S	Halo	R/S	Halo	R/S	Halo	R/S	Halo	R/S
1	E1	21	S	23	S	6	R	31	S	-	-
2	E2	22	S	23	S	6	R	32	S	-	-
3	E3	22	S	23	S	6	R	31	S	-	-
4	E4	22	S	24	S	6	R	32	S	-	-
5	E5	24	S	26	S	24	S	32	S	21	S
6	E6	25	S	26	S	25	S	31	S	22	S
7	E7	23	S	15	I	6	R	24	S	-	-
8	E8	22	S	13	r	6	R	23	S	-	-
9	E9	23	S	14	I	6	R	23	S	-	-
10	E10	23	S	14	I	6	R	25	S	-	-
11	ST1	25	S	25	S	26	S	31	S	-	-
12	ST2	24	S	24	S	24	S	31	S	-	-
13	ST3	15	S	24	S	6	R	30	S	-	-
14	ST4	23	S	23	S	25	S	28	S	-	-
15	E6bA 1	24	S	9 *	R	25	S	29	S	-	-
16	E6bA 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	E6bA 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	E6bA 4	25	S	9 *	R	25	S	28	S	-	-
19	E6bA 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	E6bB 1	25	S	9 *	R	25	S	29	S	-	-
22	E6bB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	E6bB 3	22	S	9 *	R	20 *	S (lim)	27	S	-	-
24	E6bB 4	25	S	9 *	R	21	S	26	S	-	-
25	E6bB 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	E5bA 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	E5bA 2	25	S	8 *	R	25	S	26	S	-	-
29	E5bA 3	26	S	7 *	R	23	S	27	S	-	-
30	E5bA 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	E5bA 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	E5bB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	E5bB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	E5bB 3	25	S	9 *	R	26 *	S	30	S	-	-
36	E5bB 4	24	S	8 *	R	24	S	26	S	-	-
37	E5bB 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	ST1 A	25	S	9 *	R	27	S	25	S	-	-
40	ST1 B	26	S	9 *	R	27	S	26	S	-	-
41	ST1 C	27	S	8 *	R	28	S	25	S	-	-
42	ST1 D	26	S	8 *	R	27	S	24	S	-	-
43	ST1 E	26	S	8 *	R	28 *	S	25	S	-	-
44	ST4 A	26	S	7 *	R	25	S	25	S	-	-
45	ST4 B	26	S	9 *	R	29 *	S	26	S	-	-
46	ST4 C	26	S	10 *	R	28	S	26	S	-	-
47	ST4 D	28	S	6 *	R	27	S	26	S	-	-
48	ST4 E	25	S	6 *	R	25	S	25	S	-	-
49	HB 101	13	S	25	S	24	S	35	S	28	S
50	HB 101b	14	S	26	S	25	S	35	S	30	S
51	HB 101e	14	S	26	S	25	S	42	S	10 *	R
52	HB 101 JC	14	S	25	S	24	S	35	S	23	S

Comprobación de los patrones de resistencia de cepas a ser conjugadas. Cepas: ETEC LT (E1- E10), ETEC ST (ST1-ST4), ETEC LT resistentes al ácido nalidíxico (E6bA-E6bB-E5bA-E5bB), ETEC ST resistentes al ácido nalidíxico (ST1 A-D y ST4 A-D) y *E. coli* HB101. Se probó 5 antibióticos: estreptomina, ácido nalidíxico, tetraciclina, ciprofloxacina y kanamicina. Para cada antibiótico hay 2 columnas: la primera indica el halo de inhibición (mm) y la segunda la susceptibilidad: Resistente (R), Sensible (S), Intermedio (½). El \* indica presencia de doble halo.

**Tabla 16 Patrones de susceptibilidad y resistencia requeridos en las cepas Iniciales para experimentos de Conjugación**

CEPA	NOMBRE	KANAMICINA	ÁCIDO NALIDÍXICO	CIPROFLOXACINA
HB 101	HB101E	R	S	S
<i>E. coli</i> K12	BI	S	S	R
ETEC	E5bA3	S	R	S

Se muestran las cepas elegidas (HB101, *E. coli* K12 y ETEC) para los experimentos de conjugación. Las mismas que fueron seleccionadas en base a antibiogramas que determinó sus patrones de susceptibilidad y resistencia. Siglas utilizadas: Resistente (R), Sensible (S), Intermedio (½), Nombre (Nomenclatura bajo la cual se encuentra identificada la cepa)

**Tabla 17 Conteo de UFC del Conjugado #1 a las 24 y 48h**

Siembra Directa (24h)			Siembra Post-Antibiótico (48h)		
CAJA	DIA 1 (# UFC)	DIA 2 (# UFC)	CAJA	DIA 1 (# UFC)	DIA 2 (# UFC)
C1 A	12	50	C1 F	17	17
C1 B	14	40	C1 G	70	70
C1 C	12	20	C1 H	22	22
C1 D	6	13	C1 I	31	31
C1 E	38	38	C1 J	2	2
			C1 K	21	21

Una vez realizada la conjugación se realizó un muestreo a las 24h: Siembra Directa (panel izquierdo), y un muestreo a las 48h que fue sometido a antibióticos (panel derecho).

Siglas utilizadas: C1 (Conjugado #1), Numeración: C1A, C1B, C1C, C1D, C1E, C1F, C1G, C1H, C1I, C1J Y C1K (Cajas inoculadas con el Conjugado #1), UFC (Unidad formadora de colonia).

CEPA	Ac. Nac.		Kanamicina	
	Halo	R/S	Halo	R/S
C1 E3 A4	6	R	13,5	R
C1 E3 B3	6	R	24	S
C1 E3 C2	6	R	24	S
C1 E3 D4	6	R	23	S
C1 E3 E3	6	R	17	1/2
C1 E3 F1	7	R	7	R
C1 E3 G2	8	R	7	R
C1 E3 H5	8	R	6	R
C1 E3 I2	8	R	7	R
C1 E3 J1	8	R	6	R
C1 E3 K2	9	R	9	R

**Tabla 18 Antibiograma del Conjugado #1**

Se realizó un antibiograma de 11 aislados del Conjugado #1, de los cuales todos son resistentes al ácido nalidíxico y solo 7 son resistentes a la kanamicina.

Siglas utilizadas: R (Resistente), ½ (Intermedio), S (Sensible), Halo (Medición en mm).

**Tabla 19 Conteo de UFC del Conjugado #2 (24 y 48h)**

CAJA	UFC (#)
C2 A	17
C2 B	30
C2 C	21
C2 D	34
C2 E	25

A las 24h se registró 127 UFC en las 5 cajas, con una media de 25,4 colonias por caja.

Siglas utilizadas: UFC (Unidad formadora de colonia), C2 (Conjugado #2), C2 A-E (Cajas inoculadas con el Conjugado #2)