



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“DISTRIBUCIÓN DEL GEN *chrA* EN PLÁSMIDOS DE  
BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS DE ORIGEN CLÍNICO”**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en:

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

**Q.F.B. GUSTAVO G. CABALLERO FLORES**

Asesor:

D.C. CARLOS CERVANTES VEGA

Co-asesora:

D.C. MARTHA I. RAMÍREZ DÍAZ

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. CARLOS CERVANTES VEGA Y LA D.C. MARTHA I. RAMÍREZ DÍAZ.

PARTE DEL TRABAJO EXPERIMENTAL SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA CON EL APOYO DEL D.C. JESÚS SILVA SÁNCHEZ.

**RECUERDA QUE CUALQUIER MOMENTO ES BUENO PARA COMENZAR Y QUE NINGUNO ES TAN TERRIBLE PARA CLAUDICAR.**

**NO OLVIDES QUE TU PRESENTE ES TU PASADO, ASÍ COMO LA CAUSA DE TU FUTURO SERÁ TU PRESENTE.**

**APRENDE DE LOS AUDACES, DE LOS FUERTES, DE QUIEN NO ACEPTA SITUACIONES, DE QUIEN VIVIRÁ A PESAR DE TODO.**

**PIENSA MENOS EN TUS PROBLEMAS Y MÁS EN TU TRABAJO Y TUS PROBLEMAS SIN ALIMENTARLOS MORIRÁN.**

**APRENDE A NACER DESDE EL DOLOR Y A SER MÁS GRANDE QUE EL MÁS GRANDE DE LOS OBSTÁCULOS.**

**PABLO NERUDA**

DEDICATORIA:

A MIS PADRES, GILBERTO Y ROSA MARÍA, POR BRINDARME LA VIDA Y MI MAYOR TESORO, UNA FAMILIA MARAVILLOSA. MIL GRACIAS POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL DURANTE LOS BUENOS Y MALOS MOMENTOS.

A MIS HERMANAS, DEYSI Y PATY, POR ESTAR A MI LADO CUANDO MÁS LAS HE NECESITADO Y POR TANTAS MUESTRAS DE CARIÑO.

A TÍ ZURI, POR HACERME SONREIR AÚN EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES Y POR CREER SIEMPRE EN MÍ. ADEMÁS DE UN EXCELENTE HERMANO, ERES UN GRAN AMIGO.

A MIS SOBRINOS, ÁNGEL, FER Y EDGAR, PORQUE SIN SU INOCENCIA Y TRAVESURAS MI VIDA NO SERÍA LA MISMA.

A MI ABUELA AGUSTINA POR SER UN VERDADERO EJEMPLO DE TERNURA Y FORTALEZA PARA TODOS NOSOTROS.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LABORATORIO: AMADA, ESTHER, FER, JESSICA, KAREN, KARINA, LUIS ALFONSO, LUIS JOSÉ, LUPITA, MAURINO, MILY, RAFA, RENÉ, ROSA Y SELENE; POR COMPARTIR CONMIGO ESTA ETAPA DE MI VIDA Y POR CONTAGIARME SU ENTUSIASMO Y OPTIMISMO.

AGRADECIMIENTOS:

“LO QUE EL MAESTRO ES, ES MÁS IMPORTANTE QUE LO QUE ENSEÑA”.

KARL MENNINGER

A MI ASESOR:

D.C. CARLOS CERVANTES VEGA, UN EXCELENTE MAESTRO Y MEJOR PERSONA, UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO POR LA CONFIANZA DEPOSITADA EN MÍ, POR SUS PALABRAS PRECISAS Y VALIOSOS CONSEJOS QUE ME PERMITIERON CRECER A NIVEL PROFESIONAL Y COMO PERSONA.

A MI CO-ASESORA:

D.C. MARTHA I. RAMIREZ DÍAZ POR TODO SU APOYO Y POR COMPARTIR CONMIGO SUS CONOCIMIENTOS Y EXPERIENCIA.

A MIS SINODALES:

D.C. GUSTAVO SANTOYO PIZANO Y D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA POR SU PARTICIPACIÓN EN LA REVISIÓN DE ESTA TESIS. UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL AL D.C. JESÚS SILVA SÁNCHEZ POR ABRIRME LAS PUERTAS DE SU GRUPO DE TRABAJO Y POR SU VALIOSO APOYO EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

## RESUMEN

El gen *chrA* del plásmido pUM505 codifica a la proteína ChrA que confiere resistencia a cromato por un mecanismo de expulsión. Aunque pUM505 se identificó en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, no existen otros reportes de la presencia de genes *chrA* en bacterias de origen clínico. En este estudio, se evaluó la presencia del gen *chrA* en bacterias Gram-negativas de origen clínico con el objetivo de identificar plásmidos que participan en la prevalencia y transferencia horizontal de genes *chrA* en ambientes hospitalarios. Se empleó una colección de 133 cepas pertenecientes a las especies *Escherichia coli* (56), *Klebsiella pneumoniae* (31), *P. aeruginosa* (21), *Enterobacter cloacae* (18) y *Salmonella sp.* (7) provenientes de hospitales de distintas regiones del país. Del total de cepas analizadas, nueve *P. aeruginosa*, seis *K. pneumoniae*, dos *E. cloacae* y una *E. coli* mostraron fenotipos de resistencia a cromato y fueron positivas a hibridación con una sonda *chrA* del plásmido pUM505. De estas 18 cepas, cuatro *P. aeruginosa*, cuatro *K. pneumoniae* y dos *E. cloacae* presentaron plásmidos que hibridaron con la sonda *chrA*. Cuatro plásmidos de *P. aeruginosa* mostraron patrones de restricción similares y no pudieron ser transferidos por conjugación. Tres plásmidos de tamaños diferentes de cepas de *K. pneumoniae* y uno de *E. cloacae* se transfirieron por conjugación a cepas de *E. coli* y confirieron resistencia a cromato; estos plásmidos pertenecieron a los grupos de incompatibilidad IncN o IncP. En conclusión, los genes *chrA* se encuentran presentes en plásmidos de enterobacterias y *P. aeruginosa* de origen clínico, los cuales probablemente favorecen la prevalencia y transferencia horizontal de estos genes en hospitales.

## ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1.1.- El cromo en el medio ambiente.....	12
1.2.- Transporte y acumulación de cromato.....	12
1.3.- Toxicidad del Cr(VI) .....	14
1.4.- Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato.....	14
1.5.- Expulsión transmembranal de cromato.....	16
1.6.- Superfamilia de transportadores CHR.....	18
1.7.- Contexto genómico de genes <i>chrA</i> .....	18
1.8.- Transferencia horizontal de genes en bacterias.....	21
1.9.- Distribución de genes de resistencia a metales.....	23
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	24
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>4.- HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>5.- OBJETIVOS</b> .....	26
5.1.- Objetivo general.....	26
5.2.- Objetivos específicos.....	26
<b>6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	27
<b>7.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
7.1.- Medios de cultivo.....	28
7.2.- Cepas bacterianas.....	28
7.3.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cromato.....	33
7.4.- Pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido.....	33
7.5.- Extracción de plásmidos.....	33
7.6.- Electroforesis en geles de agarosa.....	34

7.7.- Amplificación por PCR.....	34
A) Extracción del DNA.....	34
B) Amplificación del fragmento <i>chrAc</i> .....	35
C) Amplificación al azar de polimorfismos de DNA (RAPD).....	35
7.8.- Purificación de productos de PCR.....	37
7.9.- Obtención y marcaje de sondas de DNA.....	37
7.10.- Hibridación en colonia.....	37
A) Crecimiento y transferencia de las colonias.....	38
B) Preparación de la membrana.....	38
C) Hibridación y lavado de la membrana.....	39
D) Detección de la señal y revelado fotográfico.....	39
7.11.- Hibridación Southern blot.....	40
A) Extracción de DNA.....	40
B) Corrimiento del gel.....	40
C) Tratamiento del gel.....	40
D) Transferencia del DNA.....	40
E) Tratamiento de la membrana.....	41
F) Hibridación y revelado.....	41
7.12.- Conjugación bacteriana.....	42
A) Conjugación en líquido.....	42
B) Conjugación en filtro.....	42
7.13.- Transformación por electroporación.....	43
A) Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....	43
B) Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
C) Transformación.....	43

---

7.14.- Determinación de grupos de incompatibilidad.....	44
7.15.- Restricción enzimática de plásmidos.....	44
<b>8.- RESULTADOS</b> .....	45
8.1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cromato.....	45
8.2.- Detección del gen <i>chrA</i> por hibridación en colonia.....	50
8.3.- Selección del grupo final de estudio.....	54
8.4.- Contenido de plásmidos de las cepas <i>chrA+</i> .....	56
8.5.- Caracterización de plásmidos de cepas de <i>P. aeruginosa chrA+</i> .....	58
8.5.1.- Identificación de plásmidos con secuencias <i>chrA</i> .....	58
8.5.2.- Obtención de patrones de restricción enzimática.....	64
8.5.3.- Transferencia de plásmidos por conjugación.....	67
8.5.4.- Transferencia de plásmidos por transformación.....	67
8.6.- Caracterización de plásmidos de enterobacterias <i>chrA+</i> .....	71
8.6.1.- Identificación de plásmidos con secuencias <i>chrA</i> .....	71
8.6.2.- Transferencia de plásmidos por conjugación.....	75
8.6.3.- Susceptibilidad a cromato de transconjugantes.....	77
8.6.4.- Determinación del grupo de incompatibilidad de plásmidos....	80
<b>9.- DISCUSIÓN</b> .....	83
<b>10.- CONCLUSIÓN</b> .....	96
<b>11.- PERSPECTIVAS</b> .....	96
<b>12.- MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	97
Apéndice 1.- Diferenciación de clonas por PCR-RAPD.....	97
Apéndice 2.- Hibridación Southern de cepas sin señal en plásmidos.....	99
<b>13.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Captación del cromato en bacterias.....	13
<b>Figura 2.-</b> Toxicidad y resistencia a cromato en bacterias.....	15
<b>Figura 3.-</b> Expulsión de cromato por la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
<b>Figura 4.-</b> Análisis filogenético de la familia LCHR de transportadores de cromato.....	19
<b>Figura 5.-</b> Contexto genómico de los genes <i>chrA</i> en la subfamilia LCHR5..	20
<b>Figura 6.-</b> Movilización de genes por conjugación y transposición.....	22
<b>Figura 7.-</b> Transposones de resistencia a cromato.....	25
<b>Figura 8.-</b> Origen y distribución de las cepas clínicas.....	30
<b>Figura 9.-</b> Distribución de la susceptibilidad a cromato de cepas de <i>E. coli</i> y <i>E. cloacae</i> .....	46
<b>Figura 10.-</b> Distribución de la susceptibilidad a cromato de cepas de <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....	47
<b>Figura 11.-</b> Fragmento de DNA utilizado como sonda para la detección de genes <i>chrA</i> .....	51
<b>Figura 12.-</b> Detección del gen <i>chrA</i> en las cepas clínicas por hibridación en colonia.....	52
<b>Figura 13.-</b> Detección del gen <i>chrA</i> en las cepas <i>chrA+</i> .....	57
<b>Figura 14.-</b> Contenido de plásmidos de cepas de <i>P. aeruginosa chrA+</i> .....	59
<b>Figura 15.-</b> Contenido de plásmidos de cepas de enterobacterias <i>chrA+</i> ....	60
<b>Figura 16.-</b> Hibridación Southern de cepas de <i>P. aeruginosa chrA+</i> .....	63
<b>Figura 17.-</b> Restricción enzimática de plásmidos de cepas de <i>P. aeruginosa chrA+</i> .....	65
<b>Figura 18.-</b> Plásmidos de cepas de <i>P. aeruginosa</i> transferidos por transformación.....	69

<b>Figura 19.-</b> Susceptibilidad a cromato de transformantes PAO1 y cepas de <i>P. aeruginosa chrA+</i> .....	70
<b>Figura 20.-</b> Hibridación Southern de cepas de enterobacterias <i>chrA+</i> .....	73
<b>Figura 21.-</b> Transferencia de plásmidos de enterobacterias por conjugación.....	76
<b>Figura 22.-</b> Susceptibilidad a cromato de las transconjugantes J53-2 (p70kb) y J53-2 (p100kb).....	78
<b>Figura 23.-</b> Susceptibilidad a cromato de las transconjugantes J53-2 (p85kb) y J53-2 (p95kb).....	79
<b>Figura 24.-</b> Determinación del grupo de incompatibilidad de plásmidos de transconjugantes de enterobacterias <i>chrA+</i> .....	81
<b>Figura A1.-</b> Diferenciación de cepas de <i>P. aeruginosa</i> por PCR-RAPD.....	98
<b>Figura A2.-</b> Hibridación Southern de cepas con señal en región del cromosoma.....	100

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Origen e identidad de las cepas clínicas analizadas.....	31
<b>Tabla 2.-</b> Cepas de referencia usadas en el presente estudio.....	32
<b>Tabla 3.-</b> Oligonucleótidos empleados en el presente estudio.....	36
<b>Tabla 4.-</b> Resistencia a cromato de la colección de cepas clínicas.....	48
<b>Tabla 5.-</b> Grupo final de estudio, cepas <i>chrA+</i> .....	55
<b>Tabla 6.-</b> Contenido de plásmidos de las cepas <i>chrA+</i> .....	61
<b>Tabla 7.-</b> Cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a cromato que contienen plásmidos con secuencias <i>chrA</i> .....	66
<b>Tabla 8.-</b> Cepas de enterobacterias resistentes a cromato que contienen plásmidos con secuencias <i>chrA</i> .....	74

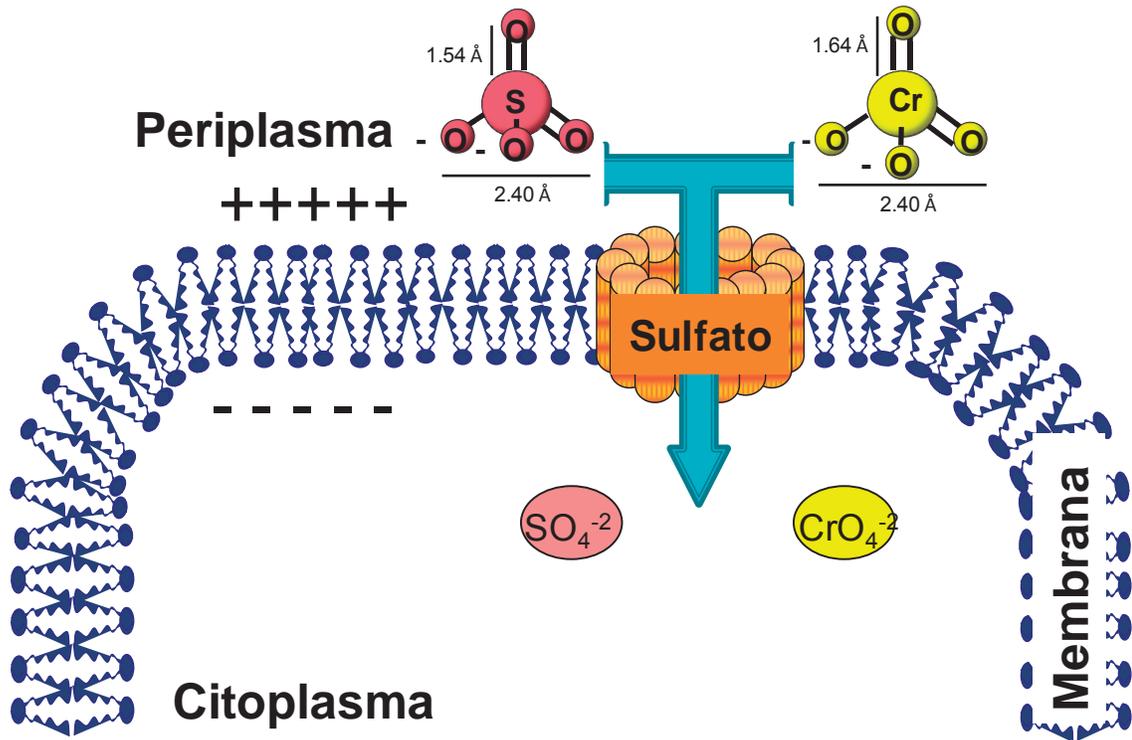
## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1- EL CROMO EN EL MEDIO AMBIENTE

El cromo (Cr) es un metal de transición perteneciente al grupo VI-B de la tabla periódica. Se encuentra de forma natural en rocas, suelo, plantas, animales y emisiones volcánicas y es el séptimo elemento más abundante en la tierra (Cervantes y col., 2001). Las formas trivalente Cr(III) y hexavalente Cr(VI) son las más estables y abundantes del cromo. El Cr(VI), considerado la forma más tóxica del cromo ya que es hidrosoluble a pH fisiológico, está comúnmente presente en solución como los oxianiones cromato ( $\text{CrO}_4^{-2}$ ) o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ ) (McGrath y Smith, 1990). En contraste, el Cr(III) en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, es mucho menos móvil y se encuentra mayormente unido a materia orgánica en ambientes terrestres o acuáticos. Además, el Cr(III) es mucho menos tóxico debido a que es poco hidrosoluble a pH fisiológico. El uso generalizado del cromo en diversos procesos industriales lo ha convertido en un serio contaminante del agua, suelo y aire (Khashim y col., 1989).

### 1.2.- TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN DE CROMATO

En bacterias el Cr(VI) es altamente tóxico debido a que ingresa rápidamente al citoplasma donde puede ejercer sus efectos tóxicos (Katz y Salem, 1993). El transporte activo de cromato a través de la membrana por medio de la vía de captación de sulfato se ha demostrado en una amplia variedad de especies bacterianas, lo cual refleja la analogía estructural entre estos dos oxianiones que poseen radios atómicos y distancia de enlace similares (Figura 1).



**Figura 1.- Captación del cromato en bacterias.** El cromato es transportado al interior de la célula por medio de las permeasas de sulfato SulT, SulP, CysP o CysZ. Se muestran las estructuras tetraédricas del sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) y el cromato ( $\text{CrO}_4^{-2}$ ), los cuales poseen radios atómicos y distancia de enlace similares (modificada de León-Márquez, 2010).

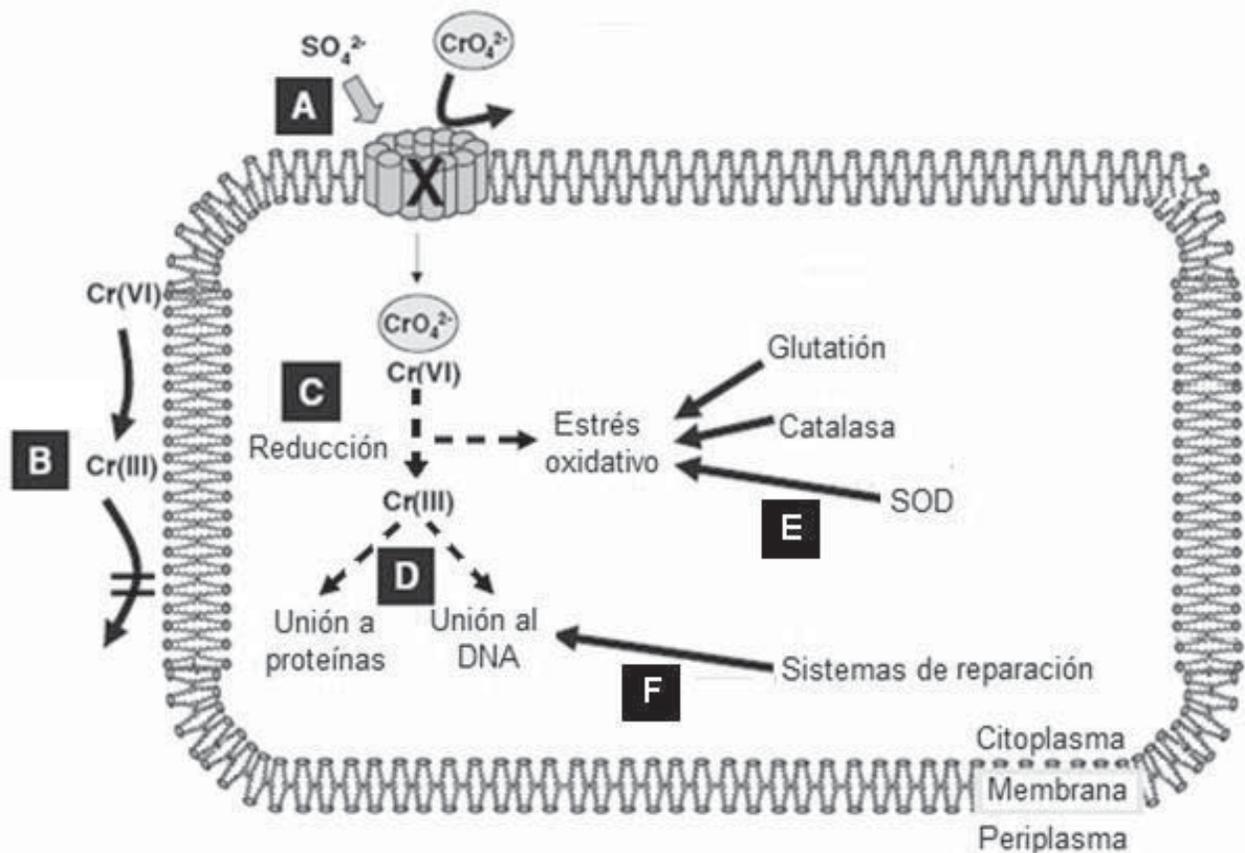
Además, se ha demostrado que mutaciones en genes que codifican transportadores de sulfato afectan la entrada de cromato a la célula (Figura 2A). En contraste, la mayoría de las células son impermeables a Cr(III), probablemente porque forma complejos insolubles en soluciones acuosas no ácidas (Figura 2B). Una vez dentro de las células, el Cr(VI) es rápidamente reducido por mecanismos no enzimáticos o por la acción de varias enzimas a Cr(III), el cual puede ejercer diversos efectos tóxicos en el citoplasma (Figura 2C).

### 1.3.- TOXICIDAD DEL Cr(VI)

La toxicidad del cromo en el citoplasma está relacionada con el proceso de reducción de Cr(VI) a los estados de oxidación más bajos Cr(III) y Cr(V), el cual genera radicales libres (Shi y Dalal, 1990). El daño oxidativo al DNA es probablemente responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromato. Además, la reducción intracelular del Cr(VI) a Cr(III) produce efectos tóxicos adicionales por la capacidad de este último de unirse al DNA y a proteínas (Bridgewater y col., 1994; Plaper y col., 2002) (Figura 2D).

### 1.4.- MECANISMOS BACTERIANOS DE RESISTENCIA A CROMATO

Se ha reportado una gran variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato, incluyendo cepas de origen ambiental y clínico (Cervantes y col., 2001). Los mecanismos de resistencia a este oxianión pueden ser codificados tanto en cromosomas como en plásmidos (Nies y col., 1998; Cervantes y Campos-García, 2007).



**Figura 2.- Toxicidad y resistencia a cromato en bacterias.** Los mecanismos de daño se indican con líneas punteadas y los mecanismos de resistencia con líneas continuas. **A)** Mutaciones en el transportador de sulfato (**X**) disminuyen la entrada de cromato. **B)** Reducción extracelular de  $\text{Cr(VI)}$  a  $\text{Cr(III)}$ , que no ingresa a la célula. **C)** La reducción intracelular de  $\text{Cr(VI)}$  a  $\text{Cr(III)}$  genera estrés oxidativo. **D)** El  $\text{Cr(III)}$  produce daño a proteínas y al DNA. **E)** Sistemas de protección contra el estrés oxidativo. **F)** Sistemas de reparación del daño al DNA (modificado de Ramírez-Díaz y col., 2008).

Los sistemas de resistencia localizados en cromosomas bacterianos están usualmente relacionados con estrategias como reducción del Cr(VI) por enzimas específicas o inespecíficas y actividades de destoxificación (Figura 2E), así como sistemas de reparación de daño al DNA (Figura 2F). Por otro lado, los genes plasmídicos usualmente codifican transportadores de membrana, los cuales directamente expulsan los iones cromato del citoplasma de la célula.

### 1.5- EXPULSIÓN TRANSMEMBRANAL DE CROMATO

Uno de los mecanismos de resistencia a cromato mejor caracterizados es la expulsión de cromato conferido por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990), la cual funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa al oxianión tóxico del citoplasma hacia el periplasma utilizando el potencial eléctrico transmembranal como fuente de energía (Figura 3). Además de ChrA de *P. aeruginosa*, otros determinantes bacterianos de resistencia a cromato se han caracterizado a nivel experimental: los presentes en las especies *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Nies y col., 1990), *Shewanella* sp. ANA-3 (Aguilar-Barajas y col., 2008), *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (Branco y col., 2008), *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne y col., 2009), *Bacillus subtilis* 168 (Díaz-Magaña y col., 2009), *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Aguilar-Barajas, 2010) y los múltiples homólogos *chrA* de *Burkholderia xenovorans* LB400 (León-Márquez, 2009; Luna-Luna, 2010).

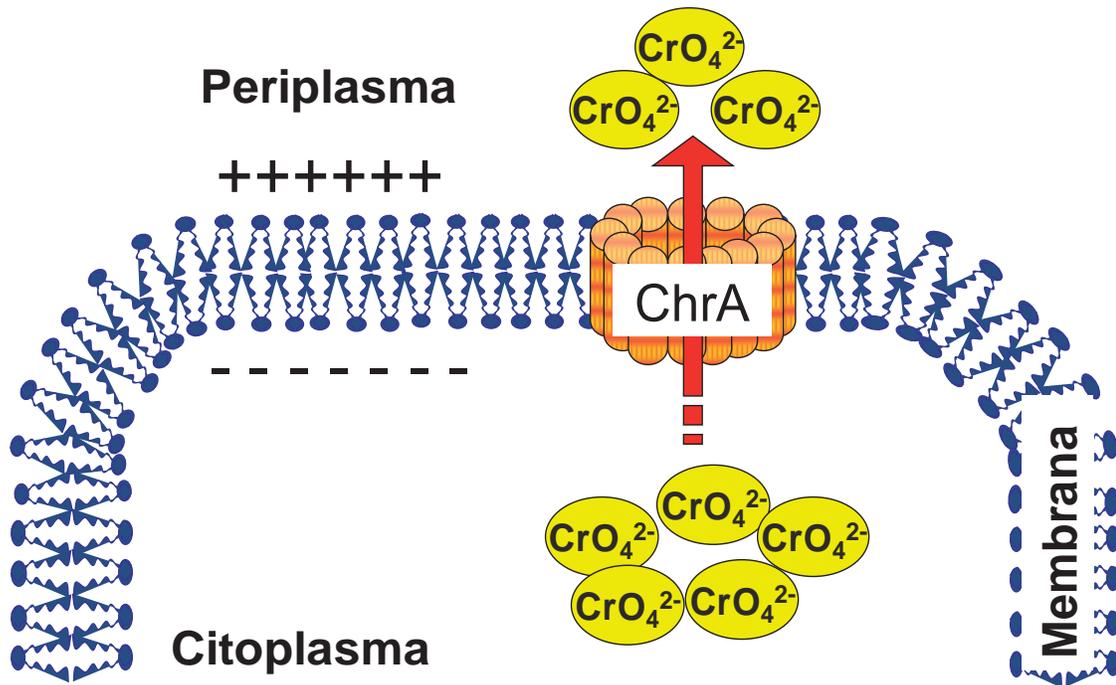


Figura 3.- Expulsión de cromato por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína membranal ChrA expulsa los iones cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) del citoplasma hacia el espacio periplásmico empleando el potencial de membrana como fuente de energía (modificado de Pimentel y col., 2002).

## 1.6- SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES CHR

La familia de transportadores CHR fue descrita por vez primera por Nies y col. (1998) como un pequeño grupo de proteínas procariontes involucradas en el transporte de cromato o sulfato. Díaz-Pérez y col. en 2007 realizaron un análisis filogenético de estas proteínas, a las que denominaron la superfamilia CHR, e identificaron 135 secuencias de proteínas homólogas a ChrA de *P. aeruginosa* en las bases de datos: 58 proteínas de cadena corta o SCHR (de ~200 aminoácidos) con sólo un dominio y codificadas por pares de genes en tándem; y 77 proteínas de cadena larga o LCHR (de ~400 aminoácidos) constituidas por un dominio amino y un dominio carboxilo que muestran similitud significativa en su secuencia. La familia LCHR está dividida en seis subfamilias bacterianas, denominadas LCHR1 a LCHR6, y una subfamilia de secuencias presentes en hongos (Figura 4).

## 1.7.- CONTEXTO GENÓMICO DE GENES *chrA*

Además de su longitud, los genes *chrA* difieren en la presencia de potenciales genes accesorios asociados con la resistencia a cromato (Cervantes y Campos-García, 2007). Por ejemplo, la mayoría de los genes *chrA* que codifican proteínas de la subfamilia LCHR2 poseen un gen aledaño denominado *chrB*, que codifica una proteína necesaria para la regulación de la resistencia a cromato en *C. metallidurans* CH34 (Juhnke y col., 2002) y *O. tritici* 5bvl1 (Branco y col., 2008). En contraste, los genes que codifican a miembros de la subfamilia LCHR5, a la cual pertenece ChrA de *P. aeruginosa*, usualmente carecen de genes *chrB* adyacentes (Figura 5). La presencia del gen *chrC*, cuyo producto posee homología con una superóxido dismutasa, es otra característica variable de las diferentes subfamilias.

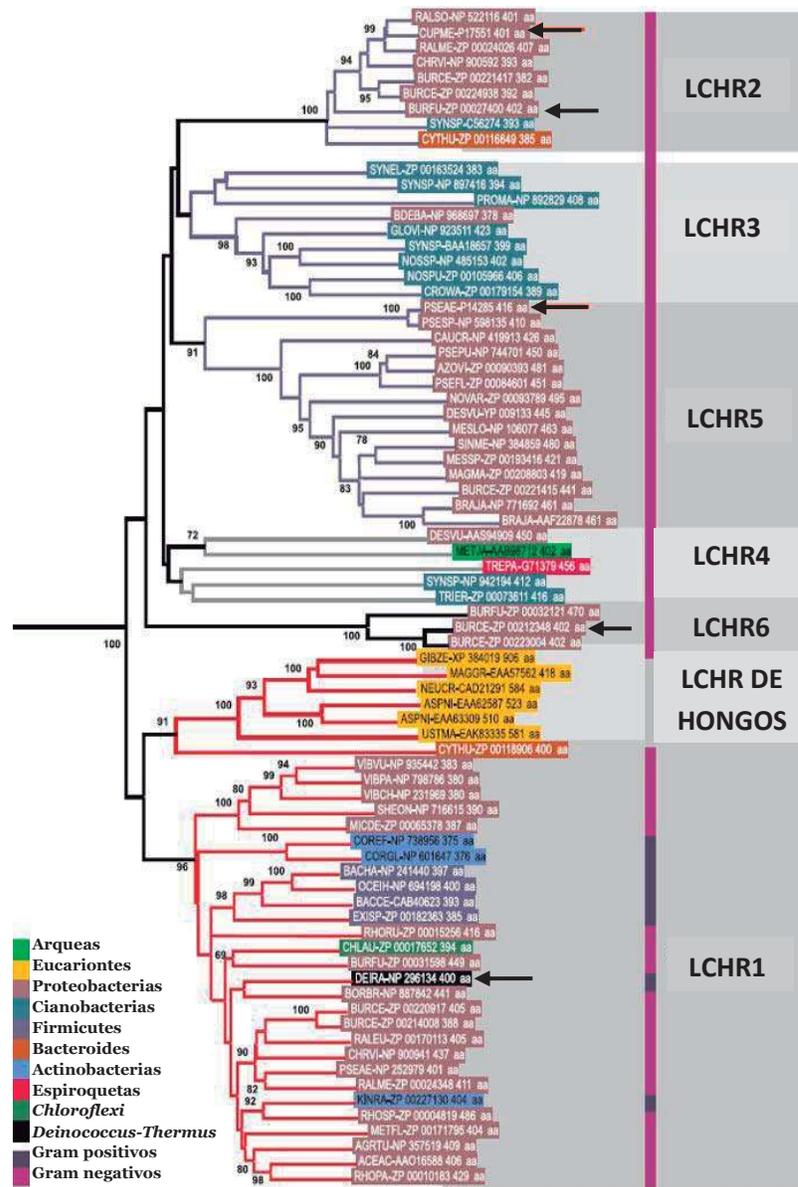
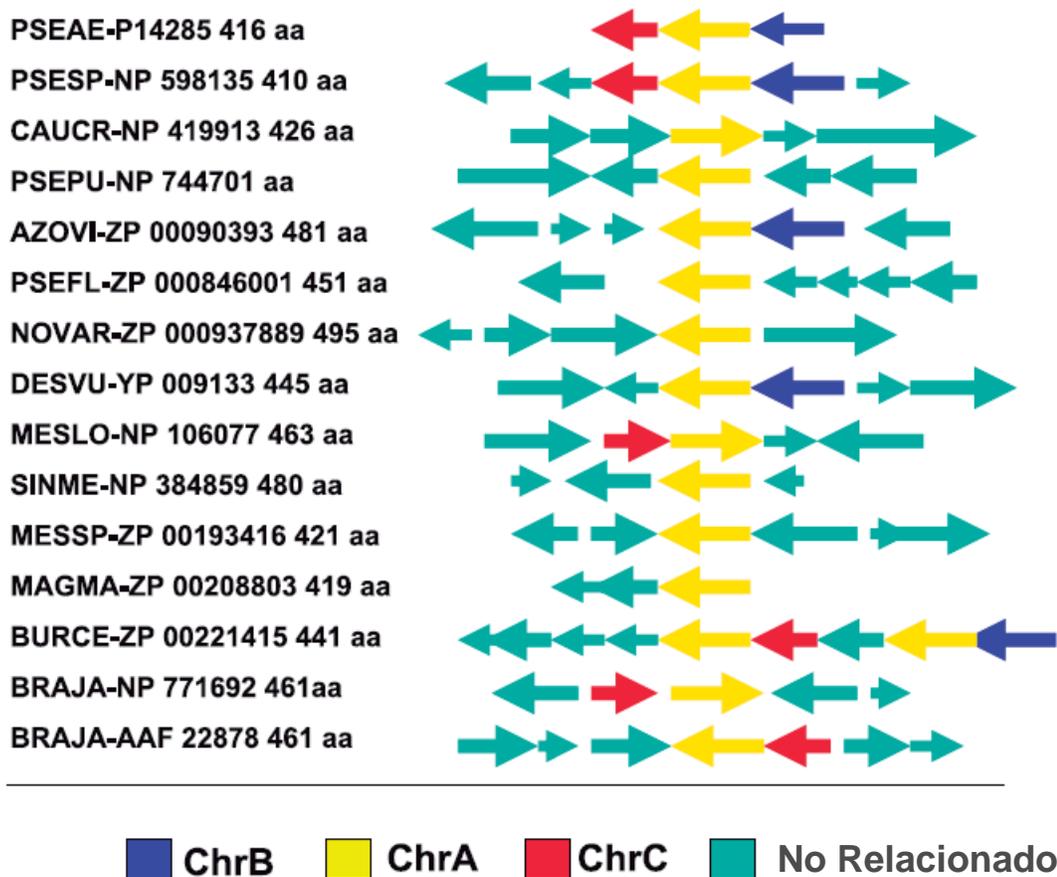


Figura 4.- Análisis filogenético de la familia LCHR de transportadores de cromato. Las proteínas se agrupan en subfamilias denominadas LCHR1 a LCHR6 y LCHR de hongos. Se indican con flechas algunas de las proteínas bacterianas caracterizadas a nivel experimental descritas en el texto. El código de colores (esquina inferior izquierda) muestra los diferentes organismos encontrados en el análisis (modificada de Cervantes y Campos-García, 2007).



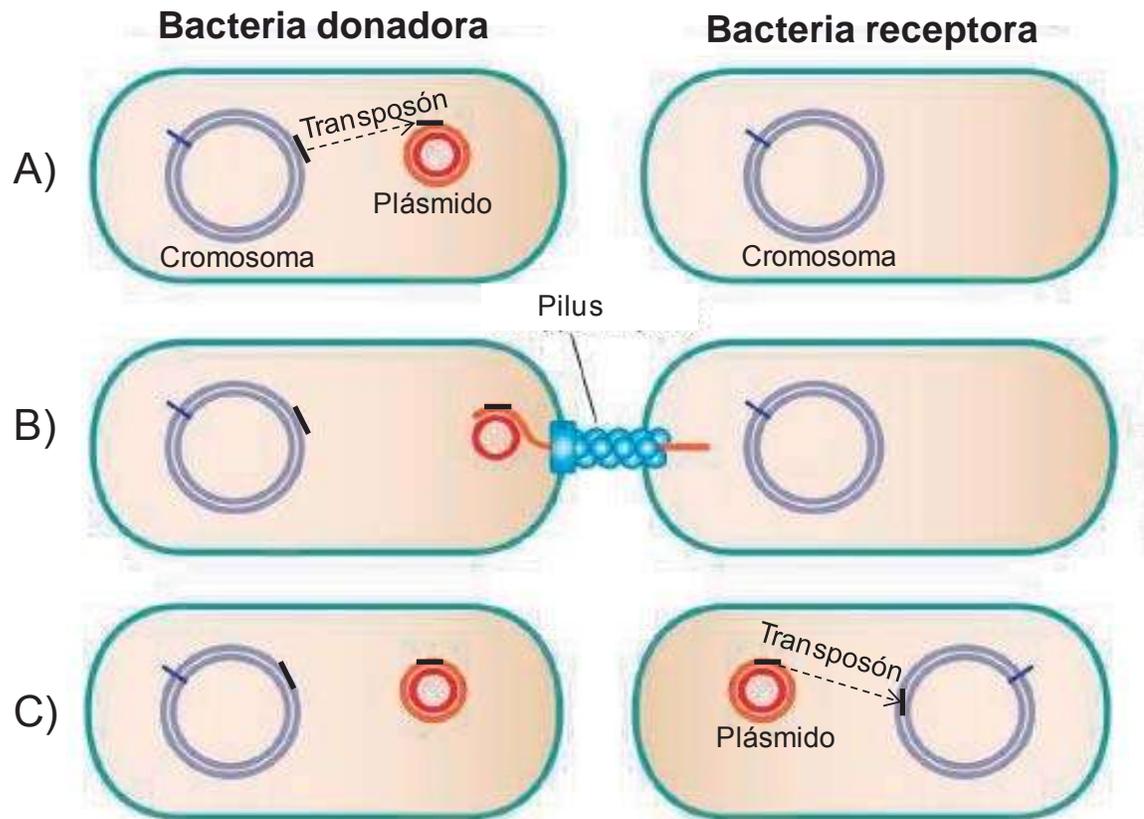
**Figura 5.- Contexto genómico de los genes *chrA* en la subfamilia LCHR5.** El nombre abreviado del organismo, número de acceso de la secuencia y número de aminoácidos (aa) de cada proteína se muestran a la izquierda. Las flechas de distintos colores representan genes relacionados con la resistencia a cromato y su dirección de transcripción. Las asignaciones génicas se muestran con recuadros en la parte inferior. Las flechas verdes indican genes de función desconocida (modificada de Cervantes y Campos-García, 2007).

## 1.8.- TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES EN BACTERIAS

El intercambio de información genética entre una bacteria donadora y una bacteria receptora se conoce como transferencia génica horizontal (HGT) (Figura 6). La transferencia de genes por HGT puede ocurrir entre organismos tanto filogenéticamente cercanos como distantemente relacionados y puede promover la adaptación bacteriana en diversos ambientes por conferir fenotipos específicos ventajosos bajo ciertas condiciones selectivas (Zaneveld y col., 2008). Por ejemplo, la diseminación por HGT de genes que codifican nuevas vías catabólicas en *P. aeruginosa* promueve la persistencia de esta bacteria en ambientes contaminados con compuestos orgánicos tóxicos, mientras que la adquisición de genes de virulencia o de resistencia a antibióticos promueve la prevalencia de bacterias en ambientes clínicos (Kung y col., 2010).

La conjugación es uno de los mecanismos principales de HGT y consiste en el intercambio de material genético entre células en una forma dependiente de contacto (Figura 6B). Este tipo de transferencia es mediada por plásmidos, los cuales son segmentos de DNA extracromosómico capaces de replicarse independientemente del cromosoma del hospedero y pueden promover su propia transferencia de una bacteria a otra (Zaneveld y col., 2008).

En adición a los mecanismos de HGT, existen procesos de movilización génica intracelular como la transposición que consiste en la translocación de elementos genéticos móviles denominados transposones de un sitio a otro en el genoma de una bacteria (Figura 6A y C). Los transposones no son capaces de autotransferirse de una célula a otra pero pueden ser movilizados por HGT si están asociados a plásmidos conjugativos (Figura 6B).



**Figura 6.- Movilización de genes por conjugación y transposición.**

**A)** Los transposones son capaces de translocarse del cromosoma a plásmidos presentes en la misma bacteria. **B)** Los plásmidos conjugativos codifican pilus tipo IV, apéndices capaces de mediar la transferencia del plásmido de una bacteria donadora a una bacteria receptora. **C)** El plásmido transferido es mantenido en la bacteria receptora y los transposones presentes en este replicón pueden integrarse en el cromosoma del nuevo hospedero (modificada de Kung y col., 2011).

## 1.9.- DISTRIBUCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A METALES

En un análisis de distribución génica se lleva a cabo la detección o identificación de secuencias de DNA de interés en colecciones bacterianas de un determinado origen con el fin de evaluar la naturaleza y abundancia de dichas secuencias en las poblaciones bacterianas (Trajanovska y col., 1997).

Diversos estudios de distribución de genes de resistencia a metales se han realizado con bacterias aisladas de sitios contaminados con metales. Estos incluyen genes de resistencia a cobre (operón *pco*) en bacterias de suelo (Trajanovska y col., 1997), mercurio (operón *mer*) en especies de *Bacillus* de diversos orígenes (Bogdanova y col., 1998), arsénico (genes *aoxB* y *arsB*) en aislados bacterianos de suelo (Cai y col., 2009) y el determinante *czc*, que confiere resistencia a cadmio, zinc y cobalto, en cepas de *C. metallidurans* de suelos contaminados con metales (Diels y Mergeay, 1990).

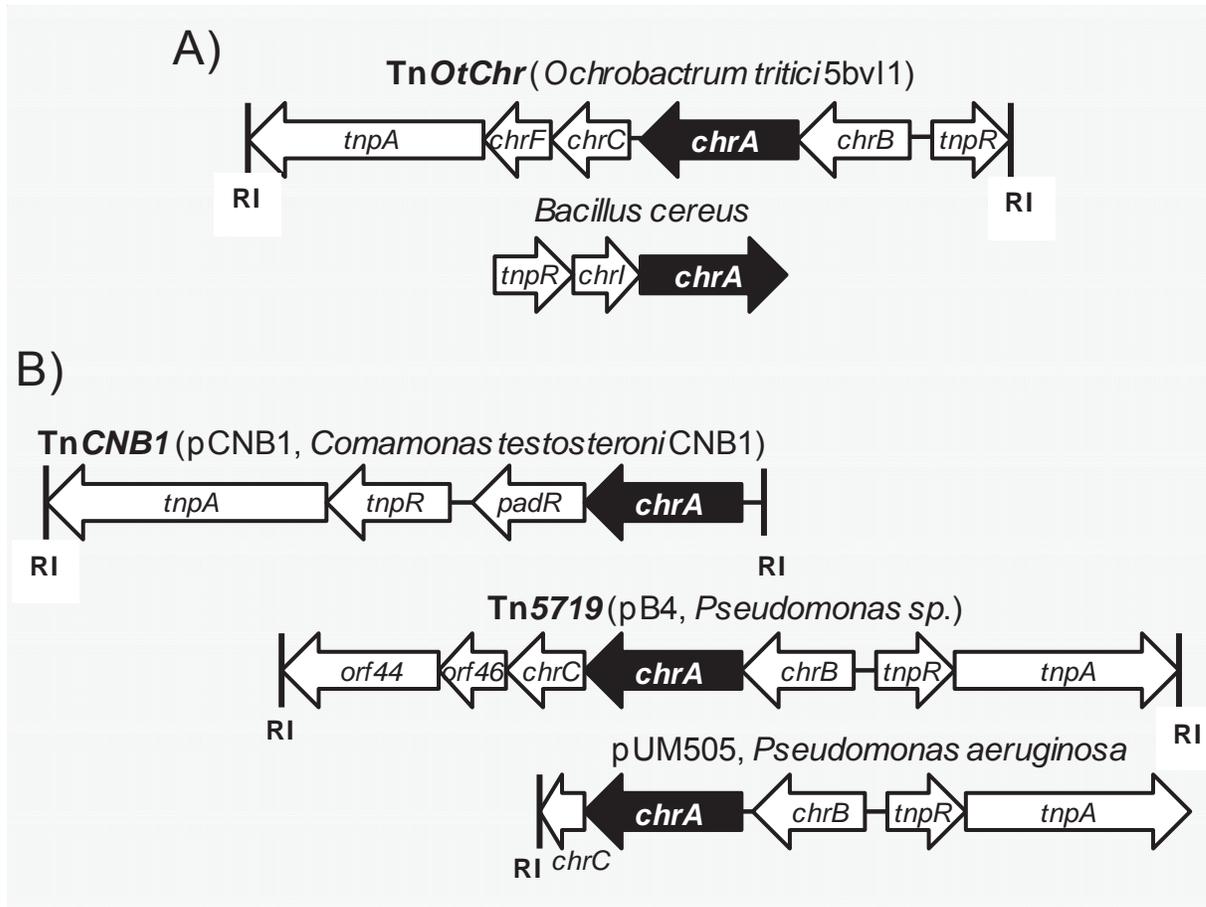
Por otro lado, este tipo de estudios también se han llevado a cabo con colecciones bacterianas de origen clínico, como los realizados para los determinantes de resistencia a plata (genes *agr* y *sil*) en plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* de origen clínico (Gupta y col., 2001); y mercurio (genes *mer*) en enterobacterias y *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos (Tato y col., 2010).

El único reporte encontrado en la literatura sobre la distribución de los genes *chrA* es el estudio realizado por Trajanovska y col. en 1997. En este trabajo se utilizó el gen *chrA* del plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* CH34 para detectar determinantes de resistencia a cromato en una colección de aislados bacterianos de suelo contaminado con plomo, sin embargo, no se logró detectar la presencia de genes *chrA* en las bacterias analizadas.

## 2.- ANTECEDENTES

Diversas proteínas ChrA están codificadas en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, tal es el caso de los plásmidos pMOL28 de *C. metallidurans* CH34 (Nies y col., 1990), pCNB-1 de *Comamonas* sp. CNB-1 (Ma y col., 2007), plásmido 1 de *Shewanella* sp. ANA-3 (Aguilar-Barajas y col., 2008), plásmido 3 de *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne y col., 2009) y el plásmido pB4 de una bacteria no cultivable (Tauch y col., 2003); además de los transposones de resistencia a cromato descritos en *O. tritici* 5bv11, *Comamonas* sp. CNB-1, *Bacillus cereus* ATCC10987 y en el plásmido pB4 (Figura 7). Estos plásmidos y transposones se identificaron en bacterias aisladas de sitios contaminados.

El gen *chrA* de *P. aeruginosa* se identificó en una cepa aislada de un paciente hospitalizado en Morelia (Cervantes y col., 1990) y representa el único reporte de la presencia de estos determinantes en bacterias de origen clínico. Este gen puede haberse distribuido de forma horizontal ya que forma parte de un transposón localizado en el plásmido conjugativo pUM505 (Figura 7). Este replicón además posee genes probablemente implicados en virulencia y confiere resistencia a antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (Ramírez-Díaz y col., 2011), características que podrían favorecer la prevalencia de pUM505 en ambientes hospitalarios. Por lo tanto, el gen *chrA* podría estar presente y transferirse de forma horizontal en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones de bacterias de origen clínico.



**Figura 7.- Transposones de resistencia a cromato. A) Cromosomales. B) Plasmídicos.** Las flechas representan regiones codificantes y su dirección de transcripción; las flechas en negro indican los genes *chrA*. Las líneas verticales representan secuencias repetidas invertidas (RI). Se indica el nombre de los transposones (negritas), así como de los organismos y plásmidos donde se identificaron. *chrA*, *chrB*, *chrC*, *chrF* y *chl*, genes relacionados con la resistencia a cromato; *tnpA*, transposasa; *tnpR*, resolvasa; *orf44* y *orf46*, regiones codificantes predichas sin función asignada (modificada de Vasconcelos-Morais y col., 2011).

### 3.- JUSTIFICACIÓN

Además del gen *chrA* de *P. aeruginosa*, no existen otros reportes a la fecha de la presencia de genes *chrA* en bacterias de origen clínico. Este estudio permitirá identificar plásmidos que podrían participar en la transferencia horizontal de genes *chrA* y puede ayudar a conocer los factores que seleccionan bacterias resistentes a cromato en el hospital.

### 4.- HIPÓTESIS

El gen *chrA* se encuentra presente en plásmidos de bacterias Gram-negativas de origen clínico.

### 5.- OBJETIVOS

#### 5.1.- OBJETIVO GENERAL

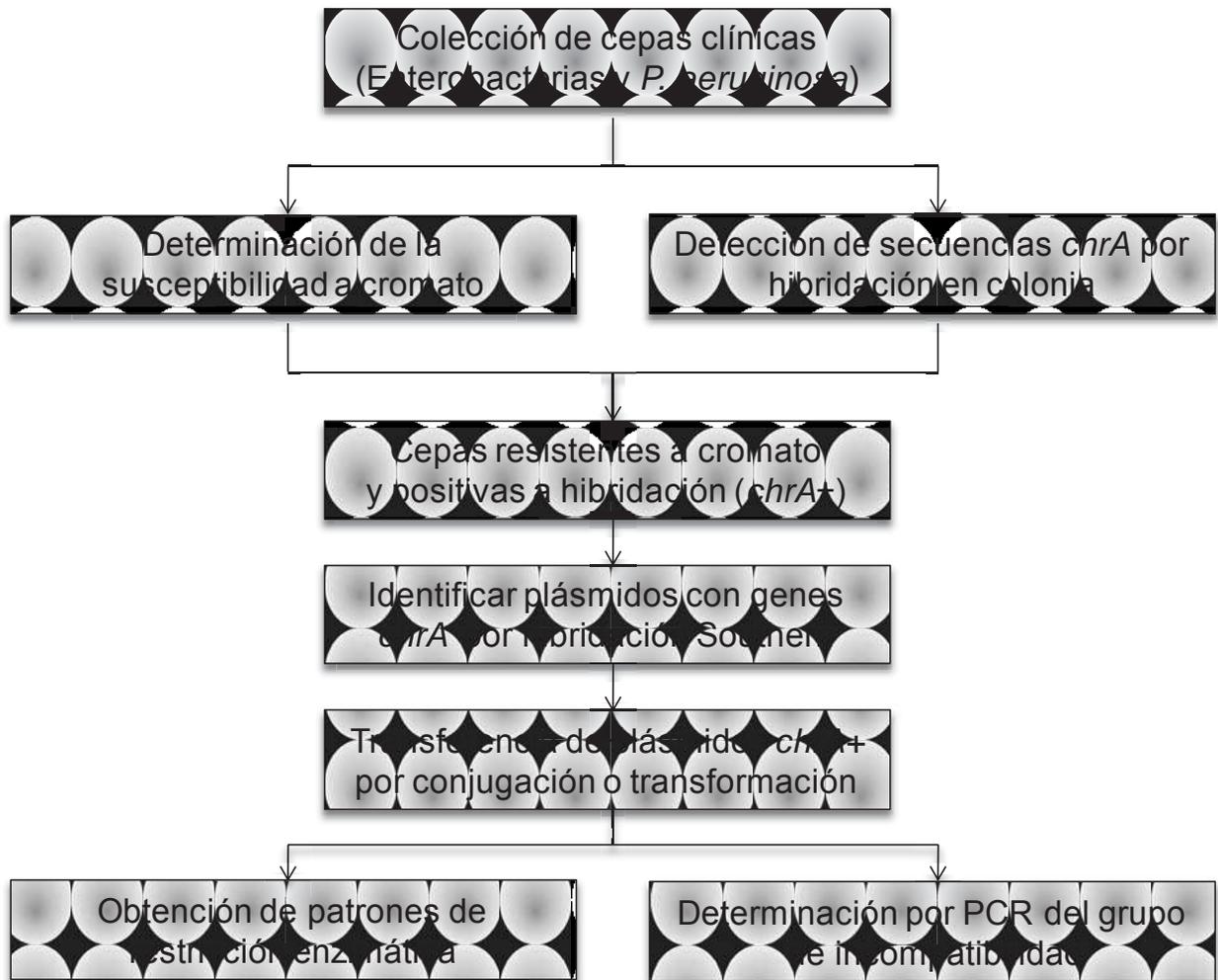
Evaluar la presencia del gen *chrA* en una colección de cepas clínicas Gram-negativas de distintos hospitales del país.

#### 5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la susceptibilidad a cromato de una colección de cepas clínicas de bacterias Gram-negativas.
- 2) Identificar y caracterizar las cepas resistentes a cromato con genes *chrA*.
- 3) Identificar y caracterizar los plásmidos que contengan el gen *chrA* de cepas resistentes a cromato.

## 6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama muestra la estrategia experimental diseñada para el desarrollo del presente trabajo:



## 7.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se obtuvieron de los laboratorios Merck de México S.A., Sigma Chemical Corporation, J. T. Baker o Bioxón de México S.A.

**Caldo Luria-Bertani (LB).**- Medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano. Preparado con 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl para 1 l de agua destilada.

**Agar Luria-Bertani (LB).**- Medio sólido utilizado para el crecimiento bacteriano. Misma composición del caldo LB más 1.5% de agar bacteriológico.

**Caldo nutritivo (CN).**- Medio líquido utilizado para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato.

**Medio mínimo (M9).**- Medio líquido utilizado para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato. Composición: sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y MgSO<sub>4</sub> 2 mM.

### 7.2.- CEPAS BACTERIANAS

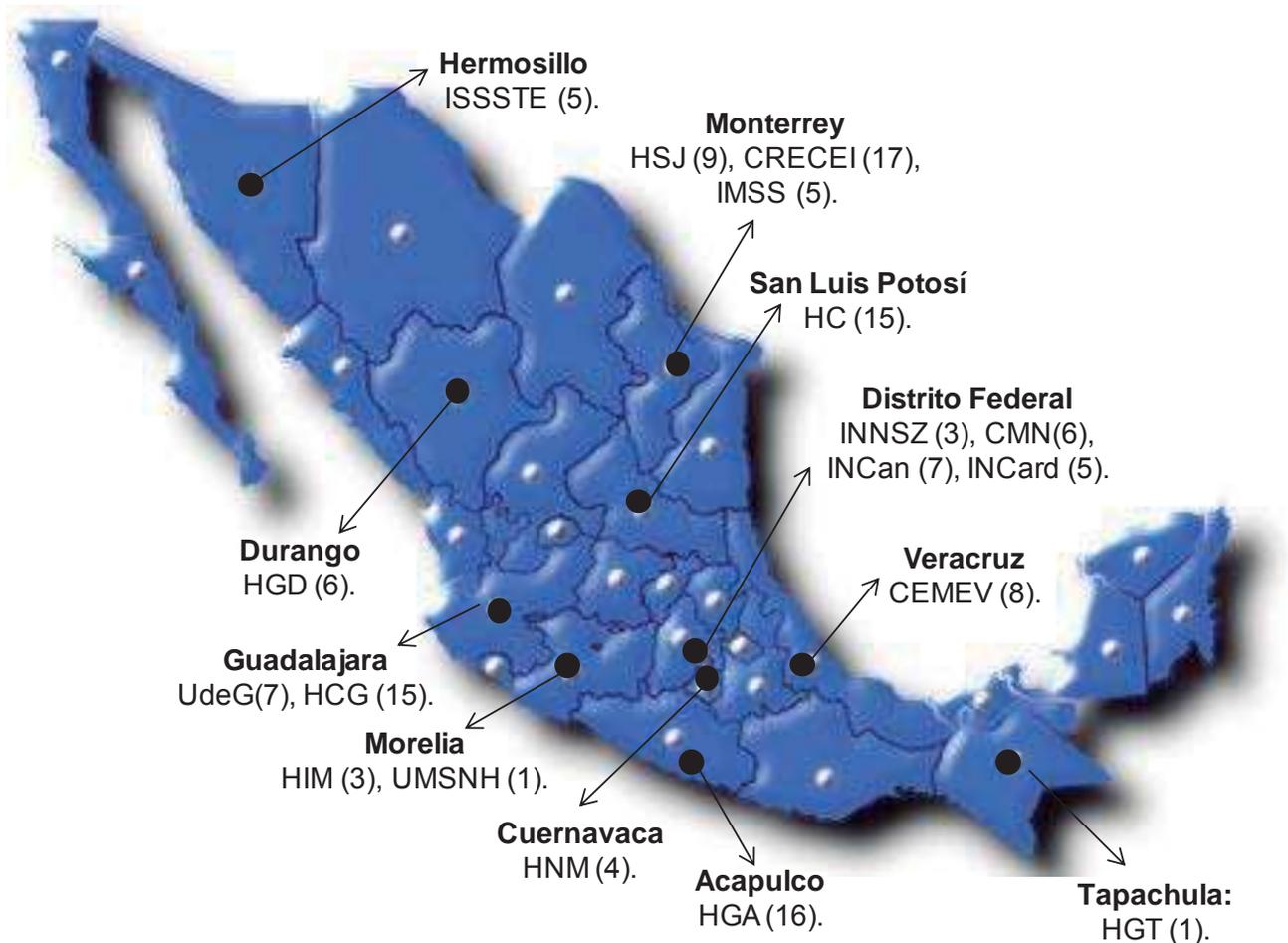
A) **Cepas clínicas.**- Las cepas de enterobacterias y *P. aeruginosa* analizadas en este trabajo se aislaron de pacientes en diferentes hospitales del país (Figura 9) en el periodo de junio del 2002 a noviembre del 2009. Estas cepas forman parte de la colección de bacterias multirresistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP, Cuernavaca Mor.) y fueron proporcionadas por el D.C. Jesús Silva Sánchez

Para este estudio, se incluyeron cepas de todas las especies presentes en la colección del CISEI tratando que el número de cepas seleccionadas fuera representativo del total de aislados de cada especie en dicha colección. La Figura 8 muestra el origen y la distribución geográfica de las 133 cepas clínicas analizadas. El número e identidad de las mismas se resume en la Tabla 1.

Para el crecimiento y diferenciación de las enterobacterias clínicas se utilizó agar MacConkey y para el aislamiento selectivo de las cepas de *P. aeruginosa* se usó agar Cetrimida. Las bacterias previamente crecidas en caldo LB se almacenaron en 30% de glicerol a -80°C hasta su uso.

B) **Cepas de referencia.**- Las cepas de *E. coli* W3110 y DH5 $\alpha$ , que no poseen homólogos *chrA* (Tabla 2), se utilizaron como controles sensibles en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cromato para enterobacterias y como controles negativos en los ensayos de hibridación en colonia. *E. coli* W3110 (pUChrAShe), que contiene el homólogo *chrA* de *Shewanella sp.* ANA-3 clonado en el vector pUCP20 (Tabla 2), se usó como control resistente a cromato en los ensayos de MIC.

La cepa *P. aeruginosa* PU21 con y sin el plásmido pUM505 (Tabla 2) se utilizó como control resistente y sensible, respectivamente, en los ensayos de MIC para el grupo de *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* PAO1 (pEPL1), que posee el gen *chrA* de pUM505 clonado en pUCP20 (Tabla 2), se usó como control positivo en hibridaciones. Las cepas *P. aeruginosa* PU21 y *E. coli* J53-2, ambas sin plásmidos, resistentes a rifampicina y sensibles a cromato (Tabla 2), se usaron como receptoras en los ensayos de conjugación.



**Figura 8.- Origen y distribución de las cepas clínicas.** Se muestran los diferentes hospitales donde se aislaron las 133 cepas analizadas en el presente estudio; entre paréntesis, número de aislados de cada procedencia incluidos. Abreviaturas: **Acapulco:** HGA, Hospital General de Acapulco; **Cuernavaca:** HNM, Hospital del Niño Morelense; **Distrito Federal:** CMN, Centro Médico Nacional “Siglo XXI”; INCAn, Instituto Nacional de Cancerología; INCard, Instituto Nacional de Cardiología; INNSZ, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”; **Durango:** HGD, Hospital General de Durango; **Guadalajara:** HCG, Hospital Civil de Guadalajara; UdeG, Universidad de Guadalajara; **Hermosillo:** ISSSTE, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado; **Monterrey:** CRECEI, Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas; HSJ, Hospital San José; IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social; **Morelia:** HIM, Hospital Infantil de Morelia; UMSNH, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; **San Luis Potosí:** HC, Hospital Central; **Tapachula:** HGT, Hospital General de Tapachula; **Veracruz:** CEMEVA, Centro de Especialidades Médicas del Estado de Veracruz.

Tabla 1.- Origen e identidad de las cepas clínicas analizadas.

		Origen <sup>a</sup>											
Especie/ Género		Ac	Cu	DF	Du	Gd	He	Mn	Mr	SL	Ta	Ve	Total
E n t é r i c a s	<i>Escherichia coli</i>	4	-	10	6	6	4	15	-	7	-	4	56
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	-	-	-	6	1	9	-	8	1	1	31
	<i>Enterobacter cloacae</i>	7	-	1	-	-	-	7	-	-	-	3	18
	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	7
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	4	9	-	3	-	1	4	-	-	-	21
	<b>Total</b>	16	4	20	6	22	5	32	4	15	1	8	<b>133</b>

<sup>a</sup>, Abreviaturas: Ac, Acapulco; Cu, Cuernavaca; DF, Distrito Federal; Du, Durango; Gd, Guadalajara; He, Hermosillo; Mn, Monterrey; Mr, Morelia; SL, San Luis Potosí; Ta, Tapachula; Ve, Veracruz. Los números indican el número de cepas incluidas en el presente trabajo.

**Tabla 2.- Cepas de referencia usadas en el presente estudio.**

Especie	Cepa	Características	P <sup>a</sup>	Ref <sup>b</sup>
<i>Escherichia Coli</i>	W3110	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> rph-1 INV(rrnD, rrnE)	No	Bachmann y col., 1976
	W3110 (pUChrAShe)	W3110 con el gen <i>chrA</i> de <i>Shewanella sp.</i> ANA-3 clonado en el vector pUCP20	~10	Aguilar-Barajas y col., 2008
	DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )λ <sup>-</sup>	No	Hanahan y col., 1985
	J53-2	F <sup>-</sup> met pro rif <sup>r</sup>	No	Stratagene
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PU21	llv <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> str <sup>r</sup> rif <sup>r</sup>	No	Jacoby <sup>c</sup>
	PAO1	Protótrofa	No	Holloway y col., 1969
	PAO1 (pEPL1)	PAO1 con el gen <i>chrA</i> de pUM505 clonado en pUCP20	~7.1	Pérez-López, 2001

<sup>a</sup>, Plásmido(s), tamaño en kilobases (kb); <sup>b</sup>, Referencia o fuente; <sup>c</sup>, Cepa proporcionada por el Dr. George A. Jacoby (Hospital General de Massachusetts, Boston, Mass., E.U.A.)

Los plásmidos 2F10 de 45 kilobases (kb) (Chen y col., 2008) y R1 de 93 kb, proporcionado por el D.C. Jesús Silva Sánchez, se utilizaron como marcadores de tamaño para DNA circular.

### 7.3.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE CROMATO

Las bacterias se crecieron en 4 ml de caldo LB a 37°C por 18 h con agitación, se diluyeron 1:100 en medio fresco y se inocularon con un replicador bacteriano tipo Steers en placas de agar LB con concentraciones crecientes de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (Baker).

Las cajas se incubaron 24 h a 37°C. El valor de MIC para una cepa determinada se definió como la concentración más baja de cromato que inhibió completamente el crecimiento bacteriano.

### 7.4.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO EN MEDIO LÍQUIDO

Se prepararon tubos con 4 ml de medio líquido CN, LB o M9 con diferentes concentraciones de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>. A cada tubo se le agregaron 40 µl de cultivo crecido durante la noche a 37°C con agitación constante. Los tubos inoculados se incubaron por 18 h a 37°C con agitación. Posteriormente, se midió la absorbencia de los cultivos a 590 nm en un espectrofotómetro marca Milton Roy.

### 7.5.- EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

El DNA plasmídico de las cepas bacterianas se extrajo mediante la técnica descrita por Kieser y col. (1984) que consiste en la lisis celular con detergente (SDS) combinada con la desnaturalización alcalina del DNA a temperatura

elevada (60°C). Adicionalmente, se utilizó el método de Casse y col. (1979) que utiliza la lisis alcalina a 25°C a un pH elevado (~12.3).

#### 7.6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las muestras de DNA plasmídico o los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se corrieron en geles de agarosa al 0.7 y 1.0%, respectivamente, a 125 Volts (V) en cámaras de electroforesis conteniendo buffer TAE 1X [Tris-acetato 40 mM (pH 8.0) y EDTA 1 mM]. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron usando un transiluminador de luz U.V. y se fotografiaron con ayuda del fotodocumentador Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak, Digital Science).

#### 7.7.- AMPLIFICACIÓN POR PCR

A) **Extracción del DNA.** El DNA utilizado como molde en las reacciones de PCR se extrajo de la siguiente manera: las bacterias se crecieron por estriado en medio sólido, agar MacConkey para enterobacterias o Cetrimida para *P. aeruginosa*, a 37°C durante la noche. Posteriormente, dos a tres colonias de la misma morfología se tomaron con palillos estériles y se suspendieron con 50 µl de agua HPLC en un tubo de microcentrífuga. La suspensión se calentó en un baño maría a 95°C por 10 min y se enfrió en hielo por 5 min. Luego de repetir este paso dos veces, se centrifugó por

3 min a 13 000 rpm y se hizo una dilución 1:10 del sobrenadante. Se utilizaron 7 µl de la dilución en las reacciones de PCR.

**B) Amplificación del fragmento *chrAc*.** Para amplificar la región codificante del gen *chrA* de 1 248 pares de bases (pb), las reacciones de PCR se prepararon con 12.5 µl de la mezcla de reacción Accuprime (Promega), 20 pmol de oligonucleótido directo y reverso (Tabla 3), 7 µl de DNA extraído de *P. aeruginosa* PU21 (pUM505) y agua HPLC cbp 25 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 1 min (polimerización), con un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

**C) Amplificación al azar de polimorfismos de DNA (RAPD).**- Las reacciones de PCR se prepararon igual que en el inciso anterior pero con DNA extraído de las cepas clínicas y 40 pmol de un solo oligo (Tabla 3). Se emplearon las condiciones de termociclado descritas por Mahenthiralingam y col. (1996): 4 ciclos de 94°C por 5 min (desnaturalización), 36°C por 5 min (alineamiento) y 72°C por 5 min (polimerización); seguidos por 30 ciclos de 94°C por 2 min (desnaturalización), 36°C por 2 min (alineamiento) y 72°C por 2 min (polimerización), con un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 min.

**Tabla 3.- Oligonucleótidos empleados en el presente estudio.**

Gen/ Uso	Nombre	Sentido	Secuencia (5' - 3')	Referencia
<i>chrA</i>	NchrA	Directo	GAGCGTTGCGAATGAA GAGTCG	Presente estudio
	CchrA	Reverso	CAGCCTTGGTTCGGAAA TACCAG	Presente estudio
RAPD <sup>a</sup>	272 <sup>a</sup>	----	AGCGGGCCAA	Mahenthiralingam y col. (1996)
	1254 <sup>a</sup>	----	CCGCAGCCAA	Hilton y col. (1997)

<sup>a</sup> Proporcionados por el D.C. Jesús Silva Sánchez del CISEI.

#### 7.8.- PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se purificaron mediante el KIT Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), se separaron en geles de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz U.V. La banda de interés se cortó del gel y el DNA se purificó siguiendo las instrucciones del proveedor. Una alícuota del producto final (4 µl) se corrió por electroforesis en gel de agarosa para corroborar la integridad del DNA obtenido.

#### 7.9.- OBTENCIÓN Y MARCAJE DE SONDAS DE DNA

El fragmento del gen *chrA* amplificado por PCR se purificó como previamente se describió. El producto purificado se cuantificó por comparación en gel de agarosa con un marcador de concentración conocida (Lambda-HindIII, Promega) y se diluyó a 10 ng/µl. Se marcaron 20 µl de la dilución (200 ng de DNA) con la enzima fosfatasa alcalina, utilizando el kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham, GE Healthcare) y siguiendo las indicaciones del proveedor. El producto obtenido se mezcló con un volumen de glicerol y se utilizó como sonda en los ensayos de hibridación o se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 7.10.- HIBRIDACIÓN EN COLONIA

Los ensayos de hibridación en colonia se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y col. (1989), el cual consta de:

- A) **Crecimiento y transferencia de las colonias.** Se crecieron las bacterias en caldo LB por 18 h a 37°C, se inocularon 4 µl de cada cultivo con una micropipeta en placas de agar LB (~50 cepas por caja) y se incubaron 18 h a 37°C. Por otra parte, se cortó una membrana de Nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) del mismo tamaño que la placa y se colocó sobre la superficie del agar en contacto con las colonias bacterianas hasta que éstas se transfirieron completamente (~2 min). La membrana se retiró de la caja utilizando pinzas estériles.
- B) **Preparación de la membrana.** Una vez transferidas las colonias, la membrana se colocó durante 5 min, con las colonias hacia arriba, sobre un círculo de papel filtro del mismo tamaño saturado con la solución de lisis (SDS 10%). A continuación, la membrana se colocó durante 10 min sobre otro círculo de papel filtro saturado con la solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) y luego se mantuvo por otros 10 min sobre un tercer círculo de papel filtro saturado con la solución de neutralización [Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M (pH 7.4)]. Posteriormente, la membrana se transfirió a una charola con 50 ml de solución salina con citrato 2X (SSC-2X) (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 30 mM) y se agitó durante 10 min a 30 rpm en un agitador horizontal marca Lab-Line Instruments. Los restos celulares se eliminaron raspando suavemente la superficie de la membrana con la punta de los dedos usando guantes de látex. Finalmente, el DNA se fijó por exposición de la membrana a 150 x 100 µJ/cm<sup>2</sup> de luz U.V. durante 2 min en un entrecruzador CL-1000 (marca UVP).

C) **Hibridación y lavado de la membrana.** Primero, la membrana se colocó en un tubo de hibridación de 30 cm de largo por 4 cm de diámetro (Lab-Line Instruments) conteniendo 12.5 ml del buffer de hibridación (NaCl 0.5M, urea 12%, esperma de salmón 4%) y se incubó a 63°C por 45 min a 40 rpm en un horno de hibridación (Lab-Line Instruments). A continuación, se agregaron 35 µl de sonda marcada al buffer de hibridación con la membrana y se incubó toda la noche en las mismas condiciones.

Al día siguiente, la membrana se transfirió a otro tubo de hibridación con 50 ml de buffer de lavado primario (Urea 2 M, SDS 0.1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, esperma de salmón 0.2%) y se incubó durante 10 min a 63°C a 100 rpm; este paso se repitió dos veces. Posteriormente, la membrana se transfirió a una charola con 50 ml de buffer de lavado secundario [Tris-base 50 mM (pH=10), NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM] y se agitó a temperatura ambiente por 10 min a 30 rpm en un agitador horizontal; este paso se repitió dos veces.

D) **Detección de la señal y revelado fotográfico.** La membrana se retiró de la charola y se colocó sobre papel filtro durante 10 s para eliminar el exceso de buffer de lavado. Se distribuyó 1 ml de reactivo de detección CDP-Star (Amersham, GE-Healthcare) sobre la superficie de la membrana, que posteriormente se cubrió por ambos lados con parafilm, se transfirió a un casete fotográfico y se expuso a una película fotográfica Kodak por ~30 min. El revelado de la fotografía se llevó a cabo por técnicas estándar usando reactivos de revelado Fujifilm.

### 7.11.- HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT

Las hibridaciones tipo Southern se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y col. (1989), el cual consta de:

- A) **Extracción de DNA.** Se realizó por los métodos antes descritos.
- B) **Corrimiento del gel.** Se cargaron de 100 a 200 ng de DNA de cada cultivo en un gel de agarosa al 0.7% y se separaron por electroforesis a 120 V durante ~1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió con ayuda de un transiluminador de luz U.V.
- C) **Tratamiento del gel.** El gel se colocó en una charola con 50 ml de la solución de depuración (HCl 0.25 N) durante 10 min. Para eliminar el exceso de ácido, el gel se transfirió a otra charola con 100 ml de agua destilada durante 30 seg, se desechó el líquido, se adicionaron 50 ml de la solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) y se mantuvo por 45 min. Finalmente, el gel se colocó en otra charola con 50 ml de la solución de neutralización [NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M (pH 7.5)] durante 30 min. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación a 30 rpm en un agitador horizontal.
- D) **Transferencia del DNA.** La transferencia del DNA del gel a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) se llevó a cabo por capilaridad en condiciones neutras. Para esto, se colocó una tira de papel filtro encima de un soporte más grande y amplio que el gel. El soporte se colocó dentro de una charola conteniendo la solución de transferencia SSC-10X (NaCl 1.5 M, citrato de sodio 150 mM) suficiente para que el líquido llegara casi a la

superficie del soporte (~500 ml). El gel se retiró de la solución de neutralización y se colocó con los orificios de los carriles hacia abajo sobre la tira de papel filtro en el centro del soporte. Se cortó una membrana de nylon del mismo tamaño que el gel y se colocó sobre éste, se pusieron encima tres piezas de papel filtro del mismo tamaño que la membrana, una pila de toallas absorbentes de 5 a 10 cm de alto y un matraz conteniendo 1 l de agua. La transferencia se dejó transcurrir durante 18 h cambiando las toallas de papel húmedas cada 6 h.

E) **Tratamiento de la membrana.** Al término de la transferencia, la membrana se separó del gel, se colocó en una charola con 25 ml de NaOH 0.4 N durante 1 min, se desechó el líquido y se agregaron 25 ml de solución Tris-HCl 0.2 M/SSC 1X (pH 7.5) por 2 min. Posteriormente, se transfirió el gel a otra charola con 50 ml de solución SSC 2X durante 10 min. Los pasos anteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación a 30 rpm en un agitador horizontal. Finalmente, el DNA se fijó por exposición de la membrana a  $150 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  de luz U.V. durante 2 min en un entrecruzador CL-1000 (marca UVP).

F) **Hibridación y revelado.** El procedimiento de hibridación, los tratamientos post-hibridación y el revelado fotográfico se llevaron a cabo de la misma forma que para la hibridación en colonia pero a una temperatura de 60°C en lugar de 63°C.

## 7.12.- CONJUGACIÓN BACTERIANA

A) **Conjugación en líquido.** Las cepas donadoras (*chrA*<sup>+</sup>, Rif<sup>S</sup>, Cr<sup>R</sup>) y las receptoras *E. coli* J53-2 o *P. aeruginosa* PU21 (ambas *chrA*<sup>-</sup>, Rif<sup>R</sup>, Cr<sup>S</sup>) se crecieron en caldo LB por 6 h a 37°C con agitación, posteriormente se mezclaron 200 µl del cultivo de la donadora con 800 µl de cultivo de la receptora en tubos con 2 ml de medio fresco y se incubaron por 18 h a 37°C sin agitación. Se distribuyeron 100 µl de la mezcla de conjugación sobre el medio de selección: agar LB con rifampicina 350 µg/ml y K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 2 mM para las conjugaciones con J53-2 o rifampicina 350 µg/ml y K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 4 mM para PU21. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Las colonias resultantes se inocularon por estriado sobre agar LB a concentraciones inhibitorias de cromato para J53-2 (1.0 y 1.5 mM) o PU21 (4 y 5 mM) y en cajas con rifampicina 350 µg/ml. La transferencia se confirmó por extracción de DNA plasmídico de cultivos de las transconjugantes y corrimiento electroforético de los productos.

B) **Conjugación en filtro.** Las cepas donadoras y receptoras se crecieron y procesaron de la misma forma que en el inciso anterior. Se inocularon 200 µl de la mezcla de conjugación sobre filtros Millipore de 0.45 mm de diámetro de poro colocados en cajas de agar LB y se incubaron a 37°C por 24 h. Los filtros se retiraron de la caja con pinzas estériles y se transfirieron a tubos con 2 ml de caldo LB, se agitaron vigorosamente en un vórtex y se distribuyeron 200 µl de la suspensión sobre los medios de selección antes descritos. Los pasos restantes coinciden con el apartado anterior.

### 7.13.- TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

- A) **Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.** Se inocularon 250 ml de caldo LB con 4 ml de cultivo de *E. coli* W3110 crecido a 37°C con agitación durante la noche. Las células se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente el cultivo se mantuvo en hielo por 20 min. Las células se cosecharon centrifugando a 6 000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 15 ml de agua destilada estéril y fría centrifugando a 8 000 rpm durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 500 µl de glicerol estéril al 10% y se almacenaron a -70°C hasta su uso.
- B) **Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa*.** Se resuspendieron en 500 µl de agua destilada estéril y fría dos asadas (~3 mg) de células de un cultivo fresco de *P. aeruginosa* PAO1, previamente crecido en agar LB a 37°C durante la noche. Las células se lavaron dos veces con 500 µl de agua destilada estéril y fría, centrifugando 2 min a 8 000 rpm en cada lavado. Las células se resuspendieron en 250 µl de agua HPLC y se utilizaron inmediatamente para la electroporación.
- C) **Transformación.** Se llevó a cabo en un electroporador 2510 (Eppendorf). En un tubo de microcentrífuga se mezclaron 100 µl de células competentes con ~100 ng de DNA plasmídico. La mezcla se colocó entre los electrodos de una celda de electroporación fría y se ajustó el micropulso a 2500 V. La celda se colocó en la cámara deslizable del electroporador y se dio un pulso de 4 a 5 milisegundos. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un

tubo con 2 ml de caldo LB y se incubó a 37°C por 3 h con agitación. Se distribuyeron 200 µl del cultivo en cajas de agar LB adicionado con cromato 3 mM para PAO1 o 1 mM para W3110 y en cajas de agar con 200 µM de HgCl<sub>2</sub>. Las cajas se incubaron 48 h a 37°C y la transformación se confirmó por extracción y corrimiento electroforético del DNA plasmídico extraído de las transformantes por el método de Kieser y col. (1984) antes mencionado.

#### 7.14.- DETERMINACIÓN DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD

Para la determinación de los grupos de incompatibilidad de plásmidos se utilizó la metodología descrita por Carattoli y col. (2005). Para esto, se prepararon reacciones de PCR con DNA extraído de las transconjugantes y oligonucleótidos específicos (proporcionados por el D.C. Jesús Silva Sánchez) para secuencias de 18 grupos de incompatibilidad. Las amplificaciones se llevaron a cabo por 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C-1min (desnaturalización), 60°C-30 s (alineamiento), 72°C-1 min (extensión) y un ciclo de extensión final de 72°C-5min.

#### 7.15.- RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE PLÁSMIDOS

El DNA plasmídico se extrajo por el método de Kieser y col. (1984) antes descrito. Se mezclaron en un tubo de microcentrífuga 10 µl (~500 ng) de DNA, 0.5 µl de la enzima *EcoRI* (Promega), 2.5 µl de buffer H (Promega), 0.25 µl de albúmina de suero bovina y agua HPLC cbp. 25 µl. Las mezclas se incubaron por 18 h a 37 °C y los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE CROMATO

Con el objetivo de evaluar la distribución de los fenotipos de susceptibilidad a cromato en las cepas clínicas en estudio, se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de este oxianión mediante la técnica de dilución en placa de agar. Las cepas clínicas se trataron de clasificar como sensibles o resistentes en base a la distribución de los valores de MIC obtenidos para cada especie bacteriana.

Para los ensayos realizados con las cepas de enterobacterias (Tabla 1), se utilizaron como controles *E. coli* W3110, que tuvo un valor de MIC de 0.2 mM de cromato, y W3110 (pUChrAShe), que contiene el homólogo *chrA* de *Shewanella* sp. ANA-3 clonado en el vector pUCP20 y que presentó un valor de MIC de 0.6 mM. Las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* mostraron curvas de distribución con dos picos (Figuras 9A y 10), mientras que las cepas de *E. cloacae* formaron un solo grupo (Figura 9B).

La mayor parte de las cepas de *E. coli* (54 cepas en total) presentaron valores de MIC de 0.2 a 0.8 mM de cromato (Figura 9A), las cuales se consideraron sensibles y representaron el 96% de las cepas de esta especie. Sólo un par de cepas (4%) tuvieron valores de MIC de 1.5 mM y se consideraron resistentes (Figura 9A y Tabla 4).

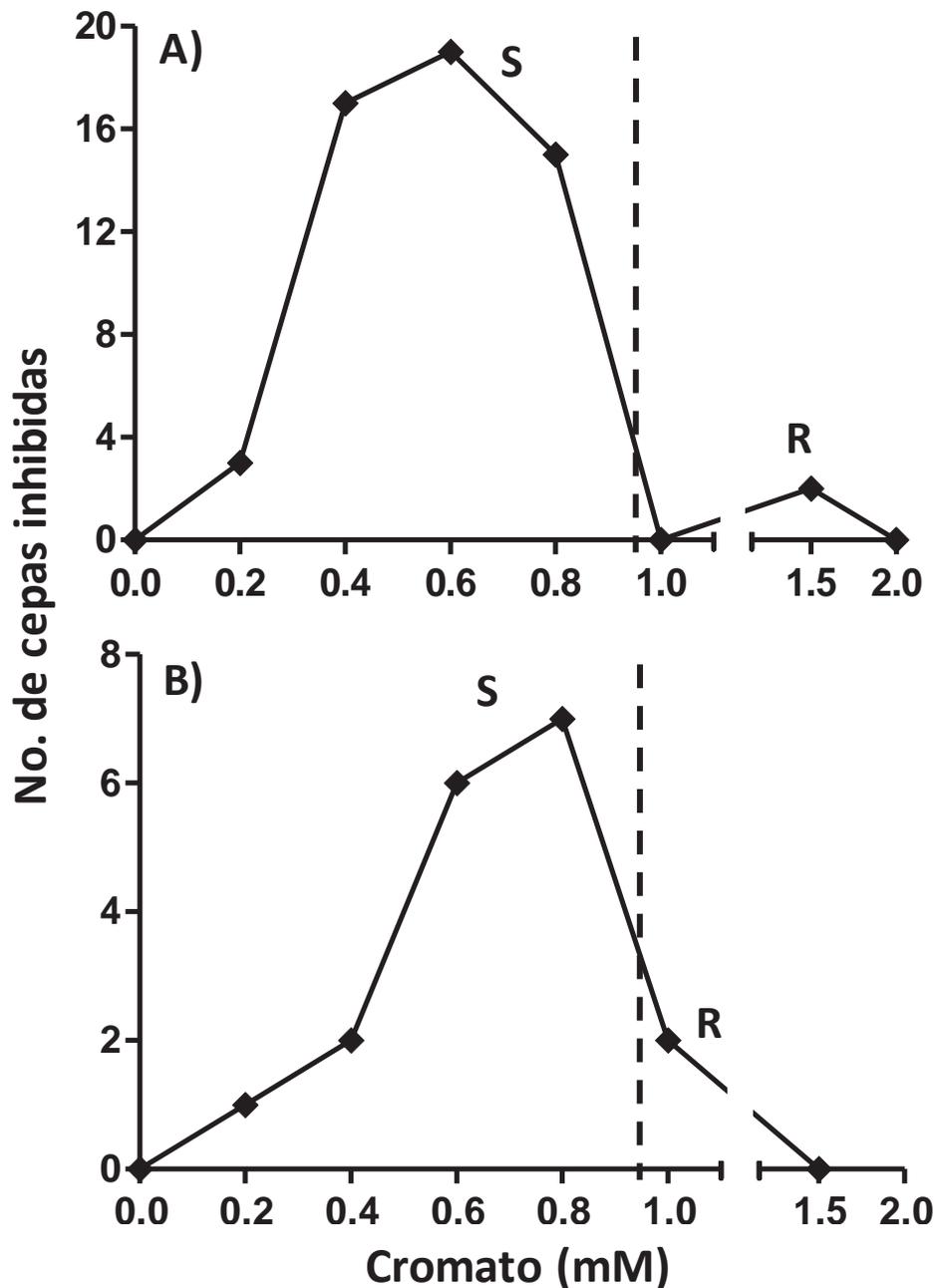


Figura 9.- Distribución de la susceptibilidad a cromato de cepas de *E. coli* y *E. cloacae*. A) Cepas de *E. coli*. B) Cepas de *E. cloacae*. Las bacterias se crecieron por 24 h a 37°C en agar con las concentraciones indicadas de cromato. El valor de MIC se determinó por inhibición en el crecimiento. Líneas punteadas, valores de corte: S, cepas sensibles; R, resistentes. Cada valor representa la moda obtenida en tres experimentos independientes.

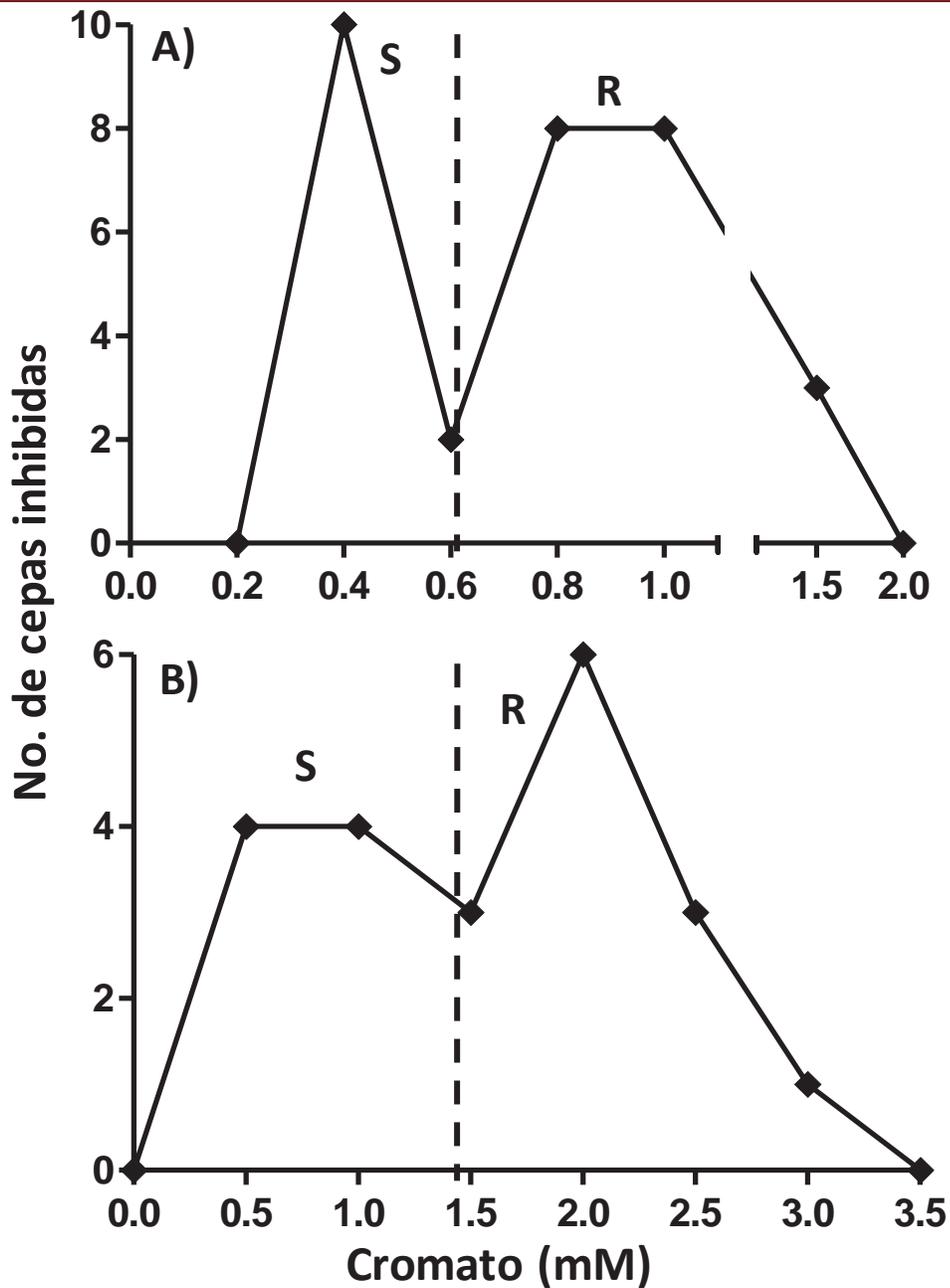


Figura 10.- Distribución de la susceptibilidad a cromato de cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. **A)** Cepas de *K. pneumoniae*. **B)** Cepas de *P. aeruginosa*. Las bacterias se crecieron por 24 h a 37°C en agar con las concentraciones indicadas de cromato. El valor de MIC se determinó por inhibición en el crecimiento. Líneas punteadas, valores de corte: S, cepas sensibles; R, resistentes. Cada valor representa la moda de tres experimentos independientes.

**Tabla 4.- Resistencia a cromato de la colección de cepas clínicas.**

		Número de cepas		
Especie		Total	Cr <sup>R a</sup>	%
<b>E n t é r i c a s</b>	<i>Escherichia coli</i>	56	2	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	19	61
	<i>Enterobacter cloacae</i>	18	2	11
	<i>Salmonella sp.</i>	7	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	13	62
	<b>Total</b>	<b>133</b>	<b>36</b>	<b>27</b>

<sup>a</sup>, Cr<sup>R</sup>= Resistentes a cromato. Los datos corresponden a los presentados en las Figuras 9 y 10.

Las cepas de *E. cloacae* formaron una campana con valores de MIC de 0.2 a 1 mM de cromato (Figura 9B), sin embargo, se decidió considerar como cepas resistentes a aquellas que sólo se inhibieron a 1 mM del oxianión (2 cepas, 11%) (Tabla 4), ya que este valor de MIC corresponde a cepas consideradas resistentes en las otras especies de enterobacterias analizadas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) (Figuras 9A y 10A).

La gráfica obtenida con las cepas de *K. pneumoniae* también mostró dos picos (Figura 10A), aunque con una distribución diferente a la observada con las cepas de *E. coli* (Figura 9A), ya que sólo 12 cepas, consideradas sensibles, se inhibieron a concentraciones de 0.4 a 0.6 mM de cromato, mientras que la gran mayoría (19 cepas, 61%) presentó valores de MIC de 0.8 a 1.5 mM y se consideraron resistentes (Figura 10A y Tabla 4). Por otro lado, las siete cepas de *Salmonella sp.* mostraron el mismo valor de MIC (0.4 mM de cromato) y se consideraron sensibles (curva no mostrada; Tabla 4).

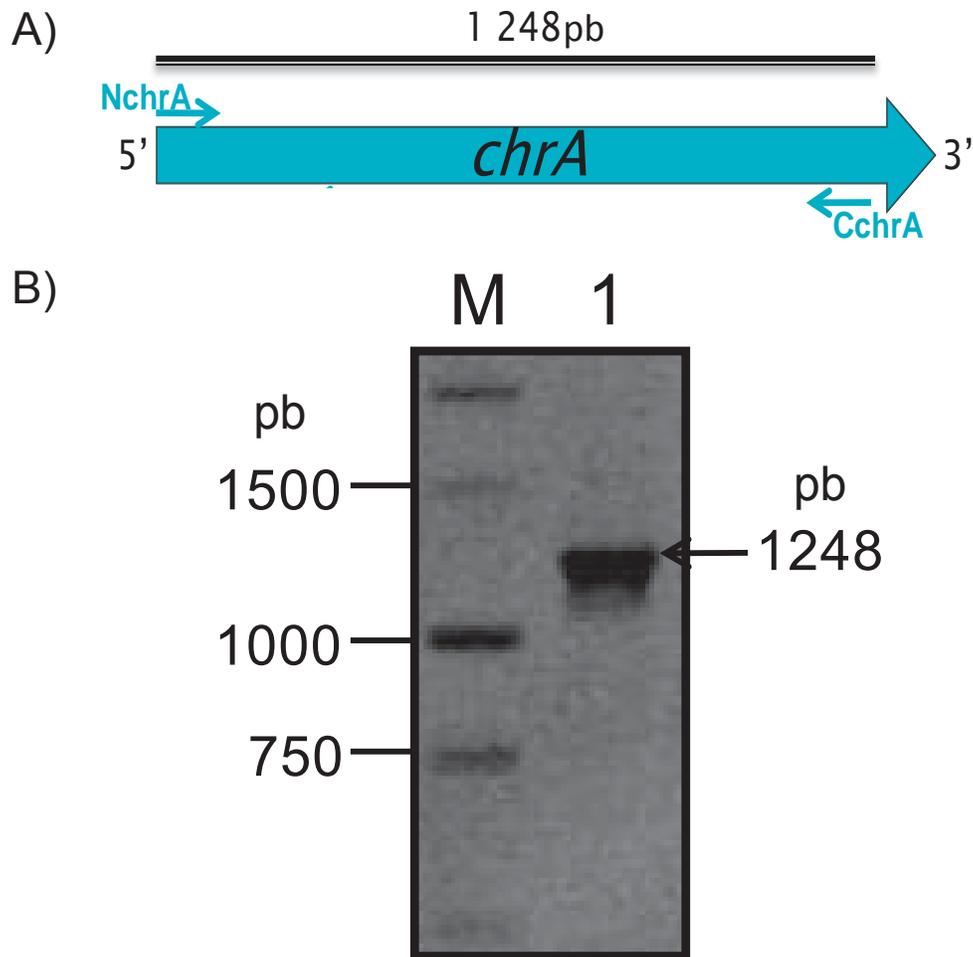
Para las determinaciones de la MIC de las 21 cepas de *P. aeruginosa* (Tabla 1), se utilizaron como controles *P. aeruginosa* PU21, cepa sensible que se inhibió a 0.5 mM del oxianión, y PU21 (pUM505), cepa resistente que tuvo un valor de MIC de 2 mM. Al igual que con las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, en la curva de distribución se obtuvieron dos picos (Figura 10B): cepas con valores de MIC de 0.5 a 1.0 mM de cromato, consideradas sensibles y que representaron el 38% (8 cepas); y el grupo de resistentes, con valores de inhibición de 1.5 a 3 mM (13 cepas, 62%) (Figura 10B y Tabla 4).

Se concluyó que las cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* presentan una alta frecuencia de cepas resistentes a cromato (61 y 62%, respectivamente), mientras que este fenotipo es menos común en las especies *E. coli*, *E. cloacae* y *Salmonella sp.* ( $\leq 11\%$ ).

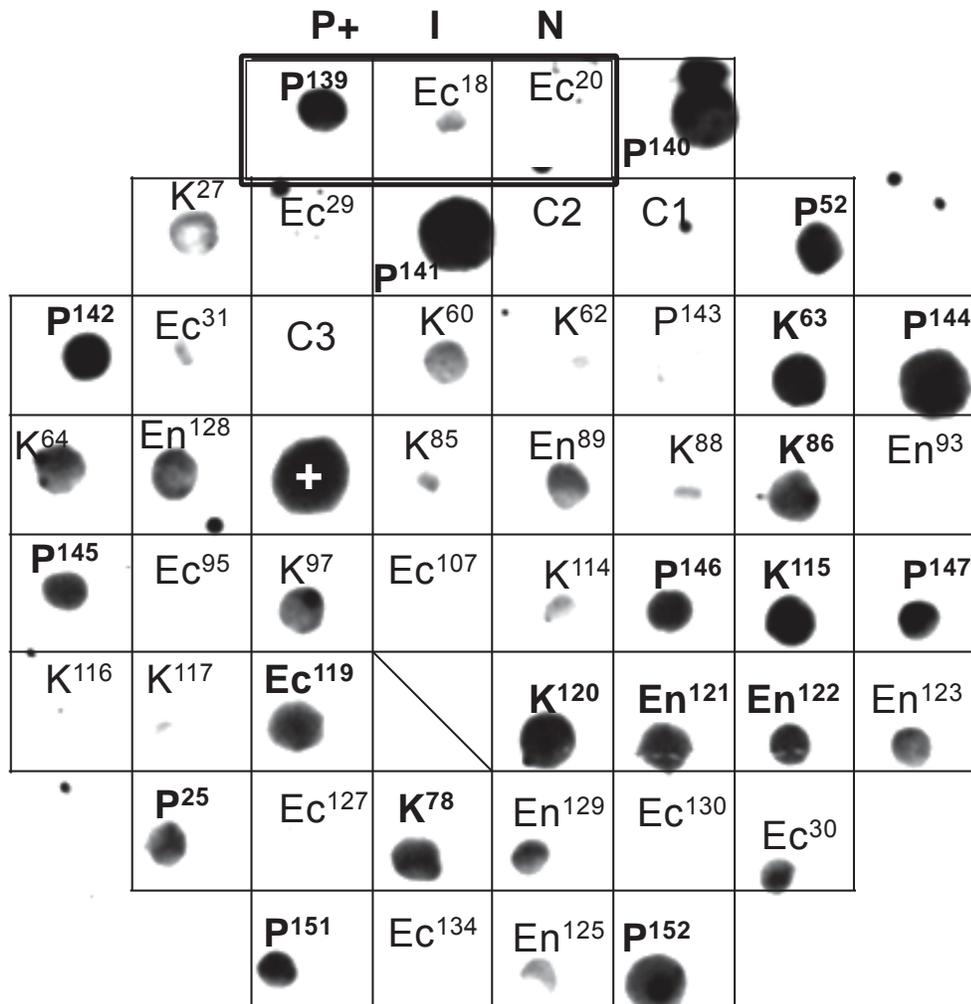
## 8.2.- DETECCIÓN DEL GEN *chrA* POR HIBRIDACIÓN EN COLONIA

Con el propósito de evaluar la presencia de secuencias relacionadas con el gen *chrA* en las cepas clínicas, se llevó a cabo la detección de este gen por hibridación en colonia, utilizando como sonda la región codificante del gen *chrA* del plásmido pUM505 (Figura 11A). El producto de amplificación por PCR de esta región mostró una banda única del tamaño esperado de 1 248 pb (Figura 11B), fragmento denominado *chrAc*. Este resultado indica que el fragmento de DNA utilizado como sonda en los ensayos de hibridación contiene una región específica del gen *chrA*. Se realizaron experimentos de hibridación en colonia con la sonda *chrAc* para las 133 cepas clínicas independientemente de su fenotipo de susceptibilidad a cromato. Para esto, las membranas con el DNA de las bacterias fijado se hibridaron con la sonda marcada bajo condiciones de alta astringencia, como previamente se describió.

En las hibridaciones el control positivo (+), cepa *P. aeruginosa* PU21 (pUM505), mostró una señal intensa en la autorradiografía, mientras que los controles negativos C1, C2 y C3, cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , W3110 y W3110 (pUChrAShe), respectivamente, no mostraron señal (Figura 12). Esto indica que la hibridación de la sonda *chrAc* fue específica con el gen *chrA* de pUM505.



**Figura 11.- Fragmento de DNA utilizado como sonda para la detección de genes *chrA*.** **A)** Región codificante del gen *chrA* (fragmento *chrAc*). Las flechas pequeñas indican las posiciones aproximadas de los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR el fragmento *chrAc*. Se indica el tamaño esperado en pares de bases (pb) del producto amplificado. **B)** Amplificación por PCR del fragmento *chrAc*. Se utilizó DNA del plásmido pUM505 y oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Se muestra la fotografía del gel de agarosa al 1% con el producto de amplificación. M, marcador de tamaño molecular con los tamaños (pb) de las bandas indicados con líneas a la izquierda; carril 1, producto *chrAc*. La flecha señala la localización y el tamaño (pb) del fragmento amplificado.



**Figura 12.- Detección del gen *chrA* en las cepas clínicas por hibridación en colonia.** Se muestran los resultados de hibridación en colonia para 47 de las 133 cepas clínicas. Se utilizó la sonda *chrAc* y la hibridación se llevó a cabo a 63°C. La cuadrícula indica la posición de los inóculos bacterianos en la membrana. Recuadro superior: P+, cepa positiva; I, intermedia; N, negativa. Se señalan con negritas las cepas consideradas positivas a hibridación. +, *P. aeruginosa* PU21(pUM505); C1 y C2, *E. coli* W3110 y DH5α, respectivamente; C3, *E. coli* W3110(pUChrAShe). Abreviaturas: Ec, *E. coli*; En, *E. cloacae*; K, *K. pneumoniae*; P, *P. aeruginosa*.

En lo que respecta a las cepas clínicas, se obtuvieron tres tipos de resultados: señales con una intensidad similar al control positivo, como la obtenida para la cepa de *P. aeruginosa* 139 (P<sup>139</sup>) (P+ en recuadro de Figura 12), consideradas positivas y que indican la presencia de secuencias de DNA con alta identidad con el gen *chrA*; cepas sin señal de hibridación, como el resultado de la cepa *E. coli* 20 (Es<sup>20</sup>) (N en recuadro de Figura 12), las cuales se consideraron negativas e indican ausencia de secuencias con identidad con el gen *chrA*; y señales intermedias con un nivel de intensidad menor que el control positivo, por ejemplo la señal obtenida para la cepa de *E. coli* 18 (Es<sup>18</sup>) (I en recuadro de Figura 12), éstas se consideraron dudosas ya que muchas de las cepas con este tipo de resultados no presentaron señal de hibridación en un segundo ensayo (datos no mostrados). En el resto del trabajo se analizaron sólo aquellas cepas con resultados francos de hibridación (P+), mientras que las cepas negativas (N) y dudosas (I) no fueron posteriormente analizadas.

Por cuestiones de espacio, en la Figura 12 se muestran sólo los resultados de hibridación en colonia de 47 de las 133 cepas clínicas analizadas en el presente trabajo.

Con estos resultados, se concluyó que secuencias de DNA con identidad con el gen *chrA* se encuentran presentes en las cepas de enterobacterias y *P. aeruginosa* de origen clínico de este estudio.

### 8.3.- SELECCIÓN DEL GRUPO FINAL DE ESTUDIO

Para seleccionar un grupo de cepas para posteriores análisis, se tomó en cuenta el siguiente criterio: incluir sólo aquellas bacterias con resultados claramente positivos y reproducibles en los ensayos de hibridación, independientemente de su valor de MIC de cromato.

Por otro lado, para minimizar la inclusión de posibles clonas (cepas genéticamente relacionadas) de enterobacterias, se evaluaron los datos de procedencia, fecha de aislamiento y valores de MIC de cromato, así como los patrones de electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) y de resistencia a antibióticos de cada cepa positiva a hibridación (datos proporcionados por el D.C. Jesús Silva Sánchez; INSP, Cuernavaca, Mor.). Se incluyeron sólo aquellas cepas que mostraron diferencias en dos o más de estas características. Las cepas de *P. aeruginosa* se diferenciaron a nivel de clonas por ensayos de PCR-RAPD (Apéndice 1), dado que para éstas no se contaba con los patrones de EGCP y de resistencia a antibióticos para comparar.

De esta forma, el grupo final de estudio, que se denominó *chrA*<sup>+</sup> y se seleccionó en base a los criterios antes mencionados, quedó conformado por 21 cepas: una *E. coli*, dos *E. cloacae*, seis *K. pneumoniae* y 12 *P. aeruginosa* (Tabla 5). Se observó que 18 (86%) de estas 21 cepas positivas a hibridación presentaron además fenotipos de resistencia a cromato, mientras que sólo tres cepas de *P. aeruginosa* mostraron sensibilidad al oxianión (Tabla 5).

Tabla 5.- Grupo final de estudio, cepas *chrA*<sup>+</sup>.

Espece	No. <sup>a</sup>	Procedencia/ Año aislamiento	MIC Cromato (mM) (Fenotipo) <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	83	Monterrey/2008	1.0 (R)
<i>Enterobacter cloacae</i>	94	Monterrey/2007	1.0 (R)
	122	Acapulco/2007	1.0 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	Guadalajara/2009	1.0 (R)
	70	Hermosillo/2009	0.8 (R)
	78	Monterrey/2008	1.0 (R)
	86	Monterrey/2006	1.5 (R)
	99	Monterrey/2007	0.8 (R)
	120	Acapulco/2008	1.5 (R)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	Cuernavaca/ 2004	2.0 (R)
	22	Cuernavaca/ 2004	2.0 (R)
	23	Cuernavaca/ 2004	2.0 (R)
	26	Distrito Federal/2005	1.5 (R)
	37	Distrito Federal/ 2004	1.0 (S)
	50	Distrito Federal/2007	2.0 (R)
	51	Distrito Federal/ 2006	0.5 (S)
	52	Distrito Federal/2006	2.0 (R)
	53	Distrito Federal/2006	1.0 (S)
	139	Monterrey/2008	3.0 (R)
	145	Morelia/2006	3.0 (R)
	152	Guadalajara/2003	3.0 (R)

<sup>a</sup>, Número asignado en la colección de cepas clínicas de este estudio.

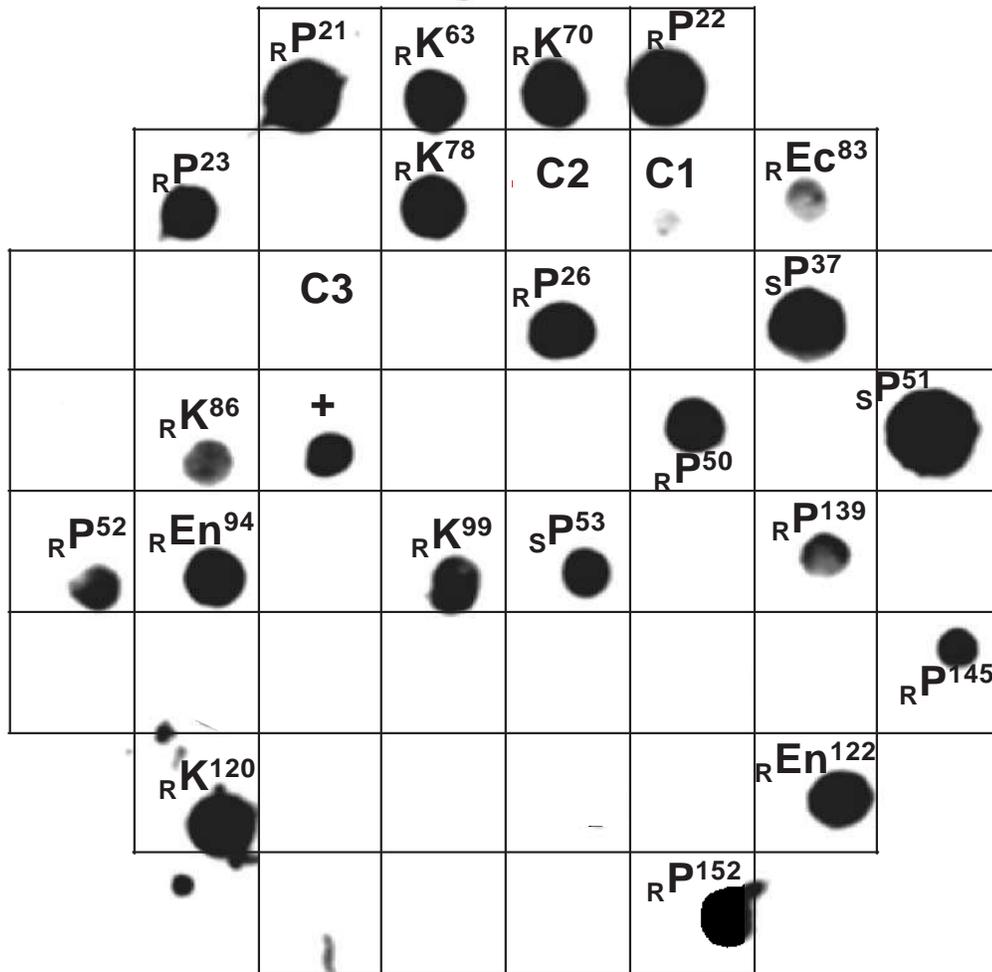
<sup>b</sup>, R, resistente; S, sensible.

Posteriormente, para corroborar la presencia de secuencias *chrA* en las cepas seleccionadas, se llevaron a cabo ensayos de hibridación en colonia con la sonda *chrAc* sólo para estas bacterias (Tabla 5). Los resultados mostraron que las 21 cepas *chrA*<sup>+</sup> presentaron claras señales de hibridación con un nivel de intensidad similar al control positivo, excepto *E. coli* 83 que mostró una señal tenue, mientras que ninguno de los controles negativos mostró señal (Figura 13). Lo anterior confirmó la presencia de secuencias con alta identidad con la región codificante del gen *chrA* en este grupo de cepas.

Con estos resultados se concluyó que existe una clara relación entre la presencia de secuencias con identidad con el gen *chrA* y la resistencia a cromato en las cepas del grupo final de estudio.

#### 8.4.- CONTENIDO DE PLÁSMIDOS DE LAS CEPAS *chrA*<sup>+</sup>

Dado que diversos genes *chrA* están codificados en replicones conjugativos, se decidió evaluar el contenido de plásmidos de las cepas *chrA*<sup>+</sup>. Para esto se llevaron a cabo extracciones de DNA plasmídico por dos métodos de extracción diferentes (Casse y col., 1979; Kieser y col., 1984) y los productos obtenidos se separaron en geles de agarosa. Aunque no necesariamente todas las bandas observadas en los geles representan moléculas de plásmidos, en adelante cada banda se considera como un plásmido. Los tamaños indicados representan valores aproximados en kb por comparación con marcadores de DNA circular.



**Figura 13.- Detección del gen *chrA* en las cepas *chrA*<sup>+</sup>.** La hibridación se realizó bajo las mismas condiciones y con los mismos controles que en la Figura 12. Se incluyeron sólo las 21 cepas consideradas *chrA*<sup>+</sup>. Los espacios en blanco en la cuadrícula indican posiciones en la membrana sin inóculos bacterianos. Abreviaturas: Ec, *E. coli*, En, *E. cloacae*; K, *K. pneumoniae*; P, *P. aeruginosa*; R, resistente; S, sensible. Números de cepas como en Tabla 5.

Los productos de extracción de DNA revelaron que cinco de las 12 cepas (58%) de *P. aeruginosa chrA<sup>+</sup>* presentaron plásmidos de tamaños entre 30 y 45 kb (Figura 14A), dos cepas (17%) mostraron bandas de mayor tamaño (100 kb) (Figura 14B) y cinco aislados no presentaron plásmidos con ninguna de las dos técnicas de extracción utilizadas (Figura 14B).

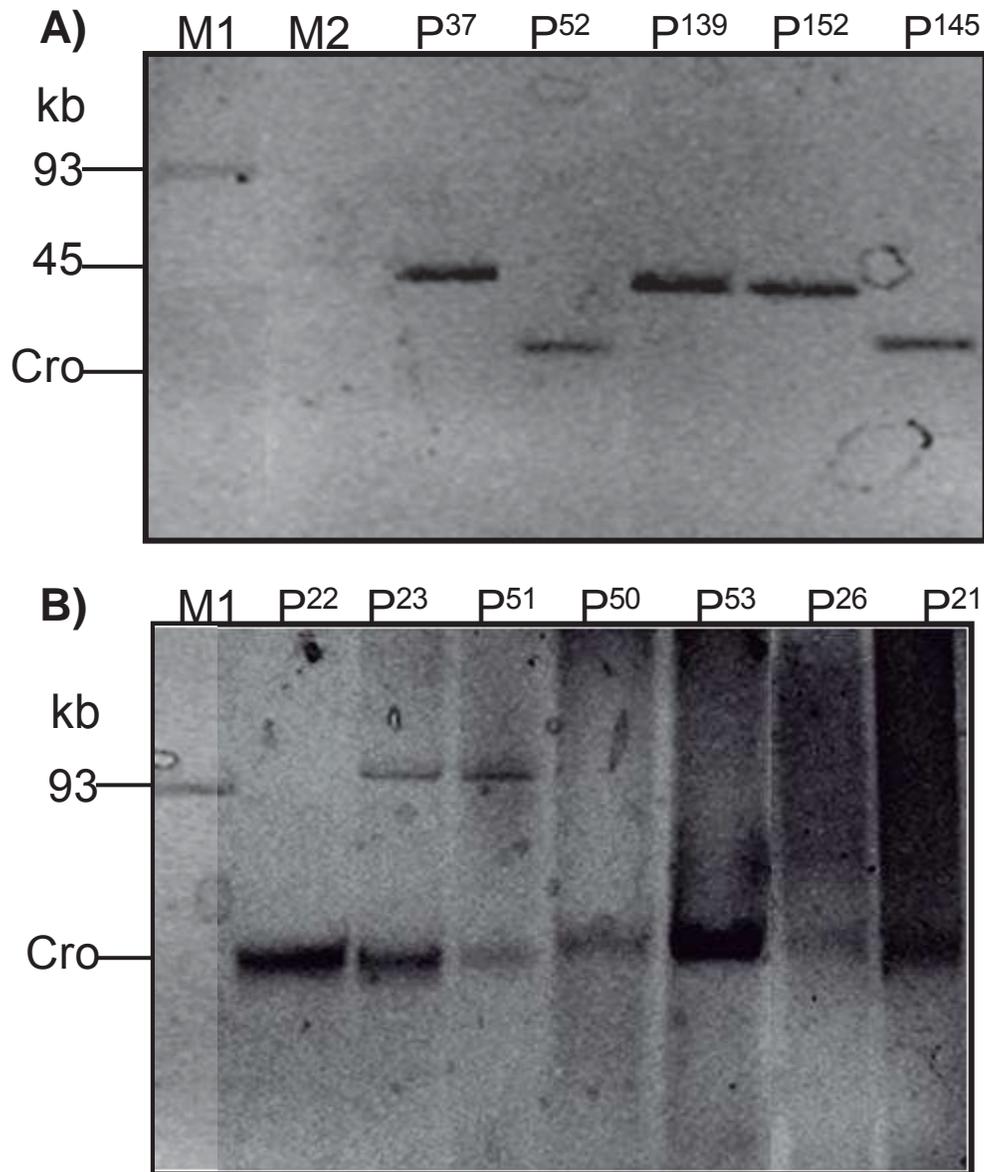
Por otro lado, ocho de las nueve cepas (89%) de enterobacterias *chrA<sup>+</sup>* presentaron un contenido variado de bandas de plásmidos de tamaños desde ~7 hasta 100 kb (Figura 15). *E. coli* 83 no mostró bandas en los corrimientos en tres extracciones independientes (Figura 15). En la Tabla 6 se presenta el contenido y el tamaño de los plásmidos presentes en las cepas *chrA<sup>+</sup>* de enterobacterias y *P. aeruginosa*.

Por lo tanto, 15 de las 21 cepas *chrA<sup>+</sup>* (72%) presentaron plásmidos: siete *P. aeruginosa* y ocho enterobacterias (Tabla 6). Con esto se concluyó que existen plásmidos de distintos tamaños en las cepas *chrA<sup>+</sup>* de enterobacterias y *P. aeruginosa*, algunos de los cuales probablemente contienen secuencias *chrA*.

## 8.5.- CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE CEPAS DE *P. aeruginosa chrA<sup>+</sup>*

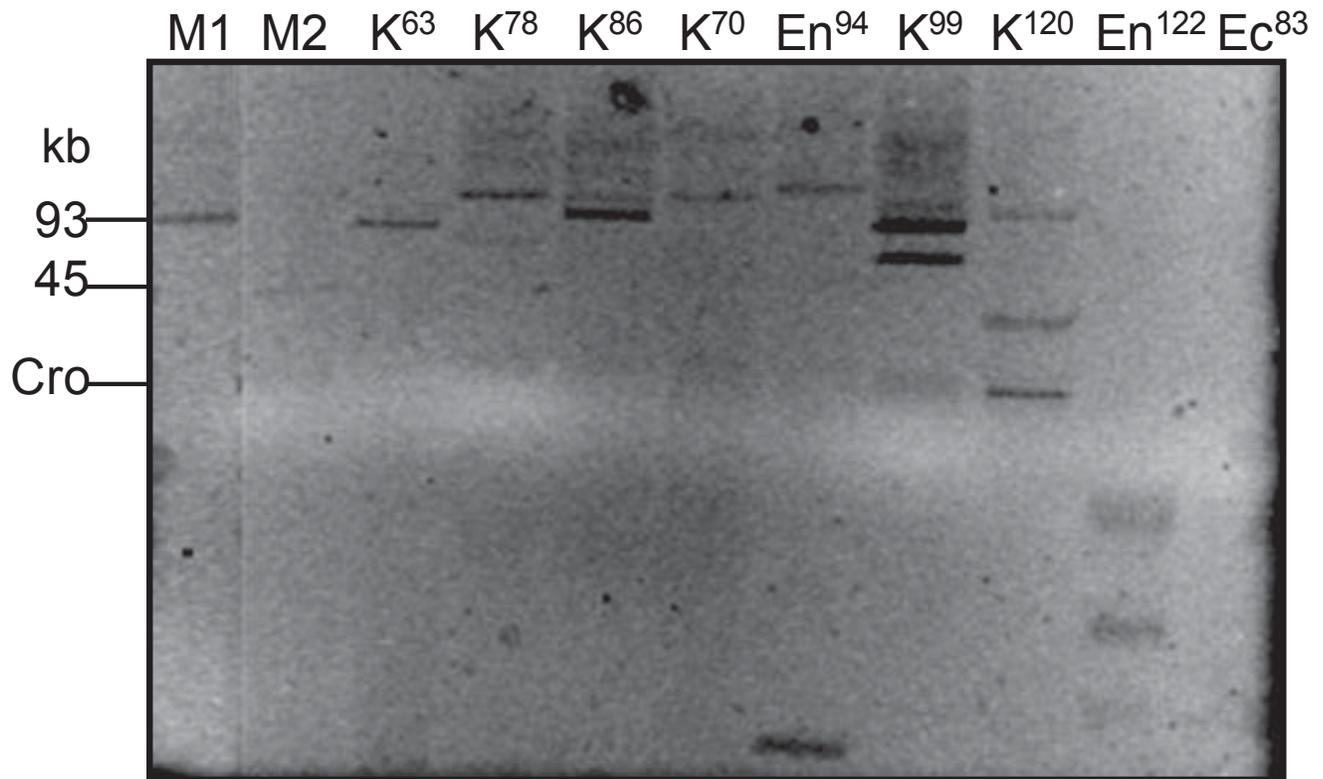
### 8.5.1.- IDENTIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS CON SECUENCIAS *chrA*

Para identificar si los genes *chrA* estaban contenidos en los plásmidos identificados en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, se llevaron a cabo ensayos de hibridación tipo Southern para las siete cepas *chrA<sup>+</sup>* que presentaron plásmidos en los corrimientos realizados (Figura 14 y Tabla 6).



**Figura 14.- Contenido de plásmidos de cepas de *P. aeruginosa* *chrA*<sup>+</sup>.**

Las bacterias se crecieron en medio líquido 18 h a 37°C y se llevó a cabo la extracción de DNA por el método de **A)** Kieser y col. (1984) o **B)** Casse y col. (1979). Se muestran las fotografías de los geles de agarosa al 0.7% con el DNA extraído de las cepas. M1 y M2, plásmidos marcadores R1 (93 kb) y 2F10 (45 kb), respectivamente. Los números de las cepas en cada carril corresponden a los asignados en la Tabla 5. Se indican con líneas las posiciones de los marcadores y la región del DNA cromosómico (Cro).



**Figura 15.- Contenido de plásmidos de cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup>.**

Las bacterias se crecieron en medio líquido 18 h a 37°C y se llevó a cabo la extracción de DNA por el método de Kieser y col. (1984). Se muestra la fotografía del gel de agarosa al 0.7% con el DNA extraído de las cepas. M1 y M2, plásmidos marcadores R1 (93 kb) y 2F10 (45 kb), respectivamente. Los números de las cepas en cada carril corresponden a los asignados en la Tabla 5. Se indican con líneas las posiciones de los marcadores y la región del DNA cromosómico (Cro).  
Abreviaturas: K, *K. pneumoniae*; En, *E. cloacae*; Ec, *E. coli*.

Tabla 6.- Contenido de plásmidos de las cepas *chrA*<sup>+</sup>.

Espece	No. <sup>a</sup>	Fenotipo <sup>b</sup> (Cromato)	Plásmido (s) (kb) <sup>c</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	R	100
	37	S	45
	51	S	100
	52	R	30
	139	R	40
	145	R	30
	152	R	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	R	80
	70	R	95
	78	R	70, 100
	86	R	85, 95
	99	R	65, 85, 95
	120	R	5, 25, 40, 90
<i>Enterobacter cloacae</i>	94	R	7, 100
	122	R	10, 15

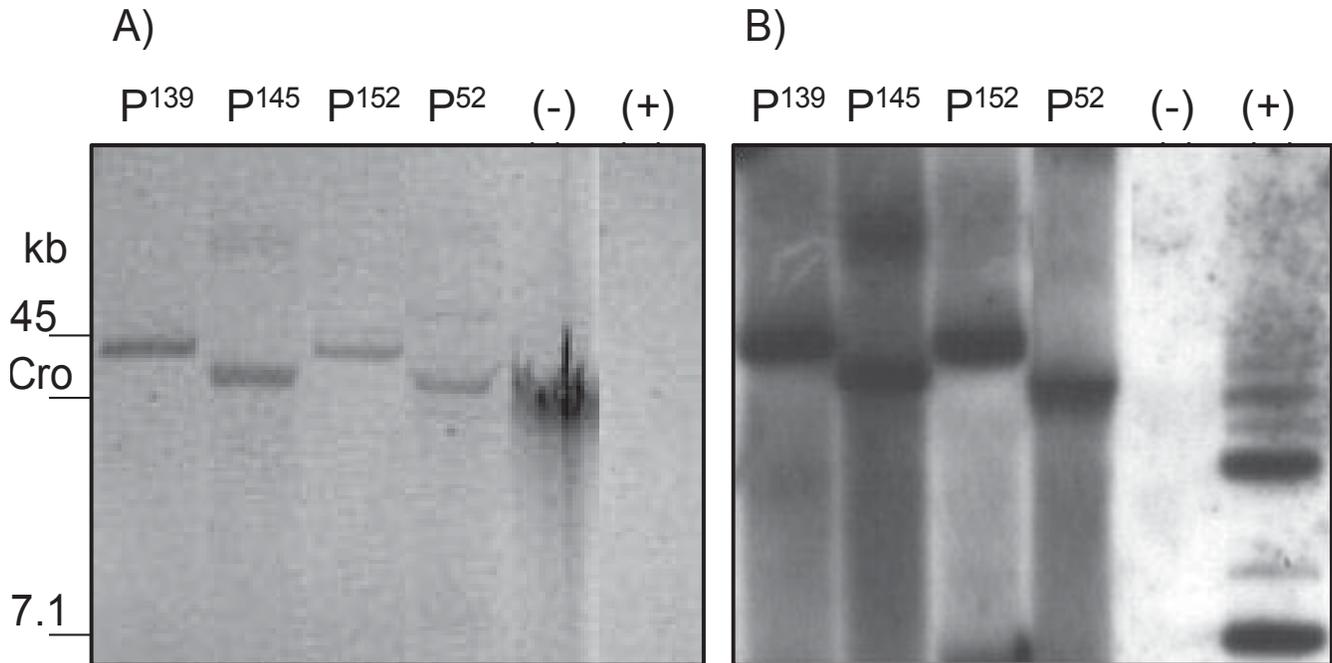
<sup>a</sup>, Números de cepas como en Tabla 5. <sup>b</sup>, R, resistente; S, sensible. <sup>c</sup>, Tamaño calculado (kb) por comparación con plásmidos marcadores (Figuras 14 y 15).

Los productos de extracción de DNA se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon. La hibridación se llevó a cabo a 60°C con la sonda *chrAc* (Figura 11) igual que en los ensayos de hibridación en colonia.

En la Figura 16A se presenta la fotografía del corrimiento electroforético de las muestras de DNA de las cepas y los controles, así como la autorradiografía de la membrana correspondiente (Figura 16B). El control positivo pEPL1, que contiene el gen *chrA* de pUM505 clonado en el vector pUCP20, arrojó una serie de claras señales en la autorradiografía correspondientes a las diferentes isoformas del plásmido, mientras que el control negativo (DNA cromosómico de *E. coli* DH5α) no mostró señal, aún cuando se cargó en exceso; esto indica que la hibridación de la sonda *chrAc* fue específica con el gen *chrA* en las condiciones utilizadas (Figura 16B). Por otro lado, las cepas *P. aeruginosa* 139 y 152 presentaron claras señales de hibridación en bandas de 40 kb, mientras que las cepas 52 y 145 mostraron señales en bandas de 30 kb (Figura 16), esto indica la presencia de secuencias con alta identidad con el gen *chrA* en estos plásmidos.

Se muestran sólo los resultados de las bacterias que mostraron señal de hibridación en plásmidos (Figura 16). El resto de las cepas que presentaron bandas en los corrimientos de DNA realizados (*P. aeruginosa* 23, 37 y 51) (Tabla 6), mostraron leves señales de hibridación en la región del cromosoma pero no en plásmidos (Apéndice 2). Estas cepas no fueron analizadas en el resto del trabajo.

De esta forma, se concluyó que secuencias con identidad con el gen *chrA* se encuentran presentes en plásmidos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* de este estudio.



**FIGURA 16.- Hibridación Southern de cepas de *P. aeruginosa* *chrA*<sup>+</sup>.**

**A)** Separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% de los productos de extracción de DNA por el método de Kieser y col. (1984). Los números de las cepas en cada carril corresponden a los asignados en la Tabla 6. (-), *E. coli* DH5 $\alpha$ ; (+), pEPL1. Se indican con líneas a la izquierda las posiciones del marcador 2F10 (45 kb), del plásmido pEPL1 (7.1 kb) y la región del cromosoma (Cro).

**B)** Autorradiografía de la hibridación a 60°C de la membrana correspondiente al gel del panel A) con la sonda *chrAc* marcada.

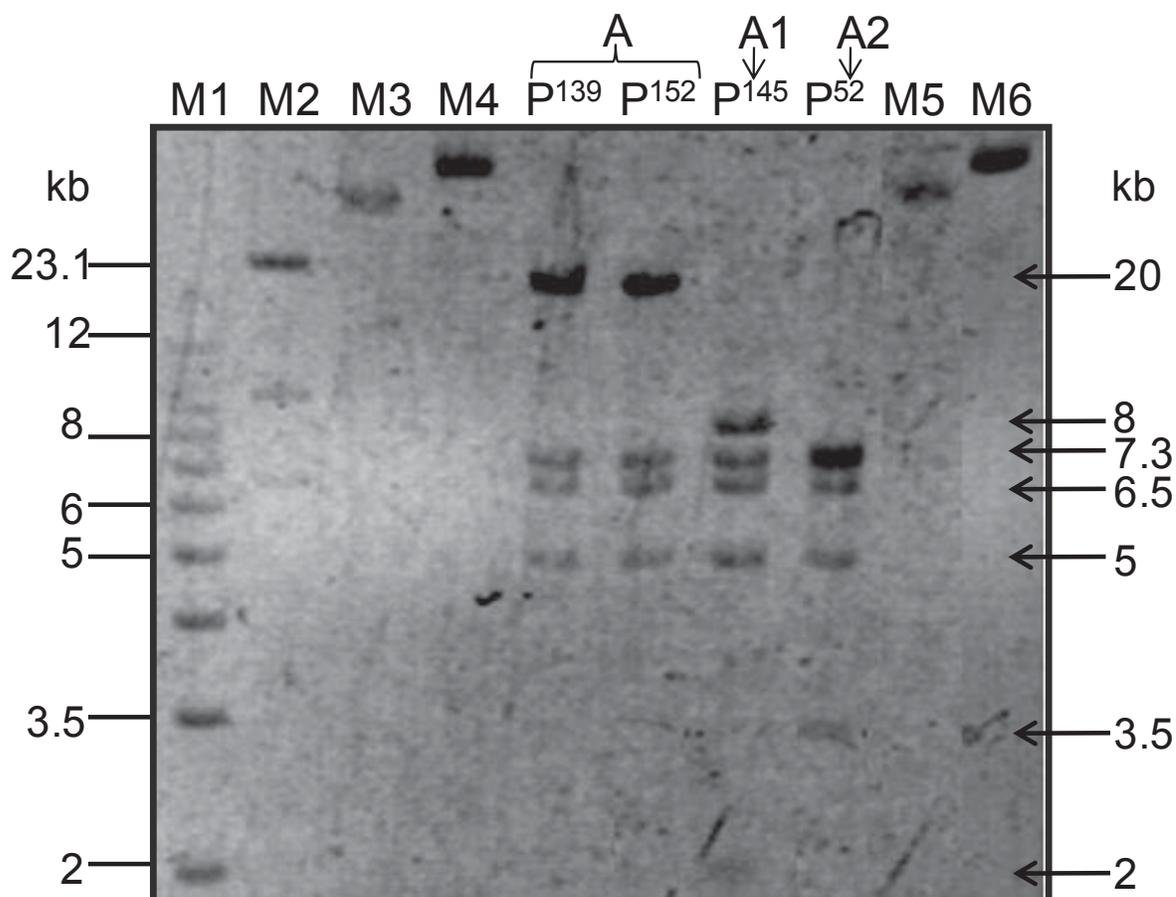
### 8.5.2.- OBTENCIÓN DE PATRONES DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

Con el objetivo de determinar si los plásmidos con secuencias *chrA* de *P. aeruginosa* están relacionados entre sí, dada su similitud en tamaño (Figura 16A), se realizaron ensayos de restricción enzimática. Para ello, el DNA plasmídico de las cepas se digirió con la enzima *EcoRI* y los productos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa.

Los plásmidos de las cepas 139 y 152 presentaron bandas comunes de 20, 7.3, 6.5 y 5 kb (Figura 17), patrón de restricción denominado A (Tabla 7), indicando que ambas moléculas probablemente representan un mismo plásmido. Los plásmidos de las cepas 145 y 52 también presentaron bandas de restricción de 7.3, 6.5 y 5 kb, además de bandas adicionales específicas de cada plásmido (Figura 17); estos patrones se denominaron A1 y A2, respectivamente (Tabla 7). Lo anterior sugiere que los cuatro plásmidos están relacionados entre sí.

Por otro lado, la suma de los tamaños de las bandas obtenidas para los plásmidos de las cepas 139 y 152 fue de 38.8 kb, tamaño similar a los 40 kb predichos por comparación con marcadores de DNA circular (Figura 14); mientras que para los plásmidos de las cepas 145 y 52 la suma de los tamaños de las bandas de restricción fue de 28.8 y 22.2 kb, respectivamente. En adelante, los plásmidos de las cepas 139 y 152 se referirán como de 39 kb y los plásmidos de las cepas 145 y 52 como de 29 y 22 kb, respectivamente (Tabla 7).

Con estos resultados se concluyó que los plásmidos con secuencias *chrA* identificados en las cepas de *P. aeruginosa* poseen una estructura molecular similar entre sí.



**Figura 17.-** Restricción enzimática de plásmidos de cepas de *P. aeruginosa* *chrA*<sup>+</sup>. El DNA extraído por el método de Kieser y col. (1984) se digirió por 18 h a 37°C con la enzima *EcoRI*. M1 y M2, marcadores de tamaño molecular (kb) 1kb-ladder y  $\lambda$ -HindIII, respectivamente; M3, M4, M5 y M6, plásmidos sin digerir de cepas de *P. aeruginosa* 52, 139, 145 y 152, respectivamente; P<sup>139</sup>, P<sup>152</sup>, P<sup>145</sup> y P<sup>52</sup>, plásmidos digeridos; A, A1 y A2, patrones de restricción obtenidos. Se señalan con líneas los tamaños (kb) de las bandas de los marcadores y con flechas, la localización y el tamaño (kb) de las bandas obtenidas. Números de cepas como se indica en Tabla 7.

**Tabla 7.- Cepas de *P. aeruginosa* resistentes a cromato que contienen plásmidos con secuencias *chrA*.**

No. <sup>a</sup>	Procedencia	MIC cromato (mM)	Plásmido (kb) <sup>b</sup>	Restricción <sup>c</sup>
139	Monterrey	2.5	39	A
152	Guadalajara	3.0	39	A
145	Morelia	2.5	29	A1
52	Distrito Federal	2.0	22	A2

<sup>a</sup>, Número de cepas como en Figura 17. <sup>b</sup>, Plásmidos que presentaron señal de hibridación con el gen *chrA*, tamaño calculado (kb) por restricción enzimática (Figura 17). <sup>c</sup>, Patrones de restricción de plásmidos con la enzima *EcoRI* (Figura 17).

### 8.5.3.- TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN.

Para determinar si los plásmidos con secuencias *chrA* identificados en las cepas de *P. aeruginosa* pueden participar en la transferencia horizontal de dichos genes, se realizaron ensayos de conjugación empleando como cepa receptora *P. aeruginosa* PU21 (Rif<sup>R</sup>, Cr<sup>S</sup>) y como donadoras las cepas *chrA*<sup>+</sup> (Rif<sup>S</sup>, Cr<sup>R</sup>) que mostraron plásmidos con secuencias *chrA* (Figura 16 y Tabla 7). La selección de las transconjugantes se realizó en medio con rifampicina y cromato. Después de varios intentos no se obtuvieron colonias en el medio de selección.

En un trabajo paralelo llevado a cabo con la misma colección de bacterias clínicas, se determinó que las cepas de *P. aeruginosa* 52, 139, 145 y 152 mostraron resistencia a mercurio inorgánico (Acosta-Navarrete, 2011), por lo cual se llevaron a cabo ensayos de conjugación para estas bacterias utilizando rifampicina y cloruro de mercurio como una herramienta alternativa para la selección de transconjugantes. Tampoco se obtuvieron colonias en el medio de selección. Con esto se concluyó que dichos plásmidos probablemente no son conjugativos.

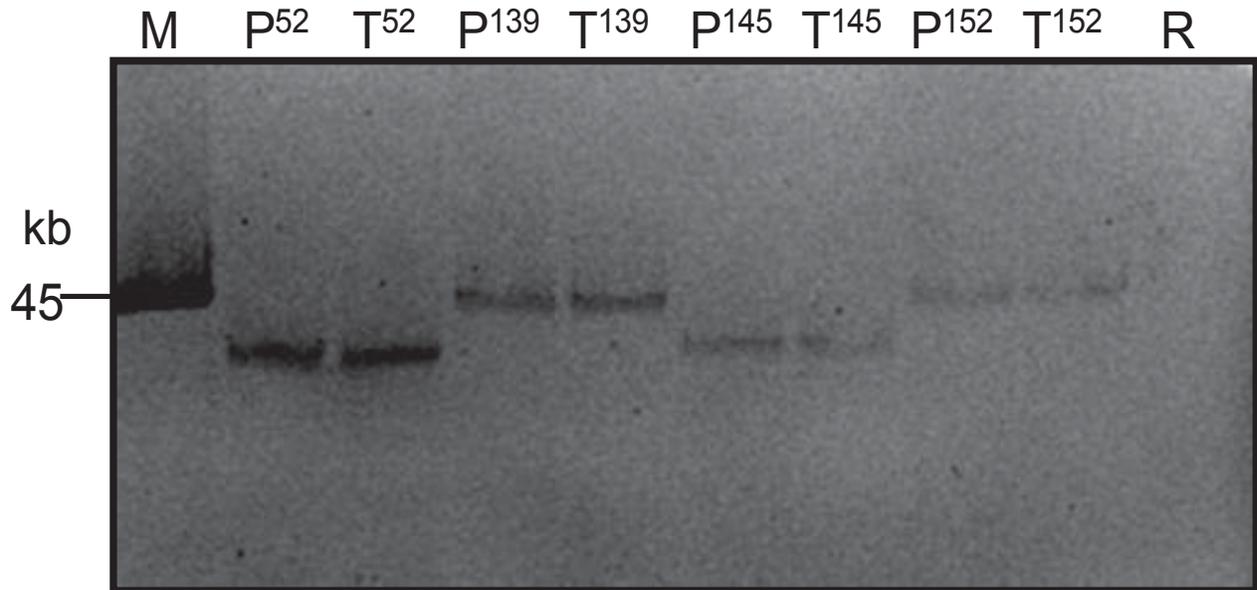
### 8.5.4.- TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR TRANSFORMACIÓN

Dado que los plásmidos de las cepas de *P. aeruginosa* *chrA*<sup>+</sup> no pudieron ser transferidos por conjugación y con el propósito de determinar si participan en el fenotipo de resistencia a cromato observado en estas cepas, se intentó transferir dichos plásmidos por electroporación a *P. aeruginosa* PAO1. La selección de las transformantes se llevó a cabo en medio con cromato. Al igual que con las conjugaciones, no se obtuvieron transformantes después de varios intentos.

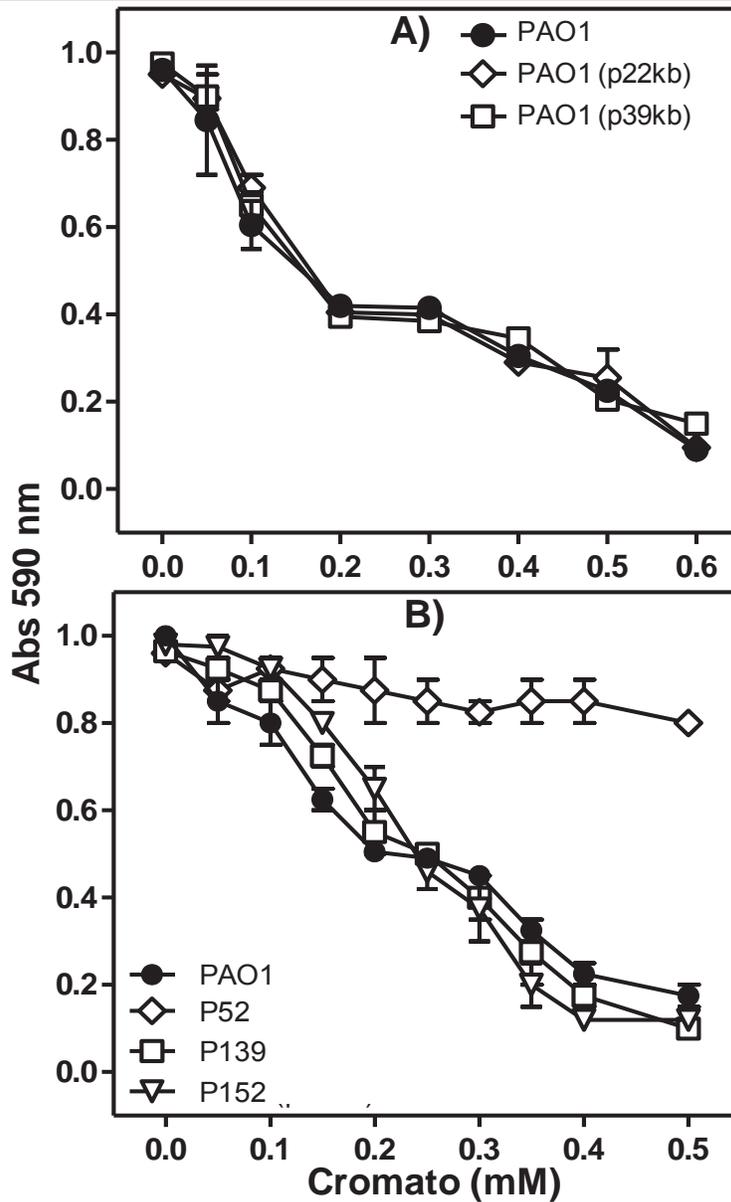
Por otro lado, estos plásmidos sí se lograron transferir a *P. aeruginosa* PAO1 cuando se utilizó mercurio en el medio de selección. Como se observa en la Figura 18, que muestra el DNA extraído de las transformantes de PAO1 obtenidas y de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, las cuatro transformantes presentaron una sola banda del mismo tamaño que las presentes en las cepas parentales, mientras que la cepa receptora PAO1 no presentó bandas en los corrimientos realizados. Se concluyó que estos plásmidos son los responsables de la resistencia a mercurio inorgánico presentada por estas cepas.

Posteriormente, para determinar si los plásmidos transferidos a *P. aeruginosa* PAO1 confieren resistencia a cromato, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad al oxianión para las transformantes obtenidas utilizando la cepa receptora sin plásmidos (PAO1) como control sensible.

Los ensayos de susceptibilidad a cromato en caldo nutritivo (CN) indicaron que las transformantes con los plásmidos de 22 y 39 kb de las cepas de *P. aeruginosa* 52 y 139, respectivamente, no presentaron diferencia en la susceptibilidad a cromato con respecto a la cepa receptora PAO1 (Figura 19A). Las transformantes con los plásmidos de *P. aeruginosa* 145 y 152, de 29 y 39 kb, respectivamente, tuvieron el mismo comportamiento de sensibilidad a cromato (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares cuando las pruebas se hicieron en caldo Luria-Bertani (LB) o en medio mínimo (M9) (datos no mostrados).



**Figura 18.- Plásmidos de cepas de *P. aeruginosa* transferidos por transformación.** Células competentes de *P. aeruginosa* PAO1 se transformaron por electroporación con DNA extraído de las cepas *chrA*<sup>+</sup> de *P. aeruginosa*. Las transformantes se seleccionaron en agar con 200  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub>. Se muestra la separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% del DNA extraído de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* (P) y de las transformantes de PAO1 obtenidas (T). M, marcador 2F10 de 45 kb (línea); R, receptora (PAO1). Números de cepas como se indica en la Tabla 7.



**Figura 19.- Susceptibilidad a cromato de transformantes PAO1 y cepas de *P. aeruginosa chrA*<sup>+</sup>.** Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación por 18 h con las concentraciones de cromato indicadas, luego se midió la absorbencia a 590 nm. **A)** PAO1(p22kb) y PAO1(p39kb), transformantes de PAO1 con plásmidos de 22 y 39 kb de *P. aeruginosa* 52 y 139, respectivamente. **B)** P52, P139 y P152, cepas de *P. aeruginosa* 52, 139 y 152, respectivamente. PAO1, *P. aeruginosa* PAO1. Los valores representan el promedio de dos ensayos por duplicado con las respectivas desviaciones estándar (barras).

Como los plásmidos de *P. aeruginosa* no confirieron resistencia en PAO1, se decidió probar la susceptibilidad a cromato de las cepas parentales con el fin de determinar si en éstas los fenotipos de resistencia se expresan bajo las condiciones utilizadas con las transformantes.

Los resultados revelaron que, a excepción de *P. aeruginosa* 52 que fue claramente resistente a cromato, el resto de las cepas ensayadas se comportaron igualmente sensibles al oxianión que PAO1 (Figura 19B). Se observaron comportamientos similares cuando las pruebas se hicieron en medio LB o en M9 (datos no mostrados). Los resultados con la cepa 145 no se presentan ya que no creció en medio CN.

Por lo tanto, se concluyó que los genes *chrA* presentes en los plásmidos de 22, 29 y 39 kb de las cepas de *P. aeruginosa chrA<sup>+</sup>* probablemente no confieren resistencia a cromato y por tanto, no son los responsables del fenotipo de resistencia observado en las cepas clínicas.

## 8.6.- CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE ENTEROBACTERIAS *chrA<sup>+</sup>*

### 8.6.1.- IDENTIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS CON SECUENCIAS *chrA*

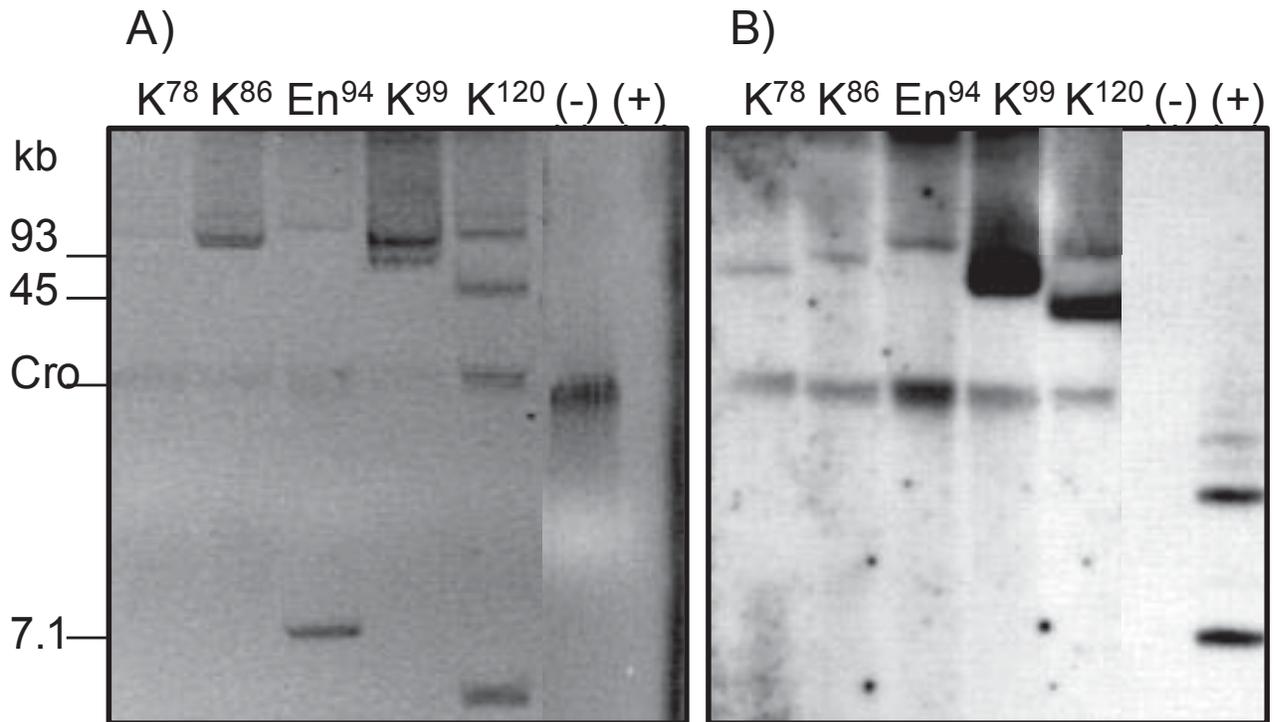
Con el fin de identificar plásmidos con genes *chrA* en las cepas clínicas de enterobacterias, se llevaron a cabo ensayos de hibridación tipo Southern para las ocho cepas *chrA<sup>+</sup>* que presentaron bandas de plásmidos en los corrimientos de DNA realizados (Figura 15 y Tabla 6).

Al igual que con las cepas de *P. aeruginosa* (Figura 16), en las hibridaciones se obtuvieron un par de señales correspondientes al control positivo y ninguna señal del control negativo (Figura 20B), lo que indica que la hibridación fue específica para el gen *chrA*.

Con respecto a las enterobacterias clínicas *chrA*<sup>+</sup>, cinco cepas mostraron señales de hibridación tanto en la región del cromosoma como en bandas de plásmidos (Figura 20B). Las cepas de *K. pneumoniae* 78 y 86 y *E. cloacae* 94, presentaron señales en un solo plásmido de 70, 95 y 100 kb, respectivamente; *K. pneumoniae* 99 mostró una intensa señal en la región correspondiente a las bandas de 65 y 85 kb; y *K. pneumoniae* 120 presentó señales en los plásmidos de 40 y 90 kb, aunque la primera presentó un mayor nivel de intensidad (Figura 20B y Tabla 8). Estos resultados indican que dichos plásmidos presentan secuencias con alta identidad con el gen *chrA*.

El resto de las cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup> que presentaron plásmidos (*K. pneumoniae* 63 y 70 y *E. cloacae* 122) (Figura 15 y Tabla 6) mostraron leves señales de hibridación en la región del cromosoma pero no en bandas de plásmidos (Apéndice 2). Estas cepas no fueron posteriormente analizadas en el resto del trabajo.

Con estos resultados se concluyó que secuencias con elevada identidad con el gen *chrA* también se encuentran presentes en plásmidos de cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* de esta colección.



**FIGURA 20.- Hibridación Southern de cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup>.**

**A)** Separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% de los productos de extracción de DNA por el método de Kieser y col. (1984). Los números de las cepas en cada carril corresponden a los asignados en la Tabla 8. K, *K. pneumoniae*; En, *E. cloacae*; (-), *E. coli* DH5 $\alpha$ ; (+), pEPL1. Se indican con líneas a la izquierda las posiciones de los marcadores R1 (93 kb) y 2F10 (45 kb), del plásmido pEPL1 (7.1 kb) y la región del cromosoma (Cro). **B)** Autorradiografía de la hibridación a 60°C de la membrana correspondiente al gel del panel A) con la sonda *chrAc* marcada.

**Tabla 8.- Cepas de enterobacterias resistentes a cromato que contienen plásmidos con secuencias *chrA*.**

Especie	No. <sup>a</sup>	Procedencia	Hospital <sup>b</sup>	MIC cromato (mM)	Plásmido (s) (kb) <sup>c</sup>	Grupo Inc <sup>d</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	78	Monterrey	HSJ	1.0	<b>70</b>	N
	86	Monterrey	CRECEI	1.5	<b>95</b>	P
	99	Monterrey	CRECEI	0.8	65 y <b>85</b>	P
	120	Acapulco	HGA	1.5	40 y 93	N.D.*
<i>Enterobacter cloacae</i>	94	Monterrey	CRECEI	1.0	<b>100</b>	N, P

<sup>a</sup>, Número de cepas como en Tabla 6. <sup>b</sup>, Abreviaturas como en Figura 8.

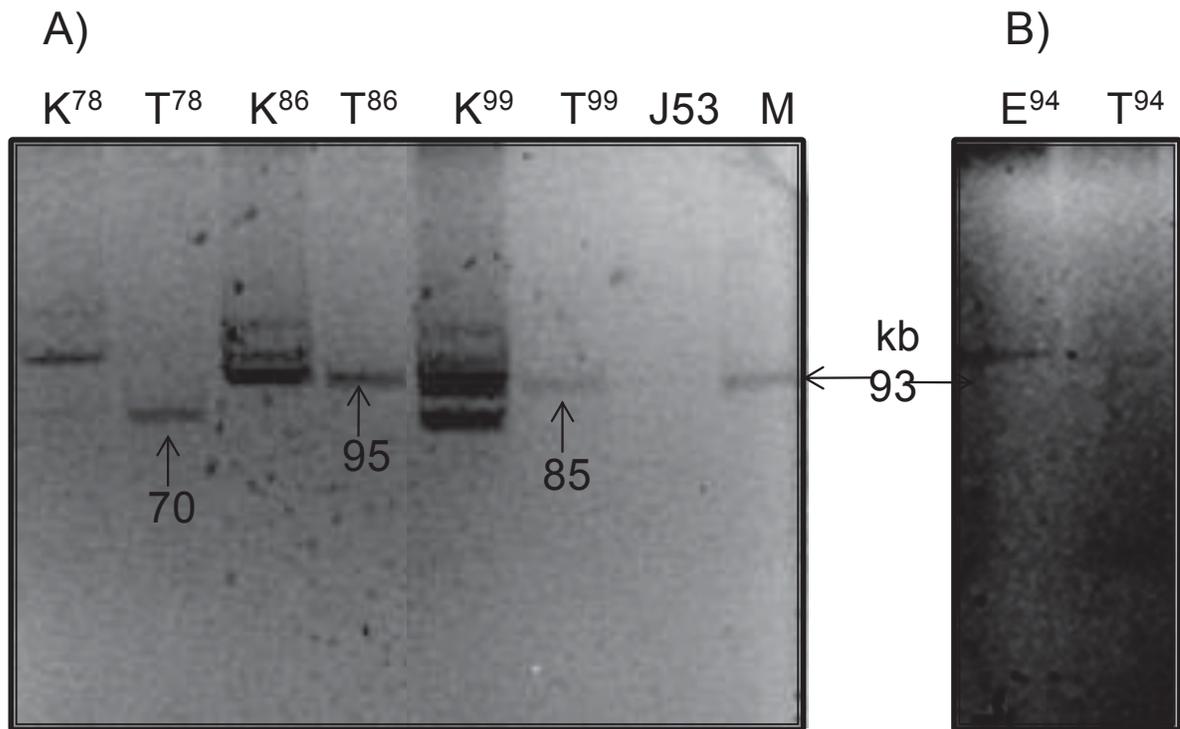
<sup>c</sup>, Plásmidos que presentaron señal de hibridación con el gen *chrA*; en negritas, plásmidos transferidos por conjugación a *E. coli* J53-2. <sup>d</sup>, Grupo de incompatibilidad de plásmidos conjugativos (Figura 24); \*, N.D., No determinado.

### 8.6.2.- TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

Para determinar si los plásmidos con secuencias similares al gen *chrA* identificados en las cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup> pueden participar en la transferencia horizontal de dichos genes, se realizaron ensayos de conjugación empleando como cepa receptora *E. coli* J53-2 (Rif<sup>R</sup>, Cr<sup>S</sup>) y como donadoras las cinco cepas *chrA*<sup>+</sup> (Rif<sup>S</sup>, Cr<sup>R</sup>) que mostraron hibridación con la sonda *chrAc* en bandas de plásmidos (Figura 20 y Tabla 8). La selección de las transconjugantes se realizó en medio con rifampicina y cromato.

Se obtuvieron colonias en el medio de selección para cuatro de las cinco mezclas de conjugación de las cepas ensayadas, excepto para *K. pneumoniae* 120 que no presentó transconjugantes. Los productos de extracción de DNA de las colonias resultantes mostraron que se transfirieron plásmidos únicos a J53-2 de 70, 95 y 85 kb presentes en las cepas de *K. pneumoniae* 78, 86 y 99, respectivamente (Figura 21A), así como un plásmido de 100 kb de *E. cloacae* 94 (Figura 21B). Además, se observó que los plásmidos transferidos coincidieron en tamaño con bandas o regiones que arrojaron señal de hibridación con el gen *chrA* en las cepas parentales (Figura 21 y Tabla 8).

Se concluyó que estos plásmidos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* son conjugativos y participan tanto en el fenotipo de resistencia a cromato en estas cepas como en la transferencia horizontal de genes *chrA*. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de plásmidos de enterobacterias con genes *chrA* funcionales.



**Figura 21.- Transferencia de plásmidos de enterobacterias por conjugación.**

Plásmidos transferidos a J53-2 de cepas donadoras de **A)** *K. pneumoniae* o **B)** *E. cloacae*. Cultivos en medio líquido de las cepas donadora y receptora se mezclaron en proporción 1:5, se incubaron por 48 h y las transconjugantes se seleccionaron en agar con rifampicina 350 µg/ml y cromato 2 mM. Se muestra la separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% del DNA extraído de las cepas donadoras y las transconjugantes. Los números de las cepas en cada carril corresponden a los asignados en la Tabla 8. K, *K. pneumoniae*; E, *E. cloacae*; T, transconjugantes; J53, *E. coli* J53-2 (receptora); M, marcador R1 (93 kb). Se señalan con flechas los tamaños (kb) de los plásmidos y del marcador.

### 8.6.3- SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO DE TRANSCONJUGANTES

Con la finalidad de evaluar el nivel de resistencia a cromato conferido por los plásmidos conjugativos, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad para las transconjugantes obtenidas empleando como control sensible la cepa receptora *E. coli* J53-2 y como resistentes las cepas parentales de enterobacterias.

Se encontró que las transconjugantes con los plásmidos de 70 y 100 kb, transferidos a J53-2 de las cepas donadoras *K. pneumoniae* 78 y *E. cloacae* 94, respectivamente (Figura 21), presentaron una clara resistencia al oxianión en medio CN con respecto a la cepa receptora sin plásmidos J53-2; en ambos casos el nivel de resistencia fue menor que el observado en la cepa parental *E. cloacae* 94 (Figura 22). *K. pneumoniae* 78 tuvo un comportamiento similar de resistencia a cromato que *E. cloacae* 94 (datos no mostrados).

Para las transconjugantes con los plásmidos de 85 y 95 kb, transferidos a J53-2 de las cepas *K. pneumoniae* 99 y 86, respectivamente (Figura 21), las pruebas se llevaron a cabo en medio LB ya que las cepas donadoras crecieron poco en medio CN. La transconjugante con el plásmido de 85 kb mostró una clara resistencia a cromato con respecto a J53-2, pero también con un menor nivel que la cepa parental *K. pneumoniae* 99 (Figura 23A); mientras que *E. coli* J53-2 con el plásmido de 95 kb presentó sólo una ligera mayor resistencia al oxianión con respecto a la cepa sin plásmidos (J53-2); al igual que en los casos anteriores, la cepa donadora (*K. pneumoniae* 86) fue más resistente (Figura 23B). Estos resultados confirmaron que los plásmidos conjugativos con secuencias *chrA* de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* confieren resistencia a cromato en *E. coli*.

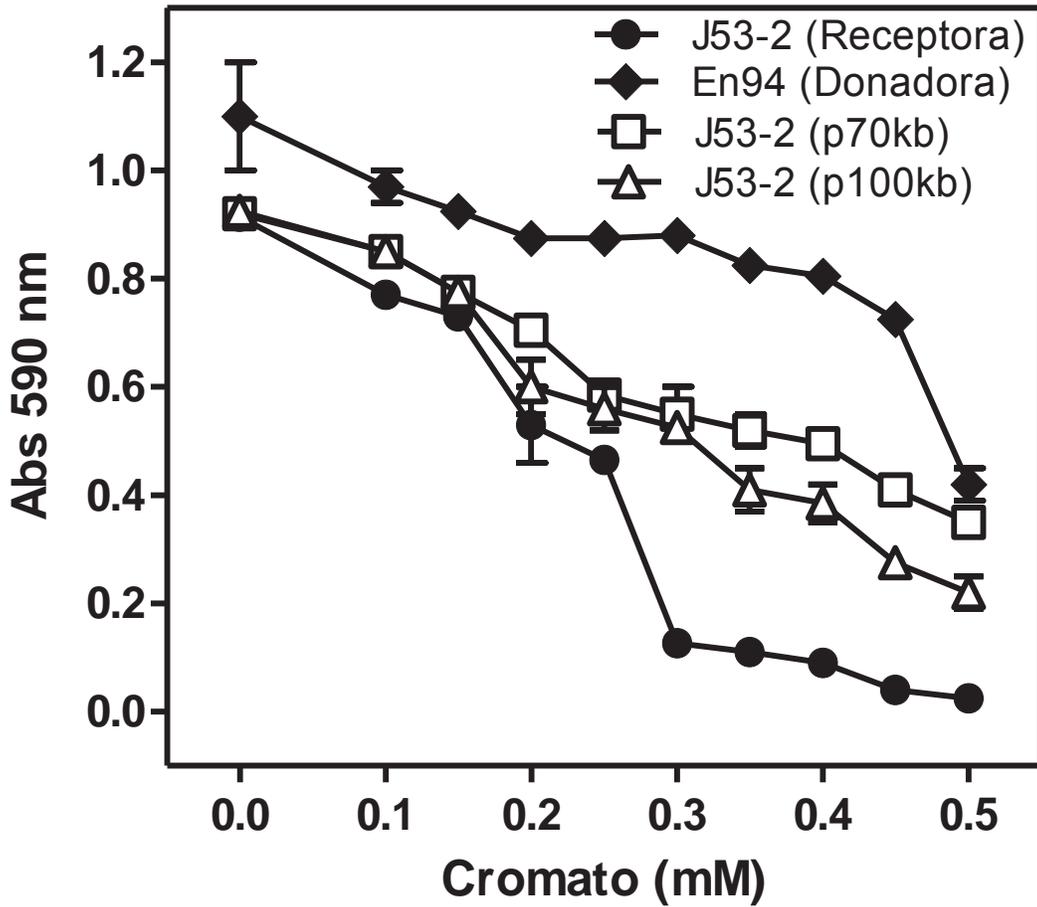
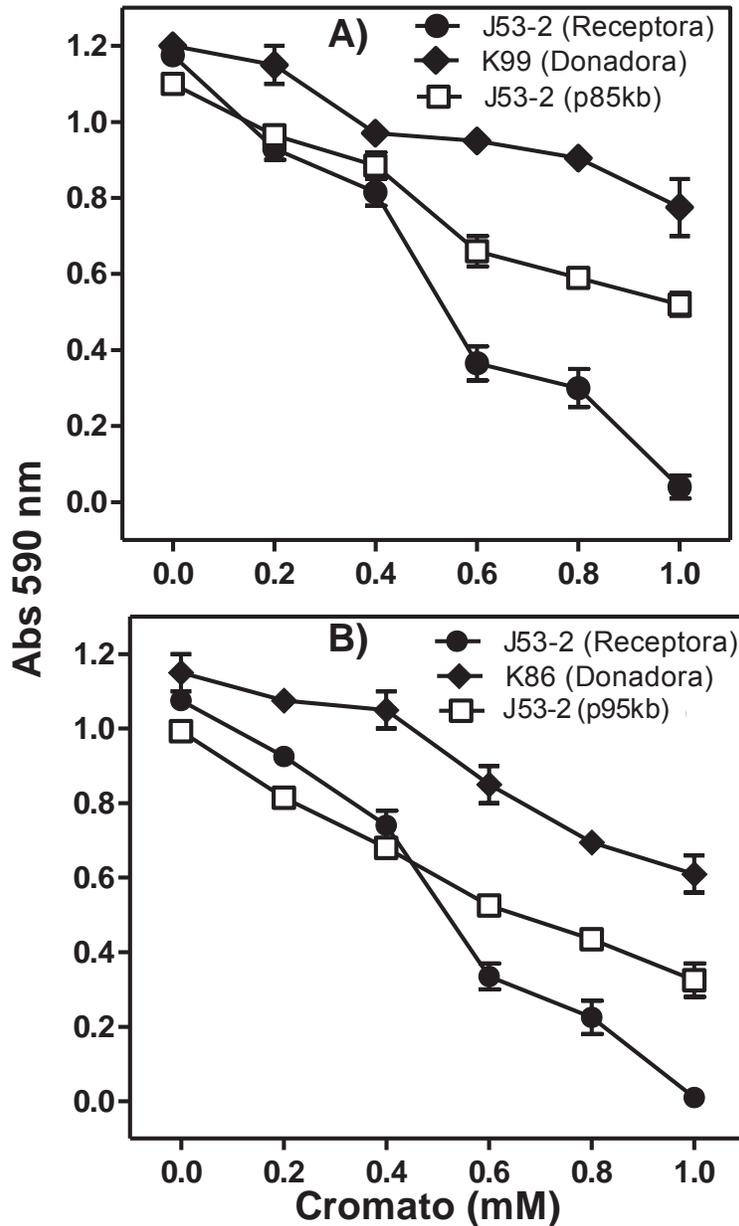


Figura 22.- Susceptibilidad a cromato de las transconjugantes J53-2 (p70kb) y J53-2 (p100kb). Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación por 18 h con las concentraciones de cromato indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. J53-2, *E. coli* J53-2 (receptora); En94, *E. cloacae* 94 (donadora); J53-2 (p70kb) y J53-2 (p100kb), transconjugantes con plásmidos de 70 y 100 kb de *K. pneumoniae* 78 y *E. cloacae* 94, respectivamente. Los valores representan los promedios de dos ensayos por duplicado con las respectivas desviaciones estándar (barras).



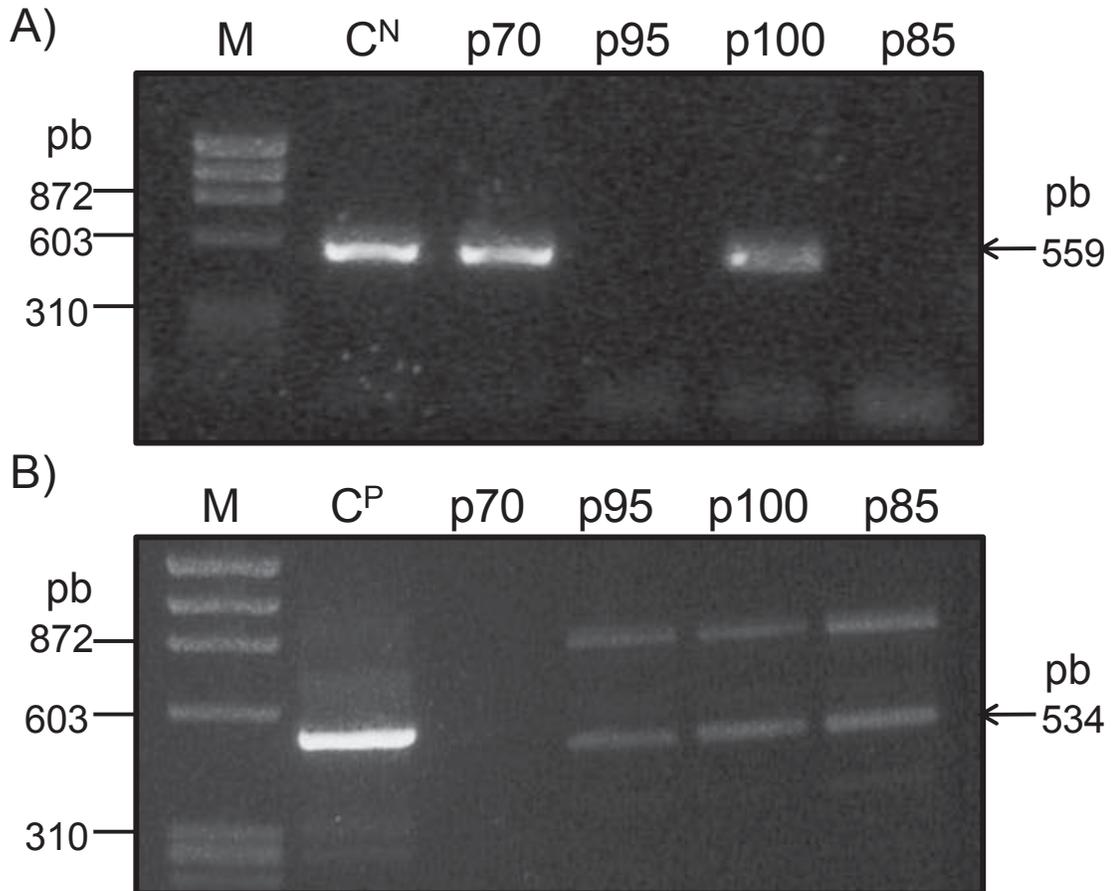
**Figura 23.- Susceptibilidad a cromato de las transconjugantes J53-2 (p85kb) y J53-2 (p95kb).** **A)** Transconjugante J53-2 (p85kb) **B)** Transconjugante J53-2 (p95kb). Los cultivos se crecieron en LB a 37°C por 18 h con las concentraciones de cromato indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. J53-2, *E. coli* J53-2 (receptora); K99 y K86, *K. pneumoniae* 99 y 86, respectivamente; J53-2 (p85kb) y J53-2 (p95kb), transconjugantes con plásmidos de 85 y 95 kb de K99 y K86, respectivamente. Barras, desviaciones estándar de dos ensayos por duplicado.

#### 8.6.4.- DETERMINACIÓN DEL GRUPO DE INCOMPATIBILIDAD DE PLÁSMIDOS

Como los cuatro plásmidos transferidos por conjugación a J53-2 están presentes en cepas que provienen de un mismo origen geográfico (Monterrey, tres de ellas de un mismo hospital) (Tabla 8) y con el propósito de evaluar si dichos plásmidos están relacionados entre sí, se determinó la familia a la que éstos pertenecen mediante la tipificación por grupos de incompatibilidad. Para esto, se empleó la metodología basada en PCR descrita por Carattoli y col. (2005).

En la Figura 24 se muestran sólo aquellos productos de amplificación que arrojaron bandas del tamaño esperado con una determinada pareja de oligonucleótidos y que por tanto, corresponden a secuencias específicas de un determinado grupo de incompatibilidad. El resto de las reacciones no arrojó productos de amplificación (datos no mostrados).

Para la transconjugante con el plásmido de 70 kb (Figura 21), al utilizar oligonucleótidos específicos para secuencias de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncN, se obtuvo una banda de 559 pb del mismo tamaño que el control positivo (fragmento del gen *repA* del plásmido R46 de *E. coli* CSH28) (Figura 24A), indicando que este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad IncN (Tabla 8). Las transconjugantes con los plásmidos de 85 y 95 kb (Figura 21) mostraron una banda de 534 pb al igual que el control positivo (origen de replicación del plásmido RP4) con oligonucleótidos específicos para secuencias IncP (Figura 24B), por lo que ambos plásmidos pertenecen al grupo IncP (Tabla 8)



**Figura 24.- Determinación del grupo de incompatibilidad de plásmidos de transconjugantes de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup>.** **A)** Productos de amplificación por PCR de secuencias IncN. **B)** Productos de amplificación por PCR de secuencias IncP. Se corrieron reacciones de PCR con DNA de las transconjugantes utilizando oligonucleótidos y controles para 18 grupos de incompatibilidad (Carattoli y col., 2005). C<sup>N</sup>, plásmido R46; C<sup>P</sup>, plásmido RP4 (controles positivos); M, marcador de tamaño molecular; p70, p95, p100 y p85, productos de PCR de transconjugantes con plásmidos de enterobacterias. Se muestran con líneas los tamaños (pb) de las bandas del marcador y con flechas los tamaños (pb) de los productos amplificados

Finalmente, la transconjugante con el plásmido de 100 kb (Figura 21) presentó productos de amplificación para los grupos IncN e IncP (Figura 24A y B), lo que indica que este plásmido presenta secuencias correspondientes a estos dos grupos de incompatibilidad (Tabla 8).

Con esto se concluyó que los plásmidos conjugativos identificados en las cepas de *K. pneumoniae* pertenecen al grupo de incompatibilidad IncN o IncP, mientras que el plásmido de *E. cloacae* es un plásmido híbrido con dos grupos de incompatibilidad.

## 9.- DISCUSIÓN

El gen *chrA* codifica a la proteína transmembranal ChrA que confiere resistencia a cromato mediante un mecanismo de expulsión dependiente de la energía generada por el potencial de membrana (Pimentel y col., 2002). Esta proteína pertenece a la superfamilia CHR que incluye cientos de proteínas homólogas presentes en los tres dominios de la vida (Díaz-Pérez y col., 2007; Henne y col., 2009), indicando que ChrA es una proteína ancestral.

Diversas proteínas ChrA bacterianas que confieren resistencia a cromato están codificadas en plásmidos (revisado en Vasconcelos-Morais y col., 2011), lo que sugiere que los genes *chrA* pueden transferirse de forma horizontal por conjugación. Aunque existen otros mecanismos de transferencia horizontal, como la transducción y la transformación, Smillie y col. (2010) propusieron que la conjugación es cuantitativamente más importante, esto debido a que algunos plásmidos pueden transferir gran cantidad de genes entre organismos tanto cercana como remotamente relacionados; la transducción en cambio, es dependiente de fagos que tienen rangos de hospederos restringidos y transportan sólo pequeñas regiones de DNA; mientras que la transformación depende de muchos factores como la competencia de las células y la estabilidad del material genético en la bacteria receptora. Por lo tanto, la conjugación podría representar el principal mecanismo de transferencia horizontal de genes *chrA*.

Aunque un transposón no es capaz de mediar su propia transferencia de una bacteria a otra, los transposones de resistencia a cromato descritos en los plásmidos pB4 (Tauch y col., 2003), pCNB1 (Ma y col., 2007) y pUM505 (Ramírez-

Díaz y col., 2011) podrían representar un mecanismo adicional de movilización de genes *chrA* en bacterias, ya que en los tres casos estos transposones se encuentran asociados a replicones conjugativos.

Aunque el determinante de resistencia a cromato mejor estudiado es el gen *chrA* del plásmido pUM505, el cual se identificó en una cepa clínica de *P. aeruginosa* aislada de un paciente hospitalizado en Morelia (Cervantes y col., 1990), el resto de los genes *chrA* caracterizados a nivel experimental se han identificado en bacterias aisladas de ambientes contaminados (revisado en Vasconcelos-Morais y col., 2011). Por lo tanto, no existen reportes a la fecha de la presencia de genes *chrA* en bacterias de origen clínico. Sin embargo, algunos determinantes de resistencia a metales sí son comúnmente encontrados en bacterias clínicas, como los genes de resistencia a plata (genes *agr* y *sil*) (revisado en Percival y col., 2005) y mercurio (operón *mer*) (Tato y col., 2010). En ambos casos se ha propuesto que el uso de compuestos derivados de plata y mercurio, tanto en la práctica médica como en odontología, favorece la prevalencia de estos determinantes en los hospitales.

Por otro lado, no se conocen posibles fuentes de cromato en el hospital que favorezcan la selección de bacterias resistentes al oxianión, ya que los compuestos de Cr(VI) no son utilizados en la práctica médica debido a que son potenciales agentes cancerígenos (Mertz, 1993). Sin embargo, aunque no son reconocidos como medicamentos, algunos compuestos de Cr(III) que aumentan el catabolismo de lípidos (picolinato de cromo) y la acción de la insulina (cloruro de cromo) se han utilizado en el tratamiento de la obesidad y la diabetes, respectivamente (Mertz, 1993). No existe evidencia reportada en la literatura para

atribuir a estos compuestos un posible papel en la selección de bacterias resistentes a cromato en ambientes hospitalarios.

Diversos estudios proponen que los genes de resistencia a metales y antibióticos son adquiridos por bacterias por medio de plásmidos o transposones, luego estos determinantes de resistencia pueden asociarse en un mismo elemento genético móvil lo que puede favorecer su co-selección (Alonso y col., 2001; Spain, 2003; Baker-Austin y col., 2006). Lo anterior permite asumir que los determinantes de resistencia a antibióticos pueden favorecer la prevalencia de genes de resistencia a cromato en bacterias hospitalarias por el uso de antimicrobianos en la clínica. Esto puede ocurrir si ambos determinantes están presentes en un mismo plásmido o transposón.

En el presente estudio se evaluó la presencia de genes *chrA* en bacterias de origen clínico resistentes a antibióticos, con el fin de identificar plásmidos que participen en la transferencia horizontal de este gen como un intento inicial por conocer los factores que seleccionan la prevalencia de bacterias resistentes a cromato en los hospitales.

Las cepas clínicas analizadas en el presente trabajo se aislaron de pacientes en distintos hospitales del país (**Figura 8**) y son productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE's), una clase de enzimas que poseen actividad hidrolítica contra penicilinas, oximino-cefalosporinas y aztreonam (Garza-Ramos y col., 2007). Harada y col. en 2008 reportaron que los genes que codifican BLEE's pueden estar localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos, sin embargo, algunos miembros de este grupo como los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*, son comúnmente encontrados en plásmidos. Aunque no se ha reportado la presencia

de genes *chrA* y genes que codifican BLEE's en un mismo elemento genético móvil, Tauch y col. en 2003 reportaron la coexistencia en el plásmido conjugativo pB4 de los genes *chrA* y *bla<sub>NPS-1</sub>*, éste último codifica una  $\beta$ -lactamasa de espectro reducido que confiere resistencia a los antibióticos amoxicilina y piperacilina. Por lo tanto, la presencia de genes que codifican BLEE's en plásmidos de las cepas clínicas de este estudio aumenta la probabilidad de encontrar genes *chrA* en estas bacterias si ambos determinantes se encuentran en el mismo replicón, ya que esto podría permitir una co-selección por el uso de  $\beta$ -lactámicos en los hospitales.

Inicialmente, para evaluar los fenotipos de susceptibilidad a cromato en las cepas clínicas, se llevó a cabo la determinación de la MIC para este oxianión. Las curvas de distribución obtenidas mostraron diferentes valores de resistencia a cromato para cada especie bacteriana (**Figuras 9 y 10**), lo cual era de esperarse considerando que los niveles de resistencia a Cr(VI) reportados en cepas bacterianas es altamente variable, con valores desde 0.3 mM para *C. metallidurans* CH34 hasta 200 mM para *Arthrobacter sp.* FB24 (revisado en Henne y col., 2009), aunque estas concentraciones pueden variar según el medio de cultivo utilizado. La variabilidad en el nivel de resistencia al oxianión probablemente se debe a la diferencia entre especies en cuanto a la presencia de diversos genes implicados en la resistencia a cromato y en la regulación de los mismos. Esto considerando que además de los genes *chrA*, existen diversos mecanismos de resistencia al oxianión como los descritos por Cervantes y Campos-García en 2007.

Se encontró que las cepas de *P. aeruginosa* presentaron el más alto porcentaje (62%) de bacterias resistentes a cromato (**Tabla 4**). En un estudio realizado con

48 aislados de *Pseudomonas sp.* de suelos irrigados con aguas residuales se encontró también un alto porcentaje (62.5%) de bacterias resistentes a cromato, así como a múltiples antibióticos (Malik y Aleem, 2010). Estos datos, en conjunto con los obtenidos en el presente trabajo, sugieren que *P. aeruginosa* requiere la presencia tanto de genes de resistencia a cromato como a antibióticos para adaptarse a los diferentes tipos de estrés presentes en los múltiples nichos ecológicos que habita ya que esta especie bacteriana, además de ser un patógeno oportunista de humanos, es conocida desde hace mucho tiempo por su capacidad de habitar suelo, agua y diversos hospederos vegetales y animales (Hoadley y McCoy, 1968).

Por lo tanto, el cromato en suelos o ambientes acuáticos contaminados podría favorecer la selección de cepas de *P. aeruginosa* resistentes al oxianión que posteriormente pueden infectar a humanos y llegar al hospital. La presencia en las mismas bacterias de genes de resistencia a antibióticos favorecería la prevalencia de cepas resistentes a cromato en los hospitales por co-selección.

Aunque *E. cloacae* presentó una proporción ligeramente mayor de cepas resistentes a cromato (11%) con respecto a *E. coli* (4%) y *Salmonella sp.* (0%) (**Tabla 4**), eran esperados bajos porcentajes de resistencia para las enterobacterias debido a que, como se mencionó antes, no se conocen fuentes de cromato en los hospitales que actúen como factores de selección. Sin embargo, la otra especie de enterobacteria *K. pneumoniae* presentó un alto porcentaje de cepas resistentes al oxianión (61%) (**Tabla 4**). Al igual que *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* también se ha descrito como una especie ubicua en la naturaleza cuyos hábitats no clínicos comprenden suelo, agua y plantas (Bagley y col., 1985).

Esto sugiere que *K. pneumoniae* también puede estar expuesta a cromato en suelos o ambientes acuáticos contaminados favoreciendo la selección de cepas con resistencia al oxianión. Estos determinantes pueden ser transferidos posteriormente al ambiente clínico por la capacidad de esta especie bacteriana de colonizar hospederos humanos. Lo anterior se ve apoyado por el estudio realizado por Podschun y col. en 2001, quienes reportaron aislados de *K. pneumoniae* de ambientes acuáticos capaces de producir los mismos factores de virulencia que bacterias clínicas de la misma especie. Esto indica que las cepas ambientales de *K. pneumoniae* son capaces de producir infección en humanos.

Por lo tanto, es posible que los genes de resistencia a cromato sean adquiridos por bacterias patógenas en ambientes contaminados y luego sean transferidas por hospederos humanos al hospital. Una vez ahí, los plásmidos o transposones pueden participar en la prevalencia y transferencia horizontal de estos determinantes a otras bacterias hospitalarias por co-selección con genes de resistencia a antibióticos.

Como diversas cepas de la colección analizada presentaron fenotipos de resistencia a cromato, se evaluó la presencia de genes *chrA* en las cepas clínicas por hibridación en colonia. Se utilizó como sonda el gen *chrA* de pUM505 debido a que se identificó en una bacteria de origen clínico (Cervantes y col., 1990). Aunque sólo 36 cepas (27%) presentaron fenotipo de resistencia al oxianión (**Tabla 4**), se analizaron las 133 cepas por hibridación independientemente de su valor de MIC, considerando que algunas bacterias podrían contener genes *chrA* que no se expresan en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de susceptibilidad.

Un grupo de colonias bacterianas mostraron claras señales de hibridación (**Figura 12**), indicando que estas cepas contienen secuencias con un alto nivel de identidad con el gen *chrA*. Las cepas que no presentaron señal de hibridación o que mostraron señales tenues no fueron posteriormente analizadas en el resto del trabajo, esto debido a que dichos resultados indican ausencia de secuencias con identidad con *chrA* o presencia de secuencias con baja identidad con este gen.

Las cepas que presentaron francas señales de hibridación (**Figura 13**), denominadas *chrA*<sup>+</sup>, pertenecen a cuatro de las cinco especies analizadas. Esto sugiere que el gen *chrA* sigue presente en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, como se reportó inicialmente por Cervantes y col. en 1990, y que además se encuentra también en otras especies como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* en el ambiente hospitalario.

Por otro lado, 18 de las 21 cepas *chrA*<sup>+</sup> además presentaron resistencia a cromato (**Tabla 5**), lo que sugiere que estas bacterias poseen un mecanismo de resistencia al oxianión que involucra la expulsión de iones de cromato del citoplasma al periplasma por proteínas ChrA. Sin embargo, tres cepas de *P. aeruginosa chrA*<sup>+</sup> fueron sensibles al oxianión, probablemente porque los genes *chrA* presentes en estas bacterias no son funcionales o no se expresan en las condiciones en que se realizaron los ensayos de susceptibilidad. Situaciones similares se han reportado en especies de *Burkholderia* que poseen diversos genes *chrA* que confieren resistencia a cromato sólo bajo condiciones específicas de crecimiento (León-Márquez, 2009; Luna-Luna, 2010).

Una posible explicación para la presencia de genes *chrA* en las bacterias clínicas de este estudio, además de la posible co-selección con genes de resistencia a

antibióticos antes mencionada, sería que estos determinantes genéticos, además de conferir resistencia a cromato, lleven a cabo funciones adicionales en la misma bacteria que representen una ventaja adaptativa en el ambiente hospitalario. Lo anterior se ha propuesto para el gen *mdrL* de *Listeria monocytogenes*, que codifica el transportador de membrana MdrL y que al ser deletado disminuyeron los valores de MIC de cromato y del antibiótico cefotaxima, indicando que MdrL contribuye a la destoxificación de ambos compuestos (Mata y col., 2000). En un estudio similar, Aendekerk y col. (2002) interrumpieron el determinante *mexGHI-ompD* que codifica una bomba de expulsión de antibióticos generando una mutante de *P. aeruginosa* hipersensible a Vanadio (V). Considerando que la expulsión citoplásmica es también un mecanismo de resistencia común para antimicrobianos (revisado en Van Bambeke y col., 2000), podría ser que la proteína ChrA, además de expulsar al oxianión cromato, lleve a cabo también la expulsión de antibióticos aniónicos como fluoroquinolonas o  $\beta$ -lactámicos, lo cual favorecería su prevalencia en ambientes clínicos.

Posteriormente, se determinó el contenido de plásmidos de las cepas *chrA*<sup>+</sup>, ya que diversos genes *chrA* están codificados en este tipo de replicones. Se encontró que siete de las 12 cepas de *P. aeruginosa* mostraron plásmidos (**Figura 14**), de los cuales cinco presentaron tamaños similares (entre 25 y 45 kb). Estos resultados concuerdan con dos estudios realizados con cepas provenientes de la misma colección bacteriana del CISEI, donde se describió la presencia del gen *bla*<sub>IMP-15</sub> en plásmidos de un tamaño similar (30 kb) presentes en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en hospitales de Guadalajara (Garza-Ramos y col., 2008) y Morelia (Garza-Ramos y col., 2011). Esto nuevamente sugiere que los genes que

codifican BLEE's en las cepas clínicas del presente estudio probablemente están localizados en plásmidos que son mantenidos en el ambiente clínico por el amplio uso de  $\beta$ -lactámicos en la práctica médica.

Para determinar si estos plásmidos contienen los genes *chrA* identificados por hibridación en colonia, se realizaron ensayos de hibridación tipo Southern. Las cuatro bandas de entre 25 y 40 kb que hibridaron con la sonda *chrAc* (**Figura 16B**) confirmaron que estos plásmidos en efecto contienen secuencias *chrA*. Como uno de los objetivos del presente trabajo es identificar plásmidos implicados en la prevalencia y transferencia horizontal de genes *chrA*, las cepas que no presentaron señal de hibridación en plásmidos (**Apéndice 2**) no fueron posteriormente analizadas debido a que dichos genes probablemente se encuentran localizados en el cromosoma.

Aunque los cuatro plásmidos de *P. aeruginosa* con secuencias *chrA* pertenecen a cepas aisladas en diferentes ciudades (**Tabla 7**), éstos presentaron patrones de restricción enzimática similares (**Figura 17**). Estos resultados sugieren que estos plásmidos poseen una estructura molecular similar y por tanto, están relacionados genéticamente entre sí. El aislamiento de cepas que comparten el mismo contenido y tipo de plásmidos, pero que se aislaron en diferentes localizaciones geográficas, sugiere una diseminación geográfica de cepas genéticamente relacionadas. Considerando además que los plásmidos que contienen secuencias *chrA* identificados en *P. aeruginosa* no pudieron ser transferidos por conjugación y probablemente no se transfieren de forma horizontal, la diseminación clonal podría representar la principal forma de distribución de estos genes *chrA* en los hospitales. Por otro lado, aunque estos plásmidos sí se lograron transferir por

electroporación a *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 18**), no confirieron resistencia a cromato en la cepa receptora (**Figura 19A**); esto sugiere que los genes *chrA* presentes en dichos plásmidos no son funcionales bajo las condiciones ensayadas o que tal vez no son los responsables del fenotipo de resistencia a cromato en las cepas clínicas.

Por lo tanto, los plásmidos con genes *chrA* identificados en las cepas de *P. aeruginosa* no confieren resistencia a cromato y probablemente no participan en la transferencia horizontal de estos determinantes. Los genes *chrA* presentes en estos plásmidos sólo podrían distribuirse de un hospital a otro por diseminación geográfica de las cepas que los contienen.

Con respecto a las cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup>, se encontró que éstas presentaron un alto contenido de bandas de plásmidos de tamaños diferentes entre sí (**Figura 15**). Estos resultados se relacionan con un estudio realizado con una colección similar de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE's y aisladas en hospitales de Colombia (Espinal y col., 2010). En este trabajo también se encontró una amplia variedad de plásmidos de tamaños diferentes (entre 40 y 300 kb). Lo anterior refleja el alto contenido y diversidad de plásmidos de las enterobacterias multirresistentes a antibióticos y sugiere que los genes *chrA* podrían estar presentes en plásmidos diferentes en las enterobacterias *chrA*<sup>+</sup>.

Las hibridaciones tipo Southern revelaron la presencia de secuencias *chrA* en plásmidos de cinco cepas de enterobacterias *chrA*<sup>+</sup> (**Figura 20B**), mientras que el resto de las cepas presentaron sólo una leve señal de hibridación en la región del cromosoma (**Apéndice 2**), indicando una probable localización cromosomal de dichas secuencias. Cuatro plásmidos de 70, 85, 95 y 100 kb, presentes en las

cepas de *K. pneumoniae* 78, 99 y 86 y *E. cloacae* 94, respectivamente, se transfirieron por conjugación a *E. coli* J53-2 (**Figura 21**) y confirieron resistencia a cromato (**Figuras 22 y 23**). Estos resultados indican que dichos plásmidos pueden transferirse por conjugación entre bacterias de origen clínico y que los genes *chrA* presentes en éstos son funcionales en un huésped heterólogo, propiedades que probablemente favorecen la prevalencia y diseminación de estos plásmidos entre bacterias clínicas de diversas especies.

Si bien recientemente se han reportado plásmidos de *E. coli* (Woodford y col., 2009) y *K. pneumoniae* (Miriagou y col., 2010; Zhao y col., 2010) con secuencias relacionadas a los genes *chrA*, a nuestro conocimiento, este es el primer reporte de plásmidos de enterobacterias con genes *chrA* que confieren resistencia a cromato. La ausencia de reportes sobre la presencia de estos determinantes en cepas clínicas de la familia *Enterobacteriaceae* probablemente se debe a falta de estudios de distribución de genes *chr* en bacterias hospitalarias, ya que este tipo de trabajos se han reportado sólo para cepas provenientes de sitios contaminados (Trajanovska y col., 1997; Abou-Shanab y col., 2006). Lo anterior también podría reflejar una baja abundancia de este tipo de genes en las enterobacterias clínicas, probablemente debido a que éstas no están comúnmente expuestas a cromato en los hospitales y los genes *chrA* pueden llegar a perderse por falta de un factor selectivo que permita su prevalencia o su co-selección.

Se determinó que los plásmidos conjugativos de 85 y 95 kb, presentes en las cepas de *K. pneumoniae* 99 y 86, respectivamente, pertenecen al grupo de incompatibilidad IncP, el plásmido de 70 kb de *K. pneumoniae* 78 pertenece al grupo IncN y el plásmido de 100 kb de *E. cloacae* 94 presentó secuencias de

estos dos grupos de incompatibilidad (**Figura 24 y Tabla 8**). Suzuki y col. en 2010 realizaron un estudio sobre el rango de hospederos de diversas familias de plásmidos basado en evidencias experimentales y predicciones genómicas. Estos autores reportaron que los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncN son principalmente encontrados en especies de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP se encuentran presentes en diversos órdenes bacterianos como *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales* y *Neisseriales*, por lo que son considerados de amplio rango de hospederos. Por lo tanto, el plásmido de 70 kb, que se identificó en *K. pneumoniae* 78 y pertenece al grupo de incompatibilidad IncN, podría participar en la transferencia horizontal de genes *chrA* entre diversas especies de enterobacterias, mientras que los plásmidos de 85 y 95 kb, identificados en las cepas de *K. pneumoniae* 99 y 86, respectivamente, y pertenecientes al grupo IncP, podrían participar en la transferencia de los mismos entre especies filogenéticamente no relacionadas. Esto sugiere que el principal mecanismo de distribución de los genes *chrA* de enterobacterias es la transferencia horizontal por conjugación, a diferencia de los genes *chrA* identificados en *P. aeruginosa* que posiblemente se distribuyen por disseminación clonal.

Por otro lado, el plásmido de 100 kb de *E. cloacae* 94, que presentó tanto secuencias de los grupos IncN e IncP, probablemente es un replicón híbrido que posee las maquinarias de replicación producto de la recombinación entre un plásmido del grupo IncN y otro del grupo IncP. Una situación similar se reportó para el plásmido pJD4 de *Neisseria gonorrhoeae* que posee tres orígenes de

replicación, pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFII e IncW, y dos diferentes proteínas de inicio de la replicación (RepA y RepB) que son utilizadas de manera diferencial en *E. coli* (Pagotto y Dillon, 2001). Lo anterior sugiere que las dos maquinarias de replicación presentes en el plásmido de 100 kb de *E. cloacae* 94 podrían ser utilizadas de manera diferencial dependiendo del hospedero; esto puede representar una ventaja para la prevalencia de dicho plásmido (y del gen *chrA* que contiene) por permitir su replicación en diferentes especies bacterianas.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone que los genes *chrA* se transfieren de forma horizontal o por diseminación clonal en plásmidos. Estos determinantes pueden ser mantenidos en bacterias clínicas por co-selección con genes de resistencia a antibióticos o porque llevan a cabo funciones adicionales útiles en el ambiente hospitalario como la expulsión de antimicrobianos.

Este es el primer estudio de distribución reportado para el gen *chrA* en bacterias de origen clínico y representa el primer reporte de plásmidos de enterobacterias con genes *chrA* funcionales. Sin embargo, como la multirresistencia bacteriana a antibióticos es un problema de salud mundial, se deben llevar a cabo estudios posteriores para identificar posibles fuentes de cromato en los hospitales que podrían favorecer la co-selección de bacterias resistentes al oxianión y a múltiples antibióticos.

## 10.- CONCLUSIÓN

El gen *chrA* de resistencia a cromato se encuentra presente en plásmidos de cepas de enterobacterias y *P. aeruginosa* de origen clínico, los cuales probablemente participan en la prevalencia y transferencia horizontal de estos genes en ambientes hospitalarios.

## 11.- PERSPECTIVAS

Obtener la secuencia de nucleótidos de los plásmidos conjugativos *chrA+* para:

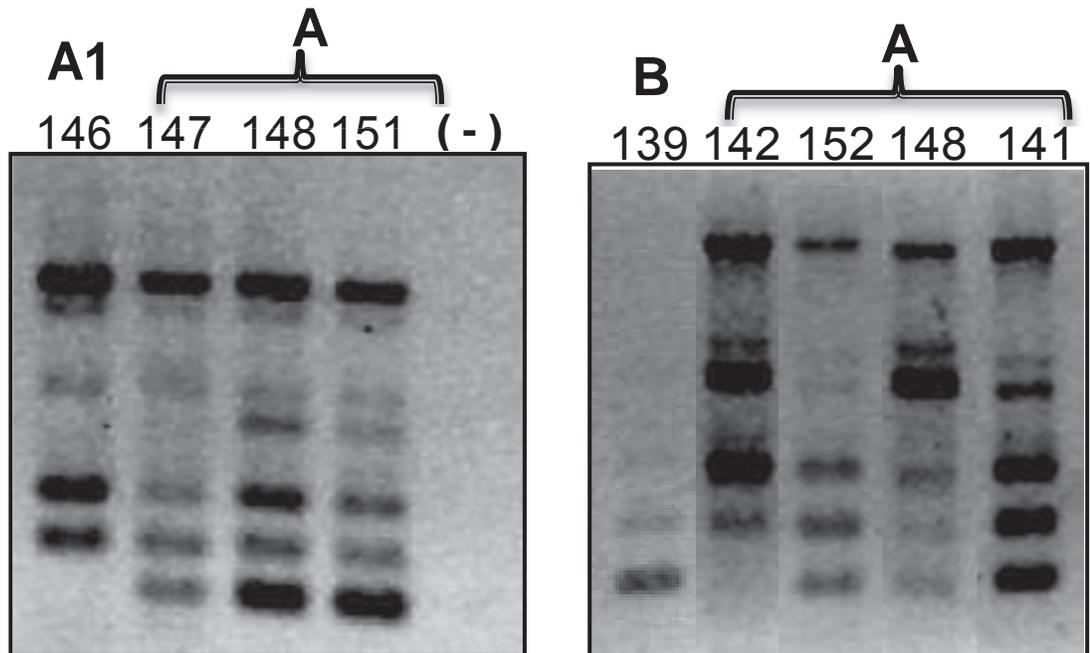
1. Evaluar si los plásmidos con secuencias *chrA* también poseen genes de resistencia a antibióticos o de virulencia.
2. Determinar si los genes *chrA* forman parte de transposones que pueden participar en la transferencia horizontal de los mismos.

## 12.- MATERIAL SUPLEMENTARIO

### APÉNDICE 1.- DIFERENCIACIÓN DE CLONAS POR PCR RAPD

Dado que las cepas de *P. aeruginosa* 139, 141, 142, 144, 146, 147, 148, 151 y 152 tuvieron valores de MIC a cromato muy similares (2.5 a 3.0 mM), presentaron resultados positivos de hibridación en colonia y además mostraron un plásmido del mismo tamaño (~40 kb), se procedió a realizar una diferenciación clonal para descartar que representaran una misma clona. Para esto se utilizó la técnica de PCR-RAPD descrita en materiales y métodos. La amplificación se llevó a cabo con DNA de las bacterias y el oligonucleótido 1254 (Tabla 3). Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y la diferenciación se realizó por comparación de los patrones de bandeo obtenidos.

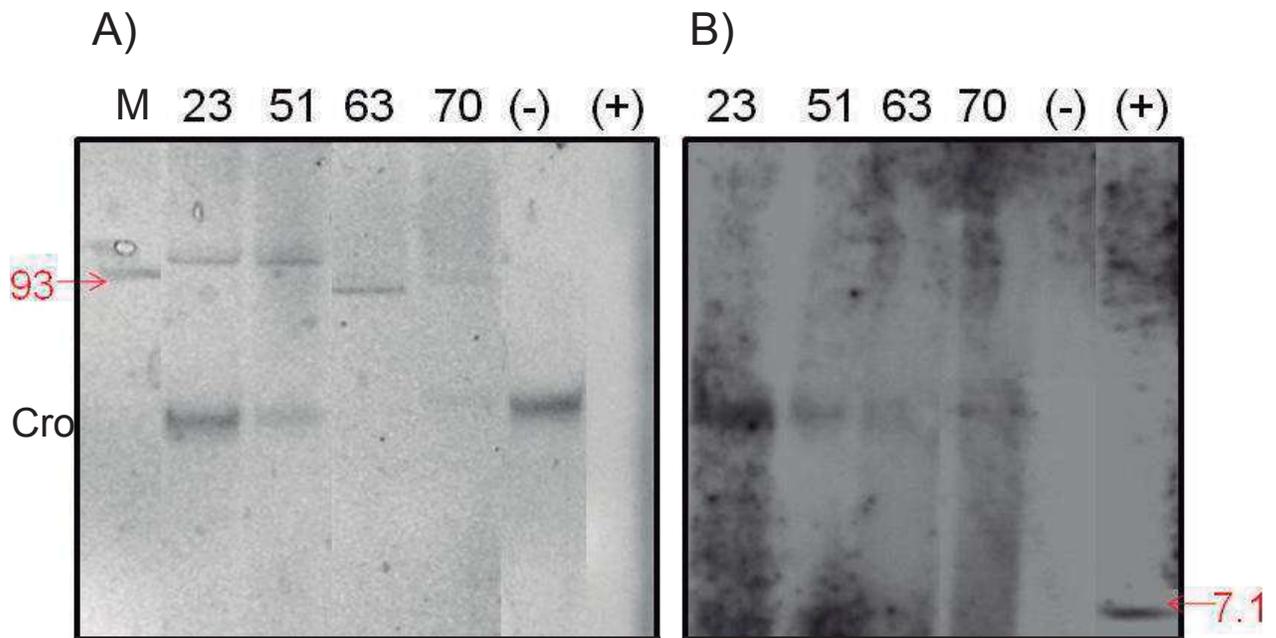
Los patrones de bandeo obtenidos oscilaron entre cinco y siete bandas (Figura A1). Al comparar dichos patrones se encontró que las cepas 141,142, 144, 147, 148, 151 y 152 presentan el mismo patrón de bandeo, por lo cual se consideraron una misma clona, que se denominó A. La cepa 146 presentó cinco bandas en común con el grupo de clonas A; sin embargo, careció de dos bandas más presentes en éstas, por lo cual se consideró como la subclona A1. Finalmente, la cepa 139 sólo compartió tres bandas con el resto de las cepas y se consideró clonalmente distinta al resto (clona B). En el grupo final de estudio sólo se incluyeron dos de las cepas clonalmente distintas entre sí (*P. aeruginosa* 139 y 152).



**Figura A1.-** Diferenciación de cepas de *P. aeruginosa* por PCR-RAPD. La amplificación se realizó con DNA de las cepas clínicas y el oligonucleótido 1254 (Tabla 3). Se muestran fotografías de geles de agarosa al 1% con los productos de amplificación obtenidos. Los números en los carriles corresponden a los asignados en la colección completa de cepas clínicas. A, grupo de clonas A; A1, subclona del grupo A; B, clona B; (-), control negativo (sin DNA molde).

## APÉNDICE 2.- HIBRIDACIÓN SOUTHERN DE CEPAS SIN SEÑAL EN PLÁSMIDOS

En la Figura A2 se muestran los resultados de hibridación Southern de las cepas *chrA*<sup>+</sup> que no presentaron señal de hibridación en bandas de plásmidos. Se encontró que las cepas de *K. pneumoniae* 63 y 70, que presentaron bandas de 85 y 95 kb, respectivamente (Figura 15), y las cepas de *P. aeruginosa* 23 y 51, con bandas de 100 kb (Figura 16), no presentaron señal de hibridación con la sonda *chrAc* en las bandas antes mencionadas. Las cepas de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* tampoco mostraron bandas de plásmidos con señal de hibridación (Datos no mostrados). Estos resultados indican que estas cepas no contienen plásmidos con secuencias *chrA*, por lo cual no fueron posteriormente incluidas en el resto del trabajo.



**FIGURA A2.- Hibridación Southern de cepas con señal en región del cromosoma.** A) Separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% de los productos de extracción de DNA por el método de Kiesser (1984). M, Marcador de tamaño molecular. Números en los carriles, DNA extraído de cepas de enterobacterias y *P. aeruginosa* como se indica en la Tabla 5. (-), *E. coli* DH5 $\alpha$ ; (+), pEPL1. Se indican con flechas las posiciones aproximadas del marcador R1 (93 kb) y del plásmido pEPL1 (7.1 kb); Cro, región del cromosoma. B) Autorradiografía de la hibridación a 60°C de la membrana correspondiente al gel del panel A) con la sonda *chrAc* marcada.

### 13.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abou-Shanab, R. A. I., van Berkum, P. y Angle, J. S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68: 360–367.
2. Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. y Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148: 2371–2381.
3. Aguilar-Barajas, E., Paluscio, E., Cervantes, C. y Rensing, C. (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella sp.* strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 285: 97-100.
4. Alonso, A., Sánchez, P. y Martínez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3: 1-9.
5. Bachmann, B. J., Low, K. B. y Taylor, A. L. (1976). Recalibrated linkage of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* 40: 116-167.
6. Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control* 6: 52–58.
7. Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. y McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *TRENDS Microbiol.* 14: 176-182.
8. Bogdanova, E. S., Bass, I. A., Minakhin, L. S., Petrova, M. A., Mindlin, Z., Volodin, A. A., Kalyaeva, E., Tiedje, J. M., Hobman, J. L., Brown, N. L.,

- Nikiforov, V. G. (1998). Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144: 609-620.
9. Branco, R., Chang, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element *TnOtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *J. Bacteriol.* 172: 287-291.
10. Bridgewater, L. C., Manning, F. C., Woo, E. S. y Patierno, S. R. (1994) DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium. *Mol. Carcinog.* 9: 122-133.
11. Cai, L., Lui, G., Rensing, C. y Wang, G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol.* 9: 1471-1480.
12. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. y Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63: 219-228.
13. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. y Denaire, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113: 229-242.
14. Cervantes C. y Campos-García J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. En *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Nies D. H. y Silver S. (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.407-417.
15. Cervantes C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. K. y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance

- determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172: 287-291.
16. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25: 335-347.
17. Chen, Y., Holtman, C. K., Magnuson, R. D., Youderian, P. A. y Golden, S. S. (2008). The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular fresh water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Plasmid 59: 176-192.
18. Díaz-Magaña, A., Aguilar-Barajas, E., Moreno-Sánchez, R., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., Vargas, E. y Cervantes, C. (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 191: 5441-5445.
19. Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A. y Riveros-Rosas, H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. FEBS J. 274: 6215-6227.
20. Diels, L. y Mergeay, M. (1990). DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1485-1491.
21. Espinal, P., Garza-Ramos, U., Reyna, F., Rojas-Moreno, T., Sánchez-Pérez, A., Carrillo, B., Martínez, P., Mattar, S. y Silva-Sánchez, J. (2010). Identification of SHV-type and CTX-M-12 extended-spectrum- $\beta$ -lactamases

- (ESBLs) in multiresistant *Enterobacteriaceae* from colombian caribbean hospitals. J. Chemother. 22: 160-164.
22. Garza-Ramos, U., Martínez-Romero, E. y Silva-Sánchez J. (2007). SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. Salud Pública Mex. 49: 415-421.
23. Garza-Ramos, U., Morfín-Otero, R., Sader, H. S., Jones, R. N., Hernández, E., Rodríguez-Noriega, E., Sánchez, A., Carrillo, B., Esparza-Ahumada, S. y Silva-Sanchez, J. (2008). Metallo- $\beta$ -lactamase gene *blaIMP-15* in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 2943–2946.
24. Garza-Ramos, U., Sánchez-Martínez, G., Barajas, J., Suarez, S., Sánchez, A., Rojas, T., Carrillo, B. y Silva-Sánchez, J. (2011). Variability of the *blaIMP-15*-containing integrons, highly related to In95, on an endemic clone of *Pseudomonas aeruginosa* in Mexico. Microb. Drug Resist. 16: 191-195.
25. Gupta, A., Phung, L. T., Taylor, D. E. y Silver, S. (2001). Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. Microbiology 147: 3393-3402.
26. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning: A practical approach. Glover, D. M. (Ed.) IRL Press, McLean, Virginia. pp. 109-135.

27. Harada, S., Ishii, Y. y Yamaguchi, K. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical, laboratory and therapy. *Korean J. Lab. Med.* 28: 401-412.
28. Henne, K. L., Nakatsu C. H., Thompson, D. K. y Konopka A. E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter sp.* strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiol.* 9: 199.
29. Hilton, A. C., Banks, J. G. y Penn, C. W. (1997). Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 243-248.
30. Hoadley, A. W. y McCoy E. (1968). Some observations on the ecology of *Pseudomonas aeruginosa* and its occurrence in the intestinal tracts of animals. *Cornell Vet.* 58: 354-63.
31. Holloway, B. W. (1969). Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol. Rev.* 33: 419-443.
32. Juhnke, S., Peitzsch, N., Hubener, N., Grobe, C. y Nies, D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179: 15–25.
33. Katz S. A. y Salem H. (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.
34. Khashim, D. I., Kumar, N. V. y Hussain, R. C. (1989). Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 742-746.
35. Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12: 10-36.

36. Kung, V. L., Ozer, E. A. y Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 621-641.
37. León-Márquez, Y. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de Maestría en Biología Experimental, IIQB-UMSNH.
38. Luna-Luna, M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de Maestría en Biología Experimental, IIQB-UMSNH.
39. Ma, Y. F., Wu, J. F., Wang, S. Y., Jiang, C. Y., Zhang, Y., Qi, S. W., Liu, L., Zhao, G. P., Liu, S. J. (2007). Nucleotide sequence of plasmid pCNB-1 from *Comamonas* strain CNB-1 reveals novel genetic organization and evolution for 4-chloronitrobenzene degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4477-4483.
40. Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S. y Speert D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1129-1135.
41. Malik, A. y Aleem, A. (2010). Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas spp.* from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ. Monit. Assess.* 10: 1007-1021.
42. Mata, M. T., Baquero, F. y Pérez-Díaz, J.C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 185-188.
43. McGrath, S. P. y Smith, S. (1990). Chromium and nickel. En: Heavy metals in soils. Alloway, B. J. (Ed.) Wiley, New York. pp.125-150.

44. Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123: 626-633.
45. Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., Kotsakis, S. D., Loli, A., Tzelepi, E., Legakis, N. J. y Tzouvelekis, L. S. (2010). Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the *bla*VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4497–4502.
46. Nies, A., Nies, D. H. y Silver, S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265: 5648-5653.
47. Nies, D. H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M. H. Jr. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180: 5799-5802.
48. Pagotto, F. y Dillon J. (2001). Multiple origins and replication proteins influence biological properties of  $\beta$ -lactamase-producing plasmids from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 183: 5472–5481.
49. Percival, S. L., Bowler, P. G. y Russell, D. (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60: 1-7.
50. Pérez-López, E. (2001). Expresión de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría en Biología Experimental, IIQB-UMSNH.
51. Pimentel, B. E., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes C. (2002). Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 249-254.

52. Plaper, A., Jenko-Brinovec, S., Premzl, A., Kos, J., Raspor, P. (2002). Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chem. Res. Toxicol.* 15:943–949.
53. Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., y Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3325–3327.
54. Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. y Rensing C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid* 66: 7-18.
55. Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-332.
56. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
57. Shi, X. y Dalal, N. S. (1990). On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 342–350.
58. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. y de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 434-452.
59. Spain, A. (2003). Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. Undergrad. Res.* 2: 1-6.

60. Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J. y Top, E. M. (2010). Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J. Bacteriol.* 192: 6045-6055.
61. Tato, M., Coque, T. M., Baquero F. y Cantón, F. (2010). Dispersal of carbapenemase *blaVIM-1* gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 320-327.
62. Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, A., Goesmann, A., Meyer, F. y Pühler, A. (2003). The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an INcP-1 $\beta$  backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *blaNPS-1*, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol. Gen. Genomics* 268: 570-584.
63. Trajanovska, S., Britz, M. L. y Bhave, M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation* 8: 113-124.
64. Van Bambeke, F., Balzi E. y Tulkens, P. M., (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60: 457-470.
65. Vasconcelos-Morais, P., Branco, R. y Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant?. *Biometals* 24: 401-410.
66. Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M. J. y Livermore, D. M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the

international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4472–4482.

67. Zaneveld, J. R., Nemergut, D. R. y Knight, R. (2008). Are all horizontal gene transfers created equal?. Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology* 154: 1-15.

68. Zhao, F., Bai, J., Wu, J., Liu, J., Zhou, M., Xia, S., Wang, S., Yao, X., Yi, H., Lin, M., Gao, S., Zhou, T., Xu, Z., Niu, Y. y Bao, Q. (2010). Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE* 5: e10141. doi:10.1371.