



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Escuela de Químico Farmacobiología

**ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A DETERGENTES EN UN AISLAMIENTO DE
Klebsiella pneumoniae ASOCIADO A MASTITIS BOVINA**

Tesis que presenta

Sonia Catalina Sánchez Baca

Como requisito parcial para optar por el Título Profesional de Químico

Farmacobiólogo

Director de tesis: Dr. Joel Edmundo López Meza

Morelia, Michoacán, diciembre de 2006

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto 14.5 CIC/UMSNH, "Análisis molecular de determinantes de resistencia a antimicrobianos en aislados de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina".

DEDICATORIA

Para mi Lalo, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joel E. López Meza por aceptarme en el CMEB, por tener siempre la intención de ayudarme y por su confianza.

A la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, por su valiosa opinión y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Pedro D. Loeza Lara, por su paciencia, por su disposición, su ayuda y sus consejos.

Al Dr. José Luis Anaya López, por compartir su experiencia y aceptar formar parte del comité.

A mamá y a papá por su amor, por su comprensión, su apoyo y su fe en mí.

A mis Kerrekas por compartir su alegría conmigo, hacer más ligeros los malos momentos y por regalarme su amistad.

A Ana, por sacudirme la flojera y por su contagiosa emoción por la ciencia.

A las Lilis por el consejo, el consuelo, el abrazo, el ánimo.

A José Luis. Por las comidas, las sonrisas, los saludos. Por querer hablar conmigo y escuchar. Por todo lo que he aprendido de ti dentro y fuera del laboratorio.

A César, por nunca dejarme olvidar que tengo sueños y que son posibles si en verdad los deseo.

A May por la frizzy, la sillita en la cochera, la sopita y el poema.

A Elías, el doctor de mi computadora. Por mantenerla en buen estado para poder completar mi trabajo, por los buenos chistes y los malos también.

A Morelia, por compartir su mesa de trabajo, enseñarme las técnicas del laboratorio y los pequeños secretos que ayudan a que resulte mejor.

A mis compañeros del M3. Julio, Angie, Lety, Eric, Heber, Lalo, Paco. Por las pequeñas charlas, las risas y el pastel.

A todo aquel que me dijo que siguiera, que faltaba poco, que soy capaz, que me deseó suerte.



“Por que has venido a recoger tu imagen
Y eres mejor que todas tus imágenes
Porque eres linda desde el pie hasta el alma...”

Mario Benedetti

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1 Mastitis causada por bacterias coliformes	3
1.2 Uso de detergentes en el control de microorganismos	5
1.3 Los plásmidos bacterianos	9
1.4 Tipos de plásmidos	10
1.5 Replicación de los plásmidos bacterianos	11
1.5.1 Mecanismo de replicación vía el círculo rodante (RC)	11
1.5.2 Mecanismo de replicación tipo <i>theta</i>	13
1.5.3 Mecanismo de replicación por desplazamiento de la cadena	14
2. Antecedentes	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivo General	16
4.1 Objetivos Específicos	16
5. Material y Métodos	17
5.1 Colecta del aislamiento STA6	17
5.2 Pruebas de sensibilidad a antibióticos y susceptibilidad a compuestos cuaternarios de amonio (QAC)	17
5.3 Identificación del aislamiento STA6	18
5.4 Identificación de determinantes de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio	19
5.5 Obtención de los plásmidos	20
5.6 Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol	21
5.7 Purificación de ADN a partir de agarosa (Gene Clean)	21
5.8 Digestión de ADN con enzimas de restricción	22

5.9	Ligación de fragmentos de ADN	23
5.10	Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> para electroporación	23
5.11	Electroporación de células de <i>E. coli</i>	24
5.12	Minipreparación de plásmidos de <i>E. coli</i>	24
5.13	Maxipreparación de plásmidos de <i>E. coli</i>	25
5.14	Reacciones de secuenciación de ADN	26
5.15	Limpieza de las reacciones de secuenciación	27
5.16	Análisis de la secuencia	27
6.	Resultados	28
6.1	Colecta del aislamiento STA6 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
6.2	Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos y sensibilidad a CTAB en el aislamiento STA6	29
6.3	Identificación del aislamiento STA6 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
6.4	Determinación de CIMs	31
6.5	Identificación de determinantes de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio	32
6.6	Clonación y determinación parcial de la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de <i>K. pneumoniae</i>	32
7.	Discusión	39
8.	Conclusión	45
9.	Referencias	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)	7
Figura 2. Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de ADN de cadena sencilla	12
Figura 3. Modelo de replicación tipo theta	14
Figura 4. Mecanismo de replicación por desplazamiento de la cadena	15
Figura 5. Amplificación por PCR de la región V3 del ADNr 16S del aislamiento STA6	30
Figura 6. Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región V3 del ADN ribosomal 16S del aislamiento STA6	31
Figura 7. Identificación de determinantes de resistencia a QAC en el aislamiento STA6 de <i>K. pneumoniae</i>	32
Figura 8. Perfil de plásmidos del aislamiento STA6 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
Figura 9. Purificación y digestiones enzimáticas del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
Figura 10. Plásmidos recombinantes conteniendo los productos derivados de la digestión del plásmido pBMKn1 con <i>KpnI</i>	36
Figura 11. Plásmidos recombinantes digeridos con la enzima <i>KpnI</i>	36
Figura 12. Secuencia de nucleótidos del fragmento <i>KpnI</i> de ~500 pb del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38

1. Introducción

La mastitis bovina es una inflamación del tejido mamario causada usualmente por bacterias. Esto se manifiesta con ubres duras, de color rojo, más tibias de lo normal y con dolor al tacto (Fox *et al.*, 2001). En los casos de mastitis clínica, el cuarto infectado en general se inflama, en algunas vacas se encuentra dolorido al tocarlo, la leche se encuentra visiblemente alterada por la presencia de coágulos, descamaciones, o suero descolorido y algunas veces sangre. En casos más severos (mastitis aguda), la vaca muestra signos generalizados: fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito, reducción aguda de la producción de leche. En contraste, la mastitis subclínica es sutil y más difícil de corregir. La vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal. A pesar de ello, los microorganismos y células blancas de la leche (células somáticas) que combaten las infecciones se encuentran elevadas en gran número (Wattiaux, 1999).

Streptococcus agalactiae era considerado el mayor agente etiológico, pero se ha logrado reducir su incidencia mediante técnicas de prevención, control y tratamiento, incluyendo medidas profilácticas y de higiene (Fox *et al.*, 2001). Actualmente, el patógeno contagioso más importante causante de mastitis es *Staphylococcus aureus* cuya infección puede convertirse en crónica y permanecer durante toda la vida del animal. Sin embargo, algunas bacterias coliformes como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son las responsables principales de la mastitis aguda, aunque normalmente el sistema inmune se encarga de eliminarla en cuestión de días (Hogan y Smith, 2003). La mastitis causada por *Klebsiella* puede

presentarse esporádicamente en una o varias vacas que dejan de lactar o bien en vacas con cuadros severamente agudos o suaves, pudiéndose dar manifestaciones crónicas. Este es uno de los microorganismos más importantes en términos epidemiológicos de la mastitis. Las bacterias del género *Klebsiella* se caracterizan por ser bacilos cortos Gram negativos de 1.5-5 μ de longitud, gruesos, con extremos redondeados, inmóviles, encapsulados por lo que presentan un aspecto mucoso en el medio de cultivo (Holt *et al.*, 2000).

La mastitis es la principal enfermedad de bovinos lecheros donde el uso de antimicrobianos para su control es una práctica común. Esto ha permitido la selección de resistencia a estos compuestos en los microorganismos asociados a esta enfermedad; sin embargo, el conocimiento actual respecto a los determinantes de resistencia, la localización y organización de los mismos en el genoma de las bacterias asociadas a animales de granja es reducido.

La resistencia a antimicrobianos es un problema que nos concierne a todos, no es algo que exista local o nacionalmente, es un problema mundial. Los organismos resistentes que surgen en un área geográfica pueden trasladarse a otra haciendo el problema más grave. Ya sea en animales, pacientes de hospitales o personas en casa, los antibióticos seleccionan bacterias resistentes que llegan a un ambiente común. Cuando el uso es apropiado esta consecuencia es aceptable. Desafortunadamente mucho de este uso no es el adecuado, ya que se puede disponer de ellos con gran facilidad por infinidad de razones sin fundamento. Por tanto la selección de resistencia es injustificada y queda más como un costo que un

beneficio (FAO/OIE/WHO, 2003).

Un gen o determinante de resistencia no está confinado al hospedero en el cual primero aparece, puede ser transferido a otra bacteria por fagos, plásmidos o transposones. Los genes cruzan barreras genéticas tan diversas como lo son un cerdo y una vaca. Algunas especies son capaces de incorporar genes de resistencia del ADN libre de bacterias resistentes. Así, ocurre un gran intercambio de genes continuamente en el mundo microbiano. Si añadimos el uso masivo de antibióticos tendremos una perspectiva de la magnitud del problema (Levy, 1995). Ante ésto, es necesario establecer y conocer las resistencias prevalentes en los microorganismos y determinar los mecanismos moleculares detrás de ella, lo cual permita el desarrollo de una estrategia de uso y control adecuado de los antimicrobianos.

1.1 Mastitis causada por bacterias coliformes

El término coliformes se refiere a bacterias de la familia Enterobacteriaceae que incluye los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*. Son habitantes del tracto gastrointestinal de los animales y el hombre, y se eliminan comúnmente por las heces razón por la cual se identifican como microorganismos ambientales responsables de la mastitis (Hogan y Smith, 2003).

Los coliformes provienen del medio ambiente de la vaca (pesebre, suelo, estiércol, etc.) por lo que las prácticas de manejo e higiene tienen gran influencia en la mastitis provocada por este tipo de microorganismos. Por esta razón es prácticamente imposible eliminarlas por completo, ya que se encuentran de manera

natural donde vive el animal y pueden ser controladas sólo hasta cierto punto mejorando la limpieza tanto de las vacas como de su medio ambiente. Las bacterias coliformes se multiplican bajo condiciones de humedad en presencia del sustrato adecuado (estiércol). Cuando la vaca está en un pesebre sucio, lodazales, o aún cuando se salpica la ubre con agua contaminada, estas bacterias pueden colonizar la piel de la ubre y eventualmente penetrar a través del canal del pezón durante la ordeña. También es común que se transmita el agente infeccioso por malos procedimientos de manejo, las manos contaminadas del ordeñador, materiales (tela) utilizados para lavar la ubre o falta de higiene en la máquina ordeñadora (Wattiaux, 1999). Si se contamina la piel de la ubre y luego se lava y no se seca, el agua que corre hacia la punta del pezón puede transportar las bacterias. Las vacas afectadas pueden mostrar signos clínicos que progresan generalmente a una forma aguda que incluso puede llevar a la muerte del animal. Estos casos aparecen por lo general de imprevisto con cuartos inflamados, calientes y leche con coágulos, y amarillenta. Los casos severos ocurren al comienzo de la lactancia principalmente alrededor del parto (Todhunter *et al.*, 1991).

Las infecciones con *Klebsiella* ocurren con más frecuencia al comienzo del período seco. Por otra parte, las infecciones con *E. coli* tienden a ocurrir inmediatamente antes o después del parto. Por lo tanto, es muy importante que los grupos de vacas de secado reciente, así como aquellas próximas a parir se mantengan en corrales con pesebre limpio y seco con el fin de minimizar el riesgo de infección. Hay muchas estrategias de manejo de la salud de la ubre que se

recomiendan para el periodo seco, estas incluyen: terapia de la vaca seca con antibióticos, sellado del pezón, manejo del medio ambiente, manejo nutricional, método de secado y programas de vacunación. La terapia con antibióticos al momento del secado ayuda a prevenir infecciones contraídas al comienzo del periodo seco. El tratamiento de las vacas secas y el sellado del pezón luego de la ordeña son más efectivos para controlar la mastitis contagiosa que la ambiental. Los programas de vacunación han demostrado eficacia contra las infecciones. Las prácticas de manejo tales como mantener limpio y seco en todo momento el establo son, sin lugar a dudas, de las más efectivas para prevenir la mastitis por coliformes (Hogan y Smith, 2003).

1.2 Uso de detergentes en el control de microorganismos

En el mercado se encuentran cuatro tipos de detergentes sintéticos:

Detergentes aniónicos	Jabones, sales de sodio y de potasio de los ácidos grasos más grandes, alquilsulfatos como lauril-sulfato sódico y los alquilbencenosulfonatos, que contienen comúnmente como grupos solubles sulfatos y sulfonatos de sodio.
Detergentes catiónicos	Son principalmente compuestos cuaternarios de amonio (QACs). Ej. bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) o el cloruro de benzalconio.
Detergentes no iónicos	Los productos de condensación del óxido de etileno con materiales fenólicos o ácidos grasos.
Detergentes biológicos	Contienen enzimas.

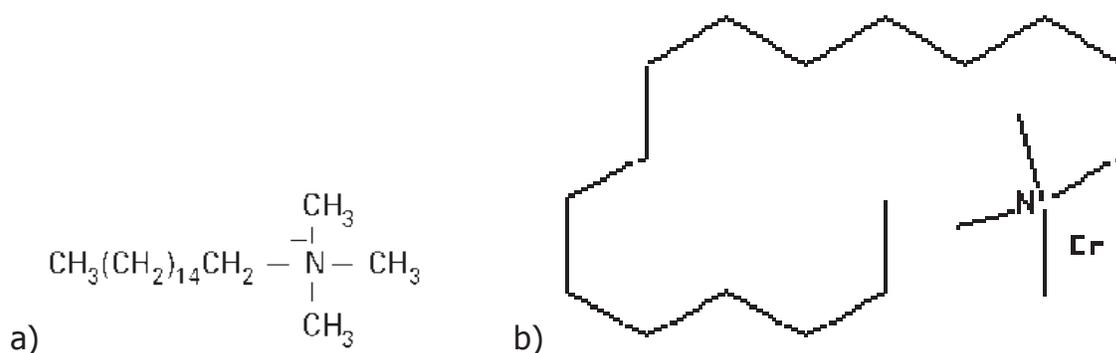
(McDonnell y Russell, 1999).

El uso inadecuado de los detergentes no ha recibido tanta atención como el de los antibióticos a pesar de que contribuyen a la resistencia bacteriana. La resistencia a antisépticos y desinfectantes (ej. detergentes) es poco comprendida, pero se conocen algunos mecanismos. Algunos detergentes, principalmente aquellos que afectan membranas (ej. compuestos cuaternarios de amonio o QAC) son menos efectivos contra las bacterias Gram negativas que contra las Gram positivas. La razón parece ser que los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas impiden que las moléculas hidrofóbicas se intercalen con la membrana exterior, mientras que las porinas (proteínas de la membrana externa que actúan como canales de difusión) restringen el acceso a la membrana citoplasmática limitando la difusión. Algunos detergentes que tienen actividad sobre la membrana, sin embargo, pueden romper esta barrera (Salyers y Whitt, 2002).

Los detergentes catiónicos con acción bactericida elaborados a partir de compuestos cuaternarios de amonio, ej. bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y cloruro de benzalconio (BC), se utilizan de forma rutinaria para desinfectar los equipos y utensilios de la ganadería lechera, además de su uso en hogares, hospitales y la industria de los alimentos. Estos productos son ligeramente tóxicos, no producen irritación y carecen de olor, razones por las que tienen amplia aceptación. No obstante las bondades de estos compuestos, el uso extensivo de los desinfectantes a base de QAC ha permitido la selección de la resistencia en diversos microorganismos.

El CTAB es una sal de amonio cuaternario. Uno de sus grupos alquilo es de

gran tamaño molecular y tiene propiedades detergentes (Figura 1). Se conocen con el nombre de jabones invertidos, debido a que su actividad superficial se debe a la presencia de un ión positivo y no a uno negativo como sucede en los sulfatos de alquilo e hidrógeno, que son los detergentes usuales (Brusés *et al.*, 2000).



Fórmula molecular: C₁₉H₄₂BrN

Peso molecular: 364.45

Figura. 1 Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB). a) Fórmula semidesarrollada. b) Fórmula estructural.

Un tipo interesante de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio ha sido encontrada en estafilococos, esta se debe a la presencia de una bomba en la membrana citoplasmática que expulsa el compuesto fuera de la célula. Los genes que codifican para estas bombas QAC se han detectado en el cromosoma y en plásmidos, básicamente los denominados RC que se replican por el mecanismo del círculo

rodante (Salyers y Whitt, 2002). Estas proteínas son capaces de expulsar también el colorante bromuro de etidio (agente con capacidad de intercalarse en el ADN) y otros biocidas catiónicos (Bjorland *et al.*, 2005). Hasta el momento no se ha descrito la resistencia a detergentes QAC en bacterias del género *Klebsiella* asociadas a mastitis bovina.

En aislados de *S. aureus* provenientes de humanos y en estafilococos coagulasa negativos (CoNS) se ha reportado la caracterización de tres diferentes determinantes que confieren resistencia a QAC: *qacA*, *qacB* y *smr (qacC)*, y dos más, *qacG* y *qacH*, han sido encontrados en CoNS obtenidos a partir de muestras de alimentos (Bjorland *et al.*, 2003). Estudios realizados en Noruega con aislados de estafilococos provenientes de hospitales e industria alimenticia muestran un vínculo frecuente entre la resistencia a QAC y la resistencia a antibióticos como la penicilina; los determinantes *qacA/qacB* y el gen de β -lactamasa (*blaZ*) se han encontrado en un mismo plásmido (Bjorland *et al.*, 2005).

Con el objetivo de identificar y analizar la presencia de estos genes en microorganismos asociados a animales, principalmente los de granja y domésticos, en años recientes se han realizado algunas investigaciones. El determinante *smr (qacC)* se caracterizó en cepas de *S. aureus* obtenidas de bovinos (Bjorland *et al.*, 2001); además, el gen *qacA* se identificó en cepas de *S. haemolyticus* obtenidas de bovinos y felinos (Anthonisen *et al.*, 2002). Y en cepas de *Staphylococcus* provenientes de equinos se determinó el gen *qacJ* (Bjorland *et al.*, 2003). No obstante, aun existen pocos estudios y en la mayoría de ellos se desconoce la distribución que presentan

estos genes. En México no se tienen reportes al respecto, a pesar del problema de Salud Pública que puede representar la resistencia hacia antimicrobianos de este tipo.

1.3 Los plásmidos bacterianos

Los plásmidos son típicamente elementos genéticos que se replican independientemente del cromosoma. La gran mayoría de los plásmidos son moléculas de ADN bicatenarios circulares, aunque hay algunos lineales (Madigan *et al.*, 1998). Su tamaño varía de 1000 a más de un millón de pares de bases. No son esenciales para el crecimiento celular; sin embargo, le confieren características especiales a las bacterias que los poseen como puede ser la resistencia a antibióticos, la degradación de compuestos complejos, la producción de colicinas, enterotoxinas, enzimas de restricción y de modificación.

De manera similar al ADN cromosómico de la célula huésped, el ADN plasmídico es duplicado antes de cada división celular. Durante esta etapa, las copias del ADN plasmídico son segregadas a cada célula hija, asegurando la continua propagación del plásmido en las sucesivas generaciones de la célula huésped (Lodish *et al.*, 2000). Algunos plásmidos también presentan la capacidad de integrarse en el cromosoma y en estas condiciones su replicación está bajo el control del cromosoma, a estos se les denomina episomas. Las bacterias pueden transferir plásmidos entre sí compartiendo de esta manera las características que este confiera. El mecanismo principal de transferencia es la conjugación, la cual está controlada por un grupo de genes en el plásmido que constituye la región *tra*. La conjugación es un proceso

replicativo y ambas células obtienen copias del plásmido. Los plásmidos poseen una gran relevancia en términos de la resistencia antimicrobiana y la transferencia horizontal de la misma.

1.4 Tipos de plásmidos

Brown (2006) propone 5 principales tipos de plásmidos basados en el tipo de genes que poseen:

1. Los plásmidos de fertilidad (plásmidos F) sólo contienen genes *tra* que participan en la transferencia conjugativa de los plásmidos. Ejemplo; plásmido F de *E. coli*.
2. Los plásmidos de resistencia (plásmidos R) que constituyen uno de los grupos más estudiados, confieren resistencia a antibióticos y otros inhibidores del crecimiento. Las cepas que los contienen pueden transmitir la resistencia a cepas sensibles mediante contacto célula a célula. Esta es probablemente una de las razones que explica el rápido aumento de las resistencias múltiples, ya que es poco probable que la resistencia a distintos antibióticos se desarrolle simultáneamente por mutación y selección. La naturaleza infecciosa de los plásmidos R conjugativos permite una rápida diseminación de estas características en las poblaciones bacterianas. Ejemplo; RP4 comúnmente hallado en *Pseudomonas*.
3. Los plásmidos que codifican para colicinas (plásmidos Col). Las colicinas son proteínas con efecto antimicrobiano. Ejemplo; ColE1 de *E. coli*.

4. Los plásmidos degradativos, permiten a la bacteria hospedera metabolizar moléculas inusuales como el tolueno y el ácido salicílico. Ejemplo; TOL de *Pseudomona putida*.
5. Los plásmidos de virulencia confieren patogenicidad en la bacteria hospedera; estos incluyen los plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, que causan la enfermedad de la agalla de la corona o "crown gall" en plantas dicotiledóneas.

1.5 Replicación de los plásmidos bacterianos

Hasta la fecha se conoce la existencia de 3 mecanismos de replicación que poseen los plásmidos bacterianos. A continuación se realizará una breve descripción de los mismos:

1.5.1 Mecanismo de replicación vía el círculo rodante (RC)

La replicación de ADN por el mecanismo del círculo rodante depende de la participación de tres elementos codificados por el plásmido: Un origen de replicación de la doble cadena (*dso*), una proteína de replicación denominada Rep y un origen de replicación de la cadena sencilla (*sso*) (Figura 2). La proteína Rep tiene actividad de topoisomerasa, reconoce la secuencia del *dso* y elabora un corte o "nick" que produce un extremo 3'-OH y uno 5'-P. La cadena temprana es sintetizada por extensión del extremo 3'-OH. Este proceso requiere de enzimas del hospedero como la ADN polimerasa III, las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB) y la

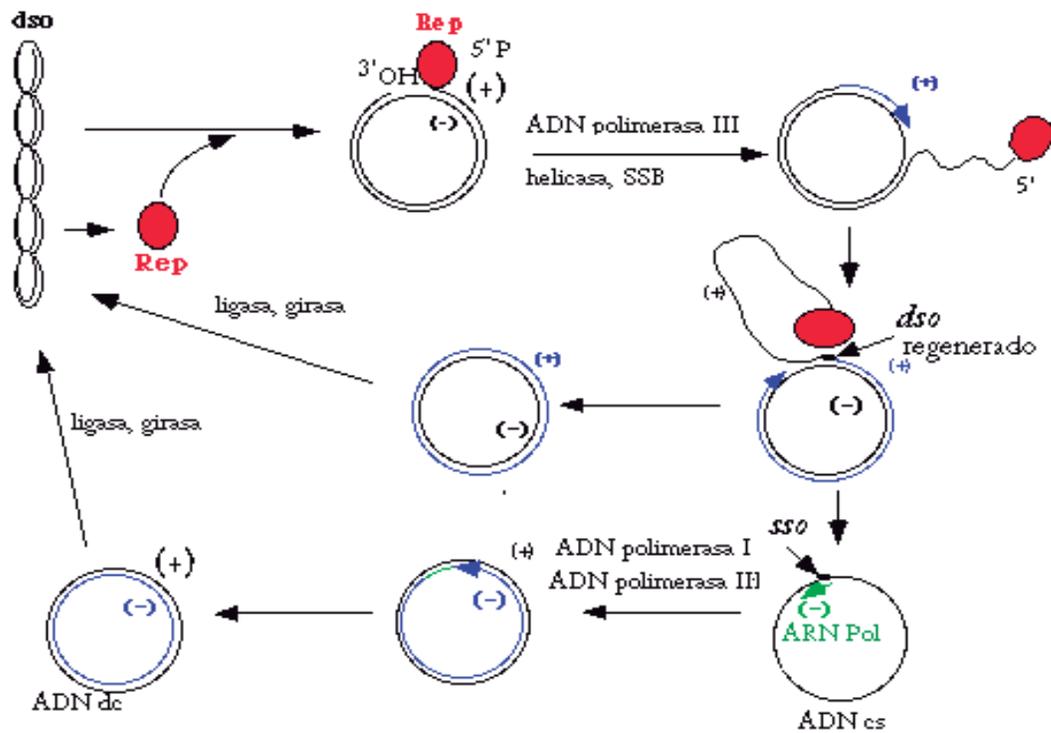


Figura 2. Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de ADN de cadena sencilla. *dso*: origen de replicación de la doble cadena; *sso*: origen de replicación de la cadena sencilla; Rep: proteína iniciadora de la replicación; ADNdc: ADN de doble cadena; ADNcs: ADN de cadena sencilla; SSB: proteínas de unión a ADNcs; ARN pol: ARN polimerasa (Modificado de Khan, 2005).

helicasa. La proteína Rep después reconoce la secuencia del *dso* que ha sido regenerada y realiza un nuevo corte y se liberan dos moléculas: una de ADN de doble cadena (ADNdc) y un monómero de cadena sencilla (ADNcs) formado por la cadena desplazada. Los extremos del monómero son ligados para formar un círculo (Gasson y Shearman, 2003). Luego esta molécula de ADNcs se convierte en ADNdc utilizando el *sso*, el cual es reconocido por la ARN polimerasa del hospedero, la cual sintetiza un oligonucleótido de ~20 bases que funciona como iniciador para la ADN polimerasa I, la cual lo extiende para que posteriormente sea utilizado por la ADN polimerasa III.

Las dos cadenas resultantes son ligadas y superenrolladas por la ligasa y girasa, respectivamente (Loeza-Lara *et al.*, 2004).

1.5.2 Mecanismo de replicación tipo *theta*

Este tipo de replicación requiere de las proteínas Rep (codificada por el plásmido) y DnaA (codificada por el hospedero), para el inicio de la síntesis de ADN (Loeza-Lara *et al.*, 2004).

Un replicón o unidad de replicación consiste en un gen que codifica una proteína específica de iniciación de la replicación de plásmidos (Rep), una serie de secuencias repetidas directas (iterones) de 22 pb donde se une la proteína Rep, sitios de unión de DnaA y una región adyacente rica en A+T. La unión de la proteína Rep y DnaA al replicón forma un complejo de nucleoproteína Rep-DnaA-ADN que abre las cadenas cerca de la región rica en A+T formando una estructura parecida a la letra griega θ (Hayes, 2003). La primasa sintetiza un oligonucleótido de ARN iniciador, el cual es extendido y corregido por la ADN polimerasa III hasta lograr la replicación completa de ambas cadenas (unidireccional), o según el plásmido, la primasa puede sintetizar dos oligonucleótidos que se extienden en sentido contrario encontrándose al terminar en el otro lado de la molécula (bidireccional) (Figura 3) (Schumann, 2001).

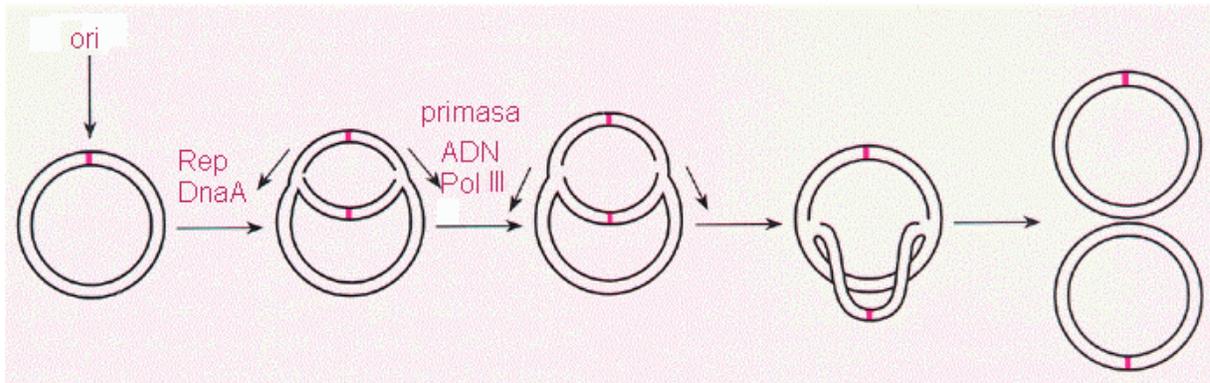


Figura 3. Modelo de replicación tipo theta. ori: origen de replicación; Rep: proteína de inicio de la replicación; DnaA: proteína involucrada en el inicio de la replicación; primasa: proteína que sintetiza el oligonucleótido de ARN que funciona como iniciador; ADN Pol III: ADN polimerasa III.

1.5.3 Mecanismo de replicación por desplazamiento de la cadena

Este es llevado a cabo por plásmidos “promiscuos” que requieren para su replicación de tres proteínas codificadas por el plásmido (RepA, RepB y RepC). Estas reconocen el origen de la replicación abriendo las cadenas de ADN en una región rica de A + T; y promueven la síntesis de oligonucleótidos de ARN como iniciadores de la replicación. Dentro del origen de replicación son importantes los sitios *ssiA* y *ssiB* que favorecen la formación de estructuras de tallo y asa, las cuales son específicamente reconocidas por la primasa (RepB) que sintetiza el oligonucleótido iniciador. RepC se une a los iterones del origen de replicación y RepA, en función de helicasa, se une a la región rica en A + T y separa las cadenas de ADN activando los sitios *ssi* (Loeza-Lara *et al.*, 2004).

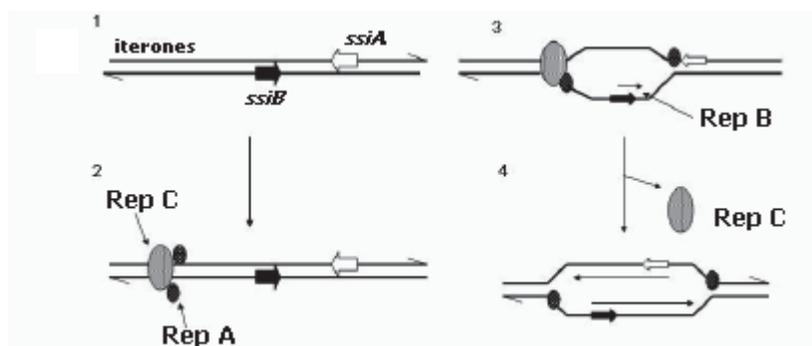


Figura 4. Mecanismo de replicación por desplazamiento de la cadena. iterones: secuencias repetidas directas; *ssiA* y *ssiB*: repetidos invertidos; RepA: proteína con actividad de helicasa; RepB: proteína con actividad de primasa; RepC: proteína iniciadora de la replicación.

2. Antecedentes

En años recientes se han realizado algunas investigaciones con el objetivo de identificar y analizar la presencia de determinantes de resistencia a QAC en microorganismos asociados a animales. Sin embargo, el conocimiento que se tiene al respecto es mínimo. Con el objetivo de establecer las resistencias hacia antimicrobianos e identificar los determinantes de resistencia hacia éstos en bacterias asociadas a mastitis bovina en explotaciones lecheras de pequeña escala, se inició una colecta de aislamientos en el Valle Morelia-Queréndaro en Michoacán (López-Meza *et al.*, 2006). Los análisis preliminares de susceptibilidad antimicrobiana realizados mostraron que solo el aislamiento STA6 posee resistencia al detergente CTAB, por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar a detalle la resistencia en el mismo. Esta incluyó la identificación a nivel de especie del aislamiento, el establecimiento de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), la identificación de los determinantes de resistencia, y una determinación parcial de la secuencia de nucleótidos del probable plásmido portador del determinante.

3. Hipótesis

La resistencia a compuestos cuaternarios de amonio en el aislamiento STA6 asociado a mastitis bovina, se debe a un determinante *qac* presente en un plásmido de bajo peso molecular.

4. Objetivo General

Analizar la resistencia a detergentes en el aislamiento STA6 asociado a mastitis bovina.

4.1 Objetivos Específicos

1. Determinar la especie bacteriana a la que pertenece el aislamiento STA6.
2. Establecer la concentración inhibitoria mínima a compuestos cuaternarios de amonio en el aislamiento STA6.
3. Identificar el (los) determinante (s) de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio (*qac*) en el aislamiento STA6.
4. Clonar y determinar la secuencia parcial de nucleótidos del plásmido de bajo peso molecular pBMKn1 del aislamiento STA6.

5. Material y Métodos

5.1 Colecta del aislamiento STA6

Se colectaron muestras de leche de vacas lactantes mantenidas en un sistema de producción lechera de pequeña escala en el Valle Morelia-Queréndaro, Mich., con signos clínicos de mastitis. El diagnóstico de la mastitis se realizó con la prueba de California. La leche se colectó en tubos estériles y se conservó a 4°C (máximo de 3 días) hasta su procesamiento. Para la obtención del aislamiento STA6 se tomaron alícuotas de 200 µl de la leche colectada y se distribuyeron en cajas de Petri con agar Luria-Bertani (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, por cada 1,000 ml de agua). Las cajas se colocaron a 37°C durante 18-24 h. Para su conservación, el aislamiento se cultivó en medio líquido LB por 16 h y se adicionó glicerol al 15% y se almacenó a -80°C.

5.2 Pruebas de sensibilidad a antibióticos y susceptibilidad a compuestos cuaternarios de amonio (QAC)

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos del aislamiento STA6 se realizaron mediante el ensayo de difusión en disco en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton (MH) (Bioxon). Las pruebas de susceptibilidad a QAC se realizaron incorporando el detergente en cajas de Petri con agar MH.

Para las pruebas de sensibilidad a antibióticos se utilizaron sensidiscos para bacterias Gram positivas (Bio-Rad). Se evaluaron 13 antibióticos: ampicilina, 10 µg;

cefalotina, 30 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; cefuroxima, 30 µg; dicloxacilina, 1 µg; eritromicina, 15 µg; gentamicina, 10 µg; pefloxacina, 5 µg; penicilina, 10 U; tetraciclina, 30 µg; trimetoprim, 25 µg, y lincomicina, 10 µg/ml (Pharmacia). Las bacterias se incubaron a 37°C por 18 h y se clasificó al aislamiento en resistente, intermedio, moderadamente sensible o sensible, dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La evaluación de la susceptibilidad a QAC se hizo cultivando las bacterias en cajas de Petri con agar MH que contenía concentraciones de 0.5-10 µg/ml del detergente QAC bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB, Sigma). Las bacterias se cultivaron a 37°C por 18 h; el criterio de selección de la resistencia fue el crecimiento bacteriano a concentraciones superiores a 6 µg/ml del detergente.

5.3 Identificación del aislamiento STA6

El aislamiento STA6 se identificó mediante la amplificación por PCR de una región del ADNr 16S y su posterior secuenciación. Se utilizaron los oligonucleótidos SRV31, 5´CGG Y(T o C) CC AGA CTC CTA CGG G 3´y SRV32, 5´TTA CCG CGG CTG CTG GCA C 3´, con los cuales se amplificó la región variable V3 de los genes de ARN ribosomal 16S (Dong-Hun *et al.*, 1996).

Se utilizaron 10 – 100 ng de ADN genómico, amortiguador para PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 200 µM, 0.5 µM de cada oligonucleótido y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. La amplificación se realizó en

un termociclador Applied Biosystem 2700 con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1.5 min, 53°C por 1.5 min y 72°C por 70 s; 1 ciclo de 72°C por 7 min; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Las amplificaciones (~ 200 pb) se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los productos de amplificación se secuenciaron como se describe más adelante.

5.4 Identificación de determinantes de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio

Los determinantes de resistencia a QAC's en el aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae* se identificaron a través de PCR. Para este fin se utilizaron los oligonucleótidos específicos reportados por Lina *et al.*, (1999).

Determinante	Oligonucleótido	Tamaño (pb)
<i>smr (qacC)</i>	5'-ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT-3'	285
	5'-TTCCGAAAATGTTTAAACGAAACTA-3'	
<i>qacH</i>	5'-CTTTATCTTACATCTGAGG-3'	590
	5'-TCAGTCGACGAGCTC-3'	

Se utilizaron 100 ng de ADN (genómico o plasmídico), amortiguador para PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 200 µM, 0.5 µM de cada oligonucleótido y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystem 2700 con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 25 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 30 s y 72°C por 60 s; 1 ciclo de

72°C por 7 min; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

5.5 Obtención de los plásmidos

Las células del aislamiento STA6 se crecieron en 2 ml de medio LB durante toda la noche. Este cultivo se utilizó como fuente de inóculo para 250 ml de medio LB, donde se cultivó por 4 h a 37°C con agitación. Las células se precipitaron por centrifugación a 4,600 rpm por 15 min a 4°C. Se decantó la mayor parte del líquido para después resuspender la pastilla y centrifugar de nuevo a 10,000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en 5 ml de solución I [sacarosa 0.5 M, EDTA 10 mM, Tris 25 mM, pH 8 con lisozima (10 mg/ml)] preparada fresca. Se incubó a 37°C por 30 min e inmediatamente después se colocó en hielo por 10 min. Enseguida se adicionaron 10 ml de solución II [NaOH 0.2 M, SDS 1%] preparada fresca y se mezcló suavemente por inversión dejándolo reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 7.2 ml de solución III [acetato de sodio 3 M, pH 4.8] y se mezcló suavemente incubando por 20 min a -20°C. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y se le añadió un volumen de isopropanol frío, mezclando suavemente y se mantuvo por 30 min a -80°C. Por último se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, se decantó y se dejó secar la pastilla. Inmediatamente después se procedió a la limpieza (Sambrook y Russell, 2001).

5.6 Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol

Se resuspendió el ADN en 200 µl de agua desionizada estéril en un tubo Eppendorf, se adicionaron 140 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló. Posteriormente se agregaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), agitándose hasta que se incorporó adecuadamente a la solución. Después se adicionaron 350 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2), se mezcló para formar una emulsión. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío mezclándose suavemente por inversión para precipitar los ácidos nucleicos, dejándolo reposar 5 min sobre hielo. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para empastillar los ácidos nucleicos. Se enjuagó con 200 µl de etanol 70% frío. Se secó la pastilla en el concentrador por 5 min a 60°C y posteriormente se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril (Stemmer, 1991). Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.6% en buffer TAE 1X (Tris 0.04 M, ácido acético glacial 0.02 mM, EDTA 0.17 mM, pH 8.5).

5.7 Purificación de ADN a partir de agarosa (Gene Clean, Bio101 Inc)

Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se cortaron las bandas de interés y se colocaron en un tubo Eppendorf. Se le agregaron 3 volúmenes de KI 6.2 M y se colocó a 55°C hasta fundir la agarosa. Se adicionaron 10 µl de suspensión de vidrio (glassmilk) y se dejó 20 min en hielo agitando frecuentemente. Después se centrifugó aproximadamente 20 s para

precipitar el complejo vidrio-ADN y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de New Wash [NaCl 0.2 M, Tris base 0.02 M, EDTA 0.002 M, pH8, etanol absoluto (50%), agua], se resuspendió y se centrifugó por 20 s descartando el sobrenadante; esto se repitió 3 veces. Después se centrifugó una vez más y se eliminó cualquier residuo de New Wash con una micropipeta. Luego se resuspendió en 10 µl de agua desionizada estéril y se calentó por 3 min a 45-50°C y se centrifugó a 13,000 rpm por 30 s y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo; esto se repitió 3 veces. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.6% en buffer TAE 1X.

5.8 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones enzimáticas se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Básicamente se utilizó el protocolo que a continuación se describe: En un tubo Eppendorf sobre hielo se adicionaron los siguientes reactivos:

ADN	variable (500 ng - 2 µg)
Amortiguador (10X)	2 µl
Agua desionizada c.b.p.	20 µl
Enzima	10 U

La mezcla de reacción se colocó a 37°C por un tiempo de 2 h. La reacción se detuvo colocándola a 65°C 5 min.

5.9 Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron de acuerdo al siguiente protocolo. El ADN a ligar y el vector se digirieron con la enzima correspondiente y se purificaron por Gene Clean. Para este caso se utilizó el vector pBluescript II KS (+) (Stratagene).

En un tubo Eppendorf sobre hielo se adicionaron los siguientes reactivos:

ADN del inserto	500 ng
ADN del vector	20 ng
Amortiguador (10X con ATP)	1 μ l
Agua desionizada c.b.p.	10 μ l
T4 ADN ligasa	1 U

La mezcla de ligación se incubó por 16 h a 18°C.

5.10 Preparación de células de *Escherichia coli* para electroporación

Las células de *E. coli* (XL1-Blue) se utilizaron para realizar todas las manipulaciones de ADN. Se inocularon 2 ml de medio LB con una colonia de la cepa y se cultivaron toda la noche a 37°C. Este cultivo sirvió para inocular 250 ml de medio LB, en el cual se dejaron crecer las células por 4 h hasta una densidad óptica de 0.5-1. Posteriormente las células se colectaron por centrifugación a 6,000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con 250 ml de agua desionizada estéril (4°C) y se precipitaron por centrifugación. Después se lavó nuevamente con 125 ml de agua desionizada estéril a 4°C y se centrifugó otra vez. La pastilla se resuspendió luego en

5 ml de glicerol al 10% y se centrifugó. Finalmente la pastilla se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10% frío. Las células se distribuyeron en alícuotas de 100 μ l y se almacenaron hasta su uso a -80°C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

5.11 Electroporación de células de *E. coli*

Las células para electroporación de *E. coli* (XL1-Blue) se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en hielo. En una celda para electroporación (Bio-Rad, 0.2 cm) se mezclaron 50 μ l de las células con 50-100 ng del ADN a introducir y se dejó la mezcla en hielo por 10 min. En el *E. coli* pulser de Bio-Rad se seleccionaron las siguientes condiciones: 25 μ F, 200 Ohms y 2.5 kV. La mezcla se colocó en la celda de electroporación y se le aplicó el pulso. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio LB y las células se transfirieron a un tubo de cultivo, incubándose por 1 h a 37°C . Después de este tiempo, se centrifugaron 2 min para empastillar las células. Se resuspendió en 350 μ l de LB estéril. Se distribuyeron en una caja 50 μ l del cultivo sobre medio LB + Amp 100 μ g/ml + IPTG 0.1 M + X-gal (50 mg/ml) por 16 h a 37°C y en otras 2 cajas 100 μ l y 150 μ l de cultivo. Las colonias transformantes se seleccionaron por color y se analizaron mediante minipreparaciones de ADN plasmídico (Sambrook y Russell, 2001).

5.12 Minipreparación de plásmidos de *E. coli*

Se inoculó una colonia de la clona transformante a analizar en 2 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se cultivó toda la noche a 37°C . Se colocaron 1.5 ml

en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución I (glucosa 0.1M, EDTA 0.01M, Tris 0.05M, pH 8). Posteriormente se le adicionaron 200 µl de la solución II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) agitándose brevemente e incubándose en hielo por 5 min. Después se le agregaron 150 µl de la solución III (acetato de sodio 3 M, pH 4.8) agitando levemente y se incubó por 10 min en hielo. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol frío y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se colectaron por centrifugación 2 min a 12,000 rpm. Finalmente la pastilla de ADN se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril (Birnboim y Doly, 1979).

5.13 Maxipreparación de plásmidos de *E. coli*

Se inocularon 200 ml de LB con una colonia transformante de *E. coli*. Se cultivó toda la noche a 37°C. El cultivo se centrifugó por 10 min a 4,000 rpm descartando el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución I y se colocó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 10 ml de la solución II agitándose brevemente y se dejó a 4°C por 10 min. Después se agregaron 7.5 ml de la solución III, se agitó y se dejó nuevamente a 4°C por 30 min. La suspensión resultante se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló y se colocó a -20°C por 30 min. Se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm para precipitar los ácidos

nucleicos (Sambrook y Russell, 2001). Se purificaron las muestras mediante limpieza con bromuro de etidio-fenol.

5.14 Reacciones de secuenciación de ADN

Para este caso se agregaron en un tubo Eppendorf los siguientes reactivos:

ADN	200-500 ng
Oligonucleótido universal o reverso (10 pM/ μ l)	1 μ l
Big Dye v3.1	4 μ l
Buffer de secuenciación 5X	4 μ l
Agua desionizada c.b.p.	20 μ l

Se ajustaron en el termociclador las siguientes condiciones:

<u>95°C</u>	<u>5 min</u>	
96°C	30 s	25 ciclos
50°C	30 s	
<u>60°C</u>	<u>4 min</u>	
4°C		

La secuencia fue determinada por el método de terminación de cadena con dideoxirribonucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) en un equipo de secuenciación automática ABI PRISM 310. Se utilizó el kit Big Dye Terminador v3.1 (Applied Biosystems).

5.15 Limpieza de las reacciones de secuenciación

Se colocaron 2 µl de EDTA 125 mM. Se adicionaron 2 µl de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y 50 µl de etanol absoluto mezclando levemente en el agitador y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min marcando la orientación de las muestras. Se retiró el sobrenadante con una micropipeta para desecharlo sin tocar la pastilla. Se adicionaron 250 µl de etanol 70% frío y se mezcló en el agitador. Luego se centrifugó 10 min, se retiró el sobrenadante y se secó la muestra en el concentrador. Finalmente, se resuspendió en 25 µl de buffer TSR (template suppression reagent, Applied Biosystems). Se mezcló en el agitador de 2 a 3 min y se incubó a 95°C por 2 min. Se colocó en hielo inmediatamente después por 5 min y se pasó a tubos de secuenciación. Se guardaron las muestras a -20°C hasta su lectura en el secuenciador.

5.16 Análisis de la secuencia

La secuencia se determinó en un secuenciador automático ABI310 utilizando el Software Sequencing analysis 3.0. Los parámetros de la lectura a utilizar fueron los siguientes: se manejó un tiempo de inyección de 30 s, y la electroforesis se realizó a 15 kV, 50°C y 50 min de corrida; utilizando un capilar de 47 cm de longitud. Las comparaciones y manejo de las secuencias se realizaron con los programas de cómputo DNASTAR y DNAsis, además del URL del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6. Resultados

6.1 Colecta del aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae*

Como parte de un programa regional para establecer las resistencias hacia antimicrobianos e identificar los determinantes de resistencia hacia éstos en bacterias asociadas a mastitis bovina en explotaciones lecheras de pequeña escala, se inició un programa de colecta en el Valle Morelia-Queréndaro en Michoacán. Se obtuvieron un total de 21 muestras de leche de vacas lactantes con mastitis. A partir de ellas se distribuyeron alícuotas de 200 µl en cajas de Petri con medio LB. Las cajas se incubaron a 37°C por 16-24 h y se observó el crecimiento bacteriano. Posteriormente, mediante una observación visual se identificaron aquellas colonias que presentaron una morfología colonial diferencial. Estas fueron cultivadas en medio líquido LB por 16 h, al final de este periodo se les adicionó glicerol al 15% y se almacenaron a -80°C para su conservación. Los aislamientos fueron etiquetados con las siglas STA y se les asignó un número arábigo.

La identificación de los aislamientos bacterianos se llevó a cabo mediante técnicas moleculares. Los aislamientos correspondientes al género *Staphylococcus* fueron identificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para ello (Depardieu *et al.*, 2004), los cuales no son tema de esta tesis y no se abordará su análisis y discusión. Los aislamientos con resultados negativos por PCR para el género *Staphylococcus*, se identificaron mediante la amplificación de la región variable 3 del gen ribosomal 16S y su posterior determinación y análisis de la secuencia.

Un análisis preliminar de resistencias permitió determinar que sólo el

aislamiento denominado STA6 mostraba resistencia hacia el detergente QAC bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), razón por la cual se decidió caracterizar esta resistencia e identificar la especie bacteriana.

6.2 Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos y sensibilidad a CTAB en el aislamiento STA6

Se analizó su susceptibilidad a 13 antibióticos y 1 detergente. Para las pruebas de sensibilidad a antibióticos se utilizaron sensidiscos para Gram positivos (Bio-Rad). Se evaluaron 13 antibióticos: ampicilina **AM**, 10 µg; cefalotina **CF**, 30 µg; cefotaxima **CTX**, 30 µg; ceftazidima **CAZ**, 30 µg; cefuroxima **CXM**, 30 µg; dicloxacilina **DC**, 1 µg; eritromicina **E**, 15 µg; gentamicina **GE**, 10 µg; pefloxacina **PEF**, 5 µg; penicilina **PE**, 10 U; tetraciclina **TE**, 30 µg; trimetoprim **SXT**, 25 µg; y lincomicina **LIN**, 10 µg/µl (Pharmacia). Después de que las bacterias se incubaron a 37°C por 18 h se midió el halo de inhibición para determinar el nivel de sensibilidad siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el aislamiento STA6 posee resistencias a 8 de los 13 antibióticos evaluados (CF, CAZ, E, AMP, CTX, CXM, DC y PE). Además, se confirmó que fue el único aislamiento que mostró resistencia al detergente QAC (>6 µg/ml).

6.3 Identificación del aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae*

El aislamiento se identificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SRV31, 5´CGG Y(T o C) CC AGA CTC CTA CGG G 3´y SRV32, 5´TTA CCG CGG CTG

CTG GCA C 3', con los cuales se amplificó la región variable V3 (~200 pb) de los genes de ARN ribosomal 16S (Dong-Hun *et al.*, 1996). Se obtuvo el ADN genómico del aislamiento STA6 y se sometió a una reacción de PCR con estos oligonucleótidos y los productos de amplificación se separaron mediante una electroforesis en agarosa. Como se observa en la Figura 5, se obtuvo la amplificación de un producto único de ~200 pb.

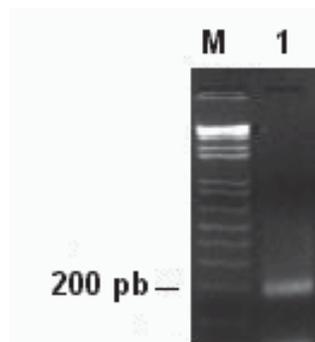


Figura 5. Amplificación por PCR de la región V3 del ADNr 16S del aislamiento STA6. Carril M) marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen); carril 1) amplificación a partir de ADN genómico.

Posteriormente, a partir del producto de PCR se determinó la secuencia de nucleótidos y se analizó en el banco de genes GenBank mediante el análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La secuencia se obtuvo mediante la lectura de las dos cadenas de ADN y correspondió a un total de 208 nucleótidos. La comparación de la secuencia obtenida permitió determinar que ésta posee 100% de identidad con aquellas derivadas de bacterias de la especie *Klebsiella pneumoniae* (Figura 6), razón por la cual el aislamiento STA6 fue identificado como miembro de esta especie.

```

STA6          4   TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCACT 63
                |||
Klebsiella 505 TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCACT 446

STA6          64   AAGGTTATTAACCTTAATGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTT 123
                |||
Klebsiella 445 AAGGTTATTAACCTTAATGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTT 386

STA6          124  CTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGCAATATTCCCCACTGC 183
                |||
Klebsiella 385 CTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGCAATATTCCCCACTGC 326

STA6          184  TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG 207
                |||
Klebsiella 325 TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG 302

```

Figura 6. Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región V3 del ADN ribosomal 16S del aislamiento STA6. STA6: Secuencia obtenida del aislamiento STA6. **Klebsiella:** Secuencia consenso de la especie *Klebsiella pneumoniae*.

6.4 Determinación de CIMs

A continuación se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para CTAB en el aislamiento STA6 de *K. pneumoniae*. Para ello, las determinaciones se realizaron en medio Mueller-Hinton, tanto líquido como sólido. Se utilizaron concentraciones crecientes del detergente (1-100 µg/ml) y las bacterias se cultivaron a 37°C por 18 h, al término del cual se observó el crecimiento celular. Para el caso del medio sólido se determinó una CIM de =10 µg/ml, en tanto para el medio líquido se observó una CIM de =30 µg/ml. En ambos casos las determinaciones son el promedio de 3 repeticiones.

6.5 Identificación de determinantes de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio

Se evaluó la presencia de 2 determinantes de resistencia a QAC's [*smr (qacC)* y *qacH*] en el aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae* mediante PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando como molde ADN genómico y plasmídico. A través de este análisis se identificó que el aislamiento STA6 sólo posee al determinante *qacH* (Figura 7) debido a que se obtuvo el producto de 590 pb esperado para este determinante. No se observó amplificación para el caso del determinante *smr (qacC)*.

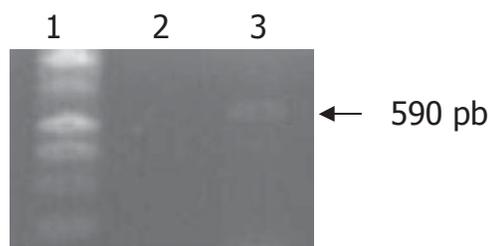


Figura 7. Identificación de determinantes de resistencia a QAC en el aislamiento STA6 de *K. pneumoniae*. Carril 1) marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen); carril 2) amplificación con oligonucleótidos para el determinante *smr (qacC)*; carril 3) amplificación con oligonucleótidos para el determinante *qacH*.

6.6 Clonación y determinación parcial de la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de *K. pneumoniae*

Una vez observado que el aislamiento STA6 presentaba un determinante de resistencia a detergentes, se decidió evaluar si este aislamiento contenía plásmidos

de bajo peso molecular con el fin de clonar y determinar la secuencia de nucleótidos de alguno de ellos. La razón para realizar ésto se debe a que se ha reportado que un gran número de los determinantes de resistencia *qac* están localizados en plásmidos de bajo peso molecular, que comúnmente se replican por el mecanismo del círculo rodante.

Para alcanzar este objetivo primero se obtuvieron los plásmidos totales del aislamiento STA6 mediante lisis alcalina. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el aislamiento STA6 sólo presentaba un plásmido de bajo peso molecular, que se denominó pBMKn1 (Figura 8), observándose las diferentes conformaciones de esta molécula. Adicionalmente, se observó una banda de alto peso molecular en las preparaciones totales de plásmidos correspondiente a ADN cromosómico y plásmidos de alto peso molecular. En algunas extracciones se logró obtener los plásmidos de alto peso molecular (datos no mostrados).

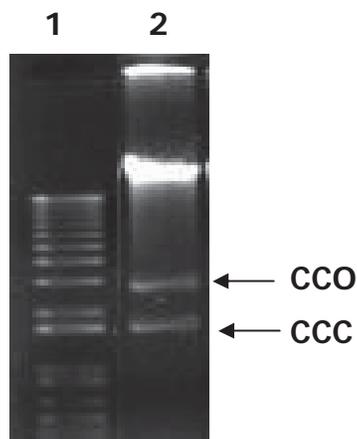


Figura 8. Perfil de plásmidos del aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae*. Carril 1) marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen); carril 2) plásmidos del aislamiento STA6. CCO= forma circular abierta de pBMKn1; CCC= forma circular cerrada o superenrollada de pBMKn1.

A continuación se procedió a purificar al plásmido pBMKn1. Para ello se separaron los plásmidos totales del aislamiento STA6 mediante una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se cortaron del gel las bandas correspondientes al plásmido de interés y se purificó de la agarosa a través de la técnica de "Gene Clean". La integridad y la eficiencia de recuperación se determinaron por electroforesis en geles de agarosa. Como se muestra en la Figura 9A (carril 2), se obtuvieron íntegras las diferentes formas correspondientes al plásmido pBMKn1.

Una vez obtenido el plásmido pBMKn1, éste se sometió a digestiones con diferentes enzimas de restricción. Se evaluaron las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI* y *KpnI*. Este análisis reveló que el plásmido presentaba sólo sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *KpnI* (Figura 9). Para el caso de la enzima *EcoRI* se determinó que el plásmido pBMKn1 posee un solo sitio de restricción ya que se observó una banda única (~2.5 kb) (Figura 9B, carril 3). Sin embargo, pBMKn1 posee 2 sitios de corte para la enzima *KpnI* debido a que se obtuvieron 2 bandas como producto de la digestión, una de ~2 kb y otra de ~0.5 kb (Figura 9A, carril 3). De acuerdo a los resultados mostrados por las digestiones enzimáticas se estimó que el plásmido pBMKn1 posee un tamaño molecular de ~2.5 kb.

Una vez determinadas las enzimas de restricción que cortaban el plásmido, éste se digirió con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* de manera independiente. Los productos de digestión se clonaron en el vector pBluescript KS (+), previamente digerido con las mismas enzimas. A continuación las mezclas de ligación se utilizaron para transformar a células de *Escherichia coli* XL1-Blue.

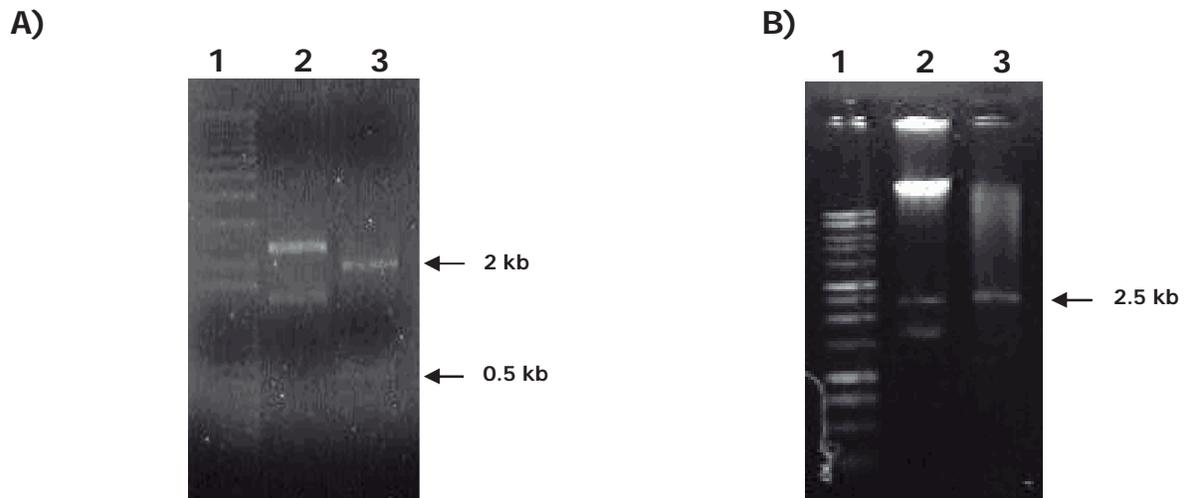


Figura 9. Purificación y digestiones enzimáticas del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae*. A) Carril 1) marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen); carril 2) plásmido pBMkn1 purificado por Gene Clean; carril 3) digestión enzimática de pBMKn1 con *KpnI*. B) Carril 1) marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen); carril 2) plásmidos totales de STA6; carril 3) digestión enzimática con *EcoRI*.

Se obtuvieron colonias transformantes (manifestado por la ausencia de color azul de las colonias) sólo en las células de *E. coli* transformadas con la ligación de ADN derivada de las digestiones con la enzima *KpnI*. Las colonias transformantes se analizaron por minipreparaciones de plásmidos.

A partir de las preparaciones de plásmidos de las clonas recombinantes se buscó aquellas que presentaran un retraso en la movilidad electroforética (indicativo de la presencia de algún inserto). En la Figura 10 se muestra el patrón electroforético de 15 clonas recombinantes; sin embargo, el retraso no fue claro por lo que se eligieron al azar dos de las clonas y se llevó a cabo una digestión usando la enzima *KpnI* para liberar los insertos de la construcción y determinar el tamaño de la misma.

Los productos de digestión se presentan en la Figura 11. Se obtuvieron clonas que presentaban únicamente insertos de ~0.5 kb.

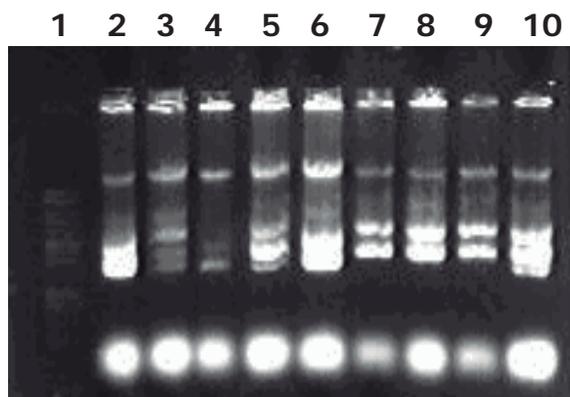


Figura 10. Plásmidos recombinantes conteniendo los productos derivados de la digestión del plásmido pBMKn1 con *KpnI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1) marcador de tamaño molecular (1 kb ladder, Invitrogen); Carriles 2-10) posibles clonas recombinantes con insertos del plásmido pBMKn1.

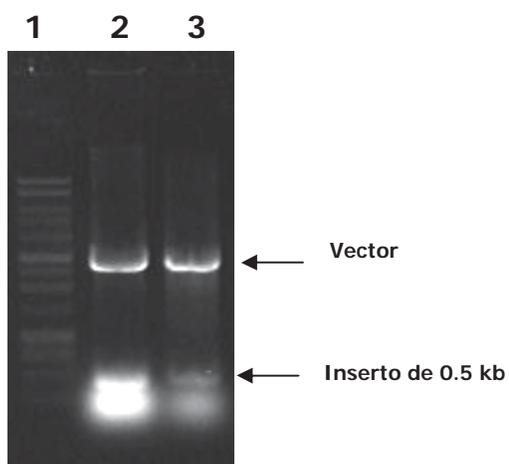


Figura 11. Plásmidos recombinantes digeridos con la enzima *KpnI*. Carril 1) marcador de tamaño molecular (1 kb ladder, Invitrogen); Carriles 2 y 3) posibles plásmidos recombinantes con insertos derivados del plásmido pBMKn1 digeridos con la enzima *KpnI*.

Después se procedió a secuenciar el fragmento de 0.5 kb clonado en el vector pBluescript. Para este fin, se utilizaron oligonucleótidos dirigidos hacia secuencias del vector, que fueron los denominados universal y reverso. En la Figura 12 se muestra el empalme de los resultados de secuenciación de ambas reacciones. Se obtuvo un total de 489 pb. Posteriormente se realizó un análisis en el banco de genes GenBank para identificar posibles homologías con otros plásmidos. Se encontró un 96% de identidad en un fragmento de 65 pb del plásmido p9123 de *E. coli*. Una región del plásmido pSS4 que confiere resistencia a estreptomicina de *Shigella sonnei* también mostró un 96% de identidad en las mismas 65 pb que p9123. Y en el mismo caso se encontró homología con los plásmidos pSSTAV y pKKTET7 de *S. sonnei* que también están relacionados con la resistencia de antibióticos. Se realizó también una búsqueda de marcos de lectura encontrándose uno que codifica para una proteína de 66 aminoácidos (Figura 12), la cual está involucrada en el mantenimiento de plásmidos en *E. coli*. Se encontraron otros marcos de lectura pero no se detectaron homologías significativas por lo que no se mencionan.

```

          9      18      27      36      45      54
5'  AACAAAGCTGGGTACCGCTCGCCGCAGCCGAACGGCCGAGCGTAGCGAGTCAGT

          63      72      81      90      99      108
      GAGCGAGGAAGCGGAAGATCTGCGATGCCTGATTGGGCTCGTGTCCGCGCCGTAC

          117     126     135     144     153     162
      CCTCTCTTTACCGCCGATTACACAGTTTCTGCAATACTTTCCCTTCCGGTTTA

          171     180     189     198     207     216
      CACATTCGTCTGCACGGATAAAACAACGGCAGAGTACGGGCAGGATATGTAAAGT

          225     234     243     252     261     270
      AGGCCTACTTTACCGCCTGCCTTATTCGCTTACAGCTCAAAGGAACATCGATGG
                                     M A

          279     288     297     306     315     324
      CCAGGTCCCCCGATCCACGACAACGTACTGAGGGTTTCCGCAAAGCGGAAGCGT
      R S P D P R Q R T E G F R K A E A S

          333     342     351     360     369     378
      CGCTGAGGCTTGAAGGCATGGACCCCGCCGGAACGCCGCTGTACGAAAATATCA
      L R L E G M D P A G T P L Y E N I K

          387     396     405     414     423     432
      AGGAGCGGGTTATTTCCGGGGATATCACTTACGAACAGGGACGGGCAGAAAATTC
      E R V I S G D I T Y E Q G R A E I L

          441     450     459     468     477     486
      TGGCTCATTACCAGAAGCGTGCGAACGGCCACTGACACGGACAGGAAACTAGGT
      A H Y Q K R A N G H *

ACC 3'

```

Figura 12. Secuencia de nucleótidos del fragmento *KpnI* de ~500 pb del plásmido pBMKn1 del aislamiento STA6 de *Klebsiella pneumoniae*. Determinada a partir de la unión de los resultados de las reacciones de secuenciación con los oligonucleótidos universal y reverso. Se indica en negritas el marco de lectura que codifica para la proteína con homología a proteínas de mantenimiento de plásmidos.

7. Discusión

En el presente trabajo se analizó la resistencia a detergentes en aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina, como parte de un estudio de resistencias antimicrobianas en bacterias asociadas a esta enfermedad. Para el control de la mastitis, caracterizada por la inflamación de la glándula mamaria, se recurre comúnmente al uso de detergentes, básicamente aquellos derivados de compuestos cuaternarios de amonio, ésto ha permitido la selección de resistencia (Bjorland *et al.*, 2003). Sin embargo, en México no existen estudios acerca de la resistencia a detergentes en bacterias asociadas a animales de granja.

Un análisis preliminar de selección de resistencias en aislamientos bacterianos obtenidos de vacas con mastitis en el Valle Morelia-Queréndaro, permitió identificar un aislamiento bacteriano (STA6) que mostraba crecimiento celular en cajas de cultivo que tenían incorporado el detergente catiónico, bromuro de cetil trimetil amonio o CTAB. El patógeno se identificó mediante la amplificación y secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S. Existen varios métodos para la caracterización de bacterias como serotipificación, tipificación por anticuerpos monoclonales, biotipificación, tipificación con bacteriófagos, tipificación de fimbrias, perfiles de resistencia a antibióticos, electroforesis celular, electroforesis de extracto total de proteína, electroforesis de proteína de membrana externa, y varios tipos de carbohidratos, lípidos, u otros perfiles químicos. Sin embargo, en este caso se utilizó el gen ARNr 16S ya que es una forma rápida y precisa de encontrar patrones específicos de secuencias de grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. En las

regiones variables es posible encontrar secuencias características de 20 a 30 bases que son específicas de una sola especie de bacteria (González-Silva, 2004). Los resultados obtenidos del análisis de la secuencia (Figura 6) permitieron establecer que el aislamiento STA6 pertenece a la bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*. Las bacterias coliformes (ej. *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*) se conoce que causan mastitis aguda en bovinos, de tal forma que no fue excepcional identificar en este trabajo un aislamiento de este grupo de bacterias (Hogan y Smith, 2003).

El aislamiento STA6 de *K. pneumoniae* mostró crecimiento aún en concentraciones >6 µg/ml de CTAB, concentración considerada como el punto de referencia para la resistencia a este detergente (Bjorland *et al.*, 2003). Adicionalmente, en las pruebas de sensibilidad hacia antibióticos realizadas con el aislamiento STA6 de *K. pneumoniae* se utilizaron sensidiscos para bacterias Gram positivas a pesar de que el aislamiento STA6 pertenece a bacterias Gram negativas. No obstante, cabe señalar que dentro de los antibióticos utilizados en los sensidiscos existen 5 que son de amplio espectro. Se determinó que STA6 mostraba resistencia a varios antibióticos, incluyendo penicilina, lo cual está en concordancia con la existencia de una posible relación entre la resistencia a QACs y la resistencia a penicilina, previamente señalada por otros autores (Bjorland *et al.*, 2005). Los detergentes que afectan membranas (ej. QAC) son menos efectivos contra las bacterias Gram negativas que contra las Gram positivas, razón por la cual se han estudiado a mayor detalle en estas últimas, particularmente en aquellas del género

Staphylococcus (McDonnell y Russell, 1999). Esta resistencia se debe a la presencia de una bomba en la membrana citoplasmática que expulsa el compuesto fuera del citoplasma celular (Salyers y Whitt, 2002). Hasta nuestro conocimiento no existen reportes de resistencia a detergentes QAC en bacterias del género *Klebsiella* asociadas a mastitis bovina, aunque se ha reportado la resistencia a QAC en las bacterias Gram negativas *Pseudomonas* y *Providencia* pero de orígenes distintos (McDonnell y Russell, 1999).

Una vez establecido que el aislamiento STA6 mostraba resistencia al detergente CTAB, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para este compuesto. Los valores estimados fueron de =10 y =30 µg/ml en medio líquido y sólido, respectivamente. En un estudio realizado con aislamientos de *Staphylococcus* spp. de origen equino que poseen el gen *qacJ*, se reportaron CIMs de 7.5 a 10.5 µg/ml para CTAB entre los diferentes aislamientos (Bjorland *et al.*, 2003). Por otro lado, en un aislamiento de *S. aureus* de origen bovino se determinó una CIM de 4.0 a 5.0 µg/ml de CTAB, este aislamiento posee el determinante *smr* (Bjorland *et al.*, 2001). En un estudio realizado en Noruega para analizar la distribución de la resistencia a detergentes en diferentes especies de estafilococos, se determinaron las CIMs para los distintos genes conocidos los cuales dieron como resultado valores de 3.0 a 8.0 µg/ml para *qacA/B*, 2.0 a 10.0 µg/ml para *qac A/B +smr*, 2.5 a 15.5 µg/ml para *smr + qacC*, 11.5 a 15.0 para *qacG*, y 5.5 a 7.5 para *qacJ* (Bjorland *et al.*, 2005). Por otro lado, en un aislamiento de *S. saprophyticus* colectado en una planta procesadora de pollos en Noruega, se determinó una CIM de 10 µg/ml para el

detergente QAC cloruro de benzalconio, es importante señalar que este aislamiento posee el determinante *qacH* (Heir *et al.*, 1998), el cual se identificó en el aislamiento STA6 de *K. pneumoniae* obtenido de bovinos para este trabajo. De acuerdo con estos reportes, los valores estimados para la CIM de CTAB sobre el aislamiento STA6 están dentro de los rangos reportados.

Teniendo como antecedentes los genes conocidos de resistencia a QACs, se eligieron para este estudio los genes *smr* y *qacH*. Se buscaron los determinantes de resistencia a QACs por PCR amplificando sobre ADN genómico del aislamiento STA6 de *K. pneumoniae*. Se observó una amplificación para el determinante *qacH* (Figura 7). Este determinante de resistencia fue anteriormente identificado en una planta procesadora de pollos en Noruega en un aislamiento de *S. saprophyticus* (Heir *et al.*, 1998) y recientemente en Angola en aislamientos de *Vibrio cholerae* unido al cassette *aadA8* (Ceccarelli *et al.*, 2006). Hasta ahora no se había encontrado en bacterias Gram negativas provenientes de aislamientos de infecciones en animales.

Los determinantes de resistencia a QAC generalmente residen en plásmidos y en el cromosoma, aunque predominan en los primeros (McDonnell y Russell, 1999). El aislamiento STA6 de *K. pneumoniae* posee el determinante *qacH*, el cual se ha identificado que reside en un plásmido de 2.4 kb en *S. saprophyticus* (Heir *et al.*, 1998). Con este antecedente, se decidió iniciar con la búsqueda de plásmidos de tamaño pequeño en el aislamiento STA6. Este análisis de plásmidos permitió identificar un solo plásmido pequeño denominado pBMKn1, una molécula de ~ 2.5 kb (Figura 8), que posiblemente porte el gen de resistencia a CTAB ya que es común

que estos genes se encuentren en plásmidos pequeños. Se realizó la purificación del plásmido pBMKn1, y el análisis de digestión permitió identificar un sitio de corte único para la enzima *EcoRI* y dos sitios de corte para la enzima *KpnI*. Luego se procedió a clonar los fragmentos, pero sólo se logró la clonación de un fragmento de aproximadamente 500 pb del plásmido proveniente de la digestión con *KpnI*. Este inserto fue secuenciado y analizado en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.mill1.sjlibrary.org/blast/>).

Hasta el momento no se conoce el mecanismo de replicación de ADN del plásmido pBMKn1, lo cual podría ayudar a explicar por que no se logró clonar el plásmido integro. Si el plásmido pBMKn1 se replicara por el mecanismo tipo theta, como el vector pBluescript, podría generar un mecanismo de incompatibilidad debido a la presencia de iterones (Loeza-Lara *et al.*, 2004). Sin embargo, también es probable que el plásmido pBMKn1 se replique por el mecanismo del círculo rodante, en cuyo caso puede haber inestabilidad por la competencia entre el origen de replicación de pBluescript y los orígenes de replicación de pBMKn1. En este tipo de interacciones usualmente solo se replica el plásmido con el mecanismo de replicación tipo theta (Gruss y Ehrlich, 1989). Probablemente el plásmido linearizado con *EcoRI* y el fragmento de ~2 kb resultante de la digestión con *KpnI* contengan alguna secuencia relacionada con el origen de replicación, por lo cual no fue posible su clonación.

Se encontraron identidades significativas con regiones del plásmido p9123 de *E. coli* (Enne *et al.*, 2004) y con los plásmidos pSSTAV (Hartman *et al.*, 2003),

pKKTET7 (Ac. AF497970) y pSS4 (Ac. AF534183) de *Shigella sonnei*. Estos plásmidos están relacionados con la resistencia a antibióticos. Los resultados indican que el plásmido pBMKn1 no sólo presenta homologías con plásmidos que confieren resistencia antimicrobiana sino que además estos plásmidos se encuentran en bacterias coliformes. Aunque es necesario determinar la secuencia completa del plásmido con el fin de determinar la estructura y organización completa y poder definir si posee el determinante de resistencia QAC y el mecanismo de replicación.

Se buscaron también posibles marcos de lectura para proteínas (ORF). Se identificó sólo un ORF que presentaba homologías significativas, el cual codifica para una proteína de 67 aminoácidos. La comparación de secuencias de aminoácidos mostró como resultado que esta proteína posee una identidad del 66% y un 91% de similitud con una proteína de mantenimiento de plásmidos de *E. coli*.

8. Conclusión

El aislamiento STA6 que fue caracterizado como *Klebsiella pneumoniae*, posee resistencia al detergente bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB); además porta el determinante de resistencia *qacH*, no obstante, falta determinar si este determinante se localiza en el plásmido pBMKn1. Este es el primer reporte de resistencia a detergentes en un aislamiento de *K. pneumoniae* asociado a mastitis bovina.

9. Referencias

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anthonisen IL, Sunde M, Steinum TM, Sidhu MS, Sorum H. 2002. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and *Tn552*-related lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3606–3612.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bjorland J, Steinum T, Kvitle B, Waage S, Sunde M, Heir E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4363-4368.
- Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. 2003. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3046–3052.
- Bjorland J, Sunde M, Waage S. 2001. Plasmid-Borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3999-4004.
- Brown T. 2006. Vectors for gene cloning: Plasmids and bacteriophages. En: *Gene cloning and DNA analysis*. Fifth edition. Blackwell Publishing: pp 18.

- Brusés B, Lucero H, Aguirre M, Gorodner J. 2000. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. 2006. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 2493-2499.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 42: 5857-5860.
- Dong-Hun L, Young GZ, Sang JK. 1996. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3112-3120.
- Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. 2004. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. J. Antimicrob. Chemother. 53: 958-963.
- FAO/OIE/WHO. 2003. First joint expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment. Background document.
- Fox L, Bayles K, Bohach G. 2001. *Staphylococcus aureus* mastitis. En: Infectious Agents and Pathogenesis. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease, Editado por: Honeyman A, Friedman H, Bendinelli M; New Cork. pp 271-275.

- Gasson M, Shearman C. 2003. Plasmid biology, conjugation and transposition. En: The Lactic Acid Bacteria. Genetics of Lactic Acid Bacteria. Editado por: Wood B, Warner P. Plenum Publishers, New York. 3: 27-29.
- González-Silva N. 2004. Estudio molecular de poblaciones bacterianas del rumen mediante PCR-SSCP de genes de ARN ribosomal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. Pp 60.
- Gruss A, Ehrlich SD. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. Microbiol. Rev. 53: 231-241.
- Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE. 2003. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: Characterization and dissemination of tet(A)-1. J. Clin. Microbiol. 41: 1023-1032.
- Hayes F. 2003. The function and organization of plasmids. En: Methods in Molecular Biology. *E. coli* Plasmid Vectors. Editado por: Casalli N, Preston A. Humana Press, New Jersey. 235: 5.
- Heir E, Sundheim G, Holck AL. 1998. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. FEMS Microbiol. Lett. 163: 49-56.
- Hogan J, Smith KL. 2003. Coliform mastitis. Vet. Res. 34: 507-519.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth edition; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: pp 181.

- Khan SA. 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53: 126-136.
- Levy S. 1995. Antimicrobial resistance: A Global Perspective. En: *Antimicrobial Resistance: A Crisis in Health Care*. Editado por: Jungkind D, Mortensen J, Fraimow H, Calandra G. Plenum Press, New York: pp 1-4.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy M, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062–1066.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*, fourth edition; W.H. Freeman and company, New York: pp 209.
- Loeza-Lara PD, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE. 2004. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *REB* 23: 71-78.
- López-Meza JE, Higuera-Ramos JE, Ochoa-Zarzosa A, Chassin-Noria O, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica Pecuaria en México*. 44: 91-106.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. 1998. *Brock, Biología de los Microorganismos*, octava edición; Prentice Hall Iberia, Madrid: pp 196.
- McDonnell G, Russell DA. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 147–179.

- Salyers A, Whitt D. 2002. Bacterial pathogenesis: A molecular approach, second edition; ASM Press, Washington, DC: pp 152.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5468.
- Schumann W. 2001. The biology of plasmids. En: Plasmids for Therapy and Vaccination. Editado por: Schleef M. Wiley-VCH. Bielefeld, Germany: pp 3-4.
- Stemmer WPC. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high salt extraction protocol for plasmid DNA. Biotechniques 10:726.
- Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS, Schoenberger PS. 1991. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. Am. J. Vet. Res. 52: 184–188.
- Wattiaux M. 1999. Mastitis: La enfermedad y su transmisión. Esenciales lecheras. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison, 23: 89-92.