

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Transferencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en Aislados de
Escherichia coli Provenientes de Comunidades Remotas
de la Provincia de Esmeraldas**

Dimitri Kakabadse

Proyecto final como requisito para la obtención del
título de Baccalaureus Scientiae en Biotecnología

Quito
Diciembre de 2007

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Transferencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en Aislados de
Escherichia coli Provenientes de Comunidades Remotas
de la Provincia de Esmeraldas**

Dimitri Kakabadse Schmidt

Gabriel Trueba, **Ph.D.**
Director de la Tesis y Miembro Comité de Tesis

Maria de Lourdes Torres, **Ph.D.**
Miembro Comité de Tesis

Rosana Segovia, **Bs.**
Miembro Comité de Tesis

Decanato de Ciencias Ambientales y Biológicas

Stella de la Torre, **Ph.D.**
Decana Colegio de Ciencias Ambientales y Biológicas

Quito, diciembre 2007

Agradecimientos

Agradezco al comité de este proyecto final conformado por el Dr. Gabriel Trueba, Maria de Lourdes Torres y Rossana Segovia. Agradezco también al personal de Laboratorio de Microbiología de la USFQ, en especial a Deysi y los chicos de la Maestría en Microbiología por la atención, interés y compañerismo durante toda la investigación. Adicionalmente quiero agradecer al Proyecto ECODESS por brindarme las facilidades en materiales y muestras para realizar mis estudios en este proyecto final. Finalmente un infinito agradecimiento a mi madre y hermanas por la educación y paciencia.

**© Derechos de autor
Dimitri Kakabadse Schmidt
2007**

Resumen

Cincuenta y un aislados de *Escherichia coli* comensal resistentes a antibióticos fueron obtenidos de muestras fecales humanas provenientes de las comunidades de San Agustín y Playa de Oro de la provincia de Esmeraldas. Las bacterias aisladas fueron resistentes a diferentes antibióticos como a Ampicilina (AMP), Tetracilina (TE) y Trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT). Estas fueron las resistencias más comunes encontradas en las cepas analizadas y fueron seleccionadas para ser analizadas en mayor detalle. La mayoría de los aislados con resistencia a antibióticos fueron capaces de conjugarse (92%) y 88% fueron capaces de pasar a *E. coli* K12 resistente al ácido nalidixico la resistencia para SXT, TE y AMP. Los resultados de esta investigación sugieren que la transferencia horizontal de genes es un mecanismo importante de propagación de resistencias a antibióticos en *E. coli* comensal.

Abstract

Fifty one antibiotic resistant strains of commensal *Escherichia coli* were isolated from human fecal samples obtained from San Agustin, Playa de Oro communities of the Esmeraldas province. The strains were resistant to different antibiotics among which Ampicillin (AMP), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT) were the most common resistance in recollected strains. The majority of the antibiotic resistance (92%) was transferable by conjugation and 88% of the resistant isolates were able to pass resistance to SXT, TE, and AMP to an *E.coli* K12 resistant to nadilixic acid. Our results suggested that horizontal gene transfer is an important mechanism of propagation of antibiotic resistance in commensal *E. coli*.

Tabla de contenido:

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
TABLA DE CONTENIDO:.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Flora Intestinal.....	1
1.1.1. Descripción de la Flora Intestinal Humana	1
1.1.2. Importancia de la Flora Intestinal.....	2
1.1.3. Bacteria <i>Escherichia coli</i>	2
1.2. Plásmidos e integrones	3
1.2.1 Estructura y ensamble del integrón	3
1.2.2. Tipos de Integrones	4
1.3. Mecanismos de Resistencia a Antibióticos en Bacterias.....	4
1.3.1. Transferencia Vertical de genes	4
1.3.2. Transferencia Horizontal de genes	5
1.3.3 Transferencia Horizontal entre Gram-Negativas y Gram-Positivas.....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	7
3. ÁREA DE ESTUDIO	7
4. METODOLOGÍA	8
4.1. Materiales	8
4.1.1. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).....	8
4.1.2. Conjugación.....	8
4.1.2. Muestras	9
4.1.3. Medios y Antibióticos	9
4.2. Métodos	9
4.2.1. Aislamiento y comprobación de las cepas empleadas en laboratorio	9
4.2.2. Conjugación.....	10
4.2.3. Electroforesis de Campo Pulsado	10
5. RESULTADOS	12
5.1. Crecimiento en medio selectivo	12

5.2. Análisis de eficiencia de la conjugación.....	12
5.3. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)	13
6. DISCUSIÓN.....	13
7. CONCLUSIONES	15
8. RECOMENDACIONES.....	15
9. BIBLIOGRAFÍA.....	17
10. TABLAS	21
11. FIGURAS	22
ANEXOS.....	26

1. Introducción

Las resistencias a los antibióticos se han vuelto un problema muy serio a nivel mundial debido a su mala utilización de drogas antimicrobianas. Existe además un incremento en resistencias en organismos patógenos para el ser humano, los cuales han sido identificados en casos clínicos y han sido vinculados en el incremento de mortandad a nivel mundial por no tener medios para evitarlos, ya que la mayoría han adquirido resistencias a diferentes antibióticos empleados anteriormente para combatirlos. El estudio de los genes que codifican genes de resistencia permite conocer la epidemiología, la diversidad y los mecanismos involucrados en las resistencias o en su transmisión (Su, Shi, Yang, Xiao, Li, y Yamasaki, 2006).

1.1. Flora Intestinal

1.1.1. Descripción de la Flora Intestinal Humana

La flora intestinal tiene un rol muy importante para la salud y enfermedades en el ser humano. El intestino del ser humano tiene una gran diversidad bacteriana aproximadamente entre 400 a 500 especies de bacterias comensales (Dionisio, 2002). Estudios realizados de la microflora intestinal han indicado que la mayoría de las bacterias son de los filos Firmicutes y Bacteroidetes, aproximadamente en un 95%. El phylum Firmicuta son bacterias Gram-positivas, por ejemplo son miembros el género *Clostridium*. El phylum Bacteroidete son bacterias Gram-negativas, como por ejemplo el género *Bacteriodes*. En caso de *E.coli* representa aproximadamente ~0.1% en la flora intestinal del ser humano (Eckburg, 2005).

1.1.2. Importancia de la Flora Intestinal

El entorno de la microflora intestinal se ha vuelto un escenario muy favorable para que ocurra la transferencia de genes al tener un número alto de bacterias capaces de transferir genes de resistencias con mucha facilidad. Por tal razón su estudio se ha vuelto de gran interés para determinar los factores que influyen en este flujo de genes, ya que son de interés médico al observar bacterias patógenas que puedan causar daños severos en la salud humana (Eckburg, 2005).

1.1.3. Bacteria *Escherichia coli*

Fue descrita por Theodore Escherich en 1885 y fue denominada *Bacterium coli*, aunque en la actualidad se la denominó como *Escherichia coli*. Este organismo es uno de los seres vivos más estudiados por lo que se encuentra en una gran diversidad de ambientes, incluyendo en la flora intestinal del humano. Algunas cepas de *E. coli* son patógenos (Donnemberg, 2002).

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa de la familia Enterobacteriaceae. Estructuralmente el genoma de *E.coli* presenta un cromosoma circular que contiene todos los genes de la célula el cual regulan su metabolismo o replicación de DNA de la bacteria. Además, suele presentar moléculas de ADN extracromosómico llamados plásmidos que le otorgan a la bacteria ciertas ventajas adaptativas o selectivas al organismo, tales como la resistencia a antibióticos (Madigan, 2004).

A su vez *E.coli* es anaerobio facultativo por lo que puede vivir en el intestino humano y de varios animales de sangre caliente. *E.coli* raramente tienen requerimientos nutricionales especiales, logrando crecer en una diversidad de compuestos carbonados como glucosa (Madigan, 2004). La presencia de este organismo en el ambiente indica contaminación fecal y consecuentemente potencial riesgo a la salud humana. Se lo puede encontrar en

alimentos como carnes, productos lácteos o el agua expuesta a contaminación fecal, y si es patógeno puede causar problemas gastro-intestinales (Dobrindt, Angerer, Michaelis, 2003) (Nandi, Hofacre, 2003) (Anexo1)

1.2. Plásmidos e integrones

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico y van a replicarse de manera independiente al cromosoma de la célula huésped. Una ventaja de los plásmidos es la de otorgar como la resistencia a antibióticos. La transferencia de los plásmidos requiere contacto directo entre las células donantes y las receptoras, con intervención de estructuras superficiales (Madigan, 2004).

Los plásmidos pueden contener elementos genéticos, como transposones o integrones, que comúnmente pueden conferir la resistencia a antibióticos (Carattoli, Bertini y Villa, 2005). Los integrones son elementos de DNA móviles con secuencias conservadas que flanquean una región central denominados cassettes, que usualmente codifican la resistencia específica hacia los antibióticos (Rowe-Magnus y Maze, 2001), (Zhao y White, 2001) (Su, Shi, Yang, Xiao, Li, y Yamasaki, 2006).

1.2.1 Estructura y ensamble del integrón

En los integrones se definen tres regiones en su estructura: una región constante 5' que contiene el gen de la integrasa, la cual va a permitir la inserción de los cassettes de resistencia, luego una región central variable en la cual se localizan los genes estructurales del integrón o cassettes, en un número variable entre uno a ocho, y la región constante 3' en donde se encuentra un gen de resistencia a sulfamidas (Pitout, 1998). Los integrones de mayor importancia en *E. coli* son los de tipo I y tipo II por su gran esparcimiento en resistencias a nivel global (Majtán, 2004), (Fluit y Schmitz, 1999). Los cassettes de resistencia corresponden a un gen de resistencia y un sitio de recombinación llamado

elemento base-59 *attI* (Toleman, 2006) El ensamble de los cassettes de resistencia se produce por la integrasa codificada por el gen *intl 5'* de la región conservada, la cual va colocando los casetes de resistencia en sitios específicos de recombinación, como la *attC* (Majta'n, 2004) (Anexo 2 y 3)

1.2.2. Tipos de Integrones

Se han descrito varios tipos de integrones los más frecuentes en enterobacterias son los integrones de tipo I y II (Fluit y Schmitz, 1999). Se los clasifica de acuerdo a los genes de la integrasa que los codifica. Integrón de tipo I o II son comúnmente encontrados en cepas aisladas del ambiente o casos clínicos (Su, Shi, Yang, Xiao, Li, y Yamasaki, 2006)

1.3. Mecanismos de Resistencia a Antibióticos en Bacterias

Se puede encontrar diferentes tipos de mecanismos de resistencia por la cual pueden expulsar o destruir al compuesto antimicrobiano.

La resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es la resistencia natural, puede deberse a una barrera natural impermeable al antibiótico, la falta de sistemas de transporte, la ausencia de una molécula diana, o la presencia de enzimas inactivantes del antibiótico (Madigan, 2004).

La resistencia adquirida se produce por algunos mecanismos tales como: las mutaciones, mecanismo también se conoce como evolución vertical y la transferencia de fragmentos de ADN que codifican para la resistencia entre bacterias, también llamada evolución horizontal (Madigan, 2004) (Anexo4).

1.3.1. Transferencia Vertical de genes

La evolución vertical se basa en el principio de selección natural, por ejemplo, mutaciones espontáneas en el cromosoma bacteriano. Por lo general en este tipo de

mutaciones están involucradas sustituciones, deleciones, o adiciones de una o pocas pares de bases (Volk, 1996).

1.3.2. Transferencia Horizontal de genes

Mientras tanto la evolución horizontal es la adquisición de genes de resistencia a partir de otro microorganismo no parental. El mecanismo por el cual este tipo de resistencia es muy variado se debe a que ciertas bacterias suelen donar estos genes a otras bacterias. Estos genes pueden ser transmitidos no necesariamente a la misma especie o género (Zhang, Srinivasan, Marrs, Foxman, 2004). La adquisición de información genética es llevada por diferentes mecanismos los cuales pueden ser: los plásmidos, los bacteriófagos, secuencias de ADN libres o por elementos transponibles como los transposones. Los mecanismos responsables de esta adquisición de ADN foráneo son la transformación, la transducción y la conjugación (Volk, 1996).

La transformación es un mecanismo en el cual se permite la adquisición y la incorporación de ADN exógeno desnudo al genoma bacteriano. Esto implica la liberación de ADN en el medio por lisis de algunas células, seguido por la captación del ADN por células receptoras (Madigan, 2004).

La transducción es otro de los mecanismos responsables de la adquisición de ADN foráneo. Consiste en la transferencia del material genético de una bacteria a otra con ayuda de un vector bacteriófago (virus que infectan células procarióticas). Como por ejemplo es en el caso de la transducción especializada, en donde al iniciar el ciclo lítico del bacteriófago, el genoma vírico se separa del cromosoma bacteriano llevándose usualmente parte del cromosoma. Luego se formarán nuevas partículas virales en cuyo genoma se encuentran segmentos del cromosoma bacteriano. Finalmente al infectar el nuevo

hospedador se inserta su genoma en el de la nueva bacteria incorporando las secuencias anteriores (Volk, 1996).

La conjugación bacteriana es el proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos. Las etapas de la conjugación se pueden presentar de la siguiente manera: primero se da el contacto entre la bacteria donadora y la receptora a través de las fimbrias que son estructuras superficiales de la célula donante. Luego el plásmido es transferido a la célula receptora, que consiste en la rotura de una de las dos cadenas del plásmido a ser donado. Finalmente se obtiene una célula donadora conservada y una receptora que recibió un plásmido (Volk, 1996). La transferencia horizontal por medio de la conjugación contribuye a la dispersión de genes de forma muy eficiente, y a incrementar rápidamente la variabilidad de las bacterias (Betsy Foxman y Carl Marrs, 2006) (Anexo 5 y 6).

1.3.3 Transferencia Horizontal entre Gram-Negativas y Gram-Positivas

El estudio de la diseminación de resistencias entre bacterias Gram-positivas a Gram-negativas por medio de la conjugación ha demostrado ser muy eficiente, considerando que también ocurre entre géneros e incluso en especies diferentes. Pero esta transferencia trans-Gram ocurre de mejor manera en especies que han demostrado una habilidad natural de transferencia (Courtvalin, 1994), (Bertram, Strätz, Dürre, 1990).

Durante esta investigación se logró caracterizar la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en *E.coli*. Mediante experimentos de conjugación empleando cepas obtenidas de comunidades de San Agustín, Playa de Oro de la provincia de Esmeraldas y una cepa de *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico. El empleo de estas cepas permitió determinar la eficiencia de conjugación entre dos cepas distintas de *E.coli* que adquirieron la resistencia a antibióticos en sus transconjugados. También se analizó

cuantas de estas cepas de *E.coli* empleadas fueron capaces de transferir los genes de resistencia para Tetraciclina, Ampicilina y Sulfamethoxazole-trimetropim.

2. Justificación

Se ha encontrado una alta tasa de resistencia a antibióticos en una zona remota de Esmeraldas en la que no existen los factores determinantes conocidos tales como caminos, cercanía hospitales, cercanía de ciudades o centros de producción animal. La importancia de este estudio es analizar la capacidad de transferencia horizontal de cepas de *E.coli* obtenidas de campo de las comunidades de San Agustín, Playa de Oro en la provincia de Esmeraldas con otras cepas de *E.coli* que son utilizadas en el laboratorio. Así finalmente, entender que uno de los mecanismos involucrados que es la transferencia horizontal de genes mediante la conjugación tiene un papel muy importante en el flujo de genes de resistencia para determinar cual es su eficiencia y facilidad de transmisión de genes, incluso en regiones alejadas.

3. Área de Estudio

Esta investigación se realizó durante los meses de Agosto 2006 a Septiembre 2007 en los laboratorios de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito y en la Provincia de Esmeraldas en las comunidades de San Agustín y Playa de Oro con la colaboración del Proyecto ECODESS.

4. Metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

- Equipo de PFGE (CHEF Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratorios)
- Solución McFarland 5 (BioMerieux, France)
- TE buffer (10Mm Tris (Fisher Scientific, USA), 1mM EDTA (Invitrogen, CA, USA), pH 8.0)
- Proteinasa K (BioLabs, New England, USA)
- Solución de Lisis (50mM Tris (Fisher Scientific, USA), 50mM EDTA (Invitrogen, CA, USA), 1% Sarcosil (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), 0.1mg/mL Proteinasa K (BioLabs, New England, USA))
- Moldes para plugs (Bio-Rad Laboratorios)
- Agarosa certificada para Campo Pulsado (Bio-Rad Laboratories)
- Enzima *XbaI* (New England Biolabs, Boston, MA)
- Cámara fotográfica Kodak DC120.

4.1.2. Conjugación

- Botellas de 500 mL.
- Incubadora Heraeus electronic (Latinreco)
- Cajas Petri.

4.1.2. Muestras

- Cepas de *E.coli* resistentes a los antibióticos Ampicilina, Tetraciclina y Sulfamethoxazole-trimetropim, aisladas de las comunidades de Playa de Oro y San Agustín en la provincia de Esmeraldas (Anexo 7)
- Cepa de *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico.

4.1.3. Medios y Antibióticos

- Muller-Hinton (Disco Laboratorios, Detroit, MI, USA).
- Agar Nutritivo (Disco Laboratorios, Detroit, MI, USA), Tryptic Soy Broth (Disco Laboratorios, Detroit, MI, USA).
- Ampicilina 10µg (Becton Dickinson, Sparks, USA) (AM), Tetraciclina 30µg (Becton Dickinson, Sparks, USA) (TE), Sulfamethoxazole-trimetropim 23.75/1.25µg (Becton Dickinson, Sparks, USA) (SXT).
- Ácido Nalidixico 20µg (Fisher Scientific, Italy).
- Agar nutritivo + Ácido Nalidixico (25µg/ml)+Tetraciclina (12µg/ml)

4.2. Métodos

4.2.1. Aislamiento y comprobación de las cepas empleadas en laboratorio

Se empleó 51 cepas de *E.coli* provenientes de las comunidades de Playa de Oro y San Agustín (Esmeraldas) resistentes a Tetraciclina, Ampicilina, Trimethoprim-sulfamethoxazol. Se uso un medio de agar nutriente en donde se estriaron las cepas con un asa de platina, para obtener un aislamiento de las colonias.

Adicionalmente, se empleó una cepa de *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico.

Se comprobó las resistencias de estas cepas de Esmeraldas en el laboratorio de la USFQ empleando un agar de Muller-Hinton con discos de antibióticos de Ampicilina 10 μ g (AM), Tetraciclina 30 μ g (TE), Sulfamethoxazole-trimetropim 23.75/1.25 μ g (SXT) para determinar las resistencias de las cepas empleadas. También se comprobó que la *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico sea sensible a los tres tipos de discos de antibióticos Ampicilina, Tetraciclina y Sulfamethoxazole-trimetropim.

4.2.2. Conjugación

Se empleó 2 botellas de 500mL por experimento. Se colocó 100mL de caldo nutritivo (Disco, Detroit, MI, USA) en cada botella y se sembró la cepa donadora, es la célula que va a transferir el plásmido con las resistencias a AMP, TE, SXT provenientes de Esmeraldas en la botella uno y la cepa *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico (K12mut) en la otra botella. Se dejó enriquecer el medio por 24 horas a 37°C, y finalmente, se mezcló ambas botellas, e incubó por 24 horas a 37°C.

Los transconjugados fueron seleccionados en medio agar nutriente+25 μ g ácido nalidixico + 12 μ L tetraciclina. Y las resistencias fueron analizadas empleando discos de antibióticos en medio Muller-Hinton, los antibióticos empleados fueron: Ampicilina 10 μ g (AM), Tetraciclina 30 μ g (TE), Sulfamethoxazole-trimetropim 23.75/1.25 μ g (SXT).

4.2.3. Electroforesis de Campo Pulsado

Los cultivos celulares de *E.coli* resistentes a Tetraciclina, Ampicilina, Sulfamethoxazole-trimetropim, *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico y los transconjugados de *E.coli* resistentes a Tetraciclina, Ampicilina, Sulfamethoxazole-trimetropim y ácido nalidixico fueron sembrados en medio agar nutritivo a 37°C por una noche. Al día siguiente se recolectó con un palillo una porción del crecimiento celular y

fue resuspendido en TE buffer (10Mm Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) con una OD 0.63 a 610nm lo que equivale a una solución McFarland 5. Se transfirió 200 μ L de la suspensión celular antes preparada a un microtubo y añadió 10 μ L de Proteinasa K (20mg/mL), 1% Pulse Field Certified Agarosa (Bio-Rad Laboratories) 1% SDS. Inmediatamente se dispensó la mezcla en moldes (plugs). Luego, se removió los moldes y transferirlos a un tubo que contenga la Solución de Lisis (1.5mL de solución de lisis celular + 40 μ L de Proteinasa K (20mg/ml) por muestra), la lisis se mantuvo a 54°C durante toda la noche (entre 12 a 18 horas) en constante agitación. Después de la lisis, los plugs de agarosa fueron lavados cuatro veces con 20mL de agua estéril a 50°C y luego 4 veces con TE buffer a 50°C. Los plugs de agarosa fueron digeridos con 60U de *XbaI* (New England Biolabs, Boston, MA) durante toda la noche a 37°C según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de restricción embebidos en los moldes de agarosa fueron separados en un gel de Pulsed Field Certified Agarosa (Bio-Rad Laboratories) al 1% utilizando la cámara de electroforesis CHEF Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratorios). Se migró el gel en TBE 0.5X-100 μ M tiourea (que se utiliza para evitar la degradación de los aislados al degradar DNAsas). Se colocó 3mL de tiourea 100 μ M en los 3 litros del buffer de corrida. Las condiciones de migración fueron: Temperatura 13°C, Voltaje 6V/cm, Pulso inicial 2.2 s que incrementa hasta 54.2 s, Tiempo de corrida 20-22 horas. El gel fue teñido con 1.5 μ L bromuro de etidio en 100mL de agua destilada por 30 minutos y desteñido en 100mL de agua destilada por 45 minutos. El gel se documentó utilizando la cámara fotográfica Kodak DC120 (Viera, 2007).

5. Resultados

5.1. Crecimiento en medio selectivo

Se obtuvieron 47 transconjugados de 51 cepas empleadas crecieron en el medio selectivo AN+25NA+12TE. Los controles que se usaron fueron la *E.coli* K12 resistente al ácido nadilixico y las cepas donadoras resistentes a los tres tipos de antibióticos TE, AMP, SXT sembradas en estos medios, en las cuales los controles no crecieron (Figura 1).

5.2. Análisis de eficiencia de la conjugación

La mayoría de las 51 cepas de *E.coli* empleadas lograron transferir plásmidos con los genes de resistencia a antibióticos de AMP, TE, SXT, 47 cepas que equivale al 92% fueron exitosamente transconjugados al recibir alguna resistencia a los antibióticos mencionados, las mismas que crecieron en el medio selectivo AN+25NA+12TE y fueron resistentes en las pruebas de antibiogramas con los discos de antibióticos. Los datos obtenidos de las 51 cepas comensales empleadas con resistencia a Ampicilina, Tetraciclina, y Sulfamethoxazole-trimetropim se obtuvieron 45 cepas transconjugadas (88%) capaces de transferir el plásmido con las resistencia completa de TE, AMP, SXT a la *E.coli* K12 resistente al ácido nadilixico, las cuales presentaron una resistencia completa. Sin embargo, las demás cepas de *E.coli* transconjugadas que transfirieron su plásmido a *E.coli* K12 con resistencia al ácido nadilixico, el 2% de cepas transconjugadas presentó resistencia a dos de los antibióticos TE, SXT y resistencia al ácido nadilixico. Otro 2% de transconjugados mostró resistencia a dos antibióticos AMP, TE y resistencia al ácido nadilixico y cuatro cepas (8%) de las 51 empleadas para la conjugación no lograron transferir genes de resistencia a antibióticos para ninguno de los antibióticos estudiados,

tampoco fueron adquirieron la resistencia al ácido nalidixico. (Tabla1) (Figura1) (Figura2) (Anexo 8).

5.3. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

El campo pulsado (PFGE) muestra un fingerprinting de las cepas transconjugadas receptora (K12 resistente al ácido nalidixico) y donadoras. Las cepas utilizadas fueron digeridas con *XbaI* (Biolabs, New England, USA) (Figura 3) que corta en sitios de restricción raros en *E.coli* por lo que genera pedazos grandes consistentes, y muy pocas bandas.

Algunas definiciones a emplearse en este experimento y que nos permitirá entender de mejor manera son: Una célula donadora es una *E.coli* que contiene las resistencias a AMP, TE, SXT y posiblemente posee varios plásmidos. Una célula receptora es una *E.coli* K12 la cual no posee plásmidos y presenta una mutación puntual en el gen de la girasa. Un transconjugado es la cepa K12 resistente al ácido nalidixico que ha adquirido resistencias de las cepas donadoras. Según los resultados los transconjugados presentan un patrón PFGE similar a *E.coli* K12 resistente al ácido nalidixico y es diferente del observado en las cepas donadoras, lo que descarta la posibilidad de que la resistencia se deba a mutaciones aleatorias (Figura 4).

6. Discusión

El 92% de las cepas de *E.coli* provenientes de San Agustín, Playa de Oro (Esmeraldas) resistentes a antibióticos estudiadas transfirieron mediante conjugación el plásmido de resistencia a los antibióticos, Ampicilina, Tetraciclina y Sulfamethoxazole-trimetropim. Esta información corrobora lo indicado por Dionisio (2002), quien argumentó que la conjugación es uno de los mecanismos más efectivos para la

transferencia de resistencias entre bacterias sobre todo en los miembros la familia Enterobacteraceae los cuales transfieren plásmidos incluso entre distintos géneros bacterianos.

Las cepas que no transfirieron la totalidad de los genes de resistencia presentaron resistencia (2%) únicamente a AMP y TE y 2% únicamente SXT, TE, ver (Tabla 1) probablemente tuvieron genes de resistencia a antibióticos asociados a otro plásmido o al cromosoma bacteriano.

De acuerdo con lo que se definió como un transconjugado anteriormente, los datos obtenidos del PFGE confirmaron que la resistencia se debió al mecanismo de conjugación. Estos resultados fueron corroborados por las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos (Figura 1).

Según Eckburg, (2005), la cantidad de *E.coli* en la flora intestinal humana es muy baja (~0.1%), sin embargo esta bacteria tiene gran facilidad para transmitir plásmidos tanto dentro de su género como hacia otros géneros. En este estudio se pudo comprobar que *E.coli* es muy efectivo para la transferencia de ADN hacia otras *E.coli*, al emplearse en este experimento varias cepas de *E.coli* comensales que se emplearon en el laboratorio, como *E.coli* K12 que es una bacteria que se emplea mucho en laboratorios para investigación y nos asegura que esta libre de plásmidos. Sin embargo, es muy difícil determinar la eficiencia de transferencia horizontal a Bacteroides o Firmicutes, ya que se ha demostrado que entre diferentes cepas de *Escherichia* comparten una homología del 39.2% de genes, el resto de genes han sido atribuidas a mecanismos de adquisición de genes como la transferencia horizontal de genes, indicándonos una promiscuidad dentro de esta familia. Sin embargo, en Bateroides tienen una homología del 99% de genes entre cada una de este phylum (Eckburg, 2005) (Courvalin, 1994). Estos datos nos sugieren que si alguna bacteria es capaz de transferir genes con mucha facilidad en el intestino humano seria *E.coli* aun

cuando ésta se encuentre en un número muy inferior en la flora intestinal, pero no hay que descartar la importancia y número de otras bacterias presentes que poseen una capacidad alta para donar o recibir genes de resistencia.

7. Conclusiones

La resistencia a los antibióticos se ha vuelto un problema muy grave a nivel mundial. El conocer los mecanismos de dispersión de genes nos proveerá una idea de como el flujo de resistencias ha influenciado al ser humano y al medio ambiente. El estudio de resistencias de antibióticos en zonas aisladas nos aproxima al entendimiento de estas vías, por las cuales se pueden elaborar medidas de prevención a las resistencias de antimicrobianos.

La transferencia horizontal de genes como la conjugación es un mecanismo de alta efectividad en la familia Enterobacteriaceae, como se pudo observar en esta investigación. El estudio de la flora intestinal humana, como principal reservorio bacteriano debe ser estudiado con mayor énfasis, y determinar las condiciones a las cuales están sujetas la diseminación de resistencias entre las bacterias.

La limitación del estudio al analizar solo *E.coli* nos impide conocer si influye mucho en la diseminación de resistencias a antibióticos en el resto de la flora intestinal, ya que no existe suficiente información sobre este fenómeno en otras familias bacterianas.

8. Recomendaciones

El estudio de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos tuvo como limitación que solo se estudio a *E.coli* como parte de la flora intestinal humana. Para obtener mayor información de la diseminación de antibióticos se debería estudiar el resto

de bacterias de la flora intestinal humana (algunos Bacteroidetes y Firmicutes) y estudiar su capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos.

Estudios de resistencias en bacterias ambientales nos permitirían entender un posible origen del flujo de genes y la evolución de estas resistencias hacia bacterias comensales del intestino humano. Ya que varias bacterias ambientales al habitar en ambientes inhóspitos suelen adaptarse para resistir en ese medio produciendo en ocasiones antimicrobianos, o resistencias a metales pesados para sobrevivir. Estas alteraciones en los organismos, son probablemente una fuente de transmisión de genes al consumir alimentos, agua y se han mezclado con nuestra flora intestinal dando una posibilidad de generar resistencias a ciertos antibióticos.

Es importante estudiar las fuentes de origen de los integrones que adquieren los cassettes de resistencia a antibióticos en estas comunidades de San Agustín, Playa de Oro en la provincia de Esmeraldas, ya que se podría encontrar la explicación a la amplia diseminación de los genes de resistencia a antibióticos.

9. Bibliografía

1. A.C. Fluit, F.J. Schmitz. 1999. Review Clinical Microbiology Infect Diseases: Class1 Integrons, Gene Cassettes, Mobility, and Epidemiology, p.18:761-770.
2. Alessandra Carattoli, Laura Villa. 2006. Emerging Infectious Diseases: Replicon Typing of Plasmids Encoding Resistance to Newer β -Lactams. Vol. 12, p.1145-48.
3. Alessandra Carattoli, Alessia Bertini, Laura Villa. 2005. Journal of Microbiological Methods: Identification of plasmid by PCR-based replicon typing. Vol. 63, p.219-228.
4. Ashraf M, Shin-ichi Miyoshi, Sumio Shimoda, and Tadashi Shimamoto. 2004. Journal of Medical Microbiology: Molecular characterization of a multidrug-resistant strain of enteroinvasive *Escherichia coli* O164 isolated in Japan. Vol.54. p.273-78.
5. Betsy Foxman, Carl Marrs. 2006. Journal of Antimicrobial Chemotherapy: The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urophthogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. Vol. 57, p.666-672.
6. Betsy Foxman, Lixing Zhang, James Koopman. 2005. Epidemic Perspectives & Innovations: Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies, p.1742-5573-2-10.
7. Bertram J, Strätz M, Dürre P. 1990. Journal of Bacteriology: Natural Transfer of Conjugative Transposon Tn916 between Gam-Positive and Gram-Negative Bacteria. Vol.173. No.2, p: 443-48.

8. Courvalin P. 1994. Antimicrobial Agents: Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Vol. 38, No.7, p. 1447-51.
9. Dobrindt U, Angerer F, Michaelis K. 2003. Journal of Bacteriology: Analysis of Genome in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Isolates by Use of DNA Arrays. Vol.185.No.6, p: 1831-1839.
10. Donnemberg M, 2002. *Escherichia coli* : virulence mechanisms of a versatile pathogen. Editorial Elsevier. Primera edición, San Diego, USA.
11. Dionisio F, Rodrigues O. 2002. Genetics: Plasmid Spread Very Fast in Heterogeneous Bacterial Communities. Vol. 162, p. 1525-32.
12. Eckburg P, Relman D. 2005. Science: Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Vol. 308, p. 1635-38.
13. Jianyu Su, Lei Shi, Liansheng Yang. 2006. FEMS: Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. Vol. 254, p.75-80.
14. Hal Jones, Margareta Tuckman, Bradford Patricia. 2006. Journal of bacteriology: Identification and Sequence of *tet(M)* Tetracycline Resistance Determinant Homologue in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. Vol. 188, No.20, p.7151-64.
15. Hyunjoo P, Jeong-hum B, Sunmi, Y. 2003. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Isolated in Korea Containing a Multidrug Resistance Class 1 Integron. Vol.47, No.6, p.2006-2008.

16. Lixin Zhang, Usha Srinivasan, Carl Marrs, Betsy Foxman. 2004. BMC Microbiology: Library on a slide for bacterial comparative genomics, p.4:12.
17. Majta'n V, Majta'nova'L, Kova'c L. 2004. FEMS: Analysis of integrons in human isolates of Salmonella enterica serovar typhimurium isolates in the Slovak republic. Letters 239, p. 25-31.
18. Michael T. Madigan, John M, Martinko, Jack Parker. 2004. Biología de los microorganismos. 10^{ma} edición, Prentice Hall, Madrid, p. 22, 25, 177, 179, 265, 281, 286-91, 340, 496.
19. Nandi S, Maurer J, Hofacre C, Summers A. 2003. PNAS: Gram-positive bacteria are mayor reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Vol.101. No.18, p.7118-7122.
20. Pitout J.D.D., K.S.Thomsom. 1998. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: β -Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. Vol. 42, p.1350-1354.
21. Shaohua Z, David G, Beilei G. 2001. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. Vol.67. No4, p. 1558-1564.
22. Shauhua Zhao, David White. 2001. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. Applied and Environmental Microbiology, p.1558-1564.

23. Toleman M, Bennett P, Walsh T. 2006. Microbiology and Molecular Biology review: ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of 21st Century?. Vol.70, No.2, p. 296-316.
24. Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M. & Mazel, D. (2002). Microbiol: Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. Vol.43, p.1657–1669.
25. Viktor Majtán, L`ubica Majtánová, L`ubor Kovác. 2004. FEMS Microbiology Letters: Analysis of integrons in human isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated in the Slvok republic. Vol.239, p.25-31.
26. Volk W, Gebhardt B, Hammarskjöld M.L, Kadner R. 1996. Medical Microbiology. 5th edición. Lippincott-Raven, USA, p. 256-78.
27. Zhang Y, Yakrus MA, Graviss EA, Williams-Bouyer N, Turenne C, Kabani A, Wallace RJ, Jr, 2004. J Clin Microbiol: Pulsed-field gel electrophoresis study of Mycobacterium abscessus isolates previously affected by DNA degradation. Vol.42, p. 5582–5587.

10. Tablas

Tabla 1: Resistencias adquiridas de los tranconjugados

Estadística Conjugaciones	
Total cepas <i>E.coli</i>	51
Total Conjugaciones <i>E.coli</i>	47
Tranconjugados con resistencias AMP, SXT, TE	45
Tranconjugados con resistencias SXT, TE	1
Tranconjugados con resistencias TE, AMP	1
Ninguna resistencia	4

11. Figuras

Figura 1: Primera columna: control negativo K12mut, sensible a SXT, TE, AMP; negativo para AN+25NA+12TE. Segunda columna: muestra donadora, antibiograma resistente a SXT, AMP, TE; y negativo en medio selectivo AN+25NA+12TE. Tercera columna: transconjugado resistente a SXT, TE, AMP; y positivo en medio selectivo AN+25NA+12TE

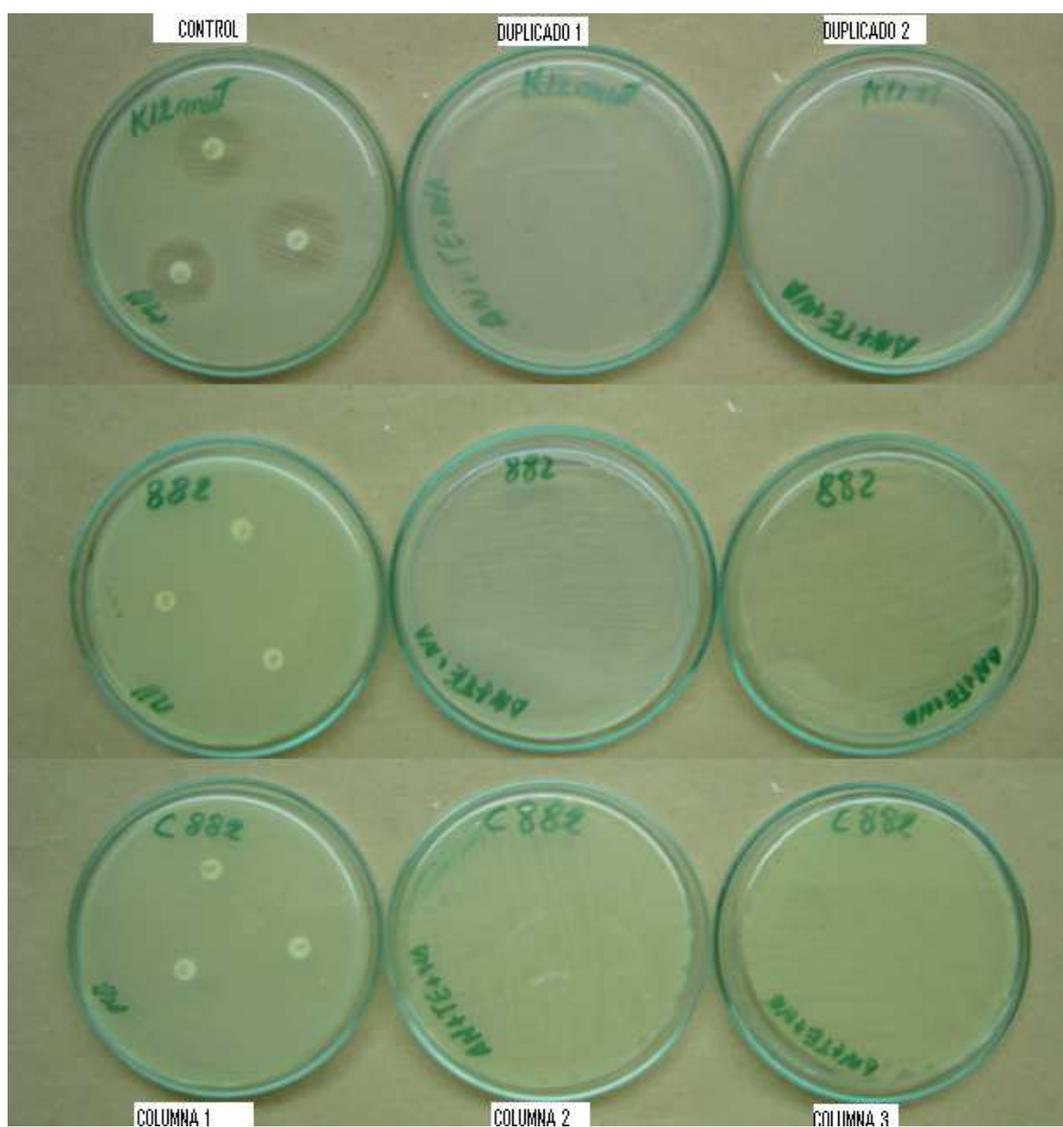


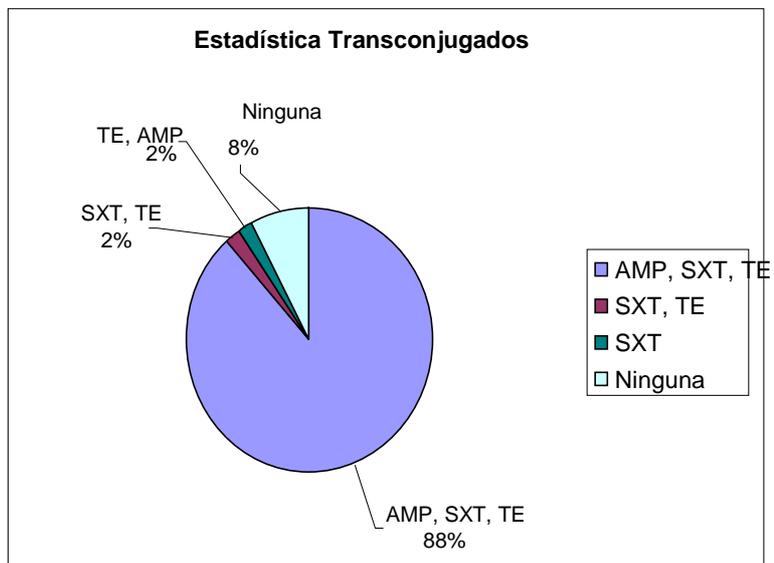
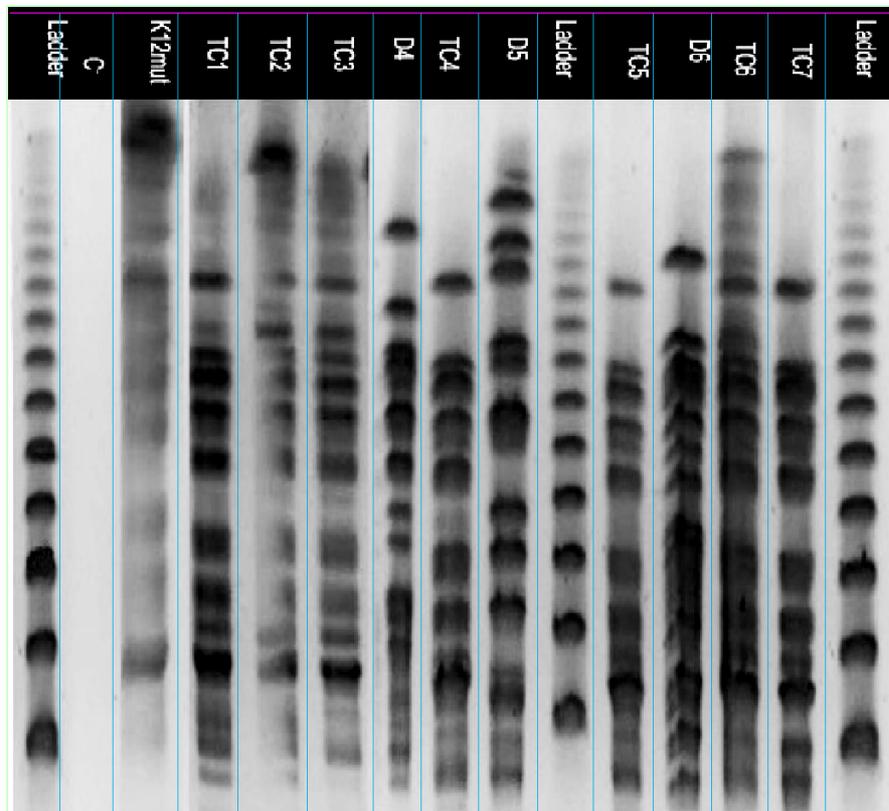
Figura 2: Porcentaje de resistencias adquiridas de las cepas transconjugadas

Figura 3 : Sitio de restricción de la enzima *XbaI*

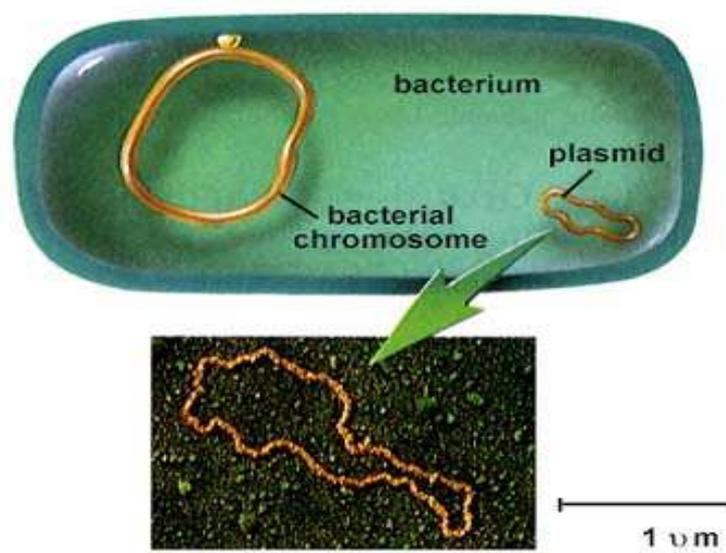


Figura 4: Electroforesis de campo pulsado (PFGE). El genoma fue digerido con *XbaI*. Filas 1, 10, 15 muestran el Ladder lambda. Segunda fila control negativo. Tercera fila K12 resistente a ácido nadilixico. Los transconjugados (TC) son los carriles 4, 5, 6, 8, 11, 13 y 14. Las cepas donadoras (D) son las filas 7, 9, 12. Los carriles 7 y 8, y 9 y 11 son donadores y transconjugados que se corresponden respectivamente.

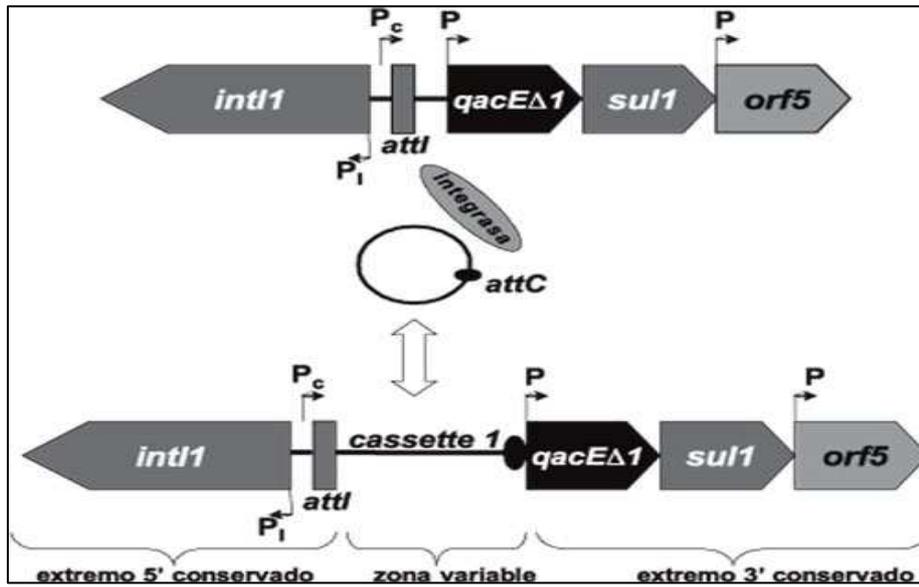


Anexos

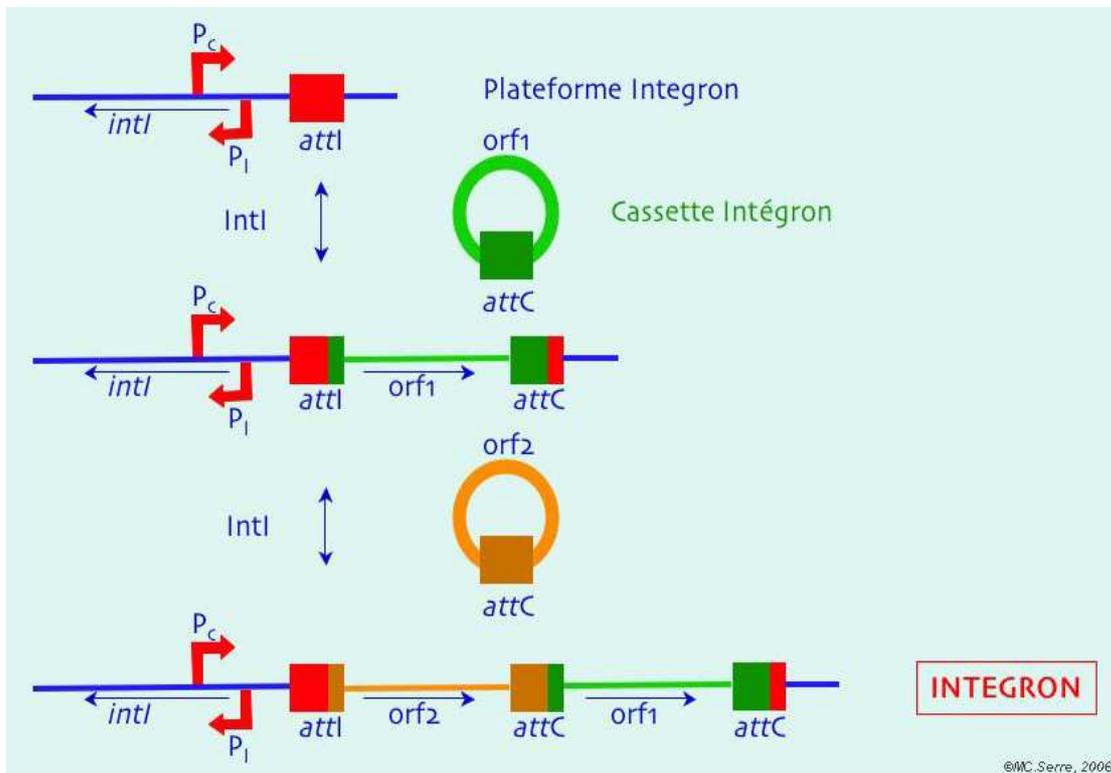
Anexo 1: Estructura de *Escherichia coli* que presenta un cromosoma circular y un plásmido extracromosómico



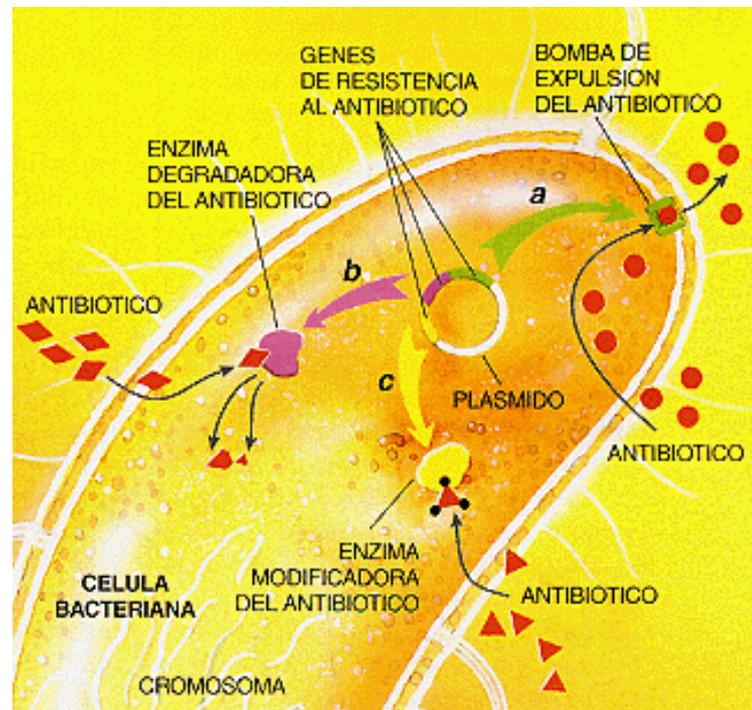
Anexo 2: Estructura de un integrón y ensamble.



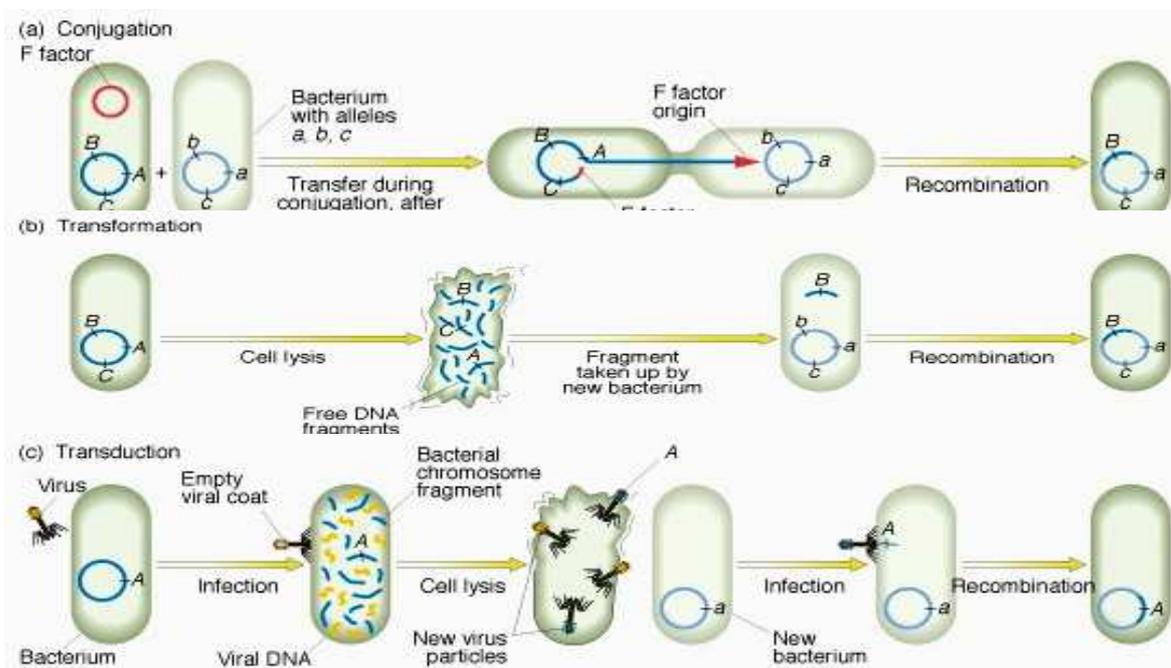
Anexo 3: Ensamble de los cassettes en los integrones

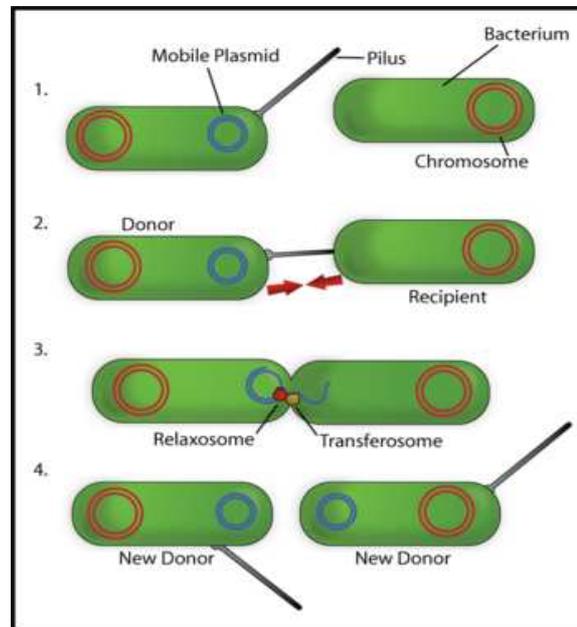


Anexo 4: Diferentes mecanismos que emplea una bacteria para destruir o neutralizar un antimicrobiano.

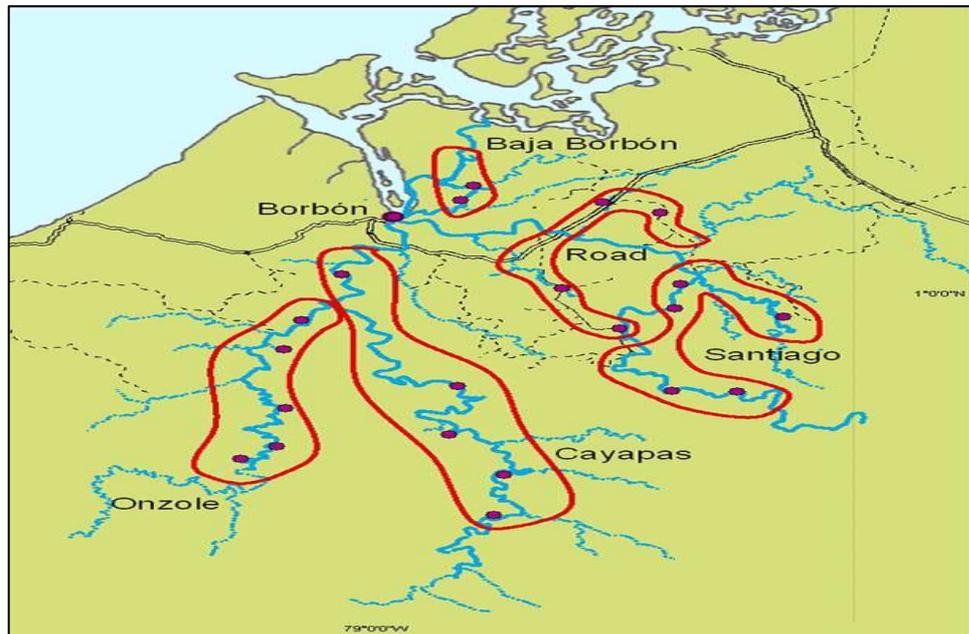


Anexo 5: Mecanismos de transferencia horizontal de genes hacia otras bacterias.



Anexo 6: Proceso de transferencia horizontal (Conjugación)

Anexo 7: Zona de Borbón de recolección de las muestras en la provincia de Esmeraldas.



Anexo 8: Muestra las resistencias y susceptibilidades de las cepas transconjugadas.
Resistente=1, Sensible=0

Susceptibilidad Antimicrobiana Transconjugados				
Transconjugados		SXT	TE	AMP
G1	728	1	1	1
G1	757	0	0	0
G1	854	1	1	1
G1	864	1	1	1
G1	882	1	1	1
G1	885	1	1	0
G1	887	1	1	1
G1	971	1	1	1
G1	975	0	1	1
G1	984	1	1	1
G1	985	0	0	0
G1	991	1	1	1
G1	1014	1	1	1
G1	1028	1	1	1
G1	1053	1	1	1
G1	1068	1	1	1
G1	1073	1	1	1
G1	1083	1	1	1
G1	1094	0	0	0
G1	1099	1	1	1
G1	1170	1	1	1
G1	1230	1	1	1
G1	1246	1	1	1
G1	1342	1	1	1
G1	1351	0	0	0
G1	1452	1	1	1
P.O	15 A	1	1	1
P.O	15 B	1	1	1
P.O	15 C	1	1	1
P.O	15 E	1	1	1
S.A	36 B	1	1	1
S.A	36 C	1	1	1
S.A	36 D	1	1	1
S.A	51 A	1	1	1
S.A	51 B	1	1	1
S.A	51 C	1	1	1
S.A	51 D	1	1	1
S.A	51 E	1	1	1
S.A	52 D	1	1	1
S.A	73 B	1	1	1
S.A	75 E	1	1	1
S.A	80 D	1	1	1
S.A	81 A	1	1	1
S.A	97 B	1	1	1