



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PLASMIDOS DE RESISTENCIA A AGENTES
QUIMIOTERAPEUTICOS EN CEPAS ENTEROTO-
XIGENICAS DE *Escherichia coli*, AISLADAS DE
LECHONES, EN MEXICO

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
QUE PRESENTA
ELVIRA NADER GARCIA

ASESOR:

DR. JOSE LOPEZ-ALVAREZ

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Material y Métodos	5
Resultados	13
Discusión	21
Literatura Citada	24

RESUMEN

Utilizando antibióticos como promotores del crecimiento en el alimento para animales, se presenta el riesgo de seleccionar cepas enteropatógenas de E. coli resistentes a los mismos y a otros agentes quimioterapéuticos.

Trescientas cinco cepas de E. coli obtenidas de lechones con diarrea fueron probadas mediante la técnica del segmento ligado de intestino para estudiar su enterotoxigenicidad. Ochenta y una cepas (27%) se consideraron enterotoxigénicas. Todas las cepas enterotoxigénicas fueron probadas mediante el método de difusión en agar para estudiar su susceptibilidad a 10 agentes quimioterapéuticos. Todos los marcadores de resistencia fueron confirmados mediante la siembra de las cepas en agar conteniendo el antimicrobiano correspondiente. El 82.5% de las cepas mostró resistencia múltiple. Todas las cepas resistentes lo fueron a la tetraciclina. Treinta y siete cepas resistentes fueron cruzadas con E. coli K12 a 37 C en caldo y se observó la transferencia de 124 (92%) de los 135 marcadores de resistencia presentes. Se identificaron 34 plásmidos R transmisibles cuya frecuencia de transferencia tuvo un rango de 9.5×10^{-6} a 3.6×10^0 transconjugantes por célula donante en 1 hr. No se detectaron plásmidos R termosensibles para su transferencia.

INTRODUCCION

Las bacterias pueden adquirir resistencia a agentes quimioterapéuticos gracias a dos mecanismos: mutación y adquisición de plásmidos que codifican para la resistencia (14).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicas capaces de una existencia autónoma en el citoplasma (7). Muchos de ellos son conjugativos, es decir, tienen información genética que les permite autoduplicarse y autotransferirse a otras células bacterianas (7). La presencia de un plásmido en una cepa bacteriana generalmente se reconoce por su expresión fenotípica, que puede ser de muy variada naturaleza: síntesis de toxinas, degradación de pesticidas, resistencia a quimioterapéuticos, síntesis de algunos tipos de fimbria, entre otros (8, 20, 24).

Los plásmidos de resistencia (plásmidos R) codifican, por lo general, para la resistencia hacia varios quimioterapéuticos a la vez y, en ocasiones, también hacia algunos iones de metales pesados como el mercurio, plomo, bismuto, etc. (7, 21). La selección de una cepa bacteriana con uno sólo de los antimicrobianos contra los cuales es resistente, resulta en la selección de la multiresistencia codificada por el plásmido R que alberga.

Desgraciadamente es común en nuestro país el uso indiscriminado de antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, sin el respaldo de pruebas de laboratorio que confirmen su efectividad in vitro. La venta que se hace de los mismos sin restricciones, sin el amparo de una prescripción médica, y la familiar automedicación por parte de los pacientes humanos o de los dueños de los anima-

les enfermos, favorecen enormemente la selección de cepas bacterianas multirresistentes en el ambiente. El problema se agrava si consideramos que es práctica común la utilización de antibióticos como aditivos en la alimentación de animales de granja, a dosis suficientes para ejercer presión selectiva sobre bacterias resistentes, habitantes del tubo intestinal (18). Dado que muchos plásmidos R son transmisibles, incluso intergenéricamente, la presencia de un plásmido R en una enterobacteria, como miembro de la flora normal del intestino, representa su potencial transmisión a una cepa patógena que entre en contacto con la cepa resistente. Es por esto que los plásmidos R representan un grave peligro tanto para la salud del hombre como para la de los animales.

Este trabajo tiene como objetivo general determinar la presencia de plásmidos R en cepas enterotoxigénicas de E. coli aisladas de lechones en México. Será interesante resolver este objetivo dada la importancia que tiene la colibacilosis de los lechones en nuestro país (24) ya que se han encontrado genes de resistencia a quimioterapéuticos ligados a plásmidos enteroxigénicos (plásmidos Ent) (6, 9, 10, 15). Esto implica un riesgo potencial de selección de cepas enterotoxigénicas multirresistentes al emplear antibióticos como promotores del crecimiento en cerdos.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes: (a) Determinar la frecuencia de aislamiento de cepas enterotoxigénicas de E. coli a partir de heces diarréicas de lechones en el Estado de Morelos, México; (b) Determinar los patrones de susceptibilidad de estas cepas a 10 agentes quimioterapéuticos; (c) Estudiar la

transmisibilidad de los marcadores de resistencia encontrados, a E. coli K12 por medio de conjugación; y (d) De terminar la frecuencia de transferencia de los plásmidos R aislados en E. coli K12 en cruces de una hora.

MATERIAL Y METODOS

DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli A PARTIR DE HECES DIARRÉICAS DE LECHONES.

A. Datos sobre las granjas

Se obtuvieron muestras de 10 granjas del Estado de Morelos, de los siguientes municipios: Cuautla, Ayala, Zacualpan de Amilpas, Tetela del Volcán, Xochistlán, Yautepec, Jonacatepec, Jatotelco y Axochiapan. El número de animales por granja varió de 450 a 2,000. El suministro de agua en la mayoría de las granjas lo constituyó un pozo de donde el agua fue almacenada en tinacos.

En todas las granjas el alimento utilizado rutinariamente fue Albamor y eventualmente Purina.

Varios agentes quimioterapéuticos fueron administrados a los cerdos de las granjas visitadas ya sea como promotores del crecimiento o en forma terapéutica (ver Cuadro 2).

Todos los lechones diarreicos de cada granja fueron muestreados en el momento de la visita, y su número varió entre granjas.

B. Muestreo de los lechones y aislamiento de las cepas de E. coli.

Los lechones fueron muestreados del recto con hisopo humedecido en caldo nutritivo^{1/}. Los hisopos fueron transportados en refrigeración al laboratorio. Una placa de agar de MacConkey^{2/} fué inoculada el mismo día con ca-

1/ DIFCO. Laboratories. Detroit, Michigan.

2/ BIOXON de México, S.A., Dr. Liceaga 117, Oaxaca, Oax.

da una de las muestras y las placas fueron incubadas a 37 C durante 18 a 24 hr. Después de la incubación se tomaron 5 clones de E. coli de cada una de las placas y fueron resembrados por separado en nuevas placas de agar de MacConkey para aislar los clones en cultivo puro. Finalmente cada clon fue mantenido en tubos herméticamente cerrados, conteniendo agar tripticasa soya^{1/} inclinado, a temperatura ambiente en la obscuridad, después de incubar a 37 C durante 18 a 24 hr, para ser utilizados como semillas.

C. Prueba del segmento ligado de intestino de cerdo para determinar la enterotoxigenicidad de las cepas (4)

Cada clon fue inoculado por separado en 10 ml de caldo infusión de cerebro y corazón^{2/} e incubado durante 24 hr, a 37 C sin agitación.

Se utilizaron lechones de 6 a 7 semanas de edad, ayunados durante 24 hr, para permitir el vaciado del intestino. Los cerdos fueron preanestesiados con 2-(2, 6-xilidino)-5 6-dihidro 4H - 1, 3 tiazina - HCl al 2% (0.1 mg/kg de peso) y anestesiados con clorhidrato de Ketamina (15 mg/kg de peso, presentación de 50 mg/ml). El estado de anestesia profunda se mantuvo mediante la inhalación de éter.

Se practicó laparatomía media para exponer el intestino delgado, el cual fue ligado en segmentos de aproximadamente 7 cm utilizando seda del 0 y dejando segmentos de 2 cm entre cada uno de ellos. Los segmentos se ligaron a partir de 50 cm del píloro, ya que esta sección anterior

1/ BIOXON de México, S.A., Dr. Liceaga 117, Oaxaca, Oax.

2/ MERCK. México, S.A., Naucalpan de Juárez, Estado de México.

es hipersensible. Se practicaron 42 segmentos por animal.

Cada segmento fue inoculado con 3 ml del cultivo en caldo de cada una de las cepas. Cada cepa fue inoculada en tres cerdos diferentes y en un nivel diferente del intestino delgado (anterior, medio y posterior) por cerdo. En cada cerdo se incluyó una cepa enterotoxigénica como testigo positivo y caldo infusión de cerebro y corazón, estéril, como testigo negativo.

El intestino se colocó en su lugar y se suturó la incisión. Los animales fueron sacrificados al día siguiente con la pistola de émbolo en el cráneo. Se hizo la lectura de la prueba mediante la medición del volumen de líquido acumulado en los segmentos intestinales. Se consideró como positivo a aquel segmento que acumuló un volumen igual o superior al del inóculo original por centímetro lineal de intestino. Para medir el líquido acumulado se utilizó una jeringa graduada en mililitros con aguja del No. 21 para absorber el líquido a través de la pared intestinal.

El número de cepas enterotoxigénicas encontrado en cada granja fue comparado mediante la prueba de chi-cuadrada.

DETERMINACION DE LOS PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS A VARIOS AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS.

La susceptibilidad inherente de las cepas enterotoxigénicas a los agentes quimioterapéuticos probados, se estimó mediante la prueba de difusión de agar utilizando discos^{1/} impregnados con cada uno de los siguientes anti-

^{1/} BIOCLIN, S.A., Sinaloa 76-1, México 7, D.F.

microbianos ($\mu\text{g}/\text{disco}$): kanamicina (30), neomicina (30), estreptomina (20), gentamicina (10), cloranfenicol (30), tetraciclina (10), ampicilina (10), ácido nalidíxico (30), triple sulfa (150) y furadantina (100).

El inóculo para cada prueba se estandarizó (3) mediante la inoculación de 1 ml de caldo nutritivo incubado a 37 C durante 4 hr, sin agitación y el ajuste de la turbidez con el tubo 0.5 del nefelómetro de MacFarland, utilizando solución salina fisiológica. Cada placa de agar de Mueller-Hinton^{1/} (10 cm de diámetro) fue inoculada en toda su superficie con un hisopo humedecido con el inóculo. Después de permitir que la superficie de las placas se secaran completamente, se aplicaron a ésta los discos de papel filtro impregnados con el quimioterapéutico correspondiente, asegurando un perfecto contacto con la superficie mediante el uso de pinzas estériles.

Las placas fueron incubadas a 37 C durante 18 a 24 hr, y la interpretación de los resultados se hizo con base en la presencia o ausencia de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco, independientemente del diámetro de la misma.

Las resistencias encontradas fueron comprobadas inoculando cultivos en caldo nutritivo en agar de MacConkey (Mueller-Hinton en el caso de las sulfanomidas) conteniendo, por separado, cada uno de los siguientes antimicrobianos ($\mu\text{g}/\text{ml}$): kanamicina (20), neomicina (10), estreptomina (30), cloranfenicol (30), tetraciclina (30), ampicilina (10), ácido nalidíxico (30). Solamente aquellas cepas que crecieron en el medio con el antimicrobiano co-

^{1/} BIÓXON de México, S.A., Dr. Liceaga 117, Oaxaca, Oax.

rrespondiente fueron considerados resistentes.

ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DE LOS MARCADORES DE RESISTENCIA ENCONTRADOS, A E. coli K12 MEDIANTE CONJUGACION

La cepa de E. coli K12 utilizada como receptora en las cruces bacterianas con las cepas donantes fue E. coli 711 (F^- , (λ), Lac-28, his-15, Trp-30, proC-23, Phe, Nal^R).

La presencia de los genes de resistencia en las cepas donantes se aseguró mediante la selección de bacterias resistentes inoculando agar de MacConkey (Mueller-Hinton en el caso de las sulfanomidas) conteniendo cada uno de los antimicrobianos por separado, antes de cruzarlas con la receptora.

Tanto la donante como la receptora fueron inoculadas por separado en 1 ml de caldo nutritivo. En el caso de la primera, el caldo fue inoculado con un asa que previamente había tocado colonias procedentes de cada uno de los medios conteniendo antimicrobianos contra los cuales la cepa era resistente. Los tubos fueron incubados a 37 C durante la noche sin agitarse. Veinte microlitros de cada conjugante fueron mezclados en 1 ml de caldo nutritivo fresco y precalentado a 37 C. La mezcla se incubó a 37 C sin agitarse durante 6 hr, junto con sendos tubos inoculados cada uno con cada conjugante por separado (donante y receptora como testigos). La cruz se continuó subcultivando 20 μl de esta mezcla en 1 ml de caldo fresco y precalentado, por 24 hr, adicionales a 37 C sin agitación. Una décima de mililitro de cada cultivo (cruza, donante y receptora) fue extendida sobre la superficie de una placa de agar de MacConkey (Mueller-Hinton en el caso de las sulfonamidas) conteniendo ácido nalidixico y el an

antimicrobiano correspondiente para seleccionar a las células de E. coli 711 (resistente al ácido nalidíxico) transconjugantes que recibieron genes de resistencia. Se inocularon placas de agar conteniendo cada uno de los antimicrobianos por separado, contra los cuales la cepa donante manifestó resistencia. Las placas fueron incubadas a 37 C durante la noche. El desarrollo de colonias Lac⁻ en el medio inoculado con la cruz significó transferencia de la resistencia. Los medios inoculados con cada una de las conjugantes por separado sirvieron de testigo, ya que ninguna de las conjugantes debería crecer en presencia de los dos antimicrobianos juntos.

En todos los casos en los que no se observó transferencia de la resistencia a 37 C se repitieron las cruces a 30 C, con el objeto de detectar plásmidos R termosensibles.

Cotransferencia de la resistencia

El 100% de cotransferencia de la resistencia implica la unión de los marcadores de resistencia y por lo tanto significa que estos genes se encuentran en el mismo plásmido. Para estudiar la cotransferencia de los marcadores encontrados se obtuvieron 100 clones transconjugantes de E. coli 711 a partir de cada una de las placas conteniendo el antimicrobiano cuya resistencia fue transferida. Estos clones fueron inoculados con palillos estériles en placas de medio conteniendo cada uno de los otros antimicrobianos, por separado, que formaban parte del patrón de resistencia correspondiente. Las placas fueron incubadas a 37 C durante la noche. De esta manera se calculó el porcentaje de cotransferencia de todos los marcadores de resistencia encontrados en cada cepa donante.

Frecuencia de transferencia de los plásmidos R

Con el objeto de evitar en lo posible la interferencia de otros plásmidos co-residentes, cada plásmido R fue "diluido" mediante su transferencia secuencial a E. coli K12, W3110, Lac⁺, Rif^r (EN300) y en turno a E. coli 711 por un total de 4 cruzas, siendo E. coli EN300 la cepa hospedera final.

Para asegurar la presencia del plásmido R en el 100% de las células, las cepas fueron inoculadas en el medio conteniendo el antimicrobiano correspondiente antes de estudiar la frecuencia de transferencia del plásmido. Un mililitro de caldo nutritivo fue inoculado con cada cepa e incubado a 37 C durante la noche sin agitar. Lo mismo se hizo con E. coli 711 para utilizarla como cepa receptora. En 1 ml de caldo nutritivo fresco precalentado se mezclaron 10 µl del cultivo de la cepa donante (EN300 albergando el plásmido R) con 100 µl de la cepa receptora (E. coli 711) para obtener una relación final de 1:10 y así poder cuantificar la transmisibilidad del plásmido por cada célula donante.

La mezcla se incubó a 37 C por 1 hr, sin agitarse. Se practicaron diluciones decimales hasta 10⁻⁷ y dos placas de agar conteniendo el antimicrobiano correspondiente y ácido nalidíxico fueron inoculados con 0.1 ml de cada dilución extendiendo el inóculo con un bastón de cristal estéril. La mezcla sin diluir fue inoculada de la misma manera.

Para cuantificar los números relativos reales de las 2 conjugantes en la mezcla, las diluciones de ésta fueron inoculadas también en dos placas de agar de MacCokey sin antimicrobiano. Después de incubar a 37 C

se contaron las colonias de ambos fenotipos (Lac^+ en el caso de la donante y Lac^- en el caso de la receptora) y multiplicando este número por el factor de dilución, se calculó el número de cada una de las conjugantes por mililitro de la mezcla. Los resultados del experimento se consideraron válidos sólo cuando se confirmó que había exceso de receptoras en la mezcla.

La frecuencia de transferencia de los plásmidos R por célula donante fue calculada dividiendo el número de células receptoras que adquirieron el plásmido por el número de células donantes presentes en la mezcla.

RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 61 lechones diarréicos procedentes de 10 granjas, variando el número de cerdos muestreados por granja de 4 a 8 ($\bar{X} = 6$). El número total de clones recuperados fue de 305.

Prueba de enterotoxigenicidad

El número y porcentaje de cepas enterotoxigénicas (ECET) encontradas por granja, de acuerdo al criterio utilizado en este trabajo, se muestran en el Cuadro 1. El porcentaje de cepas ECET de los 305 clones de E. coli aislados fue de 26.5% con un rango de 2,8 a 72% por granja. Esta diferencia fué estadísticamente significativa ($P = < .01$).

Susceptibilidad de las cepas enterotoxigénicas de E. coli a los agentes quimioterapéuticos

De las 81 cepas ECET estudiadas, 80 (99%) mostraron uno o más marcadores de resistencia. El número de marcadores por cepa resistente tuvo un rango de 1 a 7 (Figura 1). La mayoría de las cepas (22,5%) tuvo 2 marcadores diferentes, siguiéndole, en frecuencia, con 3 y 5 marcadores (19% cada una). Todas las cepas resistentes mostraron resistencia a la tetraciclina. El marcador que le siguió en frecuencia de presentación fue el de la resistencia a las sulfonamidas (54%). Ninguna cepa fue resistente a la gentamicina. La frecuencia de presentación de los diferentes marcadores de resistencia se puede ver en la Figura 2. Durante el estudio se observó la pérdida de varios marcadores de resistencia, siendo Cm^R el más frecuentemente perdido (27%) y Su^R el más estable (0%).

Se encontraron un total de 21 patrones de resistencia diferentes, cuya frecuencia siguió una distribución

CUADRO 1

NUMERO Y PORCENTAJE DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli
PRESENTES EN LECHONES DIARREICOS DE GRANJAS DEL ESTADO DE MORELOS

GRANJA	NUMERO DE CEPAS			CEPAS ECET* (PORCENTAJE)
	CERDOS MUESTREADOS	CEPAS TOTALES DE <u>E. coli</u> RECUPERADAS	CEPAS ECET*	
01	5	25	18	72
02	5	25	2	8
03	4	20	4	20
04	7	35	9	25.7
05	8	40	6	15
06	5	25	6	24
07	7	35	1	2.8
08	5	25	13	52
09	8	40	4	10
10	7	35	18	51.4
TOTAL:	61	305	81	26.5

* ECET = E. coli enterotoxigénica.

Fig. 1.- Número de marcadores de resistencia por cepa en 80 cepas enterotoxigénicas porcinas de *E. coli* resistentes aisladas de 10 granjas del Estado de Morelos

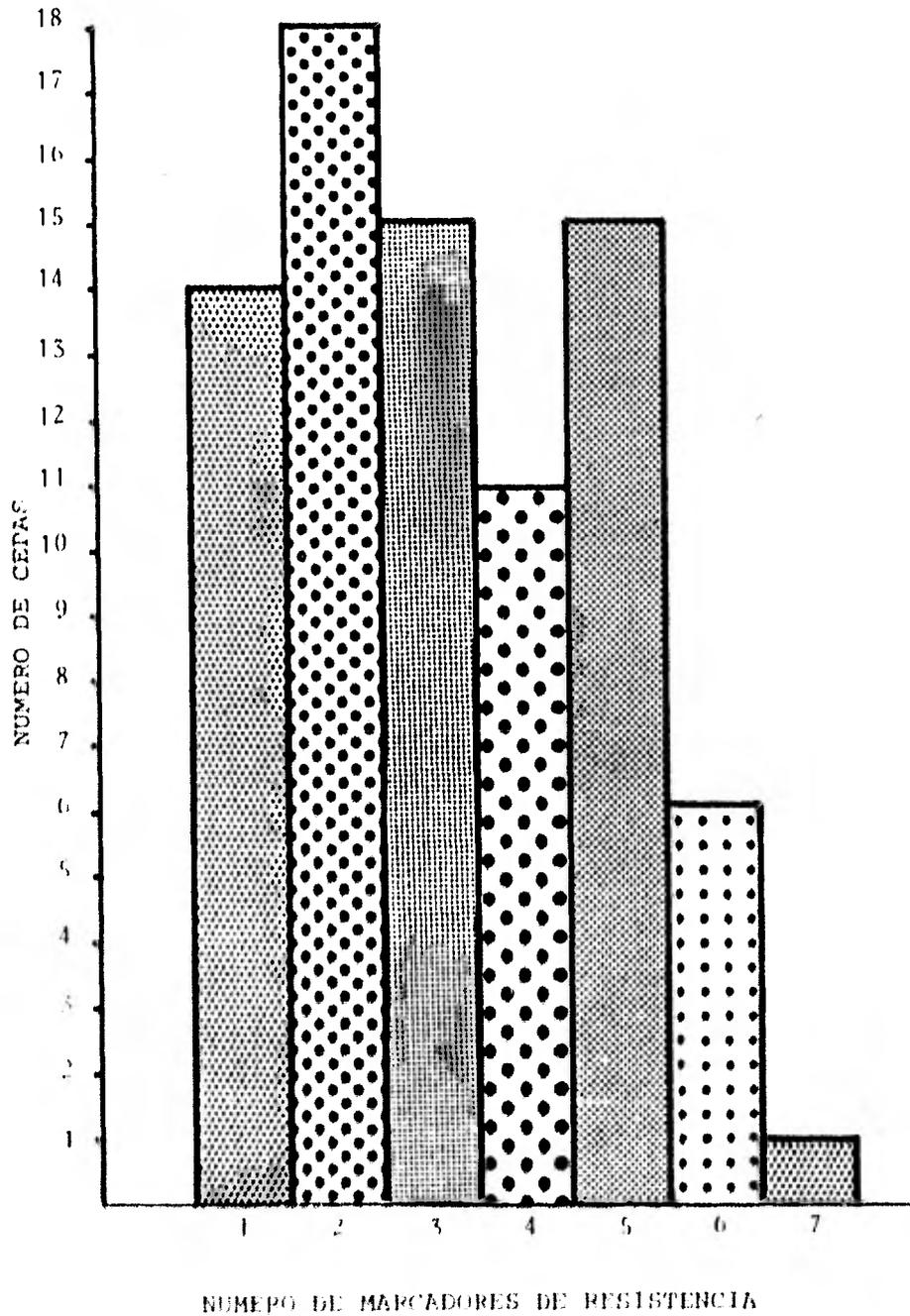
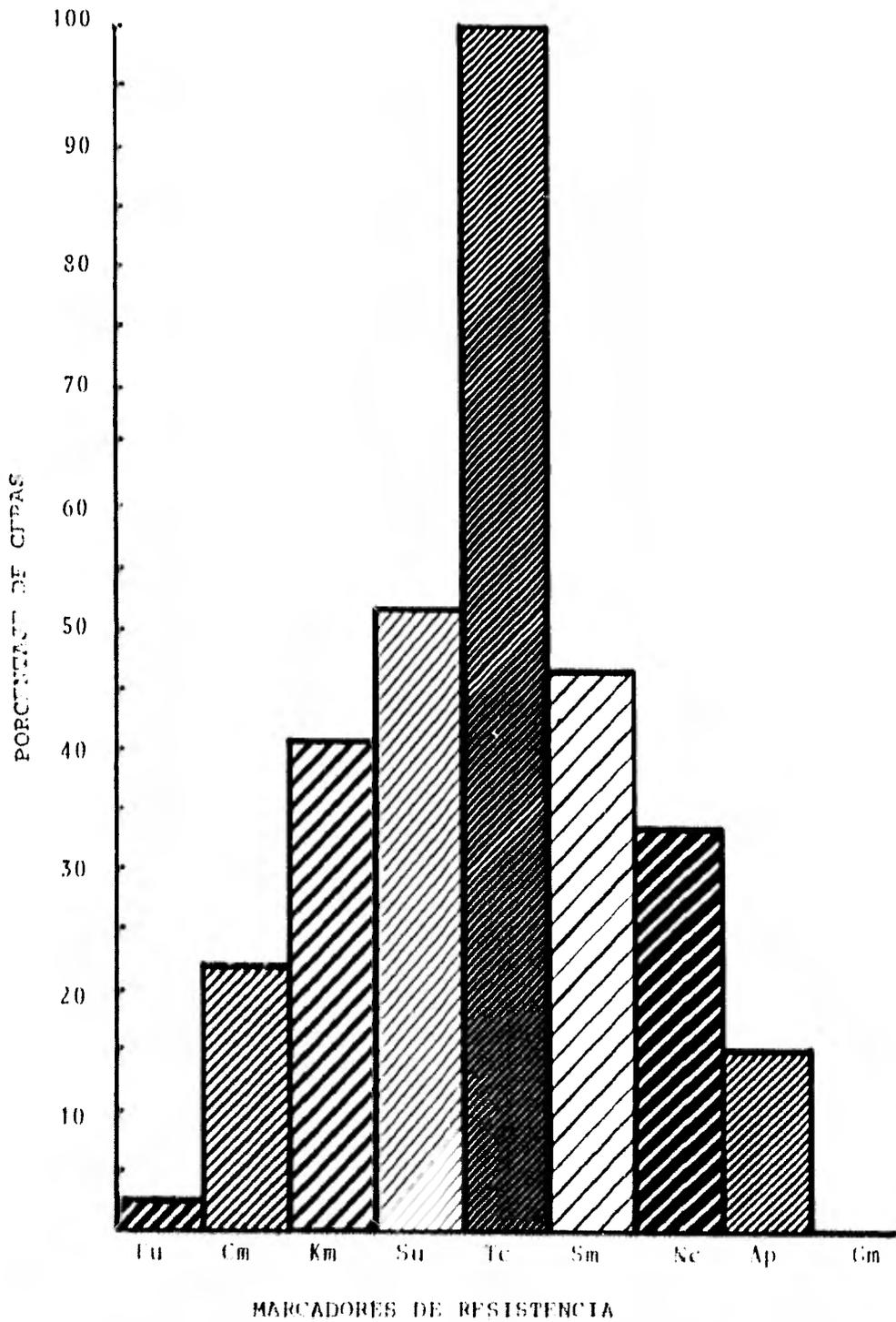


Fig. 2.- Marcadores de resistencia encontrados en 30 cepas enterotoxigénicas porcinas de E. coli aisladas de 10 granjas del Estado de Morelos



Fu= Furadantina; Cm= Cloranfenicol; Km= Kanamicina; Su= Sulfonamidas;
 Tc= Tetraciclina; Sm= Estreptomina; Nc= Neomicina; Ap= Ampicilina;
 Gm= Gentamicina.

normal (Figura 3). El patrón de resistencia más frecuentemente encontrado fue el de Tc^R , presente en 14 cepas, le siguieron en frecuencia $Tc^R Su^R$ y $Tc^R Su^R Sm^R$.

En el Cuadro 2 se puede ver la relación existente entre los quimioterapéuticos utilizados por granja y la presentación de los marcadores de resistencia correspondientes.

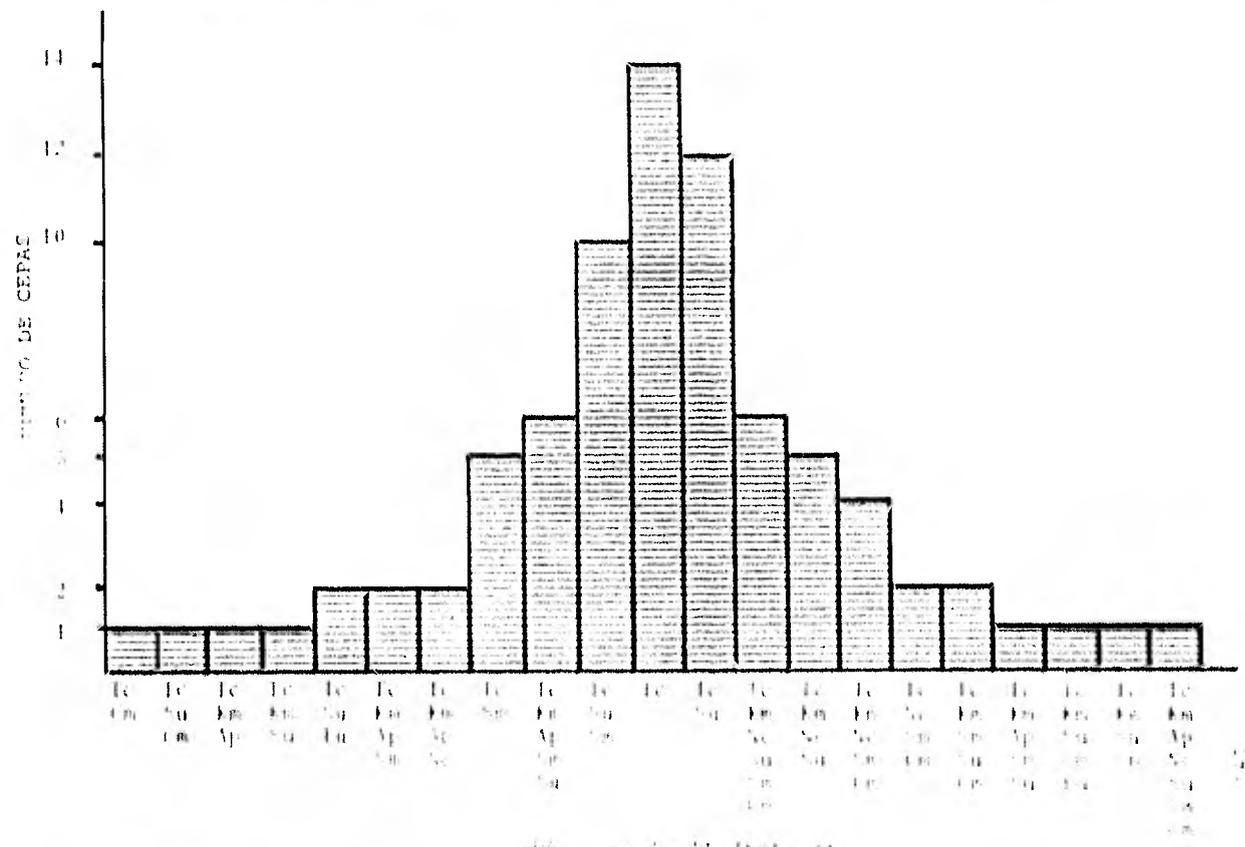
Transmisibilidad de los marcadores de resistencia a *E. coli* K12

Se estudió la transmisibilidad de los marcadores de resistencia de 37 cepas de *E. coli* aisladas de 5 granjas. Noventa y dos por ciento de los 135 marcadores de resistencia encontrados, fueron transferidos a la cepa receptora. Más de la mitad (54%) de las cepas transmitieron todos sus marcadores de resistencia.

Treinta y cuatro plásmidos fueron aislados en *E. coli* K12 y la mayoría codificó solamente para una resistencia: Tc^R (14), Ap^R (7), Su^R (4), Sm^R (2), Km^R (2) (Cuadro 3). La frecuencia de transferencia de estos plásmidos varió de 9.5×10^{-6} hasta 3.58×10^0 por célula donante en 1 hr, a 37 C (Cuadro 3). Los plásmidos transferidos con mayor frecuencia fueron los Tc^R y Ap^R .

No se detectaron plásmidos R termosensibles en ninguna de las cepas estudiadas.

Fig. 3.- Frecuencia relativa de los diferentes patrones de resistencia encontrados en 80 cepas porcinas enterotoxigénicas de *E. coli* aisladas de 10 granjas del Estado de Morelos



Te = Tetraciclina; Cm = Cloranfenicol; Ft = Fusidamida; P = ampicilina; L = Ampicilina; Fu = Furadantina; Et = Estreptomina.

CUADRO 2

RELACION ENTRE LOS MARCADORES DE RESISTENCIA ENCONTRADOS EN CEPAS PORCINAS ENTEROTOXIGENICAS DE *E. coli* AISLADAS DE 10 GRANJAS DEL ESTADO DE MORELOS Y LOS QUIMIOTERAPEUTICOS UTILIZADOS POR GRANJA

GRANJA	MARCADORES DE RESISTENCIA ENCONTRADOS	USADOS QUIMIOTERAPEUTICOS
01	Tc Km Nc Sm Ap Su	FURAZOLIDONA TETRACICLINA NITROFURANOS
02	Tc	NEOMICINA SULFANOMETOXINA OXITETRACICLINA SULFAMETAZINA PENICILINA NITROFURANOS
03	Tc Km Sm Su Cm Fu	NITROFURANOS OXITETRACICLINA FURAZOLIDONA
04	Tc Su Sm	NITROFURANOS OXITETRACICLINA ERITROMICINA SULFAMERAZINA PENICILINA
05	Tc Km Nc Su	NEOMICINA ESTREPTOMICINA PENICILINA
06	Tc Km Nc Sm Su Cm Ap	OXITETRACICLINA FUROZOLIDONA
07	Tc	LINCOMICINA EMTRIL
08	Tc Km Nc Sm Su Cm Fu	NEOMICINA LINCOMICINA NITROFURANOS
09	Tc Km Sm Ap	PENICILINA ESTREPTOMICINA
10	Tc Km Sm Su Cm Ap	LINCOMICINA NITROFURANOS

Tc= Tetraciclina; Km= Kanamicina; Nc= Neomicina; Sm= Estreptomycin; Ap= Ampicilina; Su= Sulfonamidas; Cm= Cloranfenicol; Fu= Furadantina.

FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R OBTENIDOS DE CEPAS
ENTEROTOXIGENAS PORCINAS DE *E. coli* AISLADAS DE 5 GRANJAS
DEL ESTADO DE MORELOS

PLASMIDO	MARCADOR	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA
pEN 1	Tc	3.8×10^0
pEN 6	Tc	3.1×10^0
pEN 2	Tc	2×10^0
pEN 4	Tc	2×10^0
pEN 21	Tc	1.5×10^{-1}
pEN 17	Tc	1.8×10^{-1}
pEN 7	Tc	7×10^{-2}
pEN 27	Tc	6.4×10^{-2}
pEN 3	Tc	4.5×10^{-2}
pEN 31	Tc	4.5×10^{-2}
pEN 34	Tc	4×10^{-2}
pEN 9	Tc	3.1×10^{-3}
pEN 41	Tc	3×10^{-3}
pEN 20	Tc	2.5×10^{-3}
pEN 19	Ap	2.3×10^0
pEN 16	Ap	1.4×10^0
pEN 7	Ap	9×10^{-2}
pEN 29	Ap	9×10^{-2}
pEN 5	Ap	9×10^{-3}
pEN 30	Ap	4×10^{-3}
pEN 35	Ap	8.4×10^{-4}
pEN 11	Su	2.8×10^{-1}
pEN 12	Su	2×10^{-2}
pEN 25	Su	1.4×10^{-2}
pEN 39	Su	5.5×10^{-4}
pEN 22	Sm	1.5×10^{-3}
pEN 40	Sm	1.7×10^{-5}
pEN 37	Km	3.8×10^{-5}
pEN 33	Km	9.5×10^{-6}
pEN 26	Tc Sm	8×10^{-2}
pEN 23	Tc Sm	9×10^{-3}
pEN 14	Tc Sm	3×10^{-4}
pEN 43	Tc Sm	3.5×10^{-6}
pEN 28	TcSmNcKmCm	6.7×10^{-2}

* En cruces de 1 hr a 37 C entre 2 cepas de *E. coli* K12.
Tc= Tetraciclina; Ap= Ampicilina; Su= Sulfonamidas; Sm=Estreptomicina; Km= Kanamicina; Nc= Neomicina; Cm= Cloranfenicol.

DISCUSION

El número de cepas ECET aisladas representó un porcentaje relativamente bajo; esto posiblemente sea el reflejo de las buenas condiciones de higiene en que se encontraban las granjas. En apoyo de esta idea está el hecho de que a partir de las muestras de la granja 01, con las condiciones de higiene más pobres, se aisló el mayor porcentaje de cepas ECET. Asimismo, se observó una relación directa entre las condiciones de manejo del agua en las granjas y la frecuencia de aislamiento de ECET. En la granja 07, con el mejor manejo de agua, se aisló el menor porcentaje de cepas ECET (2.8%) mientras que en las granjas 01, 08, 10 con las condiciones más pobres de higiene, se aisló un mayor porcentaje de cepas ECET (72%, 52% y 51.4% respectivamente).

Resulta alarmante el alto porcentaje (99.0%) de cepas ECET resistentes encontradas en este estudio. Hallazgos similares se han descrito tanto en el caso de ECET (10, 15) como en el caso de cepas de E. coli en general, aisladas de granjas porcinas (11, 16).

Es interesante resaltar que la mayoría de las cepas ECET resistentes mostró menos de tres marcadores de resistencia.

Todas las cepas resistentes mostraron resistencia a la tetraciclina y este hallazgo también se ha hecho en cepas porcinas de otras partes del mundo (1, 16), así como en las aisladas de otras especies domésticas (5, 13).

Los marcadores de resistencia más frecuentemente encontrados en este estudio corresponden con los descritos en otros trabajos (16) en donde encabezan la lista Tc^r,

Su^r y Sm^r. Los patrones de resistencia más frecuentemente encontrados (Tc^r, Tc^r Su^r y Tc^r Su^r Sm^r) también coinciden con los encontrados por otros autores en el caso de Salmonella (12, 22). Sin embargo en el caso de E. coli se han descrito otros patrones de resistencia más frecuentes como Tc^r Sm^r Su^r Cm^r Km^r, Tc^r Sm^r Su^r Cm^r Fu^r y Tc^r Sm^r Su^r Cm^r (11).

El porcentaje de genes de resistencia transferidos fue mucho mayor en este estudio (92.0%) que en el caso del trabajo de Gyles et al. (10), en donde aproximadamente la mitad de los marcadores de resistencia fueron transferidos de las cepas ECET resistentes a E. coli K12.

Todos los marcadores de resistencia fueron transferidos del 54.0% de las cepas ECET resistentes. Frecuencias similares han sido observadas en el caso de otros patógenos entéricos como Salmonella (12). Sin embargo, en el caso de cepas fecales de E. coli aisladas de perros clínicamente sanos, sólo el 38% de las cepas resistentes transfirieron todos los marcadores de resistencia (5). Es posible que este fenómeno pueda explicarse en función de la mayor presión selectiva ejercida con antibióticos sobre patógenos entéricos que en el caso de cepas fecales de animales clínicamente sanos. La mayor presión selectiva, con antibióticos, podría así funcionar garantizando la distribución de plásmidos R con una maquinaria de transmisibilidad muy eficaz.

Los plásmidos Tc^r fueron los más eficazmente transmitidos en este estudio, alcanzando las frecuencias de transferencia más altas. Ishiquro et al. (12) obtuvieron resultados similares en un estudio con salmonelas resistentes. La presencia constante de la tetraciclina en el

ambiente de los cerdos quizás favorezca la selección de plásmidos resistentes a este antibiótico, con sistemas desreprimidos de transferencia altamente eficaces.

La amplia distribución de los genes de resistencia en la naturaleza quedó demostrada una vez más. En todas las granjas donde se emplearon las drogas estudiadas, ya sea como promotores de crecimiento o con fines terapéuticos, se observaron algunas de las resistencias correspondientes en las cepas ECET aisladas (Cuadro 2). Se aislaron cepas ECET resistentes también en las granjas donde no se utilizaron los antibióticos correspondientes, por lo menos recientemente.

Esto enfatiza la importancia de una conciencia colectiva para la utilización racional de los antibióticos, ya que la presión selectiva ejercida por éstos resulta en la distribución generalizada de cepas resistentes, las que a su vez actúan como reservorios biológicos de genes de resistencia.

LITERATURA CITADA

1. Adetosoye, A. I. and Awad-Masalmel, M.: Drug resistance in E. coli isolated from diarrhoeic piglets. Vet. Rec. 105: 306. (1979).
2. Anderson, E. S.: A rapid screening test for transfer factors in drug-sensitive Enterobacteriaceae. Nature 208: 1016-1017. (1965).
3. Barry, A. L. and Thornsberry, C.: Susceptibility testing: Difusion Test Procedures. Manual of Clinical Microbiology, Edited by: Lennette, E. H. Balows, A., Hausler, W. J. Jr. and Truant, J. P. 463-474. 3rd. ed American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1980).
4. De, S. N. and Chatterjee, D. N.: An experimental study of the mechanism of action of Vibro cholerae on the intestinal mucous membrane. J. Pathol. Bacteriol. 66: 559-562. (1953).
5. Dwight, D., Hirsh, Ling, V. and Annette, L. R.: Incidence of R-plasmids in fecal flora of healthy household dogs. Antimicrob. Ag. Chemother. 17: 313-315. (1980).
6. Echeverría, P., Verhaert, L., Ulyangco, C.V., Komalarini, S., Ørskov, F., and Ørskov, I.: Antimicrobial resistance and enterotoxin production among isolates of Escherichia coli in the far east. Lancet ii: 589-592. (1978).
7. Falkow, S.: Infectious multiple drug resistance. Pion Ltd. London. (1975).
8. Fisher, P. R., Appleton, J., and Pemberton, J. M.: Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJPI from Alcaligenes paradoxus. J. Bacteriol. 135: 798-804. (1978).
9. Gyles, C., Falkow, S. and Rollins, L.: In vivo transfer of an Escherichia coli enterotoxin plasmid possessing genes for drug resistance. Am. J. Vet. Res. 39: 1438-1441. (1978).

10. Gyles, C., Palchaudhuri, S. and Maas, W. K.: Naturally occurring plasmid carrying drug resistance. *Science* 198: 198-199. (1977).
11. Ishiguro, N., Goto, J. and Sato, S.: Genetical relationship between R plasmids derived from Salmonella and E. coli obtained from a pig farm, and its epidemiological significance. *J. Hyg., Camb.* 84: 365. (1980).
12. Ishiguro, N., Makino, S., Sato, G., and Hashimoto, K.: Antibiotic resistance and genetic properties of R plasmids in Salmonella isolates of swine origin in Japan. *Am. J. Vet. Res.* 41: 46-50. (1980).
13. Kumar, A., Misra, D. S. and Singh, H. P.: Drug-resistant and R-Factor-bearing Escherichia coli in poultry. *Indian J. Anim. Sci.* 51: 872-876. (1981).
14. Lewin, B.: Gene expression-3: Plasmids & Phages. John Wiley & Sons, New York. (1977).
15. Novick, R. P.: The development and spread of antibiotic resistant bacteria as a consequence of feeding antibiotics to livestock. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 368: 23-59. (1981).
16. Saida, K., Ike, Y. and Mitsuhashi.: Drug resistance and R Plasmids of E. coli strains isolated from pigs, slaughterers, and breeders of pigs in Japan. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 19: 1032-1036. (1981).
17. Smith, H. W.: Thermosensitive transfer factors in chloramphenicol-resistant strains of Salmonella typhi. *Lancet.* ii, 281-282. (1974).
18. Smith, H. W. and Crab, W. E.: The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant Bacterium coli in the faeces of pigs and chickens: The sensitivity of the Bacterium coli to other chemotherapeutic agents. *Vet. Rec.* 24-30. (1957).

19. Smith, H. W. and Halls, S.: Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol. 93: 499-529. (1968).
20. Smith, H. W. and Linggood, M. A.: Observations on the pathogenic properties of K88, Hly and Ent plasmids of Escherichia coli, with particular reference to porcine diarrhoea. J. Med. Microbiol. 4: 467-485. (1971).
21. Summers, A.O. Schottel, J., Clark, D. and Silver, S.: Plasmid borne Hg (II) and organomercurial resistance Microbiology-1974. Edited by: Schlessinger, D. 219-224. American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1975).
22. Terakado, N., Ohay, T., Ueda, H. and Isayama, Y.: A survey on drug resistance and R plasmids in Salmonella isolated from domestic animals in Japan. Jap. J. Vet. Sci. 42: 543-550. (1980).
23. Uruchurtu, A., Méndez, D., Doperto, J. M. Lóñez-Alvarez, J., Romero López, R. y Sánchez García, F.: Un estudio sobre la mortalidad de lechones en México. Veterinaria, Méx. 7: 111-222. (1976).
24. Watanabe, T.: Infectious drug resistance. Facets of Genetics, Edited by: Srb., A. M. Owen, and Edgar, R. S. 57-65. Scientific American, W. H. Freeman, San Francisco. (1970).