

Caracterización de los plásmidos de cepas de *Escherichia coli* aislados de coprocultivos de niños sanos

Characterization of plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from stool culture of healthy children

Andreína Fernandes¹, Sandra Fernández², Guillermina Alonso^{3*}

RESUMEN

La microbiota intestinal representa una reserva potencial de organismos resistentes a los antimicrobianos, y el sitio donde los genes de resistencia pueden ser transferidos desde la microbiota comensal a los microorganismos virulentos. En este trabajo se caracterizaron los perfiles fenotípicos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos, en aislados de *Escherichia coli*, obtenidos de niños sanos, menores de 5 años de edad, y la capacidad de transmisibilidad de esos determinantes de resistencia, mediante ensayos de conjugación. Los aislados de *E. coli* se obtuvieron partir de coprocultivos de niños sanos mediante el uso de placas de Mc Conkey suplementadas con ampicilina y se les determinó el perfil de resistencia a diversos antibióticos, para luego realizar ensayos de conjugación. A partir de 90 coprocultivos, fueron aisladas 33 cepas de *E. coli* resistentes a algún antibiótico, presentándose un 66,6% del total de las cepas resistentes en al menos dos antibióticos. Luego de los ensayos de conjugación, se encontró que un 47,4% de las cepas presenta plásmidos conjugativos, transfiriendo marcadores de resistencia. Los patrones generados por enzimas de restricción fueron distintos entre ellos. Estos resultados nos permiten sugerir que estos elementos extracromosomales sean los responsables de la rápida diseminación de la resistencia a los antimicrobianos en la población bacteriana de niños sanos.

Palabras clave: *E. coli*, resistencia, antibióticos, plásmidos, conjugación bacteriana.

ABSTRACT

Gastrointestinal microbiota represents the potential reserve of antimicrobial-resistant organisms, and the site where resistance genes can be transferred from the commensally microbiota to virulent microorganisms. In this work we characterized the phenotypic resistance profiles to various antimicrobial agents in strains of *Escherichia coli* isolated from healthy children, less than 5 years of age, and the ability of these determinants of resistance to be mobilized by conjugation. The isolation of *E. coli* strains from stool culture from healthy children was made through the use of Mc Conkey media supplemented with ampicillin. The profile of resistance to various antibiotics was determined and then conjugation was carried out. From 90-stool culture 33 strains of *E. coli* resistant to some antibiotic were isolated, 63.6% of bacteria were resistant to -at least- two antibiotic. It have be demonstrated that 47.4% of the isolates harbored conjugative plasmids, which can mobilize markers of resistance. Restriction profiles analysis showed that all patterns were different. These results allow us to suggest that these extrachromosomal elements are responsible for the rapid spread of resistance to antimicrobials in the bacterial population of healthy children.

Key words: *E. coli*, resistance, antibiotics, plasmids, bacterial conjugation

1. Instituto de Investigaciones Odontológicas Raúl Vincentelli, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47114 Caracas 1041A, Venezuela. Teléfono: 58-212- 6053876. E-mail: andreinafernades@yahoo.es

2. Sección de Microbiología y Biología Molecular, Centro Médico Docente La Trinidad. Avenida Intercomunal La Trinidad, El Hatillo, Apartado Postal 80474. Caracas, Venezuela 1080-A. Teléfono 58-212-9496699. E-mail: sfernandez@cmdlt.edu.ve

3. Laboratorio de Biología de Plásmidos. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Apartado 47114 Caracas 1041A, Venezuela. Teléfono: 58-212-7510766 - 7510377, Fax: 58-212-7535897. E-mail: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve*

* Autor para correspondencia.

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal coloniza el intestino desde el nacimiento y permanece allí durante toda la vida del individuo. Las principales funciones de los microorganismos presentes incluyen diversas actividades metabólicas, como la producción de ácidos grasos de cadena corta y la absorción de nutrientes, además de participar en el establecimiento de la estructura y función del sistema inmunitario, y protegen al huésped frente a la invasión de microorganismos patógenos¹. A pesar que antes se pensaba que la microbiota intestinal estaba conformada por 500 a 1.000 especies de microorganismos, un estudio reciente ha estimado que la microflora del intestino humano está compuesta por más de 35.000 especies bacterianas².

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa y glucosa, que habita el tracto intestinal humano y es frecuentemente aislado en laboratorios clínicos. Puede causar una gran variedad de infecciones, incluyendo las del tracto urinario, bacteriemias, meningitis en recién nacidos y diarreas³. Es una de las primeras especies bacterianas que colonizan el intestino del recién nacido y se ha determinado que algunas cepas de *E. coli* persisten en la microbiota intestinal de un individuo durante meses o años, siendo identificadas como cepas residentes, mientras que otras desaparecen en pocas semanas, identificadas como cepas transitorias⁴.

La composición y características de la microbiota intestinal se pueden ver afectada por el consumo de antibióticos, dependiendo del tipo y de los diferentes espectros de acción de cada uno de los agentes⁵. Al incrementar la frecuencia en el uso de los antibióticos, también aumenta la velocidad de desarrollo y selección de organismos resistentes a los mismos, reduciendo la efectividad de los antibióticos⁶. La microbiota intestinal representa una gran reserva potencial de organismos resistentes a los antimicrobianos, pero también puede ser la población desde la cual los genes de resistencia pueden ser transferidos a los microorganismos patógenos, por lo que es necesario determinar la frecuencia de aparición de cepas resistentes en individuos sanos que no están siendo sometidos a tratamientos con antimicrobianos⁷.

La emergencia y diseminación de la resistencia bacteriana es considerada un problema de salud pública complejo, y en el cual los elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones juegan un papel importante⁸. La resistencia suele asociarse con mayor frecuencia a la expresión de genes presentes en plásmidos, los cuales son elementos claves en la transmisión horizontal de la información genética, debido a que son capaces de propagar la resistencia a los antibióticos entre los miembros de una misma o diferente especie⁹.

Los plásmidos son moléculas de DNA circulares, que se encuentran separadas del cromosoma de la célula, y que pueden ser portadoras de una amplia variedad de determinantes genéticos que favorecen la sobrevivencia en un ambiente adverso, o le proporciona una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma o diferente especie¹⁰. Muchas bacterias adquieren la resistencia a los antibióticos gracias a la adquisición de plásmidos que codifican proteínas mediadoras de resistencia, y permiten la diseminación de estos genes entre diversas poblaciones bacterianas¹¹.

La conjugación es uno de los mecanismos principales responsable de la transferencia horizontal de genes. Este proceso además de proveer ventajas competitivas a la bacteria, también ocasiona serias implicaciones en la Salud Pública, ya que promueve el mantenimiento y la dispersión de genes que codifican resistencia a los diversos agentes antimicrobianos¹². Estos sistemas plasmídicos también pueden ser los responsables principales de la aparición y dispersión de bacterias resistentes a múltiples antibióticos. Su caracterización y estudio representan un tópico fundamental para el control del problema creciente de la multiresistencia, y ha sido objeto de diversos estudios^{12, 13}. Sin ninguna duda, la dispersión de genes de resistencia mediada por plásmidos entre bacterias de diferentes géneros es uno de los ejemplos más impresionantes de la plasticidad bacteriana en respuesta a diferentes presiones selectivas¹⁴.

En este estudio nos planteamos caracterizar los perfiles fenotípicos de resistencia a los diversos agentes antimicrobianos en aislados de *E. coli*,

obtenidos a partir de niños sanos menores de 5 años de edad, así como también caracterizar la capacidad de trasmisibilidad de esos determinantes de resistencia.

Los resultados demuestran la presencia de bacterias con genes, cuyos productos capacitan a la célula a resistir el efecto de diversos antibióticos. Estos genes están en moléculas transmisibles, representando una vía de diseminación de éstas características.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Prospectivo, descriptivo, observacional, transversal.

Población de estudio

Para el desarrollo de este estudio, se seleccionaron y analizaron 90 coprocultivos correspondientes a las muestras de heces, procedentes de niños menores de 5 años, que asistieron a consulta control de niños sanos, en un Centro de Salud Privado, el Centro Médico Docente La Trinidad (CMDLT), de Caracas, Venezuela, entre los meses de abril y agosto de 2006.

Muestra de estudio

53 cepas de *E. coli* aisladas de coprocultivos correspondientes a las muestras de heces, procedentes de niños menores de 5 años, que asistieron a consulta control de niños sanos, en el CMDLT. Las muestras se obtuvieron por la colaboración del personal de la Sección de Microbiología y Biología Molecular del CMDLT.

Medios de cultivo

Para el crecimiento bacteriano se emplearon los medios Luria-Bertani (LB) y Mc Conkey (McK) (OXOID, England), suplementado con ampicilina (AMP) (1 mg.ml⁻¹), en base a las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para *E. coli*, según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para la identificación microbiológica se utilizaron los medios Agar Hierro de Kligler (KIA) (BBLTM, USA), Agar citrato de Simmons (BBLTM, USA), Medio movilidad-indol-ornitina (MIO) (DIFCOTM, USA), Agar lisina hierro (LIA) (BBLTM, USA) y Caldo urea (DIFCOTM, USA). Para la realización del antibiograma se empleó el medio Mueller-Hinton (OXOID, England).

Perfiles de resistencia

Para la determinación de los diferentes fenotipos de resistencia, se realizó un antibiograma según lo establecido por la Prueba de Susceptibilidad de Bauer y col.¹⁵, utilizando los siguientes antibióticos (OXOID, England): ampicilina (AMP) 10 µg; trimetoprim / sulfametoxazol (SXT) 1,25/23,75 µg; ácido nalidíxico (NAL) 30 µg; amikacina (AMK) 30 µg; tobramicina (TOB) 10 µg; cefamandole (MA) 30 µg; cefuroxima (CXM) 30 µg; cefotaxima (CTX) 30 µg; ceftazidima (CAZ) 30 µg; amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 20/10 µg. las cepas fueron clasificadas como resistentes según los criterios interpretativos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio¹⁶.

Conjugaciones

El ensayo de conjugación bacteriana, se realizó en medio líquido, utilizando como donantes a los aislados de *E. coli* recolectadas en el CMDLT. Como cepa receptora se utilizó la *E. coli* J62-2, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM, Cat. No.131)¹⁷, de genotipo F-, his, lac, pro, trp, RIFR. Ambas cepas se cultivaron en értulas de vidrio con caldo LB, a pH 7,2, 37 °C y durante 4 horas en agitación. Se tomaron 0,4 ml de la cepa receptora y 0,1 ml de cepa donante y se colocaron en un Eppendorf con 0,5 ml de caldo LB para hacer la mezcla de conjugación. Para seleccionar las transconjugantes, se sembraron en placas de agar LB, suplementado con ampicilina (150 µg/mL) y rifampicina (80 µg/mL).

Para determinar la frecuencia de conjugación, se calculó el título de la cepa donante y el título de las transconjugantes, utilizando la siguiente fórmula: Título (células / ml) = (número de colonias x factor de dilución)/Volumen de siembra; para luego, calcular la frecuencia de transferencia: Frecuencia de transferencia = (título de transconjugantes)/título de donantes.

Con el fin de verificar si junto con el marcador de selección de la transferencia se transfirieron otros marcadores, se les probó a las transconjugantes la resistencia a los antibióticos a los cuales la donante era resistente, utilizando placas de agar LB con los antibióticos correspondientes.

Extracción de plásmidos

El DNA plasmídico fue extraído por el método modificado de lisis alcalina y almacenado a - 20°C⁽¹⁰⁾.

Digestión con enzimas de restricción

El DNA plasmídico aislado de las cepas transconjugantes se digirió con dos enzimas, para determinar el mejor patrón (EcoRI (Invitrogen) y BamHI (Invitrogen). Luego de establecidas las condiciones adecuadas de buffer, temperatura y tiempo de reacción, se realizaron digestiones siguiendo los protocolos estándares¹⁸. Para ello, se añadieron las unidades de enzima necesarias (una unidad enzimática de restricción es definida como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 µg de DNA, a la temperatura óptima de las enzimas, durante una hora). Esta mezcla se incubó toda la noche a 37 °C. Para detener la reacción, se inactivaron ambas enzimas a una temperatura de 65 °C, durante 10 minutos.

Electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de amplificación de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,9% con búffer TBE 1X y teñidos con una solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 minutos. El registro fotográfico se realizó en el equipo Gel Doc (Biorad) con el programa Multi - Analyst.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis descriptivos, utilizando medidas de tendencia central y de dispersión (media, desviación típica) en el caso de variables continuas y análisis de frecuencia y tablas de contingencia en el caso de las variables discretas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Microsoft Excel.

RESULTADOS

Población de estudio

Se analizaron muestras provenientes de heces de 90 niños, menores de 5 años de edad, que asistieron a consulta control en el CMDLT. La población infantil que asistió a control no presentaba ningún síntoma de la presencia de una infección. Se seleccionaron las muestras de la población con edades comprendidas entre los 0 a 5 años, sin discriminación de sexo. Estos datos son mostrados en la **tabla 1**. El rango predominante de edad de los niños estuvo entre 12 y 24 meses de edad, con un promedio de 19,5 meses. Al realizar la discriminación entre sexos, encontramos que, del total de los coprocultivos, un 56,7% provenía de pacientes de sexo masculino, mientras que el 43,3% restante provenía de pacientes de sexo femenino.

| Edad (MESES) | SEXO | |
|-----------------|----------------|----------------|
| | F ^a | M ^b |
| 3 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 2 |
| 5 | 1 | 1 |
| 6 | 0 | 0 |
| 7 | 3 | 0 |
| 8 | 1 | 4 |
| 9 | 3 | 1 |
| 10 | 1 | 5 |
| 11 | 1 | 3 |
| 12 | 12 | 13 |
| 24 | 6 | 13 |
| 36 | 6 | 3 |
| 48 | 0 | 3 |
| 60 | 3 | 2 |
| TOTAL | 39 | 51 |

a: femenino; b: masculino

TABLA 1. DATOS DE LOS PACIENTES A PARTIR DE LOS CUALES SE OBTUVIERON LOS AISLAMIENTOS DE CEPAS DE *E. coli*, REALIZADOS A PARTIR DE COPROCULTIVOS DE MUESTRAS DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS.

De los 90 coprocultivos iniciales analizados, fueron aisladas 87 cepas presuntivas de *E. coli* en las placas de Mc Conkey suplementadas con amplicilina (96,7%). Las 3 muestras restantes no presentaron crecimiento en este medio de selección.

Identificación bioquímica

De las 87 cepas presuntivas, fueron identificadas 33 como *E. coli* en base a sus funciones metabólicas, utilizando pruebas bioquímicas, seleccionadas según las características del microorganismo de estudio, representando el 37,9% (33/87). Para ello, se dispuso de una variedad de pruebas diferenciales y de numerosos esquemas para la identificación final del microorganismo. En este trabajo se utilizaron las de uso rutinario en el CMDLT.

Perfiles de resistencia

De los 33 aislados de *E. coli*, se obtuvieron distintos perfiles de resistencia a los antibióticos que permitió agruparlas por fenotipos enumerados del I al IV (**Tabla 2**). Las cepas que presentaron sensibilidad a los antimicrobianos ensayados, o presentaron niveles de resistencia catalogados como intermedia para un solo compuesto no

fueron considerados candidatos para las pruebas de conjugación. El fenotipo II (AMPr, SXT^r) fue encontrado en 21 cepas (63,6%), siendo este el más frecuente en la población estudiada. Se aisló

| FENOTIPO | PERFIL DE RESISTENCIA | NÚMERO DE AISLADOS |
|----------|---|--------------------|
| I | AMP ^a | 7 |
| II | AMP, SXT ^b | 21 |
| III | AMP, SXT, NAL ^c , TOB ^d | 4 |
| IV | AMP, SXT, MA ^e , CXM ^f , AMC ^g | 1 |

TABLA 2.- FENOTIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE *E. coli*, AISLADAS DE LOS COPROCULTIVOS DE MUESTRAS DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS.

una cepa con resistencia a AMP, SXT, MA, CXM y AMC, siendo portadora de una betalactamasa, proveniente de un paciente de 2 años. Al calcular la frecuencia de resistencia para cada antibiótico, encontramos que SXT estuvo presente en 78,8% de los aislados (26/33), seguido de NA y TOB con 12,12% (4/33) cada uno, y MA, CXM y AMC con 3,03% (1/33) cada uno, considerando que todas las cepas son resistentes a AMP.

Conjugaciones

Los resultados de las conjugaciones demostraron que un 54,5% (18/33) de los aislados presentaban plásmidos movilizables, los cuales fueron transferidos bajo las condiciones ensayadas de conjugación, observándose la frecuencia de transferencia con los valores más elevados en 10^{-2} transconjugantes/célula donante, el cual es

considerado relativamente alto y representa un peligro potencial para la diseminación de estos determinantes de resistencia.

Además de corroborar la transferencia del marcador de resistencia seleccionado, se realizaron pruebas de cotransferencia de otros marcadores de resistencia a las células transconjugantes, obteniéndose que cinco de las dieciocho cepas recibieron otro determinante de resistencia a antibióticos, representando un 27,8% del total. El marcador de resistencia cotransferido con el de ampicilina fue SXT, lo que se corresponde con las resistencias reportadas previamente en las muestras del CMDLT (**Tabla 2**). Ningún marcador que confiera resistencia a quinolonas, cefalosporinas o inhibidor de betalactamasas fue cotransferido.

Análisis de los plásmidos

Los resultados demostraron que un 76,3% de las cepas presentaron moléculas plasmídicas. El 20,7% presentaron, al menos, un plásmido de elevado peso molecular y el 79,31% más de una molécula plasmídica, llegando a identificarse hasta siete plásmidos en una sola cepa. En las cepas transconjugantes se observó que aunque no todos los plásmidos fueron cotransferidos durante los ensayos de conjugación, todas las donantes transfirieron, al menos, un plásmido de alto peso molecular a la cepa receptora (**Figura 1**).

Dado que la población estudiada se domicilia en zonas cercanas y pueden asistir al mismo cen-

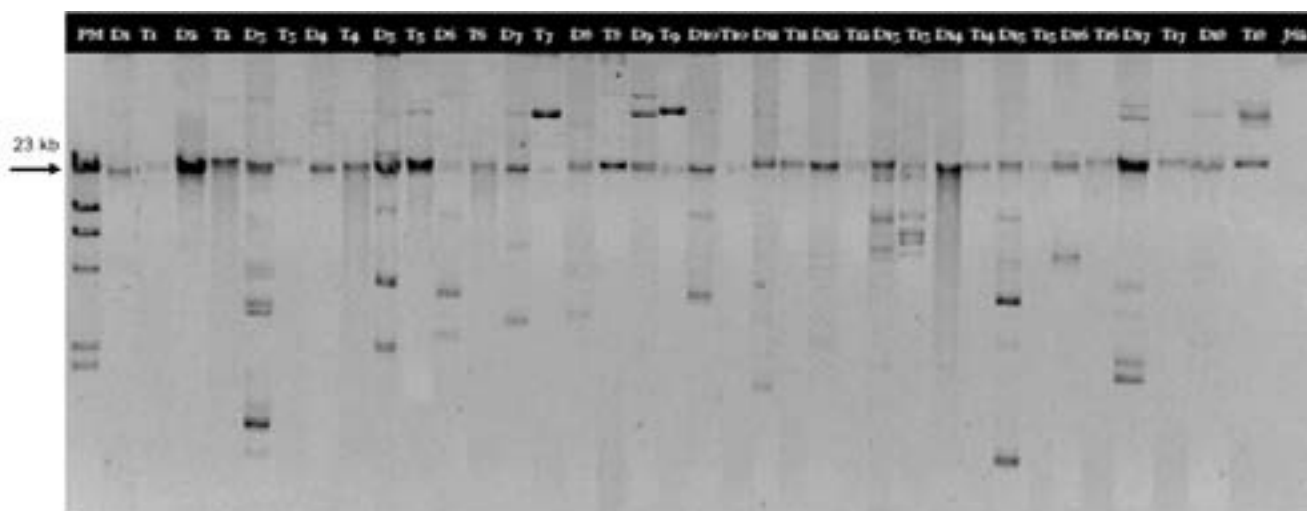


Figura 1. Registro fotográfico de la corrida electroforética de los aislamientos plasmídicos de las cepas de *Escherichia coli* y de las transconjugantes obtenidas. PM: marcador de peso molecular; D: donante; T: transconjugante; 1: 3117; 2: 3153; 3: 3156; 4: 3231; 5: 3427; 6: 3507; 7: 3898; 8: 3983; 9: 4154; 10: 4170; 11: 4196; 12: 4243; 13: 4398; 14: 4420; 15: 4788; 16: 4877; 17: 4878; 18: 5121.

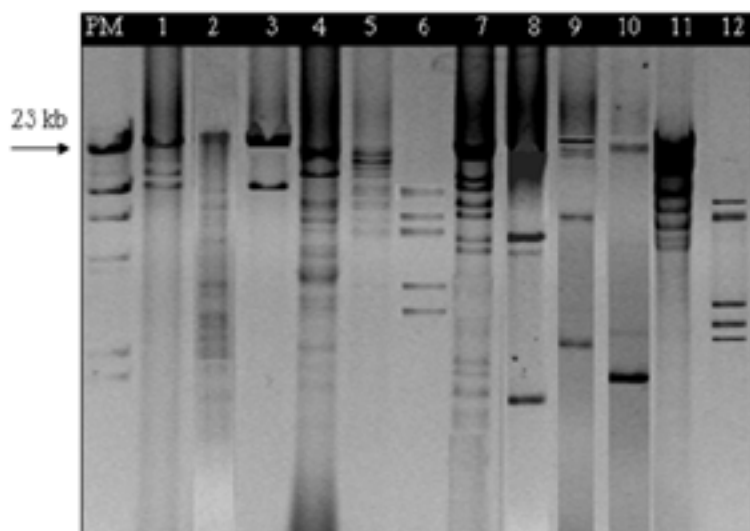


Figura 2.- Registro fotográfico de la corrida electroforética de las digestiones plasmídicas de las transconjugantes, con EcoRI. PM: marcador de peso molecular; 1: 3153; 2: 3156; 3: 3231; 4: 3427; 5: 3507; 6: 3898; 7: 3983; 8: 4154; 9: 4196; 10: 4243; 11: 4420; 12: 5121.

tro educativo, decidimos analizar los plásmidos aislados de las cepas transconjugantes y determinar si se trataba de la misma molécula o de plásmidos distintos, relacionados o no. Para esto se analizó el patrón de bandas obtenido luego de la digestión con la enzima de restricción BamHI (resultados no mostrados) y EcoRI (**Figura 2**). El análisis de los resultados reveló la presencia de patrones únicos, todos diferentes entre sí.

DISCUSIÓN

Durante el embarazo, los bebés presentan un intestino estéril. Luego del nacimiento, comienza la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal contribuyendo con el mantenimiento de la barrera mucosa del intestino, facilitando la asimilación de carbohidratos y modulando el sistema inmune de la mucosa intestinal¹⁹. Estudios recientes han demostrado que tratamientos con antibióticos parenterales a corto plazo en recién nacidos causan alteraciones significativas en la composición de la microbiota intestinal, incluyendo alteraciones en los patrones de colonización esperados por Bifidobacterias. La colonización del intestino en las primeras etapas de la vida tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema inmune y el uso de antibióticos puede incrementar el riesgo de atopia y asma alérgica, debido a la reducción del efecto protector de la exposición bacteriana²⁰. Un estudio multicéntrico encontró asociación entre el uso de antibióticos durante el primer año de vida y los síntomas de asma, rinoconjuntivitis y eczema en niños entre 6 y 7 años²¹.

En nuestro estudio se identificó cerca del 40% de las cepas aisladas de los coprocultivos de niños sanos como *E. coli*, corroborando que esta bacteria forma parte de la microbiota habitual del sistema gastrointestinal de los humanos, incluyendo a niños de cortas edades, recordando que se utilizó un medio suplementado con AMP para el aislamiento primario. La microbiota intestinal no patógena de individuos de la población en general puede representar una enorme reserva de genes de resistencia, los cuales son potencialmente transferibles a microorganismos virulentos.

Las pruebas de susceptibilidad demostraron que las cepas de *E. coli* presentan un alto porcentaje de resistencia a ampicilina al SXT, además de la resistencia a AMP (**Tabla 2**). Este fenotipo fue identificado principalmente en aislados de niños entre cinco y ocho meses de edad, y llama la atención que niños de tan corta edad ya presentan bacterias de su microbiota habitual con resistencia a dos antibióticos de familias distintas. No hubo una diferencia significativa entre los porcentajes de resistencia y el sexo de los niños.

Se ha reportado que tanto en pacientes hospitalizados como en individuos sanos, en diversas áreas de países en vías de desarrollo y desarrollados, están presentes con una alta frecuencia, bacterias Gram negativas aisladas de la microbiota fecal con resistencia a uno o más antibióticos⁷. Bartoloni y colaboradores reportaron en una población infantil de Bolivia que 97% de las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces son resistentes a alguno de los doce antibióticos ensayados por los autores²². Literak y colaboradores comparan la presencia de cepas de *E. coli* aisladas de hisopados anales en niños de 6 semanas y niños entre 6 y 17 años, reportando resistencia hasta en 36% y 24%, respectivamente, siendo la resistencia a AMP la más frecuente²³. Stoesser y colaboradores reportan 23% de Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de muestras fecales de niños menores de 6 años, de las cuales, 78% fueron identificadas como *E. coli*²⁴. Todos estos reportes están en concordancia con los resultados presentados en este trabajo.

La conjugación es considerada como el mecanismo de transferencia de material genético más so-

fisticado y complejo, y con un mayor espectro de acción sobre el flujo de genes entre las bacterias, siendo una de las principales causas de la evolución y diversidad genética que existe entre los microorganismos bacterianos¹².

Debido al uso y abuso de los antibióticos como agentes profilácticos y terapéuticos, los hospitales funcionan como agentes selectores y reservorios de organismos resistentes, promoviendo la transmisión cruzada de cepas resistentes por la eliminación de la microbiota habitual debido al uso de los antimicrobianos, aumentando la susceptibilidad de los pacientes a ser colonizados por organismos resistentes²⁵. Sin embargo, también se ha determinado que la microbiota de pacientes sanos, no hospitalizados, puede ser reservorio y fuente de diseminación de estas características.

Generalmente los genes que codifican las enzimas que confieren resistencia a los antimicrobianos están codificados en plásmidos, los cuales tienen la potencialidad de provocar una transmisión horizontal de la resistencia, creando problemas epidemiológicos importantes²⁶. Vinué y colaboradores reportan altos porcentajes de multiresistencia en cepas de *E. coli* aisladas en España a partir de personas sanas²⁷ y Mshana y colaboradores reportaron la asociación de la resistencia a CTX con un plásmido conjugativo de 145,5 Kb, detectado en el 65% de cepas de *E. coli* aisladas de distintas localizaciones anatómicas²⁸. Pallecchi y colaboradores caracterizaron dos plásmidos que portan un determinante de resistencia para quinolonas, en cepas de *E. coli*, aisladas de niños sanos de áreas urbanas de Perú y Bolivia²⁹. Literak²³ y Stoesser²⁴ reportan la presencia de plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* aislados de niños sanos, indicando la presencia de genes blaTEM, blaSXH y blaCTX-M1 asociada a la resistencia a AMP. En Venezuela, se ha determinado en aislados nosocomiales, la presencia de plásmidos auto-transmisibles y co-transferibles, de distintos tamaños, que exhibían complejos patrones de resistencia a antibióticos, expresando simultáneamente hasta diez determinantes de resistencia^{12, 26, 30}.

Usualmente, los plásmidos aislados de bacterias presentes en pacientes hospitalizados en centros de salud comparten similitudes, revelando altos niveles de relaciones genéticas, y que permiten

agruparlos en base a los perfiles de restricción, sugiriendo la movilización de estas moléculas entre los géneros bacterianos. Según los resultados de nuestro trabajo, los plásmidos presentes en los aislados obtenidos a partir de pacientes sanos ambulatorios, no presentan relaciones entre ellos. Esto nos permite sugerir que el papel de estos plásmidos en la movilización de los diferentes marcadores se restringe a la microbiota bacteriana del individuo portador.

Nuestros resultados en conjunto, indican que en las muestras analizadas provenientes de niños sanos menores de cinco años, existe un alto porcentaje de cepas de *E. coli* con resistencia a SXT. Además, estas cepas presentan plásmidos conjugativos que portan varios marcadores de resistencia a los antibióticos de uso común. Este trabajo representa el primer estudio en nuestro país basado en la caracterización de los plásmidos conjugativos aislados de muestras de la comunidad provenientes de niños sanos y, por lo tanto, no se pueden realizar aproximaciones de mejora o no en relación al problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos. Por lo tanto recomendamos continuar con los análisis de este tipo para establecer puntos de comparación.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Sección de Microbiología y Biología Molecular, del Centro Médico Docente La Trinidad, por la colaboración y el apoyo brindado.

Financiamiento: Proyecto PEII No. 2012000977 a G.A.

REFERENCIAS

1. Moreno J. Flora bacteriana intestinal. An Pediatr. Monografías. 2006; 4:12-19.
2. Jandhyala S, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy N. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015; 21(29):8787-8803.
3. Bartlet M. Enterobacteriaceae. In Diagnostic Bacteriology. A Study Guide. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2000. 123-151.
4. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard I, Aberg N, Wold A, et al. Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. Pediatr Res. 2003; 54(1):8-14.

5. Sakata H, Fujita K, Yoshioka H. The effect of the antimicrobial agents on fecal flora of children. *Antimicrob Agent Chemother.* 1986; 29:225-229.
6. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70:1060-1075.
7. Calva J, Sifuentes – Osornio J, Cerón C. Antimicrobial resistance in fecal flora: Longitudinal community – based surveillance of children from urban Mexico. *Antimicrob Agent Chemother.* 1996; 40:1699-1702.
8. González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M. Integrones y cassettes génicos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Med Chil.* 2004; 132:619-626.
9. Guzmán M, Alonso G. Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2008; 28:105-109.
10. Rivas J, Redondo C, Alonso G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act Cient Soc Venez Bioanal Espec.* 2006; 9:3-7.
11. DeNap J, Thomas J, Musk D, Hergenrother P. Combating drug resistance bacteria: small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 126:15402-15404.
12. Redondo C, Alonso G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 27:100-107.
13. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruíz J, Zarazaga M, et al. Mechanisms of resistance in multiple – antibiotic – resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob Agent Chemother.* 2004; 48:3996-4001.
14. Smalla K, Jechalke S, Top E. Plasmid detection, characterization and ecology. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(1): PLAS-0038-2014.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966 (45):493-6
16. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Information Supplement. Vol. 30. Document M100-S20, Wayne, PA; 2017.
17. Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. En: http://cvcm.ciens.ucv.ve/cvcm/CVCM_2009.htm. (Consultado el 23 de Marzo de 2007).
18. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning a laboratory manual. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
19. Songjinda P, Nakayama J, Kuroki Y, Tanaka S, Fukuda S, et al. Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69:638-641.
20. Power S, O'Toole P, Stanton C, Ross P, Fitzgerald G. Intestinal microbiota, diet and health. *British J Nut.* 2014; 111:387-402.
21. Foliaki S, Pearce N, Björkstén B, Mallol J, Montefort S, von Mutius E. Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old: International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124(5):982-989.
22. Bartoloni A, Cutts F, Leoni S, Austin C, Mantella A, Roselli M, et al. Patterns of antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia. *Trop Med Int Health.* 1998; 3:116-123.
23. Literak I, Petro R, Dolejska M, Gruberova E, Dobiasova H, Petr J, et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6):3005-3007.
24. Stoesser N, Xayaheuang S, Vongsouvath M, Phommason K, Elliot I, Elias C, et al. Colonization with Enterobacteriaceae producing ESBLs in children attending pre-school childcare facilities in the Lao People's Democratic Republic. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70:1893-1897.
25. Roghmann M, McGrail L. Novel ways of preventing antibiotic-resistance infections: What might the future hold? *Am J Infect Control.* 2006; 34:469-474.
26. Guzmán M, Alonso G. Caracterización de Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela. *Invest Clin.* 2009; 50:419-431.
27. Vinué L, Sáenz Y, Somalo S, Escudero E, Moreno M, Luiz-Larrea F, et al. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:934-937.
28. Mshana S, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Dörmann E, Chakraborty. Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:97. Doi : 10.1186/1471-2334-9-97.
29. Pallecchi L, Riccobono E, Sennati S, Mantella A, Bartalesi F, Trigosso C, et al. Characterization of small Co-

IE-Like plasmids mediating widespread dissemination of the qnrB19 gene in commensal Enterobacteria. *Antimicrob Agent Chemother.* 2010; 54:678–682.

30. Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2005; 25:29-34.