

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



TESIS DE GRADO

CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS
MEDIANTE CONJUGACIÓN Y SU EFECTO SOBRE
LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA ENTRE
CEPAS DE *Escherichia coli* y ESPECIES DE *Shigella*
AISLADAS DE PROCESOS PATOLÓGICOS
EN DIFERENTES REGIONES DE BOLIVIA,
SELECCIONADAS MEDIANTE SU PERFIL ANTIMICROBIANO
DURANTE LA GESTIÓN 2000 - 2004

POSTULANTE: LESLIE HORTENCIA CAMACHO MORALES

ASESOR: GIOVANNI RODRIGO GARCIA RADA

La Paz - Bolivia
2006

*Dedico con mucho cariño:
A mis padres, hermanos, esposo e hijo, quienes
siempre confiaron en mí y de los cuales siempre
tuve su apoyo y respaldo incondicional.
¡Gracias por su paciencia!*

AGRADECIMIENTOS

- *A Dios por darme la fuerza interior necesaria para poder culminar este trabajo.*
- *Al Laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), al Dr. Trigoso y todo el personal que conforma dicha Unidad., por acogerme en sus instalaciones y por la colaboración brindada para la realización del presente trabajo.*
- *A mi asesor Dr. Giovanni García, por la enseñanza brindada en el laboratorio, por su apoyo y confianza incondicional.*
- *A la Dra. Tec. Sup. Carmen Revollo, por toda su colaboración desinteresada.*
- *A la Dra. Aneth Vásquez, por su gentil colaboración.*
- *Y a todas las personas que de alguna u otra manera colaboraron para la realización del presente trabajo.*

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), en el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica, en la Unidad de Genética Bacteriana. El Financiamiento de este trabajo fue otorgado por INLASA.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES.....	2
3	MARCO TEÓRICO	3
3.1	ENTEROBACTERIAS	3
3.1.1	SUBDIVISIÓN TAXONÓMICA DEL GRUPO ENTÉRICO	3
3.1.2	Grupo I.....	4
3.1.3	<i>Escherichia Coli</i>	5
3.1.3.1	PATOGENÍA	6
3.1.4	<i>Shigella</i>	8
3.1.4.1	PATOGENIA	8
3.2	RELACIONES GENÉTICAS	9
3.3	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	10
3.4	ANTIBIOGRAMA.....	11
3.4.1	Parámetros controlados en la prueba de difusión en agar Bauer – Kirby.....	12
3.4.2	Prueba de difusión en agar Bauer-Kirby	12
3.5	RESISTENCIA BACTERIANA	13
3.6	ANTIBIÓTICOS	13
3.7	CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS POR SU ESTRUCTURA QUÍMICA	14
3.7.1	QUINOLONAS	14
3.7.1.1	Clasificación	14
3.7.1.2	Mecanismo de acción	14
3.7.1.3	Mecanismo de resistencia	15
3.7.2	SULFONAMIDAS.....	17
3.7.2.1	Clasificación	17
3.7.2.2	Mecanismo de acción	18
3.7.2.3	Mecanismo de resistencia	18
3.7.3	PENICILINAS.....	19
3.7.3.1	Clasificación	19
3.7.3.2	Mecanismo de acción	19
3.7.3.3	Mecanismo de resistencia	21
3.7.4	INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS.....	22
3.7.4.1	Clasificación	22
3.7.4.2	Mecanismo de acción	23
3.7.5	CEFALOSPORINAS.....	23
3.7.5.1	Clasificación	23
3.7.5.2	Mecanismo de acción.....	23
3.7.5.3	Mecanismo de resistencia	24
3.7.6	FENICOLES.....	24
3.7.6.1	Clasificación	24
3.7.6.2	Mecanismo de acción.....	24
3.7.6.3	Mecanismo de resistencia	25
3.8	BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA	25
3.9	ADQUISICIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE OTRO MICROORGANISMO QUE CODIFICA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	26
3.9.1	Transformación	27
3.9.2	Transducción	27
3.9.3	Conjugación	28
3.9.3.1	FISIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CONJUGACIÓN.....	29
3.9.3.2	REGULACION GENÉTICA DE LA CONJUGACION	32
3.10	PLÁSMIDOS	34
3.10.1	Características.....	31
3.10.2	Estructura y replicación	36
3.10.3	Clasificación.....	37
3.10.4	Plásmidos R.....	38

3.11	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA DE BIRMBON Y DOLY	39
3.12	ELECTROFORESIS DE ADN PLASMÍDICO	41
3.13	DENDROGRAMA	41
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
5	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	44
6	OBJETIVOS	44
6.1	OBJETIVO GENERAL	44
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
7	JUSTIFICACIÓN	45
8	MATERIAL Y MÉTODOS	47
8.1	UNIVERSO	47
8.2	MUESTRA	47
8.3	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	47
9	RUTA CRÍTICA	48
10	PROCEDIMIENTO	49
10.1	RECUPERACIÓN Y AISLAMIENTO DE MUESTRAS	49
10.2	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	49
10.3	ANTIBIOGRAMA	49
10.4	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	49
10.5	CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DONADORAS, RECEPTORAS Y PAREJAS DE CONJUGACIÓN	49
10.6	CONJUGACIÓN DE LA CEPAS BACTERIANAS	50
10.7	ANTIBIOGRAMA	50
10.8	CULTIVO DE CEPAS RECEPTORAS CONJUGADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO	50
10.9	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO	51
10.10	ELECTROFORESIS DE ADN PLASMIDICO	51
11	RESULTADOS	52
12	DISCUSIONES	62
13	CONCLUSIONES	68
14	RECOMENDACIONES	69
15	BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones entéricas. Las cuales representan una causa significativa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. La aparición de microorganismos resistentes se facilita por la transferencia de material genético entre géneros y especies, a través de diversos mecanismos como son la conjugación, transformación o transducción. Por tal razón el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de transferencia de plásmidos mediante conjugación y su efecto sobre la resistencia antimicrobiana entre cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* aisladas de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia, durante el periodo de 2000 a 2004, las cuales fueron seleccionadas mediante su perfil antimicrobiano. Se estudiaron 37 cepas bacterianas, 14 correspondían a cepas de *Escherichia coli* y 23 a *Shigella spp* (3 *Shigella dysenteriae*, 10 *Shigella flexneri*, 10 *Shigella sonnei*); el tamaño de muestra esta sujeto a la disposición de muestras disponibles en el laboratorio, además de formar parte de un estudio piloto, el interés del mismo fue descriptivo y no inferencial. Cada cepa se la identificó mediante pruebas bioquímicas y posteriormente se le determinó la sensibilidad antimicrobiana, mediante la Prueba de difusión en agar Bauer-Kirby, empleando 5 drogas antimicrobianas: Ampicilina (10 ug), Cloranfenicol (30 ug), Trimetoprim - sulfametoxazol (25 ug), Ácido Nalidíxico (30 ug) y Cefotaxima (30 ug), antibióticos empleados con mayor frecuencia en infecciones entéricas. Paralelamente al antibiograma, se determinó la dotación plasmídica (método de lisis alcalina de Birnboim y Doly) fueron seleccionadas cepas donadoras y receptoras según el perfil antimicrobiano Pruebas de conjugación bacteriana in vitro fueron aplicadas a 38 parejas conjugantes (27 cepas fueron usadas como donadoras y 19 como receptoras). Las cepas receptoras nuevamente fueron sometidas a un antibiograma por difusión en disco, con los antibióticos correspondientes, para verificar si hubo cambio o no en el halo de inhibición, por ende la sensibilidad. Para verificar cambio genotípico extracromosómico, fue determinada nuevamente la dotación plasmídica. Y para verificar la similitud de parejas conjugantes de importancia, se aplicó el dendrograma, basado en los programas RAPDistance 104, y MEGA 3.1. De las 38 parejas conjugantes, 5 transconjugantes no mostraron cambios fenotípicos, ni genotípicos de resistencia, 25 mostraron cambios fenotípicos de resistencia y 8 transconjugantes presentaron cambios fenotípicos, como genotípicos (2 receptoras adquirieron resistencia a AMP y 3 receptoras a SXT). Según estos resultados se pudo determinar que la transferencia de plásmidos de resistencia, mediante conjugación puede darse en cepas entéricas patógenas como *Shigella* y cepas saprofitas como *E. coli* no patogénica. Por lo que se sugiere poner en marcha actividades de vigilancia a fin de detectar y controlar la aparición de nuevas cepas entéricas resistentes.

Summary

The microbial resistance is an increasing problem in the treatment of enteric infections, which represent a significant cause of morbidity and mortality in the world, specially in developing countries. The appearance of resistant microorganism is facilitated by genetic material transference between genus and species, through diverse mechanisms as conjugation, transformation or transduction.

For such reason the objective of this work was to evaluate the capacity of plasmid transference by means of conjugation and its effect on the microbial resistance between strains of *Escherichia coli* and *Shigella* species isolated from pathological processes in different Bolivia's regions, from 2000 to 2004, which were selected by means of their antimicrobial profile.

37 bacterial strains were studied, 14 corresponded to strains of *Escherichia coli* and 23 to *Shigella spp* (3 *Shigella dysenteriae*, 10 *Shigella flexneri*, 10 *Shigella sonnei*); the sample size was subjected to the availability of laboratory samples besides to be part of a pilot study, the interest of the same was descriptive and non inferential. Each was identified by biochemical tests, and later microbial sensitivity was determined by means of disc diffusion agar test (Bauer-Kirby) using 5 antimicrobial drugs: Ampicillin (10 µg), Cloramphenicol (30 µg), sulfamethoxazole - Trimethoprim (25 µg), Nalidixic acid (30 µg) and Cefotaxime (30 µg), which are the most frequent antibiotics used in enteric infections. Parallel to disc diffusion test, the plasmidic endow was determined (method of alkaline lysis, of Birnboim and Doly); were selected donor and receiving strains according to the antimicrobial profile. Bacterial conjugation in vitro test were applied to 38 conjugated pairs (27 strains were used as donors and 19 as receiving). The receiving strains were put again under disc diffusion test, with the corresponding antibiotics, to verify if there were changes in the inhibition halo, therefore in the sensitivity.

To verify extrachromosomal genotypic changes, the plasmidic endow was determined again. And to verify the similarity of most important conjugant pairs, it was applied a dendrogram based on the programs RAPDistance 104, and MEGA 3.1. Of the 38 conjugant pairs, 5 transconjugants did not show phenotypic nor genotypic changes in the resistance, 25 showed phenotypic changes of resistance and 8 transconjugants presented phenotypic as well as genotypic changes, (2 receiving ones acquired resistance to AMP and 3 receiving ones to SXT).

According to these results we could determine that the transference of plasmids of resistance, by means of conjugation can occur in pathogenic enteric strains like *Shigella* and saprophytic strains like *Escherichia coli*. Reason why it is suggested to start up monitoring activities in order to detect and to control the appearance of new resistant enteric strains.

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias a través del tiempo han producido una diversidad de mecanismos de resistencia, con el fin de contrarrestar los antibióticos. Pueden poseer genes de resistencia en el cromosoma bacteriano, en plásmidos transferibles y en transposones. La resistencia se facilita por la transferencia entre especies de este material genético a través de diversos mecanismos como son la conjugación, transformación o transducción.

El trabajo que a continuación presentamos, “Capacidad de transferencia de plásmidos mediante conjugación y su efecto sobre la resistencia antimicrobiana entre cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* aisladas de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia, seleccionadas mediante su perfil antimicrobiano durante la gestión 2000 – 2004” fue realizado con el fin de contribuir, con la investigación científica de nuestro país, pese a ser un estudio piloto y solo descriptivo, esperamos sea de gran aporte para nuestros investigadores. El estudio fue realizado en el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA), en el Laboratorio de Bacteriología Clínica, Unidad de Genética Bacteriana. Las cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* aisladas entre el 2000 y 2004, fueron proporcionadas, por la Unidad de *Enterobacterias* del mismo laboratorio. Para el estudio de las mismas, se emplearon técnicas estandarizadas en la recuperación, aislamiento, identificación, antibiograma, conjugación, extracción de ADN plasmídico y electroforesis.

2 ANTECEDENTES

La principal amenaza al éxito de la quimioterapia está representada por la transmisión genética de plásmidos de resistencia a antibióticos (plásmidos R). En los años 50, poco después de la introducción de los primeros antibióticos, se detectó en Japón un espectacular aumento de pacientes de disentería bacilar resistentes al tratamiento con varios de estos antibióticos. Las cepas de *Shigella dysenteriae* aisladas de estos pacientes poseían el fenotipo SuR, StrR, CmR, TetR. Se comprobó que los genes correspondientes a esas resistencias formaban parte de un gran plásmido. Los plásmidos de este tipo se denominan plásmidos R. Pero aún más: los mismos pacientes tenían en sus intestinos cepas de *Escherichia coli* (que como ya se sabe, es un simple comensal que forma parte de nuestra flora endógena) que eran igualmente resistentes a esos antibióticos. Ello sugería que este tipo de plásmidos se podía transferir de unas especies a otras. La explicación estribaba en un fenómeno de intercambio dependiente de contactos célula-célula, llamado **conjugación**. En resumidas cuentas, se descubrió que existen plásmidos R capaces de diseminarse por conjugación no sólo entre células de la misma especie, sino entre especies distintas, incluyendo bacterias patógenas.

Al poco tiempo comenzaron a aparecer en Occidente cepas patógenas resistentes a uno o varios antibióticos. Actualmente las cepas con resistencias múltiples codificadas por plásmidos son muy abundantes en todo el mundo, lo que complica (y a veces desaconseja) la quimioterapia¹.

¹ Iañez Pareja, Enrique. 1998. Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granada, España

3 MARCO TEÓRICO

3.1 ENTEROBACTERIAS

La familia *Enterobacteriaceae*, se compone de un gran número de especies bacterianas, estrechamente relacionadas. Habitan en los intestinos grueso y delgado del hombre y animales, suelos, agua y material en descomposición. Debido a su hábitat normal en el hombre, a menudo son denominados “bacilos entéricos”. En este grupo de microorganismos están incluidos algunos de los patógenos intestinales más importantes del hombre; por ejemplo, los agentes de la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) y disentería bacilar (*Shigella*). Muchos bacilos entéricos no causan la enfermedad cuando quedan confinados al tracto intestinal de un hospedero normal, pero en el hospedero alterado o frente a una oportunidad de invadir otros sitios del cuerpo, tienen la capacidad de producir enfermedad en cualquier tejido (*Escherichia coli*)².

En los miembros de esta familia es muy frecuente la presencia de plásmidos, transposones y profagos, que pueden codificar factores que promueven modificaciones estructurales, como la expresión de nuevos antígenos, o metabolitos, como la utilización de nuevos sustratos, que dan lugar a cepas antigénicas o metabólicamente atípicas. Algunos plásmidos y profagos también pueden codificar factores (estructuras y toxinas) que intervienen en la patogenicidad, como sucede en *Escherichia coli*, *Shigella* y otras enterobacterias. Asimismo, diversos transposones, libres o incorporados a replicones mayores como plásmidos o bacteriófagos, pueden codificar enzimas, que inactivan a los antibióticos confiriendo resistencia a los mismas pruebas bip³.

3.1.1 SUBDIVISIÓN TAXONÓMICA DEL GRUPO ENTÉRICO

Una separación preliminar, razonablemente satisfactoria puede ser establecida en base a la inserción flagelar y a la reacción de la oxidasa. Los grupos oxidasa negativos, que

² Joklik Wolfgang K., Willet Hilda P., Amos Bernard, 1988. *Zinsser Microbiología; 18 edición, Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 235.*

³ J.D. García – Rodríguez, Nov. 1998. *Microbiología Medica, Editorial You &Us Ronda de Bruente; 1ª reimpresión. 224.*

de ser móviles lo son por poseer flagelos peritricos, incluyen los representantes más significativos de la familia *Enterobacteriaceae*, junto con *Yersinia*. La composición de las bases del ADN, junto con algunos caracteres bioquímicos y fisiológicos, permite el reconocimiento de cuatro subgrupos principales (I - IV). Especialistas que han estudiado la taxonomía de las *Enterobacteriaceae*, han creado un número muy elevado de géneros. La mayor parte de las veces distinguibles, en base a diferencias fenotípicas, tan secundarias que otros las emplearían para diferenciar especies. El mantenimiento de los tres géneros *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, no pueden justificarse, teniendo en cuenta el conocimiento que ahora se posee de las relaciones genéticas entre ellos. La distinción genética se basa únicamente en su patología⁴.

3.1.2 Grupo I

Los miembros de este grupo son habitantes del tracto intestinal del hombre y otros vertebrados. Incluye las dos especies de nuestro interés (*Shigella*, *Escherichia coli*), por lo cual nos referimos sólo a este grupo (Tabla 1).

Tabla 1. Subdivisión Taxonómica de las bacterias entéricas con flagelación peritrica y otras formas inmóviles relacionadas. (Fuente: Stanier)

Subgrupo principal	% G+C en ADN	Motilidad	Producción de:				Géneros integrantes	Otros nombres genéricos aplicados con frecuencia a algunos miembros del grupo
			<i>Butanodiol</i>	H ₂ + CO ₂	<i>Ureasa</i>	<i>Triptófano desaminasa</i>		
I	50 - 53	V	-	V	-	-	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	<i>Arizona</i> y <i>Citrobacter</i> para formas intermedias
II	50 - 59	V	+	V	-	-	<i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Klebsiella</i> y <i>Hafnia</i>
III	37 - 50	+	-	+	+	+	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>
IV	46 - 47	V	-	-	+	-	<i>Yersinia</i>	<i>Encuadrado anteriormente en Pasteurella</i>

Entre las especies del grupo I, existen subdivisiones intraespecíficas, muy minuciosas; en base al estudio inmunológico de las superficies celulares. La extremada especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, permite estudiar diferencias, con

⁴ Stanier y otros. 1988: "Microbiología, 2ª edición". Ed Reverté, Barcelona. Capítulo 11: 598.

arreglo a este criterio, entre cepas de una misma especie bacteriana, indistinguibles entre sí, por lo que respecta a otros criterios fenotípicos. Han sido caracterizadas ampliamente, tres clases de antígenos de superficie, en las enterobacterias del grupo I: los antígenos O, que representan la porción polisacárida de los lipopolisacáridos de la capa externa de la pared celular; los antígenos K que son polisacáridos capsulares, y los antígenos H, que son las proteínas flagelares. Muchos de estos organismos poseen dos conjuntos de determinantes genéticos de diferentes antígenos flagelares, susceptibles de alternarse en cuanto a la expresión fenotípica, fenómeno denominado variación de fase. En una determinada célula, los flagelos son de un tipo antígeno, pero a medida que la célula se multiplica, aparecen, con cierta probabilidad, variantes del otro tipo posible. Los cultivos de estas cepas bifásicas contienen, por tanto, dos conjuntos de antígenos H específicos.

Escherichia coli y algunos miembros del grupo I, integran la flora intestinal normal y dan lugar a infecciones solamente en condiciones excepcionales. Los géneros *Salmonella* y *Shigella* incluyen patógenos que dan lugar a gran cantidad de enfermedades entéricas en el hombre y otros animales. En todos los casos, la penetración tiene lugar por vía oral; el intestino delgado constituye el lugar principal de localización de la infección, aunque algunos de estos patógenos pueden subsiguientemente invadir otros tejidos y causar un daño generalizado en el hospedero. Los miembros del género *Shigella* son los agentes de una enfermedad entérica que afecta específicamente a la especie humana, la disentería bacilar⁵.

3.1.3 Escherichia Coli

El género *Escherichia* contiene 5 especies, la principal *Escherichia coli*. Theodor Escherichia fue quién aisló a la especie *Escherichia coli*. Es un bacilo gram negativo anaerobio facultativo, prevalente en la flora intestinal del hombre y animales de sangre caliente.

Son bacilos rectos de 1.1 – 1.5 μm de ancho por 2 – 6 μm de largo. Se presentan aislados o de a pares y pueden o no poseer cápsula. Su motilidad está dada por sus flagelos (periféricos) pero también pueden ser inmóviles.

Quimioorganotrófos. Oxidasa negativa. Pueden utilizar acetato, pero no citrato como única fuente de carbono. La glucosa y otros carbohidratos son fermentados por

⁵ Stanier y otros. 1988: "Microbiología, 2ª edición". Ed Reverté, Barcelona. Capítulo 11: 594.

producción de piruvato. La lactosa es fermentada por la mayoría de las cepas, pero esta fermentación puede ser retardada o ausente. Desarrollan en medios de cultivo simples. La serología probablemente es la forma más útil de subdivisión de *Escherichia coli*. Se basa en la propiedad de diferentes estructuras superficiales que en términos serológicos se expresan como antígenos somático (O) grupo específico, se encuentra en el lipopolisacárido, el antígeno capsular o microcapsular (K) polisacárido capsular, y el antígeno flagelar (H) que es una proteína⁶

El contenido de G+C del ADN es 50 – 51 moles %. El cromosoma de la bacteria intestinal *Escherichia coli* es único, circular y contiene cerca de 4.7 millones de pares de bases. Tiene cerca de 1 mm de longitud pero solo 2 nm de ancho. El cromosoma se replica produciendo una figura que asemeja a la letra griega theta. El promotor es la parte del ADN en donde se pega la ARN polimerasa antes de abrir el segmento de ADN a ser transcrito. Un segmento del ADN que codifica para un polipéptido específico se conoce como un gen estructural. *Escherichia coli* puede sintetizar 1700 enzimas, por lo tanto esta pequeña bacteria tiene genes para 1700 mARN. La lactosa, el azúcar de la leche, es hidrolizada por la enzima beta-galactosidasa. Esta enzima es inducible, solo se produce en grandes cantidades cuando la lactosa, el sustrato sobre el cual opera, esta presente. En cambio, las enzimas para la síntesis del aminoácido triptófano se producen continuamente a menos que el triptófano este presente en el medio de cultivo, se dice en este caso que las enzimas sintetizadoras de triptófano están reprimidas.⁷

3.1.3.1 PATOGENÍA

Para vencer las defensas del huésped y escapar a las limitaciones del medio cólico, desafiando la competición de otras especies bacterianas, *Escherichia coli* necesita de ciertas propiedades o factores de virulencia que le confieren una patogenicidad especial, para producir infecciones, ya sea a nivel intestinal.

Escherichia coli puede estar involucrada en problemas gastrointestinales, así como en infecciones urémicas y neonatales. Dentro de las infecciones intestinales, las *E. coli* se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena

⁶ de Nader Olga Miguel. *Enterobacterias II Escherichia y Shigella. Microbiología Médica. Editorial Atlante S.R.L. Buenos Aires 1996. Pag 270*

⁷ Raisman Jorge S., González Ana María. 2000: gened.emc.maricopa.edu/bio/bioBioBookPROTSYN.html

(EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). *Escherichia coli* enterotoxigénica se adquiere, al igual que los otros grupos patógenos de *E. coli*, por la ingestión de agua y alimentos contaminados. Las cepas de ETEC producen dos toxinas: LT (toxina termolábil) y ST (toxina termoestable), que actúan incrementando los niveles de Adenosina-5'- (AMPc) y Guanosina-5'- monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente; esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa. En EPEC, se ha involucrado al *pilus* BFP (bundle-forming pilus) como un factor de virulencia característico que participa en el proceso infeccioso al promover la adherencia íntima a enterocitos; posteriormente se produce la polimerización de la actina del citoesqueleto, seguida de la destrucción de las microvellosidades. Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda. En EIEC, el mecanismo de patogenicidad es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula a través de una fagocitosis "no profesional," lo que afecta el borde de cepillo del enterocito. Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas; la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadenan el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*. En este mecanismo están implicados un plásmido de alto peso molecular (120-140MDa) y genes de invasión en el genóforo bacteriano, que codifican y regulan todo el proceso invasivo. En EHEC también se producen lesiones del tipo de "adherencia y esfacelación" como en EPEC, y además sintetiza dos citotoxinas, Toxina Shiga-like I y II (STX I y II), que producen la lisis en cultivo celular. Se ha reportado que la estructura de estas toxinas es similar a la LT de las cepas ETEC y su mecanismo de acción es en el nivel de la síntesis de proteínas. Además, poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para la enterohemolisina. Este plásmido se encuentra presente en todos los aislamientos clínicos de O157:H7 asociados con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. La producción de diarrea aguda y crónica en niños se debe a la acción de las toxinas y a la adherencia al enterocito por sus fimbrias. El grupo EAEC presenta un patrón de

adherencia agregativa en cultivo celular. Este grupo está fuertemente asociado con diarrea persistente en niños. La patogénesis de EAEC está en estudio, aunque se han involucrado dos proteínas de alto peso molecular, Proteína codificada por un plásmido (Pet) y Proteína codificada en el genoma con actividad de proteasa (Pic), que producen acortamiento de las vellosidades, hemorragia, ulceración y necrosis en asa ligada de rata, además de la toxina ST de *E. coli* enteroagregativa (EAST 1) diferente de la que produce ETEC. DAEC es el grupo más reciente del cual aún no se conoce bien su mecanismo de patogenicidad⁸.

3.1.4 Shigella

El género *Shigella sp.* forma parte de la familia Enterobacteriaceae, se clasifica en la tribu *Escherichieae* y esta muy estrechamente relacionada con los miembros del género *Escherichia*. La *Shigella* se dividen en cuatro grupos principales por los antígenos O denominados: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*.

Shigella típicamente son bacilos gramnegativos, inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos, no producen H₂S excepto ciertos tipos de *S flexneri*, no producen gas durante la fermentación de hidratos de carbono, no producen lisina descarboxilasa, utilizan acetato como fuente de carbono, no fermentan lactosa excepto *Shigella sonnei* que puede fermentar lactosa luego de una prolongada incubación.

Todas las *shigellas* poseen antígeno O y algunas poseen antígenos K. el antígeno K no es significativo en la tipificación serológica de las shigellas, pero cuando están presente, interfiere con la determinación del antígeno de tipo O.⁹

3.1.4.1 PATOGENIA

Shigella es un buen modelo de enfermedades en las cuales la bacteria invade las células del hospedero, se replica en el citoplasma de estas células y se disemina de célula a célula. En primer lugar *Shigella* atraviesa la mucosa a través de las células de M de las placas de Sélter, células fagocíticas naturales, cuyo papel principal es tomar antígenos del lumen intestinal por fagocitosis y presentarlos al tejido linfoide subyacente

⁸ Cortés-Ortiz Alejandra, QFB, Rodríguez Guadalupe Angeles, M en C, Moreno Escobar Alejandra, QFB, Tenorio-Lara Jesús Manuel QFB, Torres-Mazadieg Benita Pilar, QFB, Montiel-Vázquez Edith, QFB. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México Salud pública, vol.44 no.4 Cuernavaca

⁹ Wolfgang K. Joklink, Hilda P. Willett. Enterobacteriaceae: Salmonella y Shigella, patógenos intestinales Zinsser Microbiología. 18ª Edición Cap 37 pag 708,709.

de las placas de Meyer. En una segunda etapa *Shigella* usa sus invaginas para invadir las células de la mucosa desde abajo, donde están ubicadas las integrinas, para en una tercera etapa diseminarse a células adyacentes, causando la muerte de estas células e inflamación.

La forma como se produce la muerte de las células, no está del todo aclarado. Por un lado cuando las bacterias están multiplicándose en forma intracelular disminuyen los niveles de ATP de la célula y aumentan dramáticamente los niveles de piruvato indicando una alteración del metabolismo energético. Por otra parte *Shigella* puede inducir la muerte celular programada en los macrófagos, un fenómeno llamado, apoptosis lo que sugiere otra vía de muerte celular y, por, supuesto, de inflamación. LPS contribuirá también al daño celular.

La toxina Shiga producida por *S. dysenteriae* es uno de los factores aún no del todo aclarados. Experimentalmente actúa como enterotoxina pero también como neurotoxina y como citotoxina sistémica.

No parece importante ni en la invasión ni en la muerte de las células de la mucosa. Su papel más importante parece estar en una de las complicaciones de las shigelosis, el HUS, donde dañaría las paredes de los vasos sanguíneos.

Muchos de los genes que intervienen en la adherencia, invasión de la mucosa y diseminación se encuentran en un gran plásmido de virulencia. Los genes que intervienen en la invasión son llamados *ipa*. Dos proteínas codificadas por estos genes, *IpaB* y *Ipa C* se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y pueden encontrarse libres en el líquido extracelular. Otras proteínas no están aún bien estudiadas. *IpaB* no solo intervendría en la invasión sino que también lo haría en la liberación en el citoplasma por lisis de las vesículas, probablemente por formación de poros en la pared de las mismas.

Algunos loci cromosómicos contribuyen a la invasión pero codifican sobretodo proteínas reguladoras. Otros genes involucrados en las etapas posteriores de la patogénesis de *Shigella* se encuentran también en el cromosoma (por ejemplo toxina Shiga).¹⁰

¹⁰ Algorta Gabriela, *Bacilos Gram negativos no exigentes enterobacteriaceae, vibronaceae, pseudomonas*. Pag 5 -6.

3.2 RELACIONES GENÉTICAS

El descubrimiento de la transferencia de genes por conjugación y transducción, en el grupo entérico, ha permitido estudiar en detalle, la semejanza genética, que existe entre algunos de sus integrantes. Es posible obtener genóforos híbridos de *E. coli*, con especies de *Salmonella* y *Shigella*; lo cual es indicativo, de que estas bacterias comparten un grado notable de homología, a nivel genético. Esto es confirmado, mediante la comparación de los mapas genofóricos, de las dos especies que han sido sometidas a análisis genético, más detallado: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Hay una correspondencia, en cuanto a la localización de muchos marcadores, en los dos genóforos. La semejanza genética estrecha, entre los grupos *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, también viene indicada, por los niveles elevados de hibridación del ADN-ADN intergenética, que puede ser observado in vitro. Es más, estos experimentos, indican, que el grado de homología, entre el subgrupo *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, con otros grupos de bacterias entéricas, es notablemente bajo. Las bacterias, pertenecientes a otros muchos géneros del grupo entérico, pueden adquirir plásmidos por transferencia conjugativa, a partir de cepas donadoras de *E. coli*, manteniendo dichos plásmidos, como elementos extragenofóricos. Tanto los plásmidos F modificados (por Ej. Los F-lac), como los Plásmidos R, que confieren diversos tipos de resistencia a las drogas, pueden diseminarse ampliamente de esta forma entre los miembros del grupo entérico¹¹.

3.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas para la identificación y diferenciación de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* pueden ser apreciadas en la *Tabla 2*

¹¹ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granada, España*

Tabla 2. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de *Escherichia coli* y especies de *Shigella*).

Fuente: Mac Faddin

CARACTERÍSTICAS	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Motilidad	V+	-	-	-	-
Fermentación de glucosa y gas	(A)	A	A ³	A	A
Lactosa	A ⁴	-	-	-	A ⁶
Citrato	-	-	-	-	-
Indol	+	V	V	V	-
Rojo De metilo	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-
Fenilalanina desaminansa	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	V+	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	V	-	-	-	+
Manitol	A ^a	-	A ⁷	A	A ⁹
Sacarosa	V	-	-	-	A ⁶
Dulcitol	V	-	-	-	-
Salicina	V	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	V+	-	-	-	-
Arabinosa	A	-	-	-	-
Rafinosa	V	-	-	-	-
Ramnosa	V+	-	-	-	-
Melibiosa	A	-	-	-	-
Trehalosa	A	NR	NR	NR	NR
Xilosa	V	-	-	V	V
Amigdalina	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-
ONGP	+	V+	V+	V+	V+
Esculina	V	-	-	-	-
% G+C	48 - 52	49 - 53	49 - 53	49 - 53	49 - 53

+, 90% o más de resultados positivos

-, 90% o más de resultados negativos

V, Resultados variables, 10 a 89% en un sentido o en el otro (+/-)

V+, Resultados variables, en su mayoría positivos

(A), Acido y gas.

A, ácido

A3, *Shigella flexneri*, serotipo 6, producción de gas positiva

A4, puede ser retardado

A6, puede ser retardado

A7, *Shigella flexneri*, serotipo 6, puede ser manitol negativo.

A9, rápida.

NR, No hay resultados disponibles

3.4 ANTIBIOGRAMA

Este método está basado en el uso de una cantidad constante de antimicrobiano, impregnado en un reservorio de papel filtro, el cual al ser aplicado sobre la superficie del agar, en el que ha sido sembrado el microorganismo en cuestión, formará, a medida que se difunde, un gradiente de concentración del antimicrobiano¹². El diámetro del halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco, en base a estándares internacionales¹³, determina si la cepa es sensible o resistente.

3.4.1 Parámetros controlados en la prueba de difusión en agar Bauer – Kirby

Cuando se abre un nuevo frasco de medio de cultivo se controlaron los siguientes parámetros: fecha de vencimiento del medio, si el medio deshidratado no presenta signos de humedad, composición del medio: pH, cationes, timina-timidina, con cepas ATCC.

Cuando se prepara un nuevo lote de medio de cultivo fueron controlados los siguientes parámetros: pH del medio de cultivo, profundidad adecuada del agar, humedad adecuada en el medio de cultivo, esterilidad del medio de cultivo, buen crecimiento en el medio de cultivo con cepas ATCC, la conservación (en refrigeración 4 a 8 °C) previa identificación y rotulación de las fechas de preparación y expiración del medio. (Ver anexos).

3.4.2 Prueba de difusión en agar Bauer-Kirby

- Preparar el inóculo tomando una suspensión directa de la colonia en solución salina al 0.9% a partir de un cultivo en agar no selectivo (agar nutritivo) de 18-24 horas de incubación.
- Ajustar la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. (1.5 a 2×10^8 UFC/ mL).
- Homogeneizar el inóculo en vórtex.

¹² Trigo Christian, Torrico, Elizabeth, Riera, Esteban, Aguilar, Sandra. 2003. *Manual de procedimientos bacteriológicos en sensibilidad y resistencia antimicrobiana*. OPS-OMS. INLASA 1ª edición. EDOBOL. La Paz, Bolivia. pag 21

¹³ Matthew A. Wikler, Franklin R. Cockerill, y cols. 2005. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, USA. Vol.25: 1.

- Introducir un hisopo estéril en la suspensión, haciendo rotar el hisopo presionando contra las paredes del tubo para eliminar el excedente, para luego sembrar suavemente sobre la superficie del medio (Agar Mueller Hinton).
- Posteriormente, colocar los discos sobre la superficie del agar, presionando ligeramente sobre el disco para que no se despegue.
- Incubar las placas de agar en forma invertida en estufa de incubación a 35° C.
- Realizarla lectura después de 18-24 horas de incubación.
- Realizar la interpretación de los halos de inhibición encontrados, utilizando la tabla de la NCCLS (tabla 2ª, documento M 100 – 513).
- Registrar los resultados obtenidos¹⁴.

3.5 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana está definida como "una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico"¹⁵.

Hay dos tipos de resistencia: la adquirida y la clínica. La adquirida se realiza en el laboratorio a través de las mutaciones o por transferencia de genes, sistemas de conjugación, transducción y transformación¹⁶.

La resistencia clínica, es la observada en la práctica médica, donde no todos los organismos son igualmente sensibles o igualmente resistentes a cierto antibiótico y, por tanto, requiere la ayuda de técnicas de laboratorio para medir cuantitativamente o cualitativamente dicho estado¹⁷.

3.6 ANTIBIÓTICOS

Según la definición original, un antibiótico era una sustancia química producida por diversas especies de microorganismos, que era capaz, en pequeñas concentraciones, de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, el advenimiento de métodos sintéticos, ha dado como resultado una modificación de esta definición. El

¹⁴ Torrico, Elizabeth, Trigo Christian. 2003. *Manual de Procedimientos y Control de Calidad Interno Método de Bauer Kirby*. OPS-OMS. INLASA 1ª edición. EDOBOL. La Paz, Bolivia. pag 27 – 31.

¹⁵ *Programas Educativos Especiales, Iladiba*. 1999. *Enfoque Actual de la terapia antibiótica. Presencia UPR en la reforma de Salud y Educación Continua para el Médico Primario*. Colombia. N° 5.

¹⁶ C.D.C. 2002. *Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents*.

¹⁷ Trieu-Cuot, P., M. Arthur, P. Courvalin. 1987. *Origin, Evolution And Dissemination of Antibiotic Resistance Genes*. *Microbiol. Sci.* 4: 263-266.

término antibiótico, ahora se refiere a una sustancia producida por un microorganismo, obtenido total o parcialmente por síntesis química, que en bajas concentraciones, inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Difieren notablemente, tanto químicamente, como en su mecanismo de acción. Por ende, hay poca o ninguna relación entre los antibióticos; excepto por su capacidad, para afectar adversamente, los procesos vitales de ciertos microorganismos

3.7 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS POR SU ESTRUCTURA QUIMICA

3.7.1 QUINOLONAS

Son quimioterápicos sintéticos, derivados de la quinoleína, su actividad primaria es como bacteriostática, de espectro restringido a bacterias Gram-negativas. Las quinolonas más nuevas, contienen átomos de flúor, que les confieren un mayor espectro, incluyendo así, a bacterias Gram- negativas y Gram-positivas

3.7.1.1 Clasificación

Primera generación: ac. Nalidíxico, ac. Oxolínico,

Ac. Pipemídico, Cinoxacino, Rosoxacino.

Segunda generación: Norfloxacino, Ciprofloxacino,

Ofloxacino, Enoxacino, Eefloxacino, Lomefloxacino^{18 19}.

3.7.1.2 Mecanismo de acción

Las quinolonas actúan en el interior de la bacteria, penetrando a través del canal acuoso de las porinas. Son los únicos agentes antibacterianos que ejercen su actividad bactericida, uniéndose a topoisomerasas bacterianas e inhibiéndolas; aunque éste no sería el único mecanismo de acción. Las topoisomerasas son enzimas, que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN bacteriano. El superenrollamiento, permite, a la larga molécula de ADN, empaquetarse dentro de la célula bacteriana. Esta estructura debe ser desenrollada, para permitir diferentes funciones, como replicación,

¹⁸ Sanford, JP, Gilbert DN, Gerberding JL, Sande MA. 1996. *Guide to antimicrobial therapy*, pag .101- 103.

¹⁹ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2001. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*, 5th ed. Approved standard M11A5, Villanova,

transcripción, la separación del cromosoma bacteriano durante la división, y reparación del ADN y todos los procesos celulares en los que participa el ADN. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción. Una inhibición prolongada, conduciría así, a la muerte de la célula.

Existen 4 tipos de topoisomerasas. Las quinolonas actuarían a nivel de la ADN-girasa (también llamada topoisomerasa tipo II) y de la topoisomerasa tipo IV. No actúan a nivel de las topoisomerasas I y III.

La compleja interacción de las quinolonas, con las topoisomerasas, es la base del diferente espectro antibacteriano de las quinolonas, y también de la selección de cepas resistentes. La actividad de las quinolonas, contra las bacterias gram positivas se debe a su acción "blanco" sobre las topoisomerasas IV. En cambio, la actividad contra las bacterias gram negativas, es por su acción "blanco" en las topoisomerasa II o ADN-girasa²⁰.

3.7.1.3 Mecanismo de resistencia

Las quinolonas son fármacos antimicrobianos, derivados del ácido nalidíxico, con una alta actividad contra organismos gram negativos. La introducción de un átomo de flúor, a la estructura básica de las quinolonas, produjo un grupo de antibióticos, constituido principalmente por la ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, norfloxacina y ciprofloxacina. La interacción del átomo de flúor en la posición 6 y de piperazina en la posición 7, incrementan bastante la actividad antimicrobiana. Las quinolonas actúan sobre la ADN girasa, una enzima topoisomerasa tipo II, involucrada en los procesos de replicación, transcripción y recombinación^{21 22}.

La ADN girasa, está compuesta por dos subunidades A, codificadas por el gen *gyrA* y dos subunidades B codificadas por el gen *gyrB*. Produce superenrollamiento negativo

²⁰ Zamudio Erika Juliana. 2003. *Resistencia Bacteriana: Mecanismos de Resistencia*. Programa Universidad Virtual. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

²¹ Garcia-Rey, A, et al. 2002. *Pharmacoepidemiological analysis of provincial differences between consumption of macrolides and rates of erythromycin resistance among Streptococcus pyogenes isolates in Spain*. *Journal Clinical Microbiology*. 40(8): 2959-2963.

²² Yan, S.S., et al. 2000. *Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of Streptococcus pyogenes: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 44(11): 3196-3198

sobre ADN circular, y separa reversiblemente las hebras del ADN concatenado²³. Estos procesos requieren ATP. La enzima ocasiona el rompimiento de las dos cadenas de ADN y posteriormente las reunifica. Estas actividades son inhibidas por quinolonas²⁴. Se ha encontrado in vitro que la subunidad A de la ADN girasa forma un enlace 4-fosfotirosina entre los extremos 5' de las cadenas rotas de ADN y la tirosina 122 de la girasa²⁵. Se piensa que este complejo representa un paso intermedio entre el rompimiento y la reunificación que realiza la ADN girasa sobre el ADN, de manera que las quinolonas inhiben selectivamente la reacción de reunificación. Hasta ahora no han sido descritas enzimas bacterianas capaces de hidrolizar o inactivar quinolonas, sino mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* que producen resistencia a ácido nalidíxico. Otras mutaciones cercanas a la tirosina catalítica 122, de *gyrA*, confieren resistencia a las nuevas quinolonas²⁶. Mutaciones en el gen *gyrB*, seleccionadas con ácido nalidíxico, denominadas NalC y NalB, han sido identificadas en la parte central de la secuencia codificadora de la subunidad B y se deben también a mutaciones puntuales²⁷ ²⁸. La frecuencia de las mutaciones para ácido nalidíxico, es prácticamente la misma en ambas subunidades de la girasa²⁹.

Para la producción de Quinolonas hidrofílicas, recientemente se encontró una proteína denominada NorA, en bacterias resistentes a quinolonas. Esta proteína está involucrada en funciones de transporte, y actúa como una bomba de eflujo, dependiente de energía, para quinolonas hidrofílicas³⁰.

Por otro lado, la resistencia a ácido nalidíxico, conferida por la mutación NalB, se debe a una disminución en la permeabilidad, que revierte al tratamiento con EDTA.(52) Esta mutación no tiene efecto en la susceptibilidad a las nuevas quinolonas, las cuales son

²³ Dritica, K. & Zhao, X. 1997. *AND gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61, 377-92.

²⁴ Veal, W. et al. 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump Due to an *mtrR* Mutation Is Required for Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* J. Bacteriol. 184: 5619-5624.

²⁵ Seppala, et al. 1998. *A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in Streptococcus pyogenes* *Antimicrobial Agent Chemotherapy* 42(2): 257-262, 1998.

²⁶ Yan, S.S., et al. 2000. *Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of Streptococcus pyogenes: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 44(11): 3196-3198

²⁷ Bryskien A 1993. Fluoroquinolones: mechanisms of action and resistance. *Int J Antimicrob Agents*; 3:151-84.

²⁸ Veal, W. et al. 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump Due to an *mtrR* Mutation Is Required for Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* J. Bacteriol. 184: 5619-5624.

²⁹ Pérez-Trallero, E, et al. 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1.684 *Streptococcus pneumoniae* and 2.039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships, results of a 1 year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 45(12): 334-3340.

³⁰ Calvo, A et al. 2005. *Activity of different antimicrobial agents against penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae*. *Revista Española de Quimioterapia*. 14(4):345-350

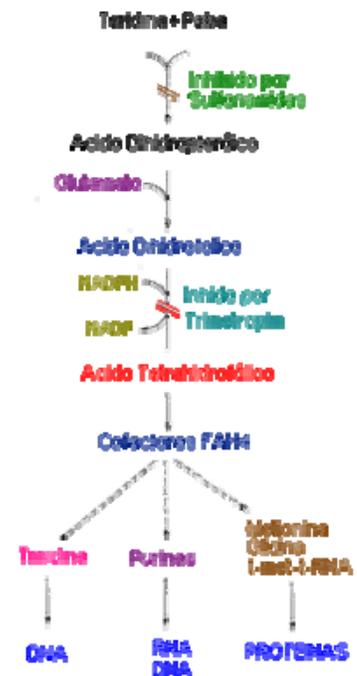
menos hidrofóbicas. En las mutantes resistentes a las nuevas quinolonas, es de vital importancia la hidrofobicidad de la membrana externa, determinada por el tipo de lipopolisacárido presente. Las mutaciones que confieren resistencia a quinolonas, se presentan en el cromosoma bacteriano³¹. Hasta 1987 no se había identificado resistencia a quinolonas mediada por plásmidos y hubo un señalamiento, de un plásmido de 240 Kb en una especie de *Shigella dysenteriae*.³²

Algunos plásmidos de resistencia, parecen aumentar la susceptibilidad de las células a las quinolonas³³, las cuales tienden a eliminarlos, inhibiendo tanto su replicación como su transferencia³⁴.

Algunas mutaciones en *gyrB*, disminuyen la capacidad de las bacterias para actuar como receptoras o donadoras, y para mantener ADN extracromosómico, en forma estable³⁵.

3.7.2 SULFONAMIDAS.

Son quimioterápicos sintéticos, con actividad exclusivamente bacteriostática, cuando actúan en forma aislada, pero puede convertirse en bactericida al asociarse. Poseen amplio espectro bacteriano³⁶. El principal representante de este grupo es el Trimetoprim sulfametoxazol (TMP/SMZ).



3.7.2.1 Clasificación

- Trimetoprim.
- Sulfametoxazol
- Sulfasoxazol

³¹ Bryskien A 1993. Fluorquinolones: mechanisms of action and resistance. *Int J Antimicrob Agents*; 3:151-84

³² Soueysch Hernández Maylen, Beltran Diaz Alfa, Perez Troya Belkis. 2005 Las quinolonas. *Revista medica cubana SINTEFARMA. versión electrónica. RNPS 1815 ISSN 1024-9419*

³³ www.WHO.org World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000 A Message From the Director-General, World Health Organization.

³⁴ Gutierrez Otero W. 1998. *Helicobacter pylori* y su resistencia al Metronidazol en Colombia. *Rev. Colombia Gastroenterología*. 13 (1): 31-33.

³⁵ Poole K. 2000. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2233-2241.

³⁶ Joklik Wolfgang K., Willet Hilda P., Amos Bernard, 1988. *Zinsser Microbiología*; 18 edición, Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 688-696

- Sulfadiazina³⁷

3.7.2.2 *Mecanismo de acción*

Cuando la sulfanilamida, u otra sulfamida, ingresan a la célula bacteriana, compite con el ácido p-aminobenzoico por el sitio activo de una enzima que participa en la síntesis del ácido fólico, por tanto, disminuye la concentración de folato. El descenso de la concentración de ácido fólico, resulta perjudicial para la bacteria, por que es esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas, las bases empleadas en la construcción del ADN, ARN y otros importantes componentes celulares. La inhibición resultante, de la síntesis de purinas y pirimidinas, lleva al cese de crecimiento bacteriano, o a la muerte del patógeno. Las sulfonamidas son selectivamente tóxicas para muchos patógenos, porque estas bacterias producen su propio folato y no pueden captar el cofactor, de forma eficaz. Por el contrario, los humanos no podemos sintetizar folato, y hemos de obtenerlo de la dieta; por ello las sulfonamidas no afectan al hospedero.

La eficacia de las sulfonamidas, esta limitada por el aumento de la resistencia a sulfonamidas de muchas bacterias³⁸.

3.7.2.3 *Mecanismo de resistencia*

La adquisición de resistencia a sulfonamida es usualmente debido a la producción de una dihidropteroato sintetasa alterada que reduce la afinidad por las sulfonamidas, pero no para el ácido aminobenzoico, debido a que tienen una afinidad 10 000 veces menor que la enzima normal codificada por el cromosoma. También puede darse por eliminación de requerimiento de timina. Y disminución de la permeabilidad de la bacteria a la sulfonamida^{39 40}

La resistencia es transferida sobre un plásmido y asociada con transposones. La resistencia a trimetoprim ocurre menos comúnmente. Es usualmente debido a síntesis

³⁷ Ordóñez-Smith. 2000. *Manual Práctico para laboratorios clínicos. Diversas pruebas de sensibilidad y su control de calidad.* Bristol.

³⁸ *Antibióticos: Mecanismos de Resistencia antibiótica*
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma03/parte07/antibioticos/mecres02.htm>

³⁹ Carmona, O, Silva, H. 1994. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos.* Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 13(1):6-18.

⁴⁰ Paul D. Stapleton, Kevin P. Shannon, and Gary L. 1999. *French Construction and Characterization of Mutants of the TEM- 1 -Lactamase Containing Amino Acid Substitutions Associated with both Extended-Spectrum Resistance and Resistance to -Lactamase Inhibitors Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1881-1887,*

mediada por plásmido R de nuevas dihidrofolato reductasas (DHFR), las cuales son menos susceptibles a trimetoprim que a unas naturales. Los genes de resistencia están asociados con transposones⁴¹.

3.7.3 PENICILINAS

Son antibióticos naturales, o semisintéticos, de estructura β -lactámica, con actividad bactericida, de corto, mediano y amplio espectro⁴².

3.7.3.1 Clasificación

Penicilinas naturales:

Penicilina G sódica, Penicilina G potásica -Penicilina V. Penicilina G procaínica, Penicilina G benzatínica

Penicilinas semisintéticas:

Aminopenicilinas: Ampicilina, Amoxicilina, Bacampicilina, Hetacilina

Penicilinas resistentes a penicilinasas: Meticilina, Isoxazolilpenicilina (dicloxacilina, flucloxacilina, oxacilina, cloxacilina)

Penicilinas anti-pseudomonas: Carboxipenicilina (carbenicilina, ticarcilina), Ureidopenicilinas (azlocilina, mezlocilina, piperacilina)

Cefalosporina

Monobactámicos –Aztreonam, Carbapenems -Imipenem-cilistatina

3.7.3.2 Mecanismo de acción

Estos antibióticos tienen un mecanismo de acción común. Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, en especial la formación de puentes cruzados entre las diversas capas de peptidoglicano, que normalmente brinda rigidez a la pared celular y protege a la membrana celular del ingreso de cantidades excesivas de agua a la bacteria, que ocurriría debido a la elevada concentración de solutos en estos microorganismos. La formación de puentes cruzados es efectuada por proteínas con acción de transpeptidasas, denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP's)⁴³.

⁴¹ Low Padilla Eduardo, Esquivel Diego. 2003: *Curso de Manejo Medicoquirúrgico de infecciones odontológicas: Mecanismos de Adquisición de Resistencia Antibiótica*. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

⁴² Livermore D, Yuan, M. 1999. *Beta-Lactamases and extended spectrum Beta-Lactamase*. *Review Clinical Microbiology* 8:557-584.

⁴³ Chirinos Pacheco Julio 2001. *Los Mecanismos de la Resistencia Microbiana*. *Revista Médica del C.I.E.M. Arequipa, Perú*

Penetran la bacteria a través de las porinas para unirse a las PBP's (penicillin binding proteins), enzimas comprometidas en la etapa terminal del "ensamblado" de la pared celular y en el "remodelamiento" de ésta durante el crecimiento y división. Las proteínas PBPs son la diana por excelencia de los antibióticos betalactámicos, a la que se unen por un residuo de serina análogamente a como lo haría el sustrato natural de las PBPs, los residuos de acil-D-alanil-D-alanina del peptidoglicano. Esta unión es reversible, la enzima reconoce al sustrato produciendo una serie de cambios conformacionales en la enzima que acaban formando un complejo no covalente en una segunda reacción el sustrato acila un residuo de serina del centro activo de la enzima uniendo covalentemente el antibiótico a la enzima mediante un enlace tipo ester. La reacción final de desacilación libera la enzima y un producto resultante de la inactivación del antibiótico. Un antibiótico β -lactámico será considerado mejor, cuanto más rápido se una de forma covalente a la enzima y, permanezca unido el mayor tiempo posible, bloqueando y saturando la enzima.

En la destrucción de la bacteria participan también otros factores como la activación de inhibidores endógenos de autolisinas bacterianas. Las autolisinas bacterianas intervienen en el crecimiento de la pared celular generando una serie de rupturas en la estructura del peptidoglicano, en la separación de las células, en el momento de la división celular, en el proceso de transformación genética y la liberación de fagos. Una vez bloqueado el crecimiento celular por la inhibición de las PBPs parece que la acción lítica de las autolisinas acaba por completar el proceso.

Aunque estos antibióticos son bactericidas, su acción requiere que las bacterias estén en multiplicación activa. Si las bacterias son intracelulares, carecen de pared celular o están en reposo, los antibióticos no son eficaces^{44 45}

⁴⁴ Carmona, O, Silva, H. 1994. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 13(1):6-18.

⁴⁵ Herzberg O, Moulton J. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Crystal structure of β -lactamase from *Staphylococcus aureus* PCI at 2.5 Å resolution. *Sci revmedchile@smschile.cl*

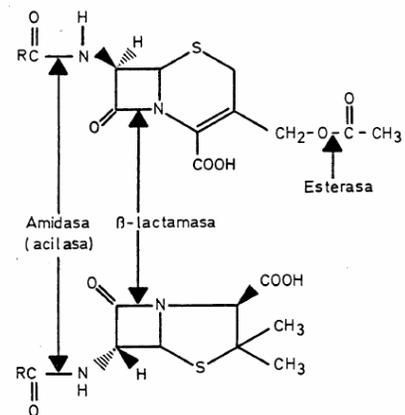
3.7.3.3 Mecanismo de resistencia

La resistencia bacteriana a la penicilina, ya era natural o adquirida in vivo; Es la inactivación de la droga por β -lactamasas. Estas enzimas dividen el anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas entre los átomos C y N para formar compuestos inactivos. La penicilina amidasa también inactiva a la penicilina por remoción de la cadena lateral de acilos.

También se puede dar por modificaciones de las PBP's con disminución de la afinidad por el β -lactámico. Este mecanismo de acción de resistencia a las drogas β -lactámicas se debe a una alteración en la cantidad o afinidad de las proteínas que se unen a la penicilina por el antibiótico. Antes de que los antibióticos β -lactámicos puedan inhibir el crecimiento, deben ser capaces de llegar a sitios blanco susceptibles en la membrana⁴⁶.

Las bacterias gram negativas poseen en el cromosoma un gen (amp C) que codifica para una β -lactamasa más activa frente a cefalosporinas que frente a penicilinas; además, muchos bacilos gram negativos poseen genes reguladores de la producción de esta β -lactamasa ampC. En algunas oportunidades y por procesos de mutación, las bacterias se convierten en productoras de grandes cantidades de la enzima, que aunque no es muy eficaz para destruir los β -lactámicos, es tan grande la producción que al final aparece la resistencia, como se ha observado con *Enterobacter cloacae*. Existen también casos, como en *Escherichia coli* resistente a ampicilina, en los cuales la mayor producción de β -lactamasa ampC es debida a modificaciones en la zona promotora del ampC que le permiten una expresión genética más eficaz⁴⁷.

Cuando la bacteria se vuelve resistente, produce las enzimas, β -lactamasas, las cuales son denominadas por abreviaturas (tem-1, tem-2, ampC, ampR, ampG, ampD, OmpF, OmpC, etc). Por ejemplo, las bacterias que producen tem-1 y tem-2 crean



⁴⁶ Joklik Wolfgang K., Willet Hilda P., Amos Bernard, 1988. *Zinsser Microbiología; 18 edición, Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 244-245, 262.*

⁴⁷ Thomson KS, Sanders CC, Smith Moland E. Use of microdilution panels with and without β -lactamase inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1393-1400.

resistencia contra las cefalosporinas y penicilinas. Cuando producen tem-3 y tem-5, son resistentes a cefalosporinas, penicilinas y cefotaxima. Cuando tienen el oxa - 1 y PSE2 son resistentes a las penicilinas y cloxacilina⁴⁸.

En las Gram-negativas se han descubierto unos 20 tipos de β -lactamasas de codificación plasmídica. Suelen ser enzimas de síntesis constitutiva que se expresan a bajos niveles, y cuya localización es periplásmica; esta localización permite que el antibiótico sea inactivado antes de que llegue a la membrana citoplásmica, donde se localizan las proteínas diana de los β -lactámicos. Algunas de ellas vienen codificadas por genes plasmídicos que forman parte de transposones (p. ej, el Tn1 o el Tn4)⁴⁹

3.7.4 INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS

Con el uso y abuso de los antibióticos han surgido cepas bacterianas resistentes a antibióticos ya sean β -lactámicos o no, principalmente, debido a la producción de enzimas mediadas por plásmidos o transposones. En el caso de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas, etc.) estas enzimas (β -lactamasas) hidrolizan el enlace amida en el anillo β -lactámico del antibiótico y producen derivados ácidos sin actividad antibacteriana. En respuesta a esta resistencia bacteriana, han aparecido combinaciones de antibióticos como los inhibidores de β -lactamasas y otros antibióticos^{50 51}.

Son antibióticos β -lactámicos, de estructura más simple que la penicilina, con un espectro antimicrobiano débil pero, con gran afinidad hacia las β -lactamasas, que, al asociarse con antibióticos β -lactámicos (Amoxicilina, Ticarcilina, Piperacilina Ampicilina, Cefoperazona), pueden vencer la resistencia bacteriana⁵².

3.7.4.1 Clasificación

Inhibidores de β -lactamasas: Ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.

⁴⁸ Martin NG.2000.Aspectos y Tendencias de la Resistencia a β -lactámicos por Bacilos gramnegativos, durante una Década en Centros Médicos de Venezuela. Tesis de Ascenso.

⁴⁹ Iañez Pareja, Enrique. 1998. Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España

⁵⁰ Khan, A et al.2002 Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India Journal Clinical. Microbiology 40: 2009-2015.

⁵¹ Martín NG, Carmona O, Guzmán M. 2000.Una Década en la Evolución de la Resistencia a β -lactámicos por bacilos Gramnegativos en Centros Médicos de Venezuela. Archiv Venez de Farmacol y Terap; 19(2)

⁵² C.D.C. 2002. Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents.

Las combinaciones presentes en el mercado son amoxicilina - clavulanato, ampicilina - sulbactam, ticarcilina - clavulanato, piperacilina - tazobactam y Cefoperazona - sulbactam)

3.7.4.2 *Mecanismo de acción*

Los inhibidores de β - lactamasas al ser más simples y tener mas "expuesto" su anillo β -lactámico tienen una afinidad por las β - lactamasas producidas por las bacterias que al ser hidrolizados por estas forman un complejo enzimático acilado irreversible con lo cual bloquean a la enzima para no continúe hidrolizando más anillos β -lactámicos, permite así "proteger" al antibiótico con el cual se le asoció, para que ejerza su acción pero ya sin resistencia bacteriana.⁵³

3.7.5 CEFALOSPORINAS

Son antibióticos semisintéticos, de estructura β -lactámica, con actividad primariamente bactericida, de amplio espectro

3.7.5.1 *Clasificación*

Cefalosporinas de 1ª generación Orales: cefadroxil, cefalexina, cefradina

Parenterales: cefazolina, cefalotina, cefradina, cefaloridina

Cefalosporinas de 2ª generación Orales: cefaclor,

cefprozil, cefuroxima, Parenterales: cefuroxima

Cefalosporinas de 3ª generación Orales: cefixima,

cefpodoxima proxetil, cefetamet pivoxil, (carbacefems) loracarbef, ceftibuten

Parenterales: cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefodizima, cefonicidid.

3.7.5.2 *Mecanismo de acción*

Al igual que la penicilinas Penetran la bacteria a través de las porinas para unirse a las PBP's (penicillin binding proteins), enzimas comprometidas en la etapa terminal de "ensamblado" de la pared celular y en el "remodelamiento" de ésta durante el crecimiento y división. En la destrucción de la bacteria participan también otros factores como la activación de inhibidores endógenos de autolisinas bacterianas. Aunque estos

⁵³ Khan, A et al. 2002 Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India *Journal Clinical. Microbiology* 40: 2009-2015

antibióticos son bactericidas, su acción requiere que las bacterias estén en multiplicación activa. Si las bacterias son intracelulares, carecen de pared celular o están en reposo, los antibióticos no son eficaces⁵⁴

3.7.5.3 *Mecanismo de resistencia*

Disminución de la permeabilidad del antibiótico a la bacteria por el cierre de porinas de la pared bacteriana.

Modificaciones de las PBP's con disminución de la afinidad por el betalactámico.

Inactivación por beta-lactamasas excretadas al medio extracelular como las Gram-positivas, o presentes en el espacio periplásmico de las Gram-negativas^{55 56}.

3.7.6 FENICOLES

El cloranfenicol y el tianfenicol son antibióticos bacteriostáticos, de amplio espectro y tienen acción bactericida para *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Deben considerarse como fármacos de reserva, dada su potencial toxicidad sobre la médula ósea.

3.7.6.1 *Clasificación*

- Cloranfenicol
- Tianfenicol 2

3.7.6.2 *Mecanismo de acción*

El cloranfenicol inhibe el crecimiento de las bacterias interfiriendo con la síntesis proteica.

El cloranfenicol se une exclusivamente a la subunidad ribosómica 50S. La unión es estéreo-específica, y existe una equivalente de 1 a 1 entre la cantidad de ribosomas presentes y el número de moléculas de cloranfenicol unidas, otros inhibidores antibióticos de la subunidad 50S compiten con el cloranfenicol por esta unión.

⁵⁴ Carmona, O, Silva, H. 1994. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos*. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 13(1):6-18.

⁵⁵ Paul D. Stapleton, Kevin P. Shannon, and Gary L. 1999. *French Construction and Characterization of Mutants of the TEM-1 -Lactamase Containing Amino Acid Substitutions Associated with both Extended-Spectrum Resistance and Resistance to -Lactamase Inhibitors Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1881-1887,

⁵⁶ Livermore D, Yuan, M. 1999. *Beta-Lactamases and extended spectrum Beta-Lactamase*. *Review Clinical Microbiology* 8:557-584.

Dado que la formación de polirribosomas continúa en ausencia de síntesis proteica, la droga no interfiere con la iniciación de la síntesis de proteínas. El cloranfenicol inhibe la formación de uniones peptídicas⁵⁷.

3.7.6.3 *Mecanismo de resistencia*

La resistencia al cloranfenicol suele deberse a una enzima inactivante de dicho antibiótico, denominada cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT), que normalmente está codificada por genes plasmídicos o genes cromosómicos (1003 pb). Uno de los genes de CAT de Gram-negativas más estudiados forma parte del transposón Tn9.

La CAT convierte el cloranfenicol en su derivado 3-acetoxi, usando el acetil-CoA; a continuación una reacción química (no catalizada por enzima) hace que el grupo acetoxi pase a la posición 1; finalmente ocurre una segunda acetilación catalizada enzimáticamente, que genera el producto final, 1,3-diacetoxi-cloranfenicol. Los derivados mono o diacetilados del cloranfenicol son inactivos como antibióticos⁵⁸

Estos derivados son incapaces de adherirse a la subunidad 50s ribosomal de la bacteria y por tanto no se da la función normal del cloranfenicol que es inhibir la actividad de la peptidiltransferasa. Hay diferentes tipos de cloranfenicol acetiltransferasas producidas también por diferentes especies bacterianas. A pesar del uso limitado del Cloranfenicol la resistencia se presenta incluso en la E. coli aunque se ve mas frecuentemente en organismos que tienen resistencias múltiples a otros agentes⁵⁹

3.8 BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA

Una cepa bacteriana puede volverse resistente a un antibiótico gracias a dos procesos básicos, a saber: mutaciones puntuales y la adquisición de fracciones de genes de resistencia procedentes de otras bacterias (evento en el que intervienen los plásmidos). Tal proceso es favorecido por el rápido crecimiento bacteriano y la poca carga genética de estos microorganismos. Una mutación puntual en un nucleótido y el subsecuente cambio en la cadena de aminoácidos, puede originar alteraciones estructurales en el

⁵⁷ Joklik Wolfgang K., Willet Hilda P., Amos Bernard, 1988. *Zinsser Microbiología; 18 edición, Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 235.*

⁵⁸ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España*

⁵⁹ Low Padilla Eduardo. Esquivel Diego. 2003: *Curso de Manejo Medicoquirúrgico de infecciones odontológicas: Mecanismos de Adquisición de Resistencia Antibiótica. Universidad Nacional de Colombia. Bogota*

sitio activo de la unión con el antibiótico, el cual se torna inefectivo, aunque la bacteria conserva su viabilidad y patogenicidad).

La adquisición de fracciones de genes procedentes de otras bacterias, supone el problema más serio, ya que: es la adquisición, por parte del microorganismo, de genes para la resistencia, transportados en plásmidos extracromosómicos, mediante transducción, transformación o conjugación.

Este mecanismo es más frecuente que el mutacional, se disemina rápidamente. Aún entre diferentes especies bacterianas, puede conferir resistencia a varios antibióticos a la vez, y a diferencia del anterior, no suele ser una desventaja adaptativa, es decir, no disminuye la tasa de crecimiento de la bacteria ni la hace perder sus propiedades de virulencia.

3.9 ADQUISICIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE OTRO MICROORGANISMO QUE CODIFICA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Hay genes presentes fuera de la estructura cromosómica normal de la bacteria. Los genes pueden ser transmitidos entre bacterias de la misma o diferente cepa, así como a otras especies, e incluso a otros géneros. Así, cada nueva progenie, llega a ser resistente, y potencial donador de rasgos de resistencia, a innumerables bacterias de un medio.

El material genético extracromosómico en las bacterias es contenido primariamente en plásmidos y transposones.

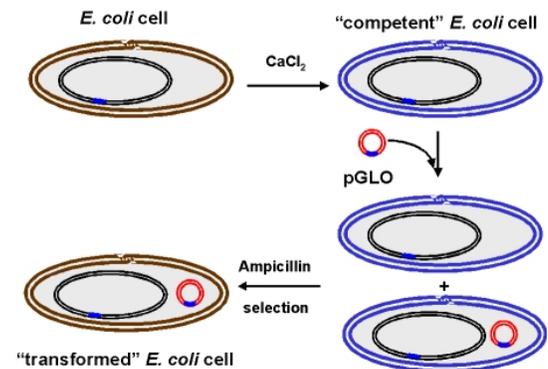
La combinación del material genético cromosómico y extracromosómico, da a las bacterias versatilidad genética y la posibilidad de desarrollar resistencia a antibióticos y nueva patogenicidad.

La adquisición de material genético de otro microorganismo, que codifica resistencia antibiótica, es el proceso más común, a través del cual, la resistencia antibiótica es diseminada. Esto se logra principalmente, a través de tres mecanismos de bacteria a bacteria: Transformación, Transducción y Conjugación; además, una vez adquirida la resistencia, esta puede ser transmitida de célula madre a célula hija⁶⁰.

⁶⁰ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granada, España*

3.9.1 Transformación

La transformación, consiste en la obtención, por parte de una célula receptora de un fragmento de ADN y la incorporación de esta molécula, al cromosoma de esta célula, en una forma heredable. En la transformación natural, el ADN procede de una bacteria donante. Es un proceso al azar, y puede ocurrir entre bacterias de la misma o diferentes especies. Cualquier



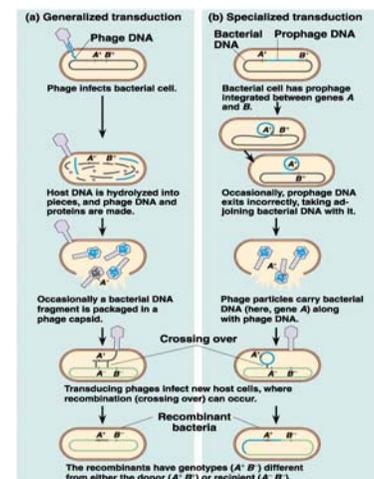
porción del genoma de la célula donante, puede incorporarse, siempre y cuando, sea igual o similar a la de la célula hospedera. El ADN de la célula donante debe tener las siguientes características: ser de doble hélice, similar al ADN de la célula receptora, de bajo peso molecular y de tamaño pequeño⁶¹.

La transformación, es un proceso de transferencia de genes, donde la célula bacteriana, capta ADN desnudo, a partir del medio; lo incorpora y expresa. Para que la célula pueda captar el ADN desnudo, debe encontrarse en estado de "competencia". El estado de "competencia", ocurre naturalmente, en algunos microorganismos (Competencia Fisiológica), y puede ser inducido artificialmente en otros (Competencia Artificial). El ADN exógeno, puede integrarse mediante recombinación, al cromosoma, o a un plásmido; o puede establecerse como un replicón autónomo.

La transformación, está dividida en diferentes etapas, que son comunes a todas las bacterias: desarrollo de la competencia, unión del ADN, procesado y captación del ADN, integración del ADN por recombinación, y expresión⁶².

3.9.2 Transducción

La transducción es la transferencia de genes, de una bacteria, a otra, por medio de un virus. La incorporación de genes bacterianos, al interior de la cápside de un fago, ocurre a



⁶¹ Serrano Núñez, Yolanda. 2004. *Genética Bacteriana – Microbiología General*. Recinto de Bayamón. Universidad Interamericana de Puerto Rico, 1

⁶² Castellón Reynaga, Dylían. 2001. *Genética Microbiana, Capítulo V. Carrera de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología*. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMON, Cochabamba – Bolivia.

consecuencia de errores cometidos, durante el ciclo duplicativo del virus. Cuando el virus que contiene estos genes, infecta a una nueva bacteria, éste, tiene la capacidad de transferirlos al cromosoma de ésta. La transducción es el mecanismo más frecuente, de intercambio y recombinación genética en las bacterias. Hay dos tipos diferentes de transducción: la generalizada y la especializada⁶³

3.9.3 Conjugación

Es un proceso, que ocurre entre dos bacterias compatibles, las cuales, se ponen en contacto directo, mediante un puente de conjugación, o pili, de tal manera, que una pequeña proporción del cromosoma, o plásmido de una de las células, es transferido a la otra. En otras palabras, el EXOGENOTE del donador puede ser Plasmídico o Plasmídico y Cromosómico; y es transferido de una Célula Donadora, a una Receptora. Algunas bacterias y géneros donde ocurre Conjugación son: *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.

Este proceso es unidireccional, y requiere de contacto directo, entre dos células de tipo sexual opuesto, y está mediado por plásmidos, y en él intervienen activamente enzimas, como las nucleasas, ligasas y los Pilis sexuales.

En *E. coli*, el proceso de Conjugación del total de su genoma, dura 90 minutos y pasan 3.000.000 de pares de nucleótidos⁶⁴.

El descubrimiento de la transformación, había revelado ya la existencia de recombinación genética, entre porciones de genomas bacterianos. En mitad de los años 40, la pregunta que se planteaba era: ¿existe algún tipo de recombinación bacteriana que suceda al estilo de la reproducción sexual de los eucariotas?

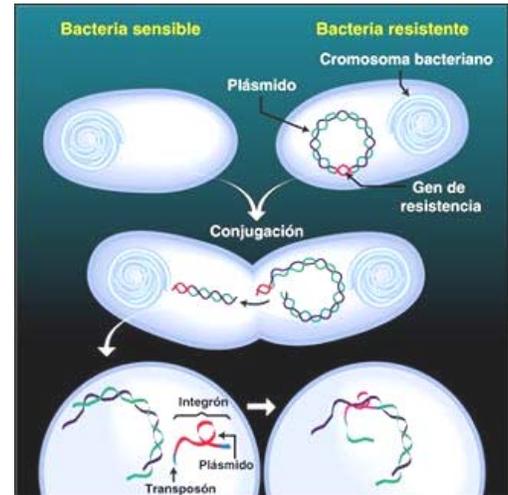
Se descubrió, que ciertas bacterias presentan una forma de recombinación, que recordaba en algunos rasgos a la sexualidad: un tipo de célula donadora ("macho") donaba directamente parte de su material genético a otro tipo (la receptora, equivalente a la "hembra"), con ulterior recombinación entre ambos. A este fenómeno se le denominó conjugación, por su similitud aparente con lo que sucede en eucariotas. Sin

⁶³ Serrano Núñez, Yolanda. 2004. *Genética Bacteriana – Microbiología General. Recinto de Bayamón. Universidad Interamericana de Puerto Rico, 1*

⁶⁴ Montealegre A., Jaime R. 2004. *Genética Microbiana. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile.*

embargo, la conjugación no es una forma auténtica de sexualidad al estilo de los eucariotas.

Con la perspectiva de los años, se puede decir, que el descubrimiento de la conjugación bacteriana fue uno de los más fortuitos, pero al mismo tiempo, de los más felices y trascendentales de toda la Biología del siglo XX. Muchos biólogos habían intentado infructuosamente demostrar conjugación de tipo "sexual" en bacterias. Lederberg y Tatum (1946), que a la sazón investigaban en la Universidad de Yale, tuvieron la enorme suerte de "escoger" (sin saberlo a priori), una de las pocas



especies bacterianas (*Escherichia coli*), que presentan sistemas naturales de conjugación, y aún más, la cepa concreta denominada K12, que llevan uno de estos sistemas... Pero todavía mejor: como se descubriría muchos años después, el sistema conjugativo de dicha cepa es casi único por su capacidad de conjugación permanente, no estando sometido a los controles negativos típicos de la inmensa mayoría de los demás sistemas que luego se descubrieron. En resumen, un extraordinario "golpe de suerte" en el año 1946 dio el "pistoletazo de salida" para una de las épocas más gloriosas de la Biología, contribuyendo de modo excepcional al origen de la Biología Molecular⁶⁵⁶².

3.9.3.1 FISIOLÓGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CONJUGACIÓN

Podemos distinguir en la conjugación dos grandes fases: contactos entre células F^+ (o, en su caso, Hfr) y F^- y la transferencia del ADN.

En el contacto entre las células F^+ y F^- , las células F^+ (o las Hfr) forman de 1 a 10 pelos sexuales. El pelo interacciona específicamente, a través de su punta, con un receptor de la célula F^- (concretamente, parece ser que se trata de la proteína OmpA, de la membrana externa).

⁶⁵ Castellón Reynaga, Dylían. 2001. *Genética Microbiana, Capítulo V. Carrera de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN, Cochabamba – Bolivia*

En los cruces se ha visto que más que parejas de cruce existen agregados de cruce, donde varias células de ambos tipos (hasta unas 20) se encuentran relacionadas por contactos directos. Las cosas ocurren de la siguiente manera:

Una célula F^+ contacta por medio de la punta de su pelo F con el receptor de superficie de una F^- . El pelo F se va despolimerizando desde su base, lo cual provoca la apariencia de que se va retrayendo. En ese movimiento de retracción, la célula F^- se va acercando a la F^+ .

Cuando el pelo se termina de desintegrar, las células se ponen en contacto directo pared-pared. Se forma un puente conjugativo que pone en contacto los citoplasmas de ambas células. Las parejas o agregados de cruce se estabilizan por la acción de los genes *traN* y *traG* del plásmido F, y de *ompA* de la célula F^- . La proteína producida por *traD* (localizada en ambas membranas, citoplásmica y externa) parece que facilita el transporte del ADN a la célula receptora. Tras cierto tiempo de conjugación, el agregado se desagrega de forma activa.

La transferencia de ADN desde una célula F^+ a una F^- es un proceso especial de replicación asimétrica por círculo rodante. Se da un corte específico de una de las cadenas de F a nivel de la secuencia *oriT*. El corte lo realiza el complejo {TraY+TraZ}, que se localiza anclado en el poro o canal de conjugación. Así pues, este complejo actúa en este momento como una endonucleasa específica que corta en una sola de las cadenas de F, dentro de la secuencia *oriT*.

El producto del gen *traM* suministra la señal, por un mecanismo desconocido, para desencadenar la transferencia.

El extremo 5' generado en el corte a *oriT* entra a la célula receptora, pero dicho extremo permanece unido al complejo {TraY+TraZ}. La transferencia progresa en el sentido 5' \square 3'. El complejo {TraY+TraZ} actúa ahora como una helicasa de tipo I, de modo que va desenrollando la doble hélice del F, separando las dos hebras, e hidrolizando ATP simultáneamente (o sea, la helicasa de F es una ATPasa dependiente de ADN). De esta forma se va desenrollando la doble hélice a razón de unas 1200 pb/seg.

En la síntesis conjugativa del ADN, se producen dos procesos simultáneos de síntesis de ADN, uno en cada célula:

En la síntesis de la cadena de reemplazo del donador, se opera de modo continuo (sería equivalente a la síntesis de la cadena adelantada de la replicación normal). Esta síntesis se inicia a partir de un ARN cebador ("*primer*" en inglés) sintetizado por un primosoma que reconoce una secuencia (n') situada cerca de *oriT*.

En la síntesis de la cadena complementaria en el receptor a diferencia de la anterior, es discontinua, a base de fragmentos de Okazaki (por lo tanto, sería la equivalente de la síntesis de la cadena retrasada).

En ambos casos parece ser que el primosoma responsable de los ARN cebadores no es exactamente idéntico al que se emplea en la replicación "normal", sino que está modificado por alguna función específica codificada por el plásmido F (una primasa específica del factor F).

En la circularización del ADN transferido y replicado, y adquisición de configuración final, no se sabe exactamente cómo ocurre la circularización (o sea, cómo se vuelven a ligar los extremos generados por la rotura descrita en el apartado 1º). Parece ser que el complejo {TraY+TraZ} "guarda" la energía del enlace fosfodiéster que él corta (conservándola al unirse con el ADN cortado), y luego la vuelve a emplear para "sellar" el corte una vez que las cadenas han sido replicadas-y-transferidas (o sea, el complejo actuaría al final como una "ADN-ligasa"). Posteriormente, sobre esta molécula circular cerrada covalentemente y aún "relajada", actúa la ADN-girasa, introduciendo superenrollamiento negativo. En esta configuración, el plásmido F queda intacto y funcional en el transconjugante.

En el caso de cruces Hfr x F⁻, al menos una parte del fragmento cromosómico "arrastrado" desde el donador al receptor se recombina, con un doble sobrecruzamiento (por el sistema de RecA) con la porción homóloga del endogenote, lo que lleva a sustitución de unas secuencias por las otras.

En el caso de plásmidos multicopia, el formado, inicialmente, se une a la membrana rápidamente, iniciando un nuevo replicón y así, cuando comienza el ciclo de replicación celular, existen ya varias copias del plásmido.

Existe un fenómeno interesante, que tiene que ver con las interacciones entre superficies celulares: se trata de la exclusión superficial, y consiste en un sistema por el que se evita que las células de tipo F⁺ puedan actuar como receptoras frente a otras F⁺.

Se sabe que la acción de dos genes del plásmido F realizan esta función: *traT*: su producto se sitúa en la membrana externa, impidiendo la formación de contactos con pelos sexuales de otra célula *traS*: su producto, situado en la membrana citoplásmica, evita la entrada de ADN desde otra célula F^+

Otro fenómeno que se puede observar en los cruces $F^+ \times F^-$ es la zigosis letal. Ocurre cuando la proporción de células F^+ es muy superior a la de F^- (p. ej., de 10:1). En este caso, las células receptoras pueden morir, debido a que están siendo modificadas en muchos puntos de su superficie por numerosos contactos con células F^+ .⁶⁶

3.9.3.2 REGULACION GENÉTICA DE LA CONJUGACION

La mayor parte de los plásmidos conjugativos (pero curiosamente no el F) tienen un control negativo de su transferencia, de modo que sólo se transfieren a alta frecuencia durante unas pocas generaciones, al cabo de las cuales se establece una baja frecuencia de conjugación. El resto del tiempo, los genes *tra* están reprimidos.

La regulación en un plásmido que sí tiene control negativo: como el R1, perteneciente a otro grupo de incompatibilidad (IncFII) distinto del F, pero que por lo demás tiene funciones similares: se produce por la acción de los genes *finO* y *finP*, e implica un mecanismo basado en ARN regulatorio antiparalelo (antisentido). *finO* está situado distalmente respecto del gran operón *traY.....Z*. *finP* está situado en la zona proximal, superpuesto de hecho con el gen *traJ*, transcribiéndose en sentido opuesto, a partir de la cadena opuesta a la que se usa para la transcripción de *traJ*. El ARN producido por transcripción de *finP* es antiparalelo respecto de una parte del ARNm del gen *traJ*. El producto de *traJ* es un activador de la transcripción del gran operón *traY.....Z*. Ahora bien, el ARN antiparalelo de *finP* tiende a emparejarse con la porción 5' del ARNm de *traJ*, ocultando la secuencia de Shine-Dalgarno. La conjunción de la expresión de *finP* y de *finO* (que produce una proteína represora) tiende a dificultar la expresión (a nivel traduccional y transcripcional) del gran operón *tra*.

⁶⁶ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granada, España*
http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/27_micro.htm

La superposición de un sistema de regulación positiva (por *traJ*) con otro de regulación negativa (por *finO* + *finP*) es la responsable de una importante característica de muchos plásmidos conjugativos: su dispersión esporádica de tipo epidémico entre poblaciones bacterianas: Supongamos que partimos de una población donde originalmente casi todas las células son de tipo infértil (F^- o R^-), y donde existe una minoría de células poseedoras de un plásmido conjugativo con el tipo de regulación que acabamos de describir. Cuando alguna de las células infértiles reciban por conjugación una copia del plásmido, tiene que pasar un tiempo (contado en generaciones de divisiones celulares) hasta que se vayan acumulando los productos de los genes *finO* y *finP* hasta que alcancen una concentración suficiente como para inhibir la conjugación. Por lo tanto, durante unas pocas generaciones el plásmido tiene una gran tendencia a transferirse a células F^- . Se dice que durante ese tiempo ocurre una alta frecuencia de transferencia (HFT). De este modo, bastan esas pocas generaciones para que el plásmido se disemine de forma epidémica a casi toda la población. Al cabo de ese tiempo, la acumulación del ARN de *finP* y de la proteína de *finO* llega a un nivel que ya es capaz de inhibir la conjugación eficazmente. El cultivo pasa, pues, a la modalidad de baja frecuencia de transferencia conjugativa (LFT). Sin embargo, para cuando se haya establecido este control, prácticamente todas las células se habrán convertido ya en F^+ . Estamos, pues, ante un sistema de conjugación que permite "prever" su propia desconexión (con el consiguiente ahorro), una vez que se ha logrado el "objetivo" de haberse diseminado a la población

Como acabamos de exponer, este sistema asegura la rápida dispersión epidémica de los plásmidos, de modo que la represión de la transferencia se produce coincidiendo con la situación en la que de hecho el plásmido conjugativo ha "invadido" toda o casi toda la población, ahorrándose la energía y materiales que tendría que dedicar a fabricar pelos sexuales y demás funciones conjugativas en unas circunstancias en las que serían superfluos.

Pero además, como se recordará, los pelos sexuales son la zona de reconocimiento de una diversidad de fagos (p. ej., para los pelos F existen diversos fagos icosaédricos de genomio ARN que se adsorben a los laterales del pelo, y fagos filamentosos de ADN que comienzan su infección uniéndose a la punta del pelo sexual). Cabe imaginar que

la represión de las funciones *tra* (entre ellas, claro está, la fabricación del pelo) son una ventaja para la bacteria, al evitar que durante la mayor parte del tiempo puedan iniciar la infección dichos fagos específicos⁶⁷.

3.10 PLÁSMIDOS

En 1955 se presentó el caso de una japonesa, que había contraído en Hong Kong, una incurable disentería por *Shigella*. El germen responsable, presentaba la particularidad, hasta entonces inaudita, de ser resistente a las sulfanilamidas, a la estreptomycin, al cloranfenicol y a la tetraciclina. Semejante ejemplo de resistencia, provocó en Japón muchas investigaciones en varias direcciones. En 1960, los bacteriólogos japoneses, descubrieron la clave del enigma: la *Shigella* había adquirido su factor de resistencia de una bacteria común del intestino, *Escherichia coli*, y se la había transmitido a otras *E. coli* y a otras *Shigella*. Este factor no era cromosómico, se le dio un nombre genético, “episoma”, que designaba una vaga entidad. En realidad, el americano Lederberg, había descubierto este factor en 1952. Era un elemento celular bacteriano, independiente de los cromosomas, pero que contenía una pequeña cantidad de material genético: el plásmido. Sin embargo, ni los japoneses ni los biólogos de otros países establecieron al principio una relación entre el plásmido y el misterioso episoma que había actuado en el intestino de la japonesa.

La relación se estableció en 1965. Entonces comenzó un inventario de todas las variedades de plásmidos bacterianos.

La recombinación genética, que hacía que ciertos gérmenes, se volvieran resistentes a los antibióticos, se efectuaba por transferencia de plásmidos que contenían la información genética, que permitía a las bacterias segregar las enzimas destructoras de los antibióticos. La transferencia de bacterias resistentes, a bacterias no resistentes, se llevaría a cabo durante el intercambio sexual entre ellas (Lederberg había descubierto la sexualidad de las bacterias en 1945; hasta entonces, se había supuesto que se multiplicaban por división celular). De este modo, también se tenía la clave, del descubrimiento, que Griffith realizara treinta y siete años antes.

⁶⁷ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Mecanismos de Regulación en la Conjugación Bacteriana*, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/27_micro.htm

3.10.1 Características

Son pequeños trozos extracromosómicos de ADN, circular, cerrados (por enlaces covalentes), que normalmente, replican de manera autónoma, en el citoplasma bacteriano. Son fácilmente intercambiados entre diferentes bacterias, de igual o distinta especie, y normalmente, portan genes no esenciales para crecimiento y multiplicación de la célula, mas bien, codifican para diversos grupos de proteínas. Puede llevar una variedad de genes diferentes, cada uno aportando resistencia para distintos tipos de antibióticos. Pueden codificar para genes que permiten la producción de toxinas o pili, permiten al hospedero usar fuentes de energía alternativas, expresar factores de virulencia, proveer resistencia a metales pesados así como funciones de transferencia y replicación.

La resistencia mediada por plásmidos ocurre en la mayoría de las especies bacterianas, puede ser a múltiples drogas, y presenta una alta tasa de transferencia de una célula a otra, usualmente por conjugación (pero también por transformación y transducción).

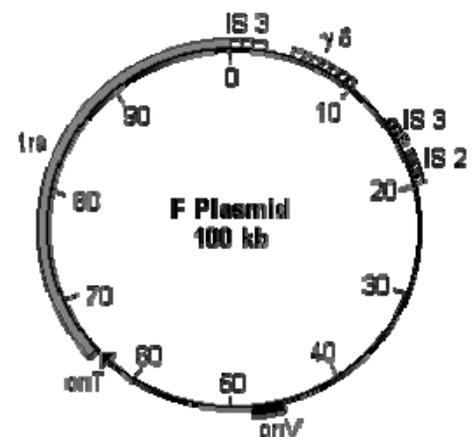
En resumen, se cree que los plásmidos proveen la flexibilidad necesaria a la bacteria, para enfrentar condiciones ambientales cambiantes, como la contaminación de su ecosistema con metales pesados, u otros agentes, como los antibióticos.

Ha sido demostrado, que algunos plásmidos, contienen una región móvil, denominada transposón, que está limitada por secuencias altamente repetidas. Esta característica, le permite moverse del plásmido al ADN cromosómico y viceversa. La inserción de un transposón, a un gen, interrumpe ese gen, y codifica para rasgos parecidos, como por ejemplo resistencia antibiótica.

La relación entre un transposón y su hospedero, es semejante a la de un parásito y su hospedero.

La importancia de los transposones, radica en la expansión del rango de células hospederas, a las cuales transfiere genes de resistencia. Evidencia

actual, sugiere que la resistencia a penicilina, y tetraciclina, se ha diseminado ampliamente, por plásmidos que contienen transposones.



IS 3 & IS 2 = insertion sequences
 γδ = transposon Tn1000
 oriV = origin of replication
 oriT = origin of conjugal transfer
 tra = tra functions

La resistencia de origen cromosómico (mutaciones), es un problema clínico, menor que la transferencia genética, de resistencia por plásmidos y transposones, ya que esta última ocurre más frecuentemente⁶⁸ **¡Error! Marcador no definido..**

3.10.2 Estructura y replicación

Un plásmido bien conocido, es el plásmido F de E. coli. El plásmido F, es conjugativo, y se puede transferir a una célula receptora por si mismo, a través de un ADN cromosómico donador. El plásmido F es una molécula circular de 94.500 pares de bases, y contiene varios genes, para los procesos de replicación, y de transferencia. Además, los plásmidos F, contienen secuencias específicas, de ácidos nucleicos, que le permiten recombinarse con el cromosoma bacteriano para formar cepas Hfr.

Los plásmidos, se replican de un modo similar al cromosoma. Esto incluye inicio de la replicación, en un origen (oriT), y replicación bidireccional, al rededor de un círculo. Debido al pequeño tamaño del ADN del plásmido, en relación al del cromosoma, todo el proceso de replicación, ocurre con mucha rapidez, posiblemente en la décima parte, o menos del tiempo que transcurre para el ciclo de división celular. Las enzimas que intervienen en la replicación del plásmido, son enzimas normales en la célula, de modo que los elementos genéticos en el plásmido, mismos que controlan la replicación, pueden intervenir principalmente en el control del tiempo del proceso de iniciación y con la distribución de los plásmidos replicados, con las células hijas. Aunque los plásmidos, son elementos genéticos que se replican en forma independiente, su replicación está bajo el control celular. La cantidad de moléculas de plásmidos, por célula, y las condiciones del medio. Algunos plásmidos, como el F, se encuentran en la célula en solamente algunas copias, posiblemente de una a tres⁶⁹. Otros plásmidos pueden alcanzar tantas copias en una célula como hasta 700⁷⁰

⁶⁸ Low Padilla Eduardo. Esquivel Diego. 2003: *Curso de Manejo Medicoquirúrgico de infecciones odontológicas: Mecanismos de Adquisición de Resistencia Antibiótica*. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

⁶⁹ Broca thomas D. "Microbiología". Editorial PRENTICE may HISPANOAMERICANA S.A. Mexico. 6° edición. cap 7: 273

⁷⁰ Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, U.S.A.

3.10.3 Clasificación

Existe una amplia variedad de plásmidos. Los plásmidos bacterianos son de muchos tipos distintos, pero a grandes rasgos, podemos clasificarlos atendiendo a diversos caracteres:

Según que sean autotransmisibles por conjugación o no:

- Plásmidos conjugativos
- Plásmidos no conjugativos. Dentro de esta categoría se incluyen:
 - plásmidos no movilizables
 - plásmidos movilizables por otros que sí son conjugativos.

Según su control de replicación vegetativa:

- Plásmidos de control estricto del número de copias: tienen bajo número de copias por cromosoma en la misma célula. Suelen ser plásmidos de tamaños medianos (unas 30 kb) a grandes (cientos de kb) Por ejemplo, el factor F se mantiene a 1-2 copias por cromosoma.
- Plásmidos de control relajado: alto nº de copias por cromosoma (más de 10). Suelen ser plásmidos pequeños (menos de 10 kb). Algunos de ellos tienen un sistema de replicación especial, y son amplificables cuando a las bacterias que los poseen, se les añade cloramfenicol: este antibiótico detiene la síntesis de proteínas, lo que afecta a la replicación del cromosoma, ya que para que se inicie cada ciclo de replicación cromosómica se necesita un nuevo "pool" de determinadas enzimas. Pero esto no afecta a la replicación del plásmido, que de esta manera se "amplifica" y aumenta aún más su proporción respecto del cromosoma.

Según el tipo de fenotipos que codifican (dejando aparte a los plásmidos crípticos, de los que se desconoce su función fenotípica):

- Plásmidos R, que codifican una o más factores de resistencia a drogas (antibióticos) y/o resistencia a metales pesados.
- Plásmidos bacteriocinogénicos, que codifican alguna bacteriocina, y, confieren simultáneamente, inmunidad frente a esa bacteriocina, a la bacteria que lo posee. Dentro de ellos, de los más estudiados son los plásmidos Col, que producen colicinas (bacteriocinas de E. coli).
- Plásmidos de virulencia, que codifican funciones relacionadas con la virulencia en muchas bacterias patógenas.

- Plásmidos que codifican factores de colonización (para la invasión de los tejidos de su hospedador).

Existen igualmente plásmidos que codifican más de un tipo de fenotipos: p. ej., plásmidos que suministran resistencia a antibióticos y capacidad de virulencia.

Plásmidos según el grupo de incompatibilidad. Dos plásmidos son incompatibles (no pueden permanecer establemente en la misma célula), porque comparten un mismo sistema de replicación y segregación de las copias. Así por ejemplo, el plásmido F pertenece al llamado grupo IncFI; Los plásmidos R1 y R100, de resistencia a antibióticos, pertenecen al grupo IncFII.

En algunas especies, como ocurre con *Oenococcus oeni*, bacteria Gram positiva, el plásmido conjugativo pVA797 ha sido transferido desde *Streptococcus sanguis* a *O. oeni* a través de *Lactococcus lactis*. Las eficiencias de este proceso son muy bajas, y se han obtenido transconjugantes en los que el plásmido original ha sufrido varias deleciones y reorganizaciones, dando lugar a otro plásmido más pequeño denominado pLO1. Una mayor eficiencia de transconjugantes se consiguió al transferir el plásmido pIP501 desde *S. sanguis* a *O. oeni* vía *L. lactis*.

Al igual que en el caso anterior, el plásmido que presentaban los transconjugantes era de menor tamaño, habiendo sufrido deleciones extensas en todos los casos, que afectaban a las regiones de transferencia conjugativa y la estabilidad de los plásmidos originales. Como dato curioso del comportamiento de estos plásmidos reorganizados y delecionados inestables en *O. oeni*, al ser transferidos a *L. lactis* presentan una estabilidad completa en esta bacteria láctica. En otras palabras, ha sido posible introducir plásmidos conjugativos en *O. oeni*, pero con una baja eficiencia y dando como producto unos plásmidos menores y bastante inestables⁷¹.

3.10.4 Plásmidos R

Los plásmidos, a menudo confieren resistencia contra los antibióticos, a las bacterias que los contienen. Los factores R o Plásmidos R, contienen de forma característica, genes que codifican enzimas capaces de destruir o modificar antibióticos. No suelen estar integrados en el cromosoma del hospedero. Estos plásmidos poseen genes, que codifican la resistencia a antibióticos, como la ampicilina, el cloranfenicol, y la

⁷¹ Ferrer Sergi; 2005. *Oenococcus oeni*. ENOLAB - Laboratorio de Microbiología Enológica; Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia; Burjassot, Valencia, España

kanamicina entre otros. Algunos plásmidos R contienen un solo gen de resistencia, mientras que otros, pueden tener hasta ocho. Con frecuencia los genes de resistencia se encuentran en un elemento transponible, de forma que las cepas bacterianas pueden desarrollar con rapidez plásmidos que codifican múltiples resistencias.

Debido a que muchos plásmidos R, también son plásmidos conjugativos, pueden propagarse en toda una población, aunque no con la misma rapidez que el factor F. Con frecuencia, los factores R no conjugativos, también pasan de una bacteria a otra, durante la conjugación, promovida por plásmidos. De esta forma, toda una población puede hacerse resistente a los antibióticos. El hecho de que, algunos de estos plásmidos se transfieran fácilmente entre especies, promueve aún más la diseminación de resistencia. Cuando el hospedero consume grandes cantidades de antibióticos, se seleccionan *E. coli* y otras bacterias con factor R y se hacen más prevalentes. Los factores R, pueden entonces, ser transferidos a géneros más patógenos, como *Salmonella* o *Shigella*, causando incluso mayores problemas de salud pública⁷².

Existen plásmidos R de distintos grupos de incompatibilidad. Son abundantes en *Pseudomonas* y en Enterobacterias, desde donde pueden ser transferidos, a una amplia gama de bacterias Gram-negativas (plásmidos promiscuos).

E. coli es portadora de plásmidos R que regulan la resistencia a uno o más medicamentos. Los plásmidos R pueden ser transferidos de una especie bacteriana a otra, como de *E. coli*, a cepas patógenas de *Shigella* o *Salmonella* (Kimber, 1983). Las cepas de bacterias resistentes a los antibióticos han llegado a ser un serio problema de salud, debido a que, la proporción de bacterias entéricas, que transportan plásmidos para resistencia a drogas múltiples, ha aumentado lentamente durante los últimos 25 años⁷³.

3.11 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA DE BIRMBOIN Y DOLY

- Resuspender las cepas cultivadas en 2ml. de STE, con ayuda de vórtex.
- Luego centrifugar a 3500 xg, durante 5 minutos.

⁷² Montealegre A., Jaime R. 2004. *Genética Microbiana. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile.*

⁷³ Saldarriaga T. Félix, Calle Sonia y Camacho Carlos. 2002. *Resistencia Antimicrobiana de Cepas de Escherichia coli Provenientes de Lechones Lactantes Criados en una Granja Tecnificada de Lima. Laboratorio de Bacteriología - FMV - UNMSM. Apdo. 41-0068. Lima - Perú* 11(2):195-200

⁷³ Fausto Sarmiento O. *Diccionario de Ecología.*

- Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no eliminar el precipitado, (dejar 100ul de sobrenadante en el tubo)
- Resuspender completamente en precipitado bacteriano en 300ul de solución I (ver anexos) con ayuda de vórtex.
- Refrigerar a 4°C, mientras se preparaba la solución II (aproximadamente 10 minutos),
- Añadir 600ul de solución II y mezclar con ayuda de vórtex, (muy brevemente).
- Refrigerar por 10 minutos a 4 ° C.
- Añadir 450ul de solución III fría, (ver anexos), dispersando suavemente esta solución con ayuda de vórtex, (muy brevemente aprox. 3 segundos).
- Refrigerar a 4°C durante 60 minutos
- Centrifugar a 3500 xg, durante 10 minutos,
- Transferir 900ul de sobrenadante a un tubo eppendorf,
- Adicionar 400ul de cloroformo previamente refrigerado a-20 °C.
- Agitar el tubo con ayuda de vórtex.
- Refrigerar durante 10 minutos a -20°C.
- Centrifugar a 14000 xg durante 5 minutos
- Repetir el lavado con cloroformo, hasta que el halo interfásico desaparezca, con el fin de obtener un ADN plasmídico libre de proteínas y otros contaminantes hidrofóbicos o anfóteros.
- Añadir al sobrenadante etanol absoluto.
- Mezclar por inversión suavemente
- Luego refrigerar a -70°C durante toda la noche, con el fin de que precipite la mayor cantidad de ADN, el tubo.
- Centrifugar a 14000 xg durante 7 minutos,
- Eliminar el sobrenadante con ayuda de micropipeta, dejando unos 500ul de este en el tubo.
- Añadir 700ul de etanol absoluto frío.
- Agitar con vórtex hasta que el precipitado se desprenda de la pared del tubo.
- Incubar 10 minutos a -20°C.
- Lavar una vez más con etanol.
- Centrifugar a 14000xg durante 10 minutos.

- Eliminar el sobrenadante, al vacío.
- Llevar el tubo a la estufa a 40°C para que el ADN quede seco.
- Resuspender el ADN en buffer TE (pH=8), (la cantidad oscila entre 60-100ul dependiendo del volumen de precipitado).
- Llevar a 40°C durante 10 minutos.
- Mezclar con ayuda de vórtex.
- Adicionar 1ul de RNAsa pancreática (20 ug/mL).
- Llevar a incubación por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agitar con vórtex, muy brevemente,
- Spin down (centrifugación por 3 segundos).

3.12 ELECTROFORESIS DE ADN PLASMÍDICO

- Pesar 0.6g de agarosa y vaciados a un matraz con 75 ml de TBE 0.5X
- Llevar a ebullición hasta obtener completa disolución de la agarosa
- Luego dejar enfriar hasta llegar aproximadamente a los 50°C,
- Vaciar al molde y dejar gelificar.
- Llevar a la cámara de electroforesis y sumergirlo en buffer de corrida (TBE 0.5X), verificando que dicho buffer cubra todo el gel.
- En un pozo se colocar 5ul de buffer de cargado de gel, más 20 ul de muestra (ADN plasmídico) y 0.3ul de bromuro de etidio, la mezcla fue sembrada en los pozos del gel, la corrida fue realizada durante 2 horas a 70 voltios.
- Posteriormente se observó los perfiles plasmídicos mediante luz ultravioleta a una longitud de onda de 300nm. (Ver anexos)

3.13 DENDROGRAMA.

Representación gráfica de la relación filial o de pertenencia de los elementos, en la que el tronco representa el ancestro más antiguo y las ramas indican divisiones sucesivas más recientes del linaje de un grupo. (*Sinónimo: árbol genealógico*)⁷⁴.

⁷⁴ Fausto Sarmiento O. *Diccionario de Ecología*

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades diarreicas representan una causa significativa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo⁷⁵. La etiología infecciosa de estas enfermedades es muy variada, incluyendo desde agentes virales, protozoarios y bacterias; estas últimas, globalmente representan aproximadamente un 80% de los casos⁷⁶. Uno de los agentes bacterianos más importantes, por la severidad de los cuadros inducidos, es *Shigella*. Está estimado que, anualmente, provoca unos 164,7 millones de casos, y el 99% de ellos, ocurre en países en desarrollo, y la mayoría de las muertes ocasionadas, ocurren en niños menores de 5 años. En el 60% de los aislamientos, *Shigella flexneri* es el agente identificado, y un 15% corresponde a *Shigella sonnei*⁷⁷.

En Bolivia, la frecuencia de hallazgos de este género, en laboratorios pertenecientes a la Red de "Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antimicrobianos" (VERA) y su respuesta a antimicrobianos, fue publicada y declarada el año 1999, con una frecuencia de 560 aislamientos, los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos fueron: Ampicilina 67.1%, Cloranfenicol 55.1%, Cotrimoxazol 68.3 %, Ac. Nalidíxico 4.1%, Cefotaxima 3.8% y hasta el año 2000 ascendió a 840 aislamientos. También se observó un ligero incremento en la resistencia a los antimicrobianos de elección comúnmente usados: ampicilina 84.0%, cloranfenicol 57.9 %, Cotrimoxazol 68.5 %, Ac. Nalidíxico 4.1%, Cefotaxima 4.2% para *Shigella* spp.

En *E. coli*, la frecuencia de aislamientos fue de 2309 en el año 1999 con un porcentaje de cepas resistentes a los antimicrobianos de: Ampicilina 72.7%, Cotrimoxazol 69.3%, Cefotaxima 7.5%. Para el año 2000 la frecuencia de aislamientos fue de 2472 y también fue notorio, un ligero incremento en la resistencia a los antimicrobianos: Ampicilina 69.3%, Cotrimoxazol 73.3%, Cefotaxima 8.3%.⁷⁸

⁷⁵ Bern C, Martines J, deZoysa I, Glass RI. Magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992; 70: 705-14

⁷⁶ Adachi JA, Ostrosky-Zeichner L, DuPont HL, Ericsson CD. Empirical antimicrobial therapy for traveler's diarrhea. *Glin Infect Dis* 2000; 31: 1079-1083

⁷⁷ Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swedlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 651-666.

⁷⁸ Trigoso Christian, Damiani Esther, Albarracin Marisol, García Giovanni, Revollo Carmen, Torrico Elizabeth. Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antibacterianos (VERA). Boletín Informativo. Ministerio de Salud y Prevención Social- INLASA-OMS-OPS. Agosto 2001. N°3

La rápida aparición y diseminación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos es un severo problema de salud pública, que afecta de manera significativa al tratamiento ambulatorio y hospitalario de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Esto conduce a prolongar el tiempo de hospitalización y al aumento de costos para el paciente y las instituciones de salud, además de aumentar la morbilidad y mortalidad, ya que la resistencia bacteriana emergente, incrementa el riesgo del uso inadecuado de antimicrobianos.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe transferencia de plásmidos mediante conjugación, que codifique resistencia a antimicrobianos, entre cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella*, aisladas de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia, durante la gestión 2000-2004?

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de transferencia de plásmidos mediante conjugación y su efecto sobre la resistencia antimicrobiana, entre cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella*, aisladas de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia durante la gestión 2000 – 2004.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clasificar las cepas en estudio, *Escherichia coli* y *Shigella*, según su especie.
- Obtener los perfiles plasmídicos de las cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* antes de la conjugación.
- Determinar la relación filial (similitud) de las parejas conjugantes de importancia, en base a los perfiles plasmídicos obtenidos, antes de la conjugación, con ayuda del dendrograma.
- Demostrar el perfil antimicrobiano de las cepas en estudio.
- Establecer las cepas donadoras y receptoras de plásmidos, en base a los resultados del antibiograma para la conjugación. Entre cepas de *Escherichia coli* y especies de *Shigella*.
- Seleccionar las parejas conjugantes, según el antibiograma, entre cepas de *E. coli* y especies de *Shigella*.
- Determinar la capacidad de transferencia de plásmidos de resistencia mediante conjugación entre cepas donantes y receptoras.
- Identificar los cambios fenotípicos, y/o genotípicos de resistencia a antimicrobianos, en cepas receptoras, después de la transferencia plásmidos mediante conjugación, sea esta visible o no.

7 JUSTIFICACIÓN

Consideramos, que los resultados de laboratorio referentes al antibiograma acerca de una determinada especie bacteriana, en este caso, *Shigella*, no es un indicador suficiente del comportamiento de la resistencia a antimicrobianos de este género. Sí las bacterias acompañantes en el lumen intestinal (bacterias saprofitas), como es el caso de *Escherichia coli*, que efectivamente es fácil descartarla, para apuntar la búsqueda de cepas consideradas patógenas, por no presentar factores de virulencia, es portadora de genes de resistencia, con una determinada capacidad de transferencia de dichos genes a otras especies acompañantes, ya que muchos plásmidos R son transmisibles, incluso intergenéricamente, su presencia en una enterobacteria intestinal representa su potencial transmisión a una cepa patógena que entre en contacto con la cepa resistente. Es por esto que los plásmidos R representan un grave peligro para la salud humana y animal. Y posiblemente la realización del antibiograma, antes de que ocurra esta transferencia e incluso antes de recibir el tratamiento, daría un resultado errado de la respuesta a antimicrobianos, si este patógeno alcanzara a recibir el material genético codificador de resistencia,

Además, que desafortunadamente, es muy común el uso indiscriminado de antibióticos y agentes quimioterapéuticos, sin el respaldo de pruebas del laboratorio que confirmen su efectividad in vitro. Así como el empleo de dosis inadecuadas de dichos antibióticos y la venta de antibióticos sin restricción alguna, y sin prescripción médica, que favorece en gran medida el incremento y la selección de cepas bacterianas saprofitas y patógenas resistentes en el ambiente. Según datos obtenidos de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en la red del Cono Sur. En Bolivia la resistencia a antimicrobianos adquirida por *Shigella spp* del año 1999 al 2001, muestra un incremento para los diferentes antibióticos: Ampicilina de un 67.1% a 73%, Cefotaxima de un 3.8% a 4%, Cloranfenicol de un 55.1% a 58%, Trimetoprima-Sulfametoxazol de 68.3% a 69% y Ácido. Nalidíxico de 4.1 a 5%.⁷⁹

⁷⁹ Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en la red del Cono Sur. 2002 Porcentaje de Resistencia a Antibióticos adquirida por *Shigella spp* en el año 2000 -.Bolivia. cuadro 22

Es importante, entonces, conocer la capacidad de la transferencia horizontal de ADN, mediante conjugación, entre enterobacterias como son *Escherichia coli* y *Shigella*, así, también conocer el perfil antimicrobiano de las cepas saprofitas, para tener un enfoque más claro de la necesidad de investigar al respecto y así comprender en qué forma los microorganismos pueden adquirir resistencia a los diversos antibióticos.

8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 UNIVERSO

Se incluyeron en el presente trabajo Cepas de *Escherichia coli* y *Shigella*, procedentes de muestras patológicas, provenientes de laboratorios y hospitales, de los diferentes departamentos de Bolivia entre los años 2000 y 2004, enviadas al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), con fines confirmatorios y seleccionados según el antibiograma.

8.2 MUESTRA

37 cepas bacterianas (23 cepas de *Shigella* y 14 cepas de *Escherichia coli*). Este tamaño de muestra esta sujeto a la disposición de cepas disponibles en el laboratorio y forma parte de un estudio piloto, ya que el interés del estudio es descriptivo y no inferencial.

8.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cepas procedentes de casos patológicos, aisladas en Laboratorios y Hospitales de las ciudades de La Paz, El Alto, Santa Cruz y Sucre, enviadas al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud, con fines confirmatorios, del año 2000 al 2004, que fueron identificadas por pruebas bioquímicas, y determinado su antibiograma por el método de difusión en agar Bauer-Kirby, a los antibióticos de interés, ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol trimetoprim, ácido nalidíxico, y cefotaxima, antibióticos empleados con mayor frecuencia en las infecciones entéricas (recomendadas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico NCCLS para la familia *Enterobacteriaceae*).

9 RUTA CRÍTICA.

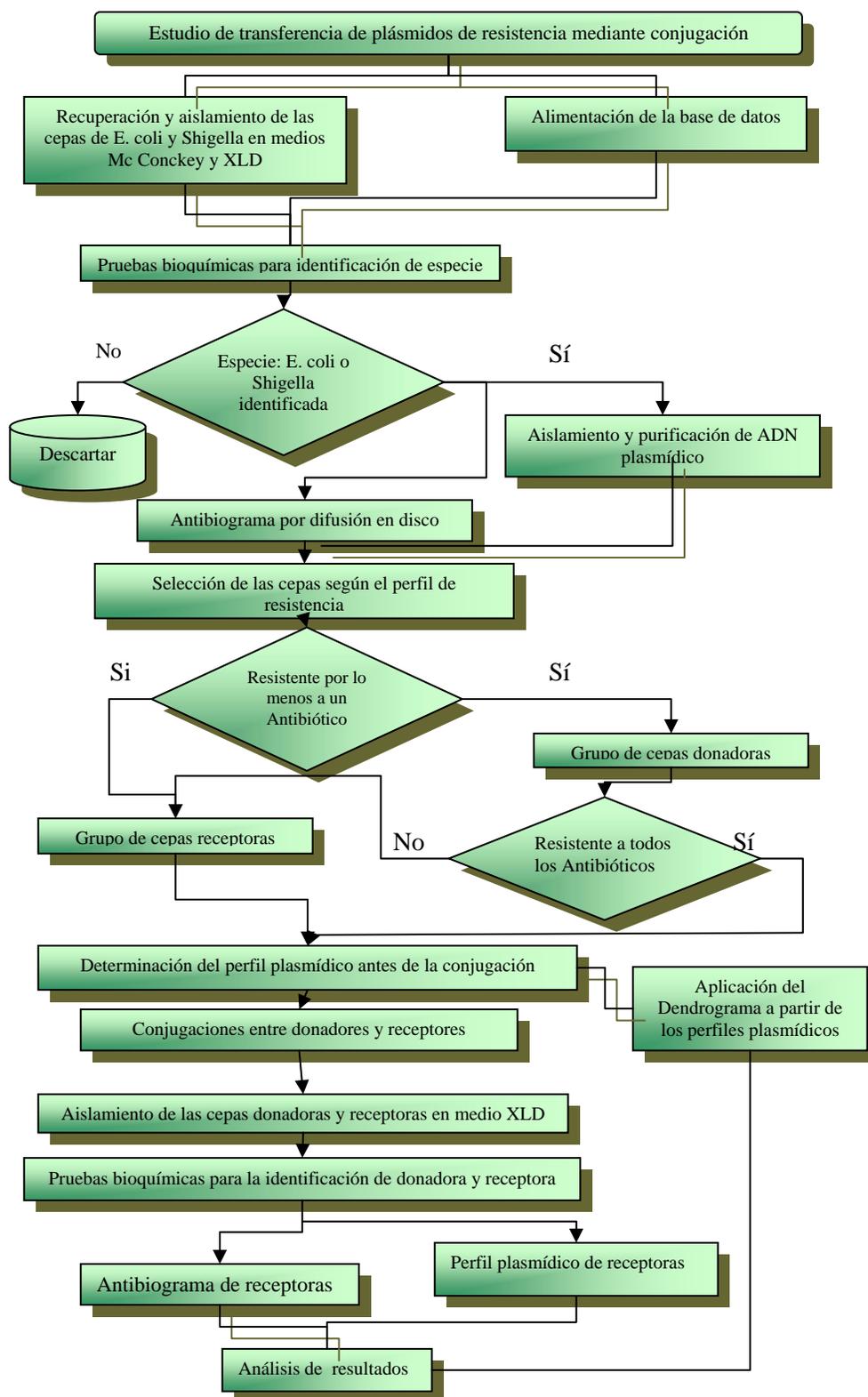


Ilustración 1. Ruta crítica para el estudio de transferencia de plásmidos de resistencia mediante conjugación entre especies de *E.coli* y *Shigella spp.*

10 PROCEDIMIENTO

10.1 RECUPERACIÓN Y AISLAMIENTO DE MUESTRAS

Las cepas de *E. coli* y *Shigella* aisladas de coprocultivos en su momento, en las diferentes regiones de Bolivia, que fueron enviadas a INLASA, con fines confirmatorios y conservadas en medio soft, durante el periodo comprendido entre 2000 y 2004; fueron recuperadas y aisladas en agar Mac Conkey cepas de *E. coli* y en XLD cepas de *Shigella*, para su posterior identificación.. Paralelamente se realizó el llenado de base de datos.

10.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Para la identificación bioquímica, se sembraron las colonias en medios TSI, LIA, SIM y citrato.

10.3 ANTIBIOGRAMA

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en agar Bauer-Kirby, empleando 5 drogas antimicrobianas: Ampicilina (10 ug), Cloranfenicol (30 ug), Trimetoprim - sulfametoxazol (25 ug), Ácido Nalidíxico (30 ug) y Cefotaxima (30 ug).se utilizaron como cepas controles *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

10.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Paralelamente al antibiograma, se realizó el aislamiento y purificación del ADN plasmídico empleando el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly, y la determinación del perfil plasmídico por electroforesis, antes de la conjugación.

10.5 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DONADORAS, RECEPTORAS Y PAREJAS DE CONJUGACIÓN

Posteriormente, con la ayuda del antibiograma se pudo clasificar las cepas en donadoras y/o receptoras. Para posteriormente seleccionar las parejas conjugantes.

10.6 CONJUGACIÓN DE LA CEPAS BACTERIANAS

Una vez seleccionadas las parejas conjugantes, se procedió a:

- Recuperar las cepas posibles a conjugar en un medio XLD.

- Posteriormente, se llevó una asada de cada cepa a 2ml de caldo LB, las cepas donadoras a caldo LB con antibiótico (Amp, Chl, SXT, Nal, de acuerdo al requerimiento), las cepas receptoras solo en caldo LB;
- Luego fueron llevadas a incubación por 2 horas a 35°C.
- Agitando con la ayuda de un vórtex se inoculó 50ul de la cepa receptora y 50ul de la cepa donadora en un tubo que contenía 100uL de caldo LB,
- Se dejó incubando por el lapso de 1 hora a 35°C.
- Luego se realizaron tres diluciones 1/10, 1/100, y 1/1000.
- De la última dilución, se sembró en un medio XLD, para recuperar y aislar las cepas donadoras y receptoras.
- Todas las cepas receptoras fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas.

10.7 ANTIBIOGRAMA

Una vez aisladas e identificadas las cepas receptoras después de la conjugación, nuevamente fueron sometidas a un antibiograma por el método de difusión en agar Bauer-Kirby, con los antibióticos correspondientes (Ampicilina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol - trimetoprim, Ácido nalidíxico), para verificar si hubo o no cambio en el tamaño del halo de inhibición, por ende, de la sensibilidad. En este segundo antibiograma no se tomó en cuenta a la Cefotaxima ya que no se encontró una cepa resistente a este antibiótico para poder conjugar, por lo que se tuvo que descartar.

10.8 CULTIVO DE CEPAS RECEPTORAS CONJUGADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO

Obtenidos los resultados del antibiograma, se realizó el cultivo de todas las cepas receptoras conjugadas. Fueron sembradas en medio Mueller Hinton con antibiótico aquellas cepas que según su perfil de antibiograma habían adquirido resistencia. (Cada cepa con el correspondiente antibiótico que necesitaba para expresar el gen de resistencia plasmídico). Las cepas receptoras conjugadas que según el perfil de antibiograma no adquirieron resistencia, fueron sembradas solo en medio Mueller Hinton sin antibiótico. El cultivo se realizó a 35°C por 18-24 horas y así obtuvimos un desarrollo masivo; para su posterior extracción de ADN plasmídico.

10.9 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO

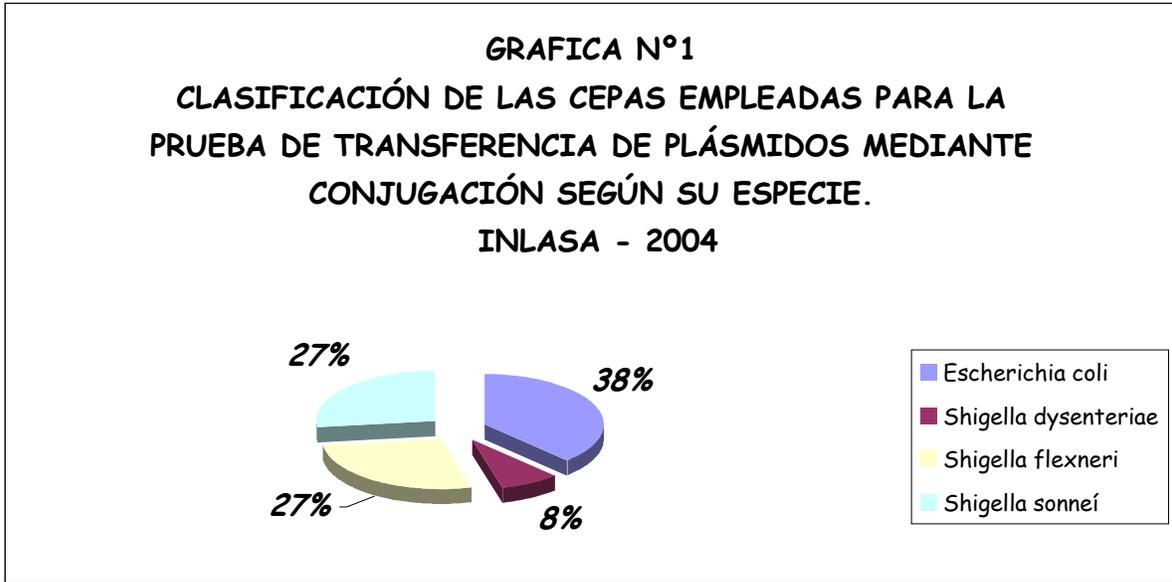
Para la extracción de ADN plasmídico fue aplicado el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly,.

10.10 ELECTROFORESIS DE ADN PLASMIDICO

La corrida electroforética fue llevada a cabo en geles de agarosa al 0.8%, los geles tenían un tamaño de 10 centímetros de ancho por 15 centímetros de largo; y 1cm de alto, preparados con buffer de corrida TBE 0.5X (ver anexos). La corrida se llevó a cabo durante 2 horas a 70 voltios a 500mA, el gel comprendía las muestras, más un patrón de peso molecular de plásmidos conocido. Una *Escherichia coli*, brindado gentilmente por el Dr. Rolando Sánchez.

11 RESULTADOS

Las 37 cepas estudiadas, procedentes de procesos patológicos, que fueron clasificadas por especie, pueden ser observadas en la Grafica 1.



Los perfiles plasmídicos antes de la conjugación de las cepas en estudio, tanto de *Escherichia coli* como de *Shigella*, pueden ser observadas en la Ilustración 2

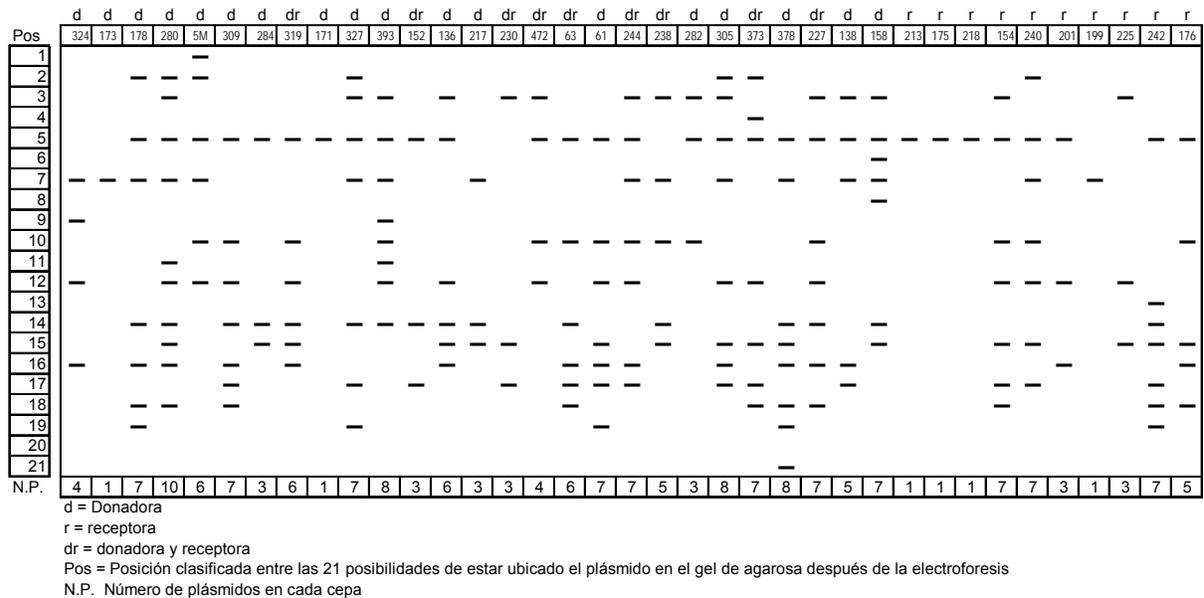
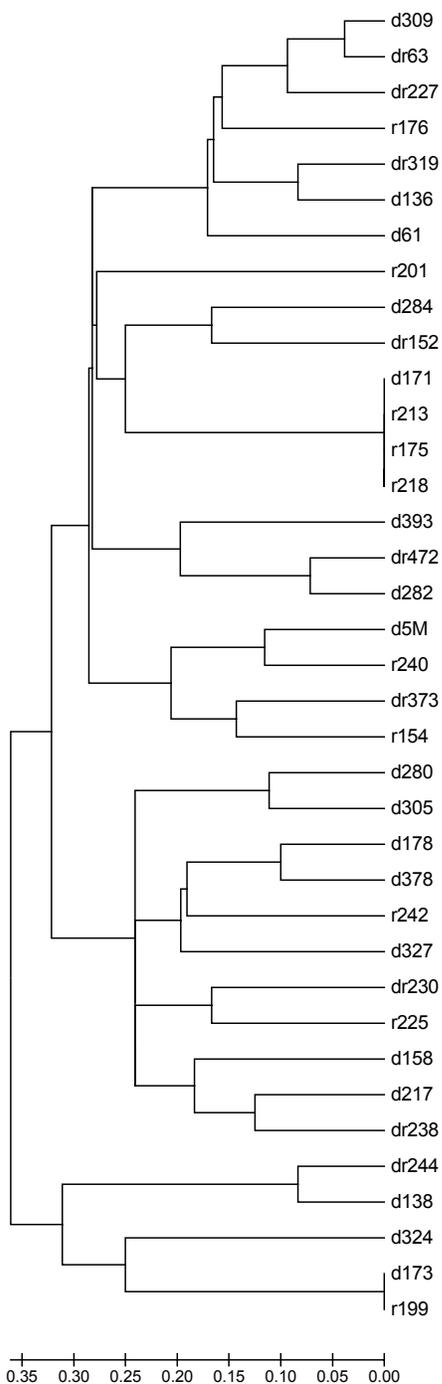


Ilustración 2. Perfiles plasmídicos de las 37 cepas de *Escherichia coli* y *Shigella* spp. Aislados de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia entre 2000-2004. Seleccionados por su antibiograma. Previos a la prueba de transferencia de plásmidos mediante conjugación.

Para determinar la relación filial de las diferentes cepas en base a los perfiles plasmídicos, sometimos este resultado al desarrollo de un dendrograma, basado en los programas RAPDistance 104, y MEGA 3.1. El resultado de este análisis puede ser observado en la Grafica 2



Gráfica 2 Dendrograma, representando la relación filial (similitud) entre las 37 cepas de *Escherichia coli* y *Shigella spp*, Aislados de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia entre 2000-2004. Seleccionados por su antibiograma. Previos a la prueba de transferencia de plásmidos mediante conjugación.

También se puede apreciar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y Grafica 3 los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos, con su correspondiente diámetro en milímetros, de cada cepa de *Escherichia coli*, y especies de *Shigella* spp, en estudio, antes de la transferencia de plásmidos por conjugación. Los cuales fueron comparados con rangos de referencia de la NCCLS (Ampicilina 10ug: R ≤ 13; I 14-16; S ≥ 17, cloranfenicol 30ug: R ≤ 12; I 13-17; S ≥ 18, Trimetoprim/sulfametoxazol 1.25/ 23.75ug : R ≤ 10; I 11-15; S ≥ 16, Ácido Nalidíxico 30ug: R ≤ 13; I 14-18; S ≥ 19, Cefotaxima 30 ug: R ≤ 14; I 15-22; S ≥ 23) para determinar la sensibilidad o resistencia.

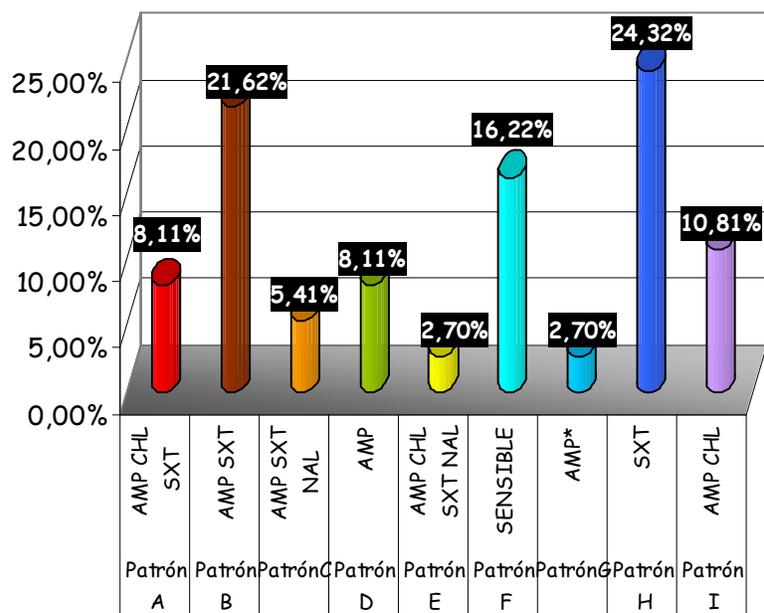
Tabla 3. Perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de *Escherichia coli* y especies de *Shigella*, Aislados de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia entre 2000-2004. Previos a la prueba de transferencia de plásmidos mediante conjugación. INLASA - 2004

PERFIL ANTIMICROBIANO DE CADA CEPA EN ESTUDIO		ANTIBIOGRAMA										
Cód.	ESPECIE	AMP			CHL		SXT		NAL		CTX	
		R	I	S	R	S	R	S	R	S	R	S
		Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)	Diám.(mm)
136	Escherichia coli	6	0	0	6	0	6	0	0	27	0	30
284	Shigella sonnei	6	0	0	6	0	6	0	0	26	0	31
324	Shigella sonnei	6	0	0	13	0	6	0	0	26	0	33
138	Escherichia coli	6	0	0	0	25	6	0	0	21	0	29
173	Escherichia coli	6	0	0	0	28	6	0	0	30	0	36
61	Escherichia coli	6	0	0	0	23	6	0	0	25	0	28
238	Shigella dysenteriae	6	0	0	0	21	6	0	0	26	0	32
309	Shigella flexneri	6	0	0	0	33	6	0	0	39	0	32
319	Shigella sonnei	6	0	0	0	24	6	0	0	27	0	33
378	Shigella sonnei	6	0	0	0	22	6	0	0	27	0	36
63	Shigella sonnei	6	0	0	0	23	6	0	0	27	0	35
152	Escherichia coli	6	0	0	0	20	6	0	8	0	0	29
230	Escherichia coli	6	0	0	0	20	6	0	6	0	0	31
158	Escherichia coli	6	0	0	0	23	0	0	0	8	0	31
217	Escherichia coli	6	0	0	0	21	0	25	0	27	0	31
5M	Escherichia coli	6	0	0	0	21	0	24	0	26	0	30
171	Escherichia coli	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	31
175	Escherichia coli	0	0	20	0	23	0	24	0	28	0	31
213	Escherichia coli	0	0	17	0	20	0	23	0	24	0	29
225	Shigella dysenteriae	0	0	22	0	29	0	26	0	26	0	32
154	Shigella sonnei	0	0	20	0	23	0	30	0	26	0	29
242	Shigella flexneri	0	0	23	0	24	0	28	0	25	0	33
199	Escherichia coli	0	16	0	0	21	0	29	0	25	0	29
218	Escherichia coli	0	0	17	0	20	0	26	0	24	0	25
305	Shigella dysenteriae	0	0	18	0	24	6	0	0	27	0	32
227	Shigella flexneri	0	0	23	0	28	6	0	0	31	0	35
240	Shigella flexneri	0	0	22	0	25	6	0	0	24	0	33
244	Shigella flexneri	0	0	22	0	29	6	0	0	26	0	31
280	Shigella flexneri	0	0	22	0	24	6	0	0	24	0	33
201	Shigella flexneri	0	0	17	0	23	6	0	0	25	0	32
327	Shigella sonnei	0	0	19	0	22	6	0	0	27	0	26
373	Shigella sonnei	0	0	18	0	21	6	0	0	29	0	24
393	Shigella sonnei	0	0	22	0	23	6	0	0	29	0	36
176	Shigella flexneri	6	0	0	6	0	0	23	0	31	0	31
178	Shigella flexneri	6	0	0	6	0	0	22	0	31	0	36
472	Shigella flexneri	6	0	0	6	0	0	19	0	25	0	27
282	Shigella sonnei	6	0	0	6	0	0	21	0	27	0	31

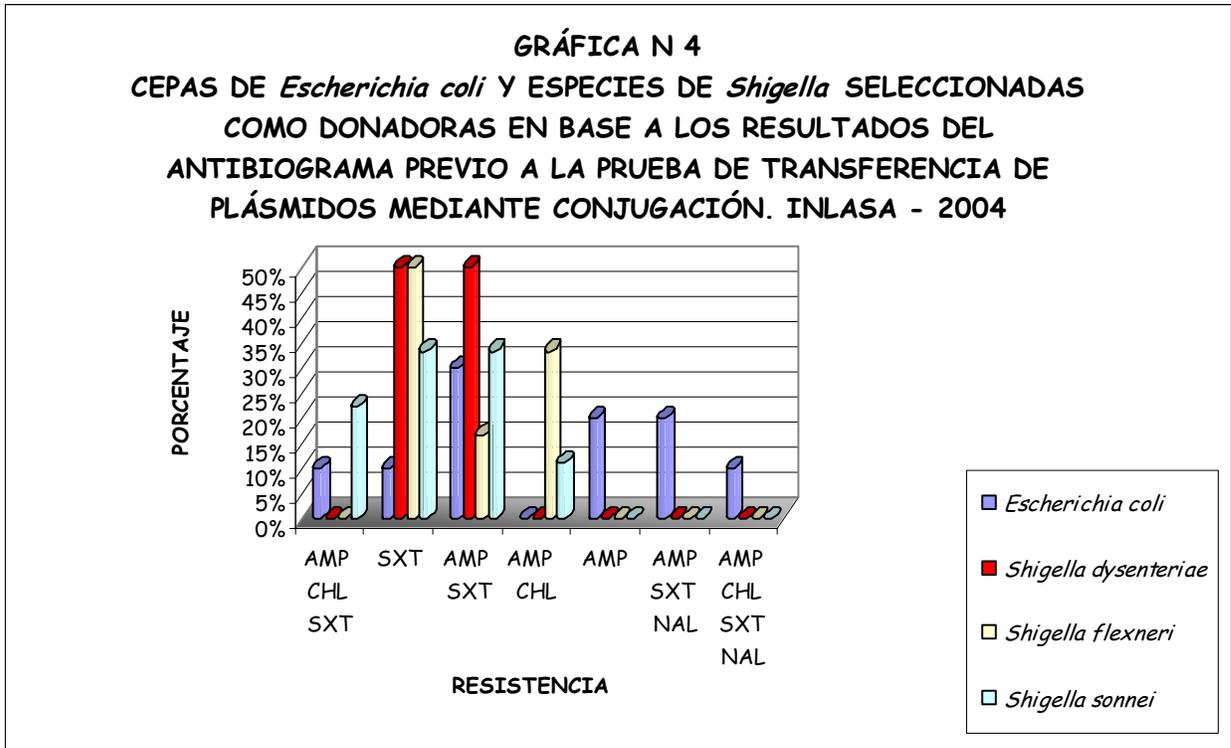
AMP = Ampicilina; CHL = Cloranfenicol; SXT= Trimtoprima sulfametoxazol; NAL= Ácido Nalidixico;CTX= Cefotaxima; R = Resistente; S = Sensible; I = Intermediario

Diám(mm) = diámetro del halo de inhibición en milímetros, obtenido de cada antibiótico y cada cepa en estudio antes de la conjugación

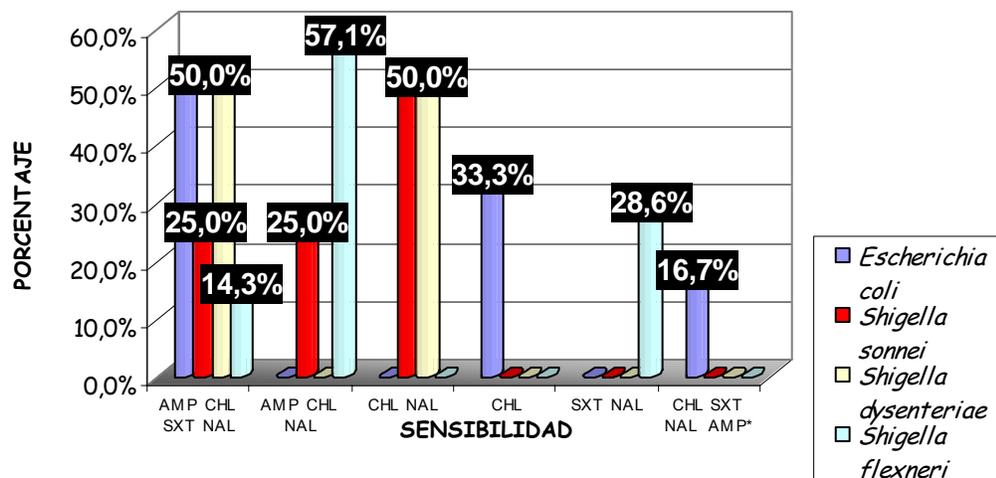
GRAFICA N° 3
CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* y ESPECIES DE *Shigella*
SEGÚN EL PATRÓN ANTIMICROBIANO QUE COMPARTEN PREVIO A LA
PRUEBA DE TRANSFERENCIA DE PLÁMIDOS MEDIANTE CONJUGACIÓN.
INLASA - 2004



La selección de cepas, como donadoras y receptora de plásmidos, para la conjugación en base al resultado del antibiograma, puede ser observada en las Gráficas 4 y 5.



GRAFICA N° 5
CEPAS DE *Escherichia coli* Y ESPECIES DE *Shigella* SELECCIONADAS
COMO RECEPTORAS EN BASE A LOS RESULTADOS DEL
ANTIBIOGRAMA. PREVIO A LA PRUEBA DE TRANSFERENCIA DE
PLÁSMIDOS MEDIANTE CONJUGACIÓN. INLASA-2004



La selección de parejas para la prueba de conjugación. (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) Alcanzaron un número de 38 parejas, entre las cuales, es posible apreciar cepas donadoras para más de una especie, y viceversa.

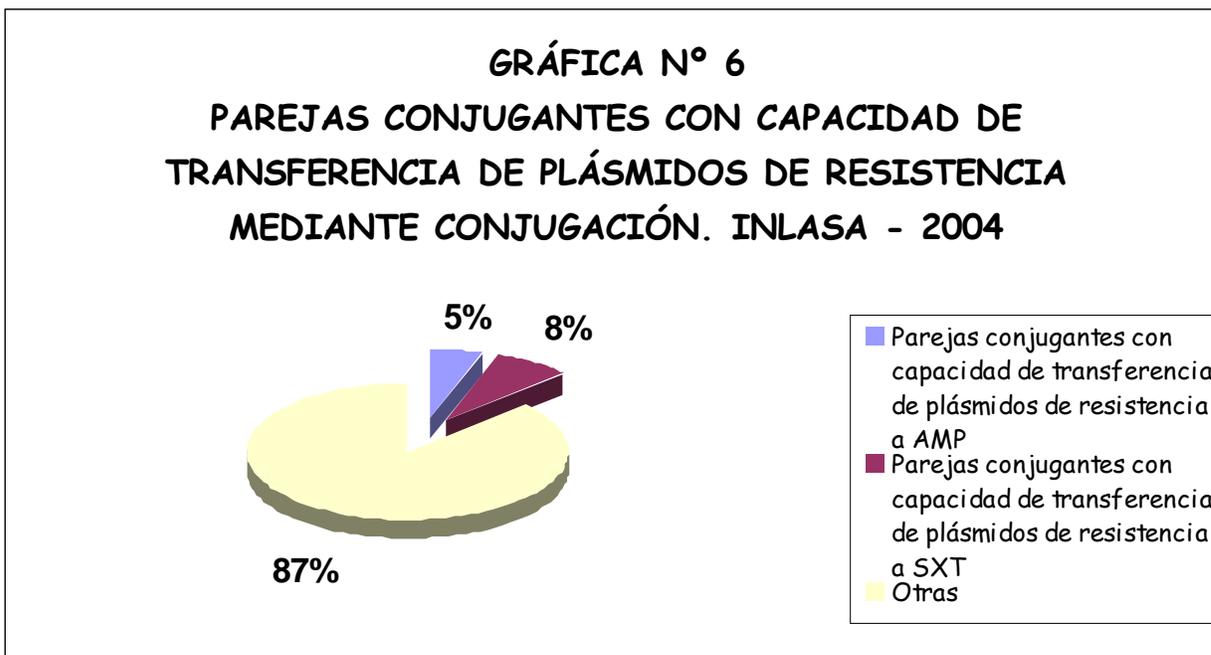
Tabla 4. Selección de parejas conjugantes según el antibiograma, entre *Escherichia coli* y especies de *Shigella*. Aislados de procesos patológicos en diferentes regiones de Bolivia entre 2000-2004 para la prueba de conjugación. INLASA - 2004

Donadora	Especie	Resistente a:	Recep	Especie	Sensibles a:
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	63	<i>Shigella sonnei</i>	CHL, NAL
178	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL	152	<i>Escherichia coli</i>	CHL
284	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, SXT	152	<i>Escherichia coli</i>	CHL
61	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SXT	154	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
230	<i>Escherichia coli</i>	SXT	154	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
5M	<i>Escherichia coli</i>	AMP	154	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
63	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, SXT	175	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
178	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL	175	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
280	<i>Shigella flexneri</i>	SXT	175	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
309	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, SXT	175	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
393	<i>Shigella sonnei</i>	SXT	175	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
158	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SXT, NAL	176	<i>Shigella flexneri</i>	SXT, NAL
227	<i>Shigella flexneri</i>	SXT	199	<i>Escherichia coli</i>	CHL, SXT, NAL, AMP*
378	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, SXT	199	<i>Escherichia coli</i>	CHL, SXT, NAL, AMP*
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	201	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, NAL
244	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, NAL	213	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
319	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, SXT	213	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
324	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, SXT	213	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
327	<i>Shigella sonnei</i>	SXT	213	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
472	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL	213	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
238	<i>Shigella dysenteriae</i>	AMP, SXT	218	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
282	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL	218	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
305	<i>Shigella dysenteriae</i>	SXT	218	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
373	<i>Shigella sonnei</i>	SXT	218	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
138	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SXT	225	<i>Shigella dysenteriae</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	227	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, NAL
472	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL	230	<i>Escherichia coli</i>	CHL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	238	<i>Shigella dysenteriae</i>	CHL, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	240	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, NAL
136	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT	242	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
152	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SXT, NAL	242	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	242	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
173	<i>Escherichia coli</i>	AMP, SXT	242	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
217	<i>Escherichia coli</i>	AMP	242	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, SXT, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	244	<i>Shigella flexneri</i>	AMP, CHL, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	319	<i>Shigella sonnei</i>	CHL, NAL
171	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CHL, SXT, NAL	373	<i>Shigella sonnei</i>	AMP, CHL, NAL
230	<i>Escherichia coli</i>	SXT	472	<i>Shigella flexneri</i>	SXT, NAL

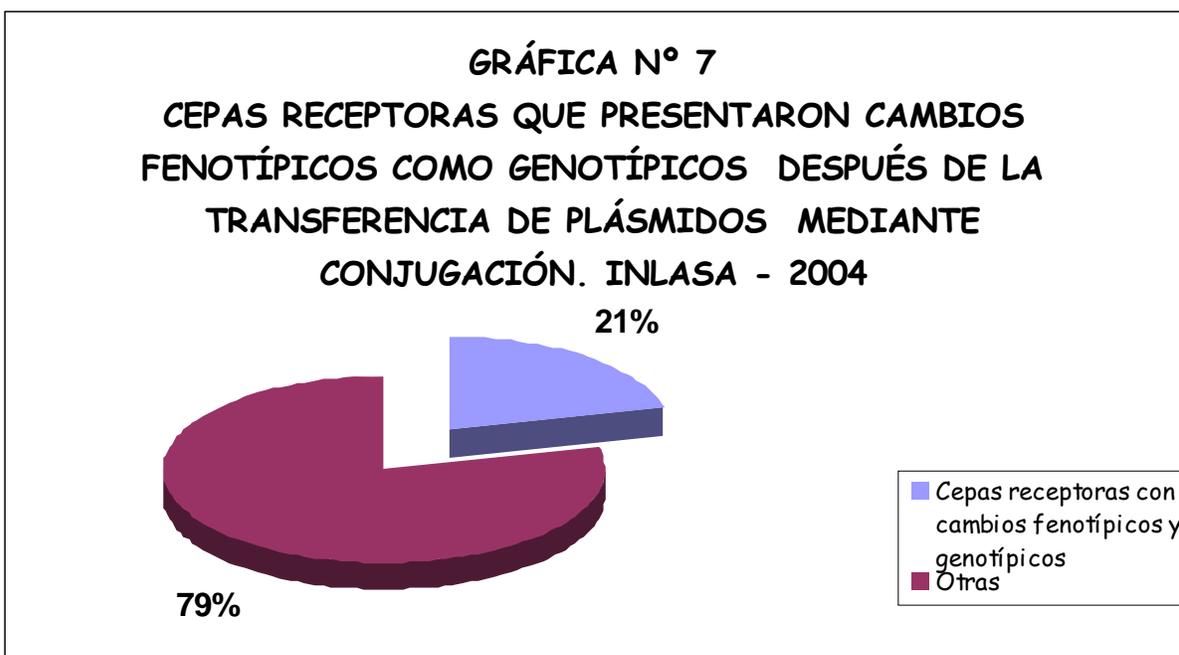
AMP = Ampicilina; CHL = Cloranfenicol; SXT= Trimtoprima sulfametoxazol; NAL= Ácido Nalidixico.

AMP* = Ampicilina rango Intermedio, no sensible, ni resistente..

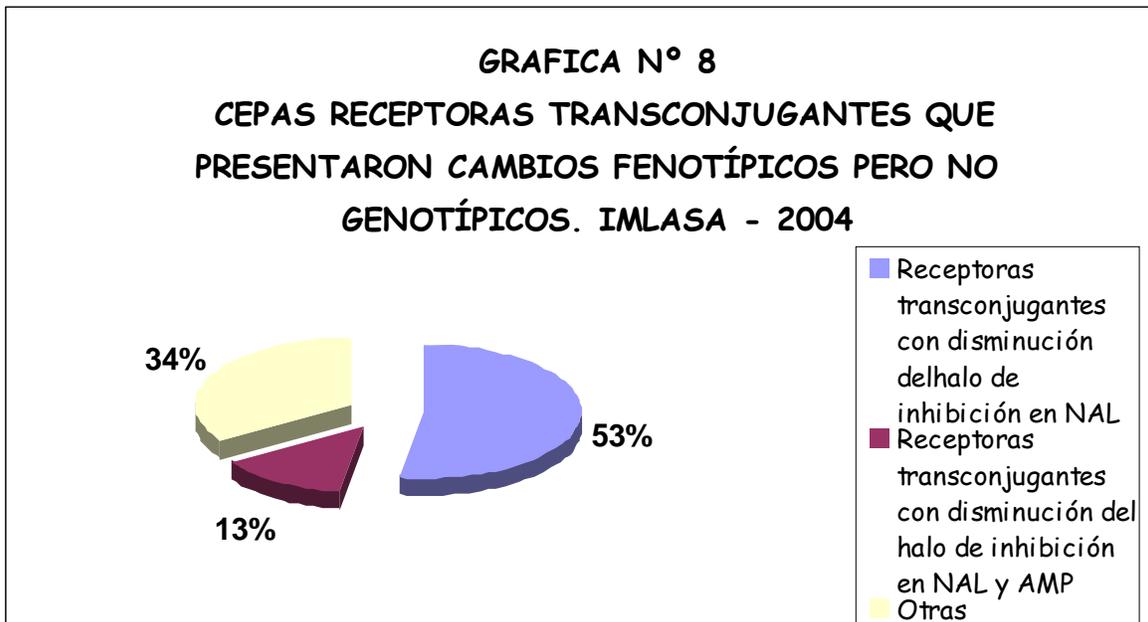
En la Gráfica 6 podemos observar el porcentaje de parejas conjugantes con capacidad de transferencia de plásmidos de resistencia mediante conjugación.



El grupo de receptoras transconjugantes, que presentó cambios tanto genotípicos, como fenotípicos en cuanto a la Resistencia a Antimicrobianos se refiere, está representado en la Gráfica 7.



Por otra parte, hubo casos de cepas receptoras transconjugantes, que presentaron sólo cambios fenotípicos. Las cuales pueden ser apreciados en la Gráfica 8.



En esta gráfica, es importante considerar que las cepas no cambiaron el resultado final de resistencia, es decir: Antes de la prueba de conjugación eran sensibles, y luego de la misma continuaron siéndolo. Sin embargo, el halo de inhibición tuvo un diámetro menor después de la prueba, de por lo menos 5 mm de diferencia con respecto al original. Estos casos, como es notorio, ocurrieron sólo para los antibióticos Ampicilina y -mayormente- Ácido Nalidíxico.

Las cepas receptoras transconjugantes, sometidas a pruebas de conjugación que no presentaron cambios genotípicos ni fenotípicos de resistencia, pueden ser observadas en la Gráfica 9.



12 DISCUSIONES

La distribución de cepas según su especie, está presentada en la Gráfica N° 1. De las 37 cepas (100%), el 38% corresponden a *Escherichia coli*, y (62%) al género *Shigella*, distribuido en tres especies: (8%) de *S. dysenteriae*, (27%) de *S. flexneri* y (27%) de *S. sonnei*. Cabe destacar que el número de cada especie de *Shigella* empleado en este trabajo, no tiene relación alguna, con la prevalencia de *Shigella* aislados en las diferentes regiones de Bolivia, como lo muestran otros estudios, donde *Shigella flexneri* es la especie más aislada, seguida de *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii*^{80 81}. Datos que tiene relación con trabajos realizados en países vecinos como Argentina donde *Shigella flexneri* es la especie más frecuentemente aislada, seguida de *S. sonnei*.⁸² Y nuestro tamaño de muestra esta sujeto a la disposición de cepas y material disponibles en el laboratorio, además de tratarse de un estudio piloto, y el interés del mismo es descriptivo y no inferencial.

La presencia de plásmidos tiene una relevante importancia en la virulencia, acción patógena y resistencia antimicrobiana de las bacterias. Los plásmidos mejor conocidos son los plásmidos R y Col que especifican la resistencia a diferentes antibióticos⁸³.

La Ilustración 2 nos permite apreciar los diferentes perfiles plasmídicos obtenidos de las 37 cepas en estudio (donadoras y/o receptoras), tanto de *Escherichia coli*, como de *Shigella spp.* Donde se puede observar que las cepas donadoras poseían de 1 a 10 plásmidos, las cepas receptoras de 1 a 7 plásmidos y las cepas que fueron tanto donadoras como receptoras poseían de 3 a 8 plásmidos.

Según datos obtenidos por el dendrograma observamos que las cepas que se parecen en el juego de conjugación, son solamente la 158-176 y 230-472. Según el dendrograma (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), las cepas donadoras tienen una similitud de perfiles plasmídicos del 76%. Entre las cepas receptoras hay una similitud de 72%. Si consideramos, la similitud de bandas entre

⁸⁰ Sanchez R.Giovanna. Importancia .2004.Epidemiológica de los Perfiles Plasmídicos de cepas de *Shigella* aisladas en diferentes regiones de Bolivia y otros factores de riesgo entre los años 1999 y 2004. Facultad de ciencias farmaceuticas y Bioquímicas. UMSA: 38

⁸¹ Llanccce Mondragón Lus María.2002 Estudio de Resistencia in vitro de cepas de *Shigella* frente a 20 antimicrobianos en el Hospital Carrión 1999-2001.Oficina general de Bibliotecas y Biblioteca General. UNSMN

⁸² Merino, Luis A.; Hreñuk, Gabriela E.; Ronconi, María C.; Alonso, José M. 2004.Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella spp.* en el nordeste argentino

<http://www.ingentaconnect.com/content/paho/pajph/2004/00000015/00000004/art00001>

⁸³ http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/14resumen.htm

donadora y receptora, para ambas parejas corresponde al 67%. Entonces, estas conjugaciones ocurrieron entre cepas distantes más que cercanos según la similitud de perfiles plasmídicos. La cepa *Escherichia coli* 171, donadora, aparece en un grupo diferente a los anteriores mencionados. Y sus receptoras que fueron conjugadas exitosamente (227 y 244) se hallan distantes de ella (72% y 63%, respectivamente). Es necesario indicar que la menor similitud alcanzada entre todas las cepas es del 63%, y la mayor, del 100%, método de DICE).

La cepa 309, donadora, también se halla distante de su receptora (cepa 175), cuya conjugación tuvo éxito.

La cepa 373, y su conjugada, 218, también son distantes, pese a que este plásmido no codifica resistencia.

La cepa 136, donadora, al igual que los anteriores está distante de su conjugada, la cepa 242. El plásmido tampoco codifica resistencia.

Estudios similares de segmentos plasmídicos (aplicación de dendrograma) ayudaron a determinar la relación filogenética (similitud) de serovariedades de *Salmonella*⁸⁴. Así como de subtipos de *Shigella flexneri*⁸⁵.

En la tabla 3 podemos apreciar los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de *Escherichia coli* y especies de *Shigella* obtenidos antes de la transferencia de plásmidos mediante conjugación, con sus respectivos tamaños del halo de inhibición para cada cepas y antimicrobiano en estudio. Para su interpretación de dichos halos de inhibición encontrados se recurrió a las tablas de la NCCLS, tablas que son editadas y actualizadas anualmente por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Conforme a lo observado en la Gráfica 3, las cepas ingresadas al estudio, están agrupadas en 9 patrones (A - I), en base a los resultados de Sensibilidad a los antimicrobianos. El patrón H con mayor número de miembros, corresponde a aquellos que fueron sensibles a todos los antimicrobianos, excepto al SXT. El patrón B, que se ubica en segundo lugar, con 8 cepas, tienen la característica de ser resistentes sólo a SXT y AMP. En tercer lugar, con 6 cepas, aparece el patrón F grupo con sensibilidad a

⁸⁴ <http://www.genetics.org/cgi/content/full/149/3/1183>

⁸⁵

[http://203.65.72.7/WebSite/%E6%9C%AC%E5%B1%80%E7%B0%A1%E4%BB%8B/%E6%9D%B1%E5%8D%80%E5%88%86%E5%B1%80/JCM%20shigella\(Lee,Ko\).pdf](http://203.65.72.7/WebSite/%E6%9C%AC%E5%B1%80%E7%B0%A1%E4%BB%8B/%E6%9D%B1%E5%8D%80%E5%88%86%E5%B1%80/JCM%20shigella(Lee,Ko).pdf)

todos los antimicrobianos. En cuarto lugar, con 4 cepas, tenemos al patrón I, grupo con resistencia a AMP y CHL. Con 3 cepas tenemos dos patrones diferentes: el primero (patrón A) con resistencia a AMP, CHL y SXT y el segundo, (patrón D) con resistencia solo a AMP, el patrón C, esta integrado de 2 cepas resistentes a AMP, SXT y NAL. Y por último tenemos a los patrones E y G, el patrón E con una cepa resistente a AMP, CHL, SXT, y NAL, y el patrón G con una cepas de categoría intermedio a AMP.

Es importante notar que, en los agrupamientos basados en el antibiograma, están presentes ambos géneros (*Escherichia* y *Shigella*), excepto, en el grupo mayoritario, es decir, el de 9 individuos, que corresponden al género *Shigella* únicamente, que, como dijimos anteriormente, tienen resistencia sólo contra SXT.

El análisis del perfil antimicrobiano de las cepas en estudio nos permitió hacer una clasificación tanto de cepas donadoras como receptoras, (Gráficas 4 y 5). Se considero como donadoras, aquellas cepas que eran resistentes por lo menos a un antibiótico. Y como receptoras aquellas cepas sensibles por lo menos a un antibiótico, en algunos casos hubo cepas que fueron empleadas, tanto como donadoras y receptoras. Según esta clasificación se pudo obtener 38 parejas conjugantes, las cuales pueden ser observadas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Tras la conjugación plasmídica, como se observa en la Gráfica 6, El 13% de las parejas conjugantes, tuvieron éxito en la transferencia de plásmidos de resistencia, 5% adquirieron un plásmido, portador del gen de resistencia a Ampicilina y el 8% adquirieron un plásmido portador del gen de resistencia a SXT.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** presenta las diferencias entre los perfiles antimicrobianos antes y después de la conjugación, de la pareja 171 (*Escherichia coli*) y 227(*Shigella flexneri*). El cambio en AMP, de sensible a resistente, adopta el fenotipo de la cepa donadora. También es apreciable el cambio en NAL de 31mm a 17mm de diámetro pasando de sensible a intermedio, reflejando un cambio gradual, no equivalente al de la cepa donadora, que en este caso es resistente, presentando un halo de inhibición de 6mm. El perfil plasmídico de esta pareja de conjugación, puede ser apreciado, en la fotografía 1 (Anexos) en la cuál notamos la adición de una banda, en el carril de la cepa receptora después de la prueba de conjugación (171a – 227). Con un tamaño aproximado de 1500 pares de bases. (El peso molecular de los plásmidos fue determinado con la ayuda de un patrón de peso

molecular de plásmidos conocido. Esta banda que debería aparecer también en la cepa donadora en este caso no es visible.

La segunda prueba de conjugación, entre 171 (*Escherichia coli*) y 244 (*Shigella flexneri*) presenta los cambios tanto fenotípicos como genotípicos evidentes en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y fotografía 2 (Anexos). Donde podemos distinguir el cambio fenotípico radical sobre AMP, que de un diámetro de 22mm bajó hasta 6mm. Otro cambio fenotípico, en segundo lugar de importancia, es sobre NAL, que permanece sensible, pero el diámetro de inhibición disminuye 7 mm después de la prueba de conjugación.

En el perfil plasmídico, podemos apreciar la migración de bandas de plásmidos, el primer carril (171e), corresponde a la cepa donadora. El segundo carril (244s), a la cepa receptora, antes de la prueba. Los tercer (171a244) y cuarto carriles (171m244), a la cepa receptora después de la conjugación, con la diferencia que el tercer carril, corresponde a la cepa tomada de la frontera del halo de inhibición de AMP, mientras que el cuarto carril, a la misma cepa, pero de una región distante de cualquiera de los discos empleados. Así, el tercer carril presenta una banda adicional, reflejando un cambio genotípico, correspondiente a un plásmido de aproximadamente 1500 pares de bases. No obstante, el carril cuatro, aunque es la misma cepa, no presenta ese plásmido, y su perfil plasmídico es similar al de la cepa antes de la prueba de conjugación (carril 2).

Las cepas 227 y 244 son las que presentaron ambos cambios (genotípico y fenotípico) Es importante indicar que los plásmidos que aparecen en ambas cepas tienen el mismo tamaño molecular. Además, el cambio de Sensible a Resistente, es radical, es decir de 6 mm (diámetro del disco). Este hecho es concordante con resistencia de origen plasmídico,⁸⁶ es decir, que la cepa cambia de sensible a resistente en un solo paso (no gradualmente).

Pese a lo expresado anteriormente, hay un inconveniente: el plásmido de 1500 pares de bases, que parece ser el mismo en ambos receptores, no es observable en la cepa donadora (cepa 171). Esto impulsa a pensar que este plásmido que aparece en las receptoras no es el que genera la resistencia a AMP. Existe la posibilidad que el

⁸⁶ Pedro Martínez, Máximo Mercado, Salim Máttar. 2003. *Determinación de b-lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. Corporación Editora Médica del Valle. Colombia*

plásmido presente en la cepa donadora, de aproximadamente 4200 pares de bases, sea el portador del gen de resistencia, porque en las cepas receptoras aparece también. La dificultad es que antes de la conjugación, ya había un plásmido de ese tamaño en las receptoras. Entonces no es posible indicar si se trata de un enmascaramiento entre dos plásmidos del mismo tamaño molecular, o posiblemente el plásmido durante el proceso de conjugación pudo haber sufrido delección y fragmentación, generando un plásmido de menor tamaño portador del gen de resistencia a AMP, proceso que puede ser respaldado bibliográficamente⁸⁷.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la cepa donadora 309 corresponde a una cepa de *Shigella flexneri*, y la receptora 175 a una *Escherichia coli*. El cambio fenotípico es manifiesto sobre el antimicrobiano SXT, que de 24 mm de diámetro de halo de inhibición, reduce hasta 6 mm después de la prueba de conjugación; tornándose, de sensible a resistente. En cuanto a los cambios genotípicos, aparece la adición de una banda en la cepa receptora, después de la conjugación, misma que concuerda con el tamaño de un plásmido de la cepa donadora. El tamaño del plásmido en consideración, es de aproximadamente 2900 pares de bases (Fotografía 3, anexos). Si bien la sensibilidad sobre NAL no cambia, hay disminución del halo de 9mm, después de la conjugación.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** nos muestra dos cambios fenotípicos, que, en orden de importancia son: El primero, sobre el SXT, que pasa de sensible a Resistente; y el segundo, NAL, de Sensible a Intermedio. También es posible apreciar un cambio genotípico. Fotografía 4 (anexos): Una banda, con un tamaño aproximado de 4200 pares de bases, presente en la cepa donadora 158D (*Escherichia coli*), la misma que aparece también en la cepa receptora 176C (*Shigella flexneri*), después de la prueba de conjugación. Algo relevante en esta prueba de conjugación, es el cambio fenotípico, similar a la anterior pareja. Pero el cambio fenotípico se aprecia sobre la adquisición de un plásmido de aproximadamente 4200 pares de bases, es decir, diferente al de 2900. Esto permite suponer la presencia de diferentes plásmidos portadores de resistencia a un antibiótico específico⁸⁸.

⁸⁷ Ordóñez-Smith. 2000. *Manual Práctico para laboratorios clínicos. Diversas pruebas de sensibilidad y su control de calidad.* Bristol

⁸⁸ Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General.* Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España
http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/27_micro.htm

Otra prueba de conjugación, entre las cepas 230 (*Escherichia coli*) y 472 (*Shigella flexneri*), correspondiente a la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, presenta un cambio fenotípico relevante sobre SXT, de Sensible a Resistente. El cambio genotípico de la cepa receptora después de la conjugación (230-472), presenta la situación especial de la adición de dos plásmidos procedentes de la cepa donadora (230e): el primero, corresponde a la primera banda de la parte superior, de aproximadamente 4200 pares de bases. El segundo, a la última banda del donador, de aproximadamente 1500 pares de bases. Este plásmido, parece ser el mismo de la pareja anterior. (Ver fotografía anexos).

Este tipo de transferencia de plásmidos de resistencia mediante conjugación, también fue observado en un trabajo realizado el año 2003, donde, según el antibiograma obtenido después de la conjugación, las cepas receptoras *Escherichia coli* y *Salmonella* adquieren resistencia a ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y tetraciclina⁸⁹.

Las parejas 373 – 218 y 136 – 242, no tuvieron cambios bruscos en la sensibilidad a los antimicrobianos. Simplemente disminución de los diámetros de halos de inhibición. Pero los receptores de ambas parejas, adquieren un plásmido de aproximadamente 2900 pares de bases, el mismo que parece no codificar resistencia.

La última pareja: 230 (*Escherichia coli*) – 154 (*Shigella sonnei*), presentan sólo disminución de los diámetros de los halos de inhibición en SXT y NAL. Pierde un plásmido en el proceso. Desde ya, la pérdida del plásmido no tendría relación con el cambio fenotípico.

En general, en la mayoría de las cepas receptoras transconjugantes (53%) presentaron disminución del halo de NAL (25 de 38 pruebas de conjugación). Este cambio leve no coincide con una resistencia adquirida por plásmidos. Además, de estas pruebas, sólo tres cepas donadoras son resistentes a NAL, y el resto sensibles. Entonces, la disminución de la sensibilidad a este antimicrobiano, prácticamente parece obedecer a un efecto mutacional sobre el cromosoma, dado que las mutaciones cromosómicas

⁸⁹ Shyamapada Mandal, Manidha Deb Mandal and Nishith Kumar Pal. 2003. R-Factor in *Salmonella* entérica Serovar Typhi; Transfer to and Acquisition from *Escherichia coli*. Department of bacteriology and Serology Calcutta school of Tropical Medicine Kolkata 700073 India pag 56, 65-67

presentan generalmente cambios graduales de la resistencia de las bacterias afectadas específicamente sobre el gen *gyrA* y/o *parC*, por la presencia del NAL⁹⁰.

La única cepa resistente a cuatro antimicrobianos (AMP, CHL, SXT y NAL), es *Escherichia coli* 171, la cuál presentó tres tipos de respuestas, dependiendo de las cepas receptoras contra las cuales fue confrontado durante la conjugación.

La primera, sin cambios fenotípicos ni genotípicos sobre *Shigella*, cepas 238 y 240. La cepa 238, con resistencia a AMP y SXT; y la cepa 240, con resistencia a SXT solamente.

La segunda, con cambios sólo fenotípicos correspondiendo simplemente a disminución del diámetro del halo de inhibición de NAL para las cepas 63, 201, 242, 319 y 373. Y la tercera, con cambios tanto fenotípicos como genotípicos, sobre la cepa 227, *Shigella flexneri*, con la adquisición de un plásmido de aproximadamente 1500 pares de bases, y la adquisición de Resistencia a Ampicilina, y un cambio del diámetro del halo de inhibición para NAL de 31mm a 17mm. Otra cepa, dentro del tercer tipo de respuesta, es la 244, *Shigella flexneri*, cuyo efecto común es fenotípico, es decir, la adquisición de resistencia a AMP, y disminución del diámetro del halo de inhibición de NAL. No obstante, y el cambio genotípico es similar. Ya que en la cepa 244 es evidente la adquisición de un plásmido. Entonces, notamos un similar comportamiento de la cepa donadora (171, *E. coli*) según la cepa receptora.

De las cinco cepas sin cambios genotípicos, dos (63 y 319) ya tenían resistencia contra AMP. Este hecho, podría explicar la ausencia del cambio fenotípico sobre AMP.

La cepa 242, es la única que presenta una disminución del diámetro en AMP, pero este fenómeno ocurre también en otro experimento sobre esta misma cepa, frente a otra donadora 136, lo cual nos inclina a descartar un efecto de las cepas donadoras sobre esta cepa.

⁹⁰ Drlica K, Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews. Public Health Research Institute, New York, New York 10016*

13 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos deducir, que este estudio, no tiene la potencia epidemiológica para indicar el grado de transferencia de ADN plasmídico en cepas circulantes en nuestro medio. Sin embargo, podemos indicar que las cepas que hemos utilizado son procedentes de pacientes que cursaron procesos diarreicos agudos, de nuestro medio.

Todas las cepas, estudiadas tanto *Escherichia coli*, como *Shigella*, presentaron de 1 a 10 plásmidos, que en base al estudio del dendrograma antes de la conjugación, se determinó, que existe una similitud poco cercana entre cepas donadoras y receptoras de importancia. Otro hecho importante de anotar, es que la menor similitud entre todas las cepas estudiadas, es del 63%, con máximo de 100%.

De los cinco antimicrobianos utilizados en este estudio: AMP, CHL, SXT, NAL y CTX, podemos indicar que los principales antimicrobianos involucrados en la conjugación, son AMP y SXT, que no se presentaron de manera asociada, más bien individual. Más aún, para SXT pudimos observar dos diferentes plásmidos que codifican resistencia para este antimicrobiano en dos diferentes apareamientos.

Entre las cepas que trabajaron como donadoras, solo cuatro pudieron lograr la transferencia de plásmidos de resistencia mediante conjugación in vitro. Y cinco de las cepas receptoras transconjugantes (13%), lograron adquirir tales plásmidos de resistencia. También pudimos observar cepas con capacidad de transferencia de plásmidos no codificadores de resistencia (5.26%). Así como cepas receptoras transconjugantes con cambios fenotípicos y/o genotípicos (21%) y por último cepas receptoras transconjugantes sin cambio alguno (13%).

14 RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos en el estudio realizado, ponemos en consideración las siguientes recomendaciones:

- Realizar investigaciones acerca de la tasa de conjugación entre especies bacterianas, en nuestro medio.
- Determinar si el plásmido transferido, es efectivamente codificador de resistencia, por detección del gen de resistencia por PCR u otra técnica disponible.
- Determinar los perfiles antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* no patógena (saprofitas) de la flora normal intestinal de pacientes en nuestro medio.
- Verificar si estas cepas saprofitas, son conjugantes y además portadoras de plásmidos que codifican resistencia a diferentes antimicrobianos. y si estas cepas pueden transferir su material durante el tiempo que se realiza el antibiograma.
- Considerar para una posterior investigación que probables factores específicos, favorecen o perjudican la conjugación entre los géneros *Escherichia* y *Shigella*,

15 BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi JA, Ostrosky-Zeichner L, DuPont HL; Ericsson CD. Empirical antimicrobial therapy for traveler's diarrhea. *Glin Infect Dis* 2000
2. Algorta Gabriela, Bacilos Gram negativos no exigentes enterobacteriaceae, vibrionaceae, pseudomonas.
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2022.pdf>
3. Antibióticos: Mecanismos de Resistencia antibiótica
4. Bern C, Martines J, deZoysa I, Glass RI. Magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992.
5. Broca thomas D. "Microbiología". Editorial PRENTICE may HISPANOAMERICANA S.A. Mexico. 6º edición.
6. Bryskien A 1993. Fluorquinolones: mechanisms of action and resistance. *Int J Antimicrob Agents*.
7. C.D.C. 2002. Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents.
8. Calvo, A et al. 2005. Activity of different antimicrobial agents against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Española de Quimioterapia*.
9. Carmona, O, Silva, H. 1994. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*.
10. Castellón Reynaga, Dylían. 2001. Genética Microbiana, Capítulo V. Carrera de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMON, Cochabamba – Bolivia.
11. Chirinos Pacheco Julio 2001. Los Mecanismos de la Resistencia Microbiana. *Revista Médica del C.I.E.M. Arequipa, Perú*.
12. Cortés-Ortiz Alejandra, QFB, Rodríguez, Guadalupe Angeles, M en C, Moreno Escobar Alejandra, QFB, Tenorio-Lara Jesús Manuel QFB, Torres-Mazadiego Benita Pilar, QFB, Montiel-Vázquez Edith, QFB. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México *Salud pública*, vol.44 no.4 Cuernavaca
13. de Nader Olga Miguel. Enterobacterias II *Escherichia* y *Shigella*. *Microbiología Médica*. Editorial Atlante S.R.L. Buenos Aires 1996.
14. Drlica K, Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Public Health Research Institute, New York, New York 10016
15. Fausto Sarmiento O. *Diccionario de Ecología*.
16. Ferrer Sergi; 2005. *Oenococcus oeni*. ENOLAB - Laboratorio de Microbiología Enológica; Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia; Burjassot, Valencia, España.

17. Garcia-Rey, A, et al. 2002. *Pharmacoepidemiological analysis of provincial differences between consumption of macrolides and rates of erythromycin resistance among Streptococcus pyogenes isolates in Spain. Journal Clinical Microbiology.*
18. Gutierrez Otero W. 1998. *Helicobacter pylori y su resistencia al Metronidazol en Colombia. Rev. Colombia Gastroenterología.*
19. Herveg, Jean-Pierre; BARCIA-MACAY, Maritza. 2004. *Biología Molecular: Los Plásmidos. Cochabamba, Bolivia.*
20. Herzberg O, Moulton J. *Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Crystal structure of β -lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution. Sci revmedchile@smschile.cl*
21. [http://203.65.72.7/WebSite/%E6%9C%AC%E5%B1%80%E7%B0%A1%E4%BB%8B/%E6%9D%B1%E5%8D%80%E5%88%86%E5%B1%80/JCM%20shigella\(Lee,Ko\).pdf](http://203.65.72.7/WebSite/%E6%9C%AC%E5%B1%80%E7%B0%A1%E4%BB%8B/%E6%9D%B1%E5%8D%80%E5%88%86%E5%B1%80/JCM%20shigella(Lee,Ko).pdf)
22. http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/14resumen.htm
23. <http://www.genetics.org/cgi/content/full/149/3/1183>
24. <http://www.ingentaconnect.com/content/paho/pajph/2004/00000015/00000004/art00001>
25. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma03/parte07/antibioticos/mecres02.htm>
26. Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Conjugación Bacteriana, Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/27_micro.htm*
27. Iañez Pareja, Enrique. 1998. *Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. Curso de Microbiología General. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología, Universidad del Granado, España. http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm*
28. J.D. García – Rodríguez, Nov. 1998. *Microbiología Médica, Editorial You & Us Ronda de Bruente; 1ª reimpresión*
29. Joklik Wolfgang K., Willet Hilda P., Amos Bernard, 1988. *Zinsser Microbiología; 18 edición, Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina*
30. Khan, A et al. 2002 *Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India Journal Clinical. Microbiology.*
31. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swedlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. *Global burden of Shigella infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999.*
32. Livermore D, Yuan, M. 1999. *Beta-Lactamases and extended spectrum Beta-Lactamase. Review Clinical Microbiology.*
33. Llanccce Mondragón Lus María. 2002 *Estudio de Resistencia in vitro de cepas de Shigella frente a 20 antimicrobianos en el Hospital Carrión 1999-2001. Oficina general de Bibliotecas y Biblioteca General. UNSMN*
34. Low Padilla Eduardo. Esquivel Diego. 2003: *Curso de Manejo Médicoquirúrgico de infecciones odontológicas: Mecanismos de Adquisición de Resistencia Antibiótica. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.*
35. Martín NG, Carmona O, Guzmán M. 2000. *Una Década en la Evolución de la Resistencia a β -lactámicos por bacilos Gramnegativos en Centros Médicos de Venezuela. Archiv Venez de Farmacol y Terap.*

36. Martin NG. 2000. Aspectos y Tendencias de la Resistencia a β -lactámicos por Bacilos gramnegativos, durante una Década en Centros Médicos de Venezuela. Tesis de Ascenso.
37. Martinez JL, Baquero F. 2000. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*.
38. Matthew A. Wikler, Franklin R. Cockerill, y cols. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, Pennsylvania, USA.
39. Merino, Luis A.; Hreňuk, Gabriela E.; Ronconi, María C.; Alonso, José M. 2004. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino
40. Montealegre A., Jaime R. 2004. Genética Microbiana. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2001. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 5th ed. Approved standard M11A5, Villanova,
42. Ordóñez-Smith. 2000. Manual Práctico para laboratorios clínicos. Diversas pruebas de sensibilidad y su control de calidad. Bristol.
43. Paul D. Stapleton, Kevin P. Shannon, and Gary L. 1999. French Construction and Characterization of Mutants of the TEM-1 β -Lactamase Containing Amino Acid Substitutions Associated with both Extended-Spectrum Resistance and Resistance to β -Lactamase Inhibitors *Antimicrob. Agents Chemother*,
44. Pedro Martínez, Máximo Mercado, Salim Máttar. 2003. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. Corporación Editora Médica del Valle. Colombia
45. Pérez-Trallero, E, et al. 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1.684 *Streptococcus pneumoniae* and 2.039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships, results of a 1 year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*.
46. Poole K. 2000. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*.
47. Programas Educativos Especiales, Iladiba. 1999. Enfoque Actual de la terapia antibiótica. Presencia UPR en la reforma de Salud y Educación Continua para el Médico Primario. Colombia. Nº 5.
48. Raisman Jorge S., González Ana María. 2000: gened.emc.maricopa.edu/bio/bioBioBookPROTSYN.html
49. Saldarriaga T. Félix, Calle Sonia y Camacho Carlos. 2002. Resistencia Antimicrobiana de Cepas de *Escherichia coli* Provenientes de Lechones Lactantes Criados en una Granja Tecnificada de Lima. Laboratorio de Bacteriología - FMV - UNMSM. Apdo. 41-0068. Lima – Perú.
50. Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, U.S.A.
51. Sanchez Roman Giovanna. 2004. Importancia Epidemiológica de los Perfiles Plasmídicos de cepas de *Shigella* aisladas en diferentes regiones de Bolivia y otros factores de riesgo entre los años 1999 y 2004. Facultad de ciencias farmaceuticas y Bioquímicas. UMSA.
52. Sanford, JP, Gilbert DN, Gerberding JL, Sande MA. 1996. Guide to antimicrobial therapy.

53. Seppala, et al. 1998. A novel erithromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes* Antimicrobial Agent Chemotherapy.
54. Serrano Núñez, Yolanda. 2004. *Genética Bacteriana – Microbiología General*. Recinto de Bayamón. Universidad Interamericana de Puerto Rico.
55. Shyamapada Mandal, Manidha Deb Mandal and Nishith Kumar Pal. 2003. R-Factor in *Salmonella entérica* Serovar Typhi; Transfer to and Acquisition from *Escherichia coli*. Department of bacteriology and Serology Calcutta school of Tropical Medicine Kolkata 700073 India .
56. Soueysch Hernández Maylen, Beltran Diaz Alfa, Perez Troya Belkis. 2005 Las quinolonas. *Revista medica cubana SINTEFARMA*. versión electrónica. RNPS 1815 ISSN
57. Stanier y otros. 1988: "Microbiología, 2ª edición". Ed Reverté, Barcelona.
58. Thomson KS, Sanders CC, Smith Moland E. Use of microdilution panels with and without β -lactamase inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999.
59. Torrico, Elizabeth, Trigo Christian. 2003. *Manual de Procedimientos y Control de Calidad Interno Método de Bauer Kirby*. OPS-OMS. INLASA 1ª edición. EDOBOL. La Paz, Bolivia.
60. Trieu-Cuot, P., M. Arthur, P. Courvalin. 1987. Origin, Evolution and Dissemination of Antibiotic Resistance Genes. *Microbiol. Sci*.
61. Trigo Christian, Damiani Esther, Albarracin Marisol, García Giovanni, Revollo Carmen, Torrico Elizabeth. *Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antibacterianos (VERA)*. Boletín Informativo. Ministerio de Salud y Prevención Social- INLASA-OMS-OPS. Agosto 2001. N°3
62. Trigo Christian. Torrico, Elizabeth. Riera, Esteban. Aguilar, Sandra. 2003. *Manual de procedimientos bacteriológicos en sensibilidad y resistencia antimicrobiana*. OPS-OMS. INLASA 1ª edición. EDOBOL. La Paz, Bolivia.
63. Veal, W. et al. 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump Due to an *mtrR* Mutation Is Required for Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* *J. Bacteriol*.
64. Veal, W. et al. 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump Due to an *mtrR* Mutation Is Required for Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* *J. Bacteriol*.
65. *Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en la red del Cono Sur. 2002 Porcentaje de Resistencia a Antibióticos adquirida por Shigella spp en el año 2000 -.* Bolivia.
66. Wolfgang K. Joklink, Hilda P. Willett. *Enterobacteriaceae: Salmonella y Shigella, patógenos intestinales Zinsser Microbiología*. 18ª Edición
67. www.WHO.org World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000 A Message From the Director-General, World Health Organization.
68. Yan, S.S., et al. 2000. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*.
69. Zamudio Erika Juliana. 2003. *Resistencia Bacteriana: Mecanismos de Resistencia*. Programa Universidad Virtual. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

ANEXOS

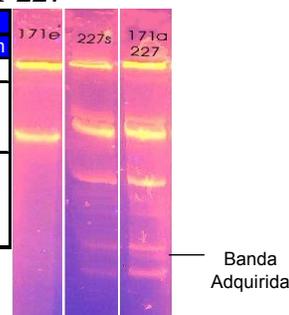
RESULTADOS

PAREJAS DE CEPAS CONJUGANTES CON CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA, MEDIANTE CONJUGACIÓN

Fotografía 1 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 171-227

Carril	Características	Antibiograma									
		Amp	Diám	Chl	Diám	Nal	Diám	Sxt	Diám	Ctx	Diám
171e	Donadora	R	6	R	6	R	6	R	6	S	31
227s	Receptora antes de la conjugación	S	23	S	28	S	31	R	6	S	35
171-227a	Receptora después de la conjugación	R	6	S	26	I	17	R	6	-	-

Diám: Diámetro; Amp: Ampicilina; Chl: Cloranfenicol; Nal: Ac. Nalidíxico;
Sxt: Sulfametoxazol -Trimetropim; Ctx: Cefotaxima

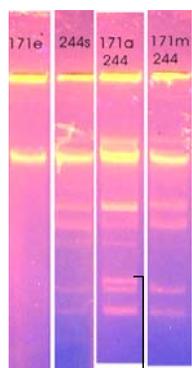


Fotografía 2 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 171-244

Carril	Características	Antibiograma									
		Amp	Diám	Chl	Diám	Nal	Diám	Sxt	Diám	Ctx	Diám
171e	Donadora	R	6	R	6	R	6	R	6	S	31
244s	Receptora antes de la conjugación	S	22	S	29	S	26	R	6	S	31
171a 244	Receptora después de la conjugación	R	6	S	19	S	19	R	6	-	-

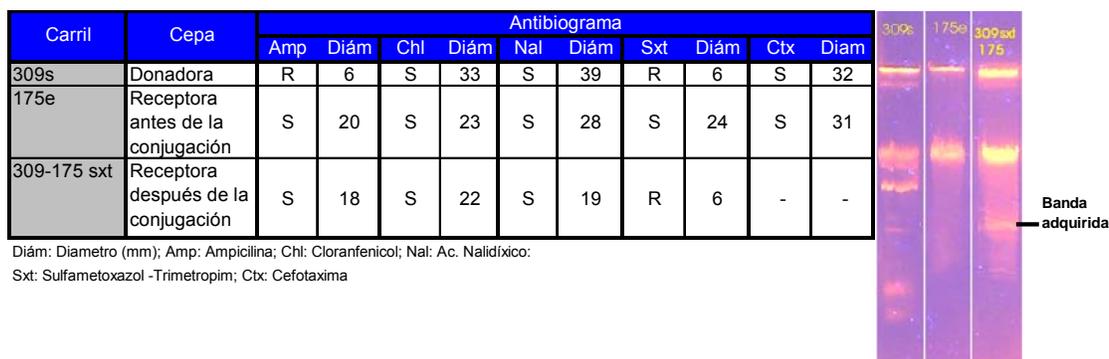
Diám: Diámetro (mm); Amp: Ampicilina; Chl: Cloranfenicol; Nal: Ac. Nalidíxico;
Sxt: Sulfametoxazol -Trimetropim; Ctx: Cefotaxima

171e, Cepa donadora; 244s: cepa receptora antes de la conjugación; 171a244: cepa receptora después de la conjugación, tomada de borde del halo de inhibición. 171m244 cepa receptora, tomada de una zona lejos de cualquier halo de inhibición.

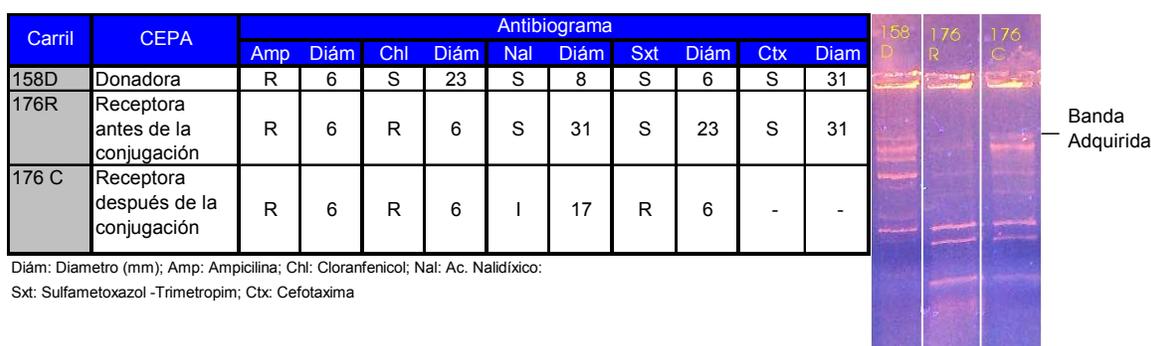


Banda Adquirida

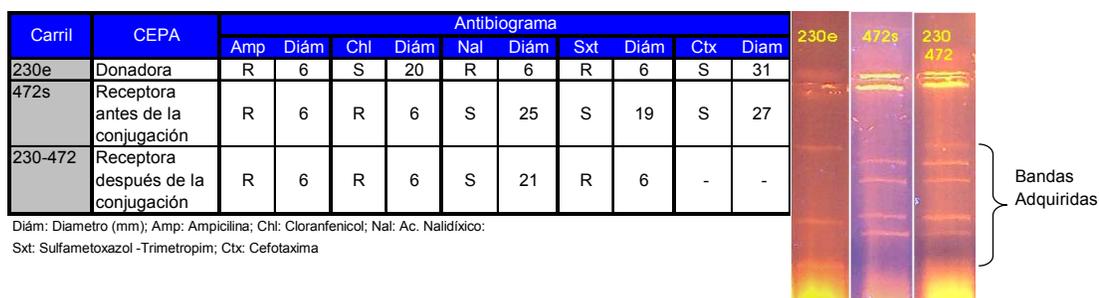
Fotografía 3 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 309-175



Fotografía 4 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 158-176

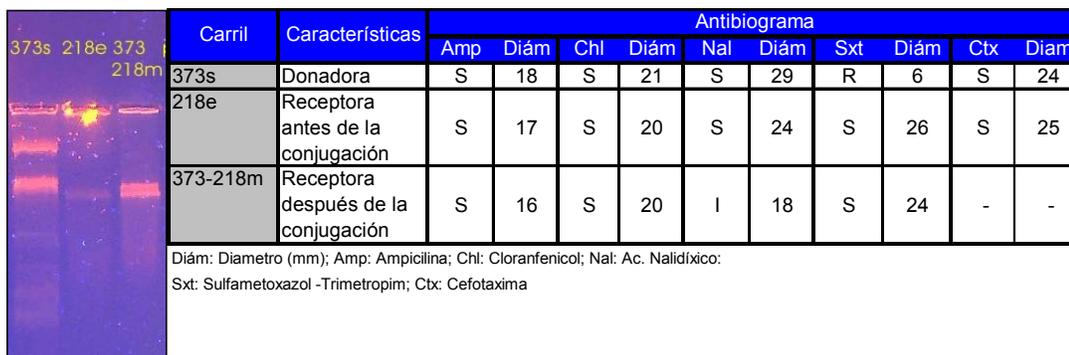


Fotografía 5 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 230-472

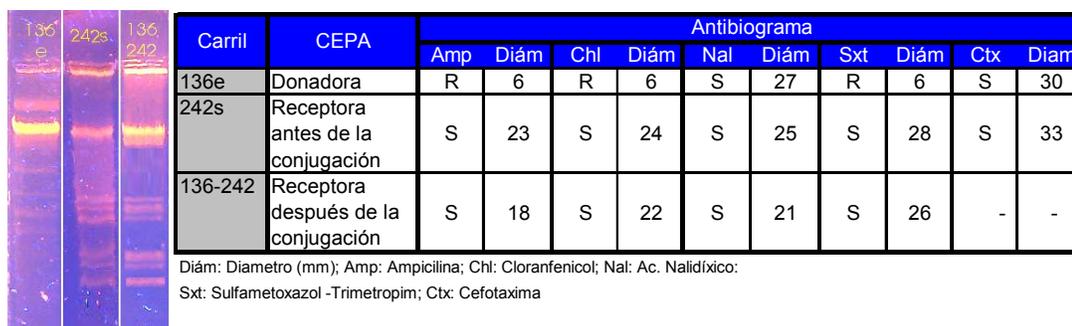


PAREJAS DE CEPAS CONJUGANTES CON CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS, MEDIANTE CONJUGACIÓN

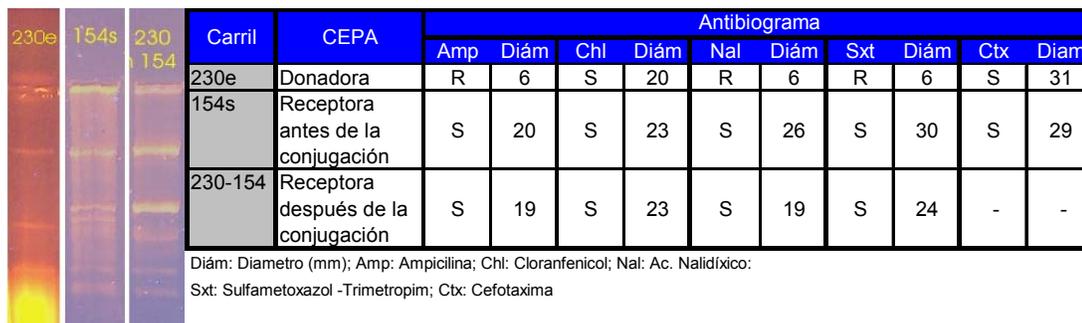
Fotografía 6 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 373-218



Fotografía 7 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 136-242



Fotografía 8 Prueba de conjugación realizada entre las cepas 230-154



MARCADOR DE PESO MOLECULAR

