

Distribución de los genes *chrA* en bacterias de origen nosocomial*

Gustavo G. Caballero Flores¹, Jesús Silva Sánchez², Carlos Cervantes¹
y Martha I. Ramírez Díaz¹

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH. ²Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor.

Resumen

El gen *chrA* se identificó originalmente en el plásmido pUM505 de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes hospitalizados en Morelia, Mich. Este gen codifica la proteína ChrA, que confiere resistencia a cromato por un mecanismo de expulsión y pertenece a la superfamilia CHR de transportadores de cromato. El objetivo del presente estudio fue determinar la distribución del gen *chrA* en bacterias de origen hospitalario. Se empleó una colección de 133 aislados de bacterias Gram-negativas (enterobacterias y *Pseudomonas*) provenientes de hospitales de distintas regiones del país. La susceptibilidad a cromato se determinó por dilución en placa y los genes *chrA* se detectaron por hibridación de DNA. Dieciocho aislados (nueve de *P. aeruginosa* y nueve correspondientes a enterobacterias) que presentaron resistencia a cromato fueron positivos a hibridación con una sonda *chrA* de pUM505. De éstos, cuatro aislados de *P. aeruginosa* y seis de enterobacterias presentaron plásmidos, los cuales hibridaron con la sonda *chrA*. Cuatro de estos plásmidos, contenidos en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, se transfirieron por conjugación a *Escherichia coli* y confirieron resistencia a cromato. Los resultados obtenidos, sugieren que genes homólogos al gen *chrA* del plásmido pUM505 se encuentran distribuidos en plásmidos residentes en bacterias de origen hospitalario.

*Parte de este trabajo fue publicado en la revista *FEMS Microbiology Letters* (2012) 327:148-154.

Palabras clave: Cromato, enterobacterias, *Pseudomonas*, plásmido.

Abstract

The *chrA* gene was originally identified in the pUM505 plasmid of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients from Morelia, Mich. This gene encodes the ChrA protein, which confers resistance to chromate by an efflux mechanism and belongs to the CHR superfamily of chromate transporters. The objective of this study was to determine the distribution of the *chrA* gene in bacteria of nosocomial origin. A collection of 133 bacterial Gram-negative isolates (enterobacteria and *Pseudomonas*) from hospitals of different regions of Mexico was analyzed. Chromate susceptibility was determined by an agar dilution assay and *chrA* genes were detected by DNA hybridization. Eighteen isolates (nine *P. aeruginosa* and nine corresponding to enterobacteria) that showed chromate resistance were also positive to hybridization with a *chrA* probe from pUM505. From these, four *P. aeruginosa* isolates and six enterobacterial isolates displayed plasmids that hybridized with the *chrA* probe. Four plasmids, contained in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* were transferred by conjugation to *Escherichia coli* strains where they conferred chromate resistance. The results obtained in this work demonstrates that genes similar to the *chrA* gene from plasmid pUM505 are distributed in plasmids from nosocomial bacteria.

Key words: Chromate, enterobacteria, *Pseudomonas*, plasmid

Introducción

El uso generalizado del cromo (Cr) en diversos procesos industriales lo ha convertido en un serio contaminante del agua, suelo y aire en áreas cercanas a las industrias (Khashim *et al.*, 1989). El Cr(VI) está comúnmente presente en solución como los oxianiones cromato (CrO_4^{-2}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$) y es considerada la forma más tóxica del cromo ya que es hidrosoluble a pH fisiológico (McGrath y Smith, 1990). En bacterias, a nivel extracelular, el Cr(VI) es altamente tóxico debido a que ingresa rápidamente al citoplasma por la vía de captación del ion esencial sulfato, donde puede ejercer sus efectos tóxicos (Katz y Salem, 1993). La toxicidad del cromo en el citoplasma está relacionada con el proceso de reducción del Cr(VI) al estado de oxidación Cr(III), lo cual genera radicales libres (Shi y Dalal, 1990); además, el Cr(III) produce efectos tóxicos adicionales debido a su capacidad de unirse al DNA y proteínas (Bridgewater *et al.*, 1994, Plaper *et al.*, 2002). Los mecanismos de resistencia a cromato pueden ser codificados por genes localizados tanto en cromosomas como en plásmidos (Nies *et al.*, 1990, Cervantes y Campos-García, 2007). Uno de los mecanismos de resistencia a cromato mejor caracterizados es la expulsión de cromato por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, la cual pertenece a la superfamilia de transportadores de cromato CHR (Díaz-Pérez *et al.*, 2007).

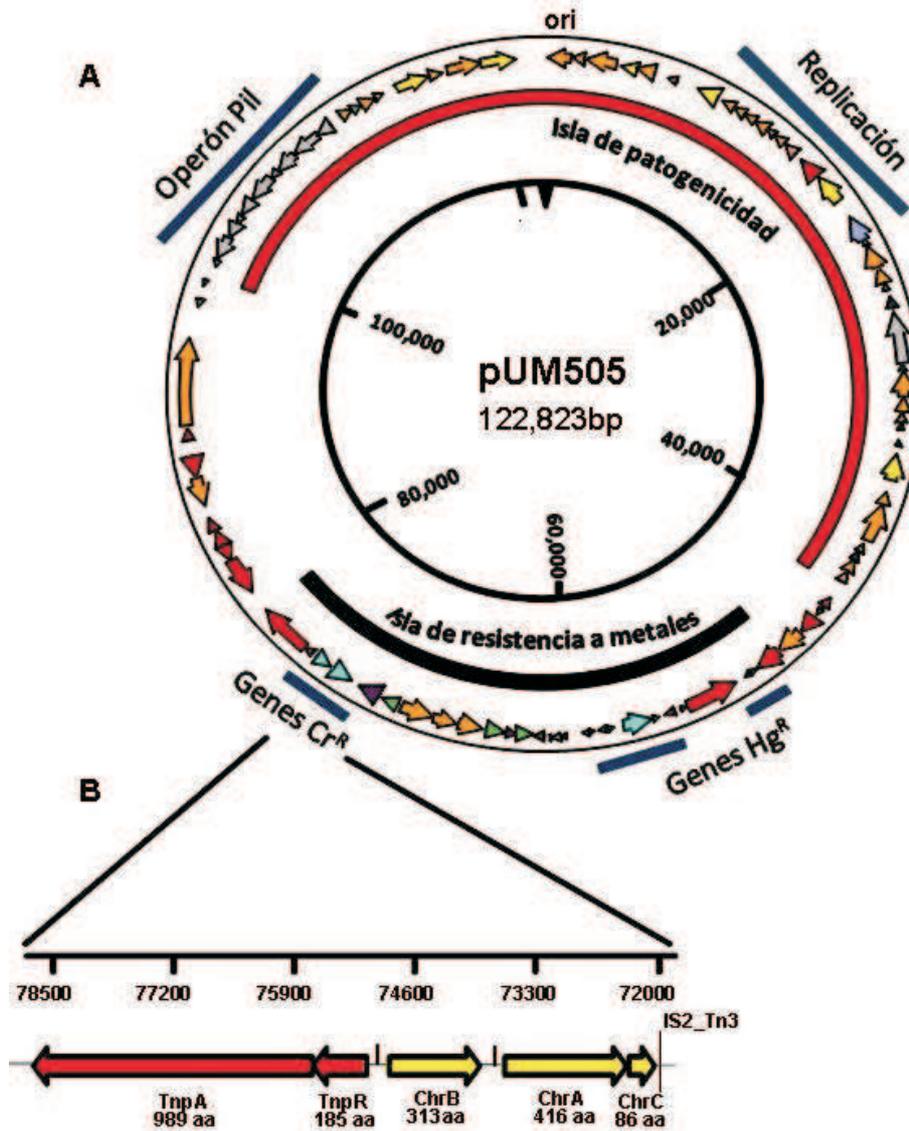


Figura 1. Contexto genómico del gen *chrA* en el plásmido pUM505. A. Mapa genético del plásmido pUM505. Las flechas o puntas de flecha representan las regiones codificantes y su dirección de la transcripción. La barra roja, representa la isla de patogenicidad; la barra negra, representa la isla genómica de resistencia a metales. B. Probable transposón de resistencia a cromato. Las flechas representan regiones codificantes y su dirección de la transcripción. Cr^R, posible operón *chrBAC* de resistencia a cromato; TnpA y TnpR, transposasa y resolvasa, respectivamente (modificada de Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

El gen *chrA*, que codifica la proteína ChrA, se identificó originalmente en el plásmido conjugativo pUM505 en cepas clínicas de *P. aeruginosa* de Morelia, México (Cervantes-Vega *et al.*, 1986). Diversas proteínas ChrA bacterianas que confieren resistencia a cromato están codificadas en plásmidos (Vasconcelos-Morais *et al.*, 2011), lo que sugiere que los genes *chrA* podrían transferirse de forma horizontal por conjugación. El plásmido pUM505, de 123 kilobases (kb), presenta dos regiones bien definidas: una isla de patogenicidad que contiene genes probablemente involucrados en virulencia, en el mantenimiento y transferencia del plásmido, y otra isla genómica de ~31 kb que contiene genes de resistencia a cromato y mercurio (Figura 1A). El gen *chrA* de pUM505 se encuentra delimitado por los genes *chrB* y *chrC* probablemente asociados con la resistencia a cromato, formando parte del posible operón *chrBAC*; este operón a su vez está flanqueado por los genes *tnpA* y *tnpR*, que codifican una transposasa y una resolvasa, respectivamente, los cuales son elementos móviles similares a los presentes en el transposón Tn172. Además, se encuentra una secuencia de inserción IS2_Tn3, similar a la presente en el transposón Tn3, sugiriendo que se trata de un potencial transposón (Figura 1B). Se ha reportado una gran variedad de especies bacterianas resistentes a cromato, incluyendo cepas de origen ambiental y clínico (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008). Por lo tanto, el gen *chrA* podría haberse distribuido en el ambiente hospitalario mediante transferencia horizontal entre especies bacterianas, sobre todo considerando que pUM505, además de ser un plásmido conjugativo, posee caracteres adaptativos como virulencia y resistencia a metales pesados. Estas características podrían funcionar como factores selectivos para la prevalencia y distribución de este plásmido en diversos ambientes, incluyendo hospitales y sitios contaminados con metales (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

La resistencia a metales es una característica comúnmente observada en bacterias de diversos ambientes, incluyendo agua y suelos contaminados (Silver y Phung, 2005). Diversos estudios de distribución de genes de resistencia a metales como cobre (Trajanovska *et al.*, 1997), arsénico (Cai *et al.*, 2009) y cadmio, zinc o cobalto (Diels y Mergeay, 1990), se han realizado con bacterias aisladas de sitios contaminados con metales. El único reporte encontrado sobre la distribución de genes *chrA* es el realizado por Trajanovska *et al.* (1997). En este trabajo se utilizó el gen *chrA* del plásmido pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* para detectar determinantes de resistencia a cromato en una colección de aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados por plomo; sin embargo, no se logró detectar la presencia de genes *chrA* en las bacterias de estudio. Por otro lado, en bacterias provenientes de hospitales, además de genes de resistencia a antibióticos, pueden estar presentes genes de resistencia a metales pesados; tal es el caso de la presencia de determinantes de resistencia a plata y mercurio en bacterias de origen clínico resistentes a antibióticos (Gupta *et al.*, 2001, Tato *et al.*, 2010). En estos trabajos se ha propuesto que la resistencia a estos metales se debe al empleo de compuestos derivados de plata y mercurio en la práctica médica y odontológica. A excepción del gen *chrA* del plásmido pUM505, el cual fue aislado de una cepa clínica, no existen otros reportes a la fecha de la presencia de este determinante en bacterias de origen clínico; el resto de los genes *chrA* caracterizados a nivel experimental se han aislado de ambientes contaminados (revisado en Vasconcelos-Morais *et al.*, 2011). No

se conocen posibles fuentes de contaminación por cromo en el hospital, debido a que este metal o sus derivados no son empleados en la práctica médica por su potencial como cancerígenos (Mertz, 1993). Sin embargo, existen algunos compuestos que contienen derivados de cromo que eran empleados en los hospitales hasta finales de los 90's, como las soluciones de lavado del equipo radiológico o para el lavado de material de vidrio. Además, algunos reactivos con cromo siguen siendo empleados en patología para la fijación de muestras (U.S. Environmental Protection Agency).

Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la distribución del gen *chrA* en bacterias de origen hospitalario, con el fin de identificar plásmidos que pudieran participar en la transferencia horizontal de este gen en el ambiente del hospital.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Los 133 aislados analizados se obtuvieron de la colección bacteriana del Instituto Nacional de Salud Pública (Cuernavaca, Mor.). El grupo de estudio consta de las siguientes especies (no. de aislados): *Escherichia coli* (56), *Klebsiella pneumoniae* (31), *P. aeruginosa* (21), *Enterobacter cloacae* (18) y *Salmonella sp.* (7), las cuales se aislaron de pacientes en diferentes hospitales del país en el periodo de junio del 2002 a noviembre del 2009. La cepa *P. aeruginosa* PU21 con el plásmido pUM505 (Cervantes-Vega *et al.*, 1986) se utilizó como control resistente a cromato y como control positivo en hibridaciones. Las cepas de *E. coli* W3110 y DH5a se utilizaron como controles sensibles a cromato y como controles negativos en hibridación. *E. coli* J53-2 (F⁻, met, pro, Rif^R, Cr^S) fue empleada como receptora en las pruebas de conjugación.

Medios de cultivo

Las cepas se crecieron a 37°C en caldo nutritivo (CN) o caldo Luria-Bertani (LB), adicionados con 1.5% de agar para medio sólido (Sambrook *et al.*, 1989).

Plásmidos

El plásmido pEPL1, que contiene el gen *chrA* de pUM505 en el vector pUCP20, se usó como control positivo en las hibridaciones y el plásmido pUCShe, que contiene el gen *chrA* de *Shewanella sp.* ANA-3 (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008), se usó como control negativo debido a que es un homólogo que sólo presenta 28% de identidad con la proteína ChrA codificada por pUM505. Los plásmidos 2F10 (45 kb) y R1 (93 kb) se usaron como marcadores de tamaño molecular. El DNA se aisló por el método descrito por Kieser (1984).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los cultivos crecidos durante la noche en caldo LB se diluyeron 1:100 en medio fresco y se inocularon en placas de agar LB con concentraciones crecientes de K_2CrO_4 (Baker). Las cajas se incubaron 24 h a 37°C. El valor de MIC se definió como la concentración más baja de cromato que inhibió completamente el crecimiento bacteriano.

Marcaje de la sonda e hibridación

Como sonda en las hibridaciones se utilizó la región codificante del gen *chrA* (~1.25 kb), la cual se amplificó por PCR a partir del DNA del plásmido pUM505 empleando los oligonucleótidos específicos directo (1D; 5'-GAGCGTTGCGAATGAAGAGTCG-3') y reverso (1R; 5'-GGAAGCATGAAACCGAGTCCC-3'). Los productos de PCR se purificaron mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) y se marcaron con fosfatasa alcalina utilizando el kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling (Amersham), siguiendo las indicaciones de los proveedores. Las hibridaciones en colonia y los ensayos de hibridación tipo Southern se llevaron a cabo por técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

Conjugación

Los cultivos de los aislados (cepas donadoras) crecidos a fase logarítmica y de la cepa receptora *E. coli* J53-2 se mezclaron en proporción 5:1 en caldo LB y se incubaron 24 h a 37°C sin agitación. Las transconjugantes se seleccionaron en cajas de agar LB con 350 µg/ml de rifampicina y 2 mM de K_2CrO_4 las cuales se incubaron por 24 h a 37°C. La transferencia de los plásmidos se confirmó por extracción y electroforesis del DNA.

Pruebas de susceptibilidad a cromato

Cultivos bacterianos crecidos durante la noche a 37°C en CN fueron diluidos 1:100 en tubos con 4 ml de medio fresco con concentraciones crecientes de K_2CrO_4 e incubados por 18 a 20 h a 37°C con agitación. El crecimiento fue monitoreado por la densidad óptica a 590 nm usando un espectrofotómetro.

Resultados

Para determinar la presencia de genes de resistencia a cromato (CrR) en bacterias clínicas se empleó una colección de 133 aislados clínicos Gram-negativos, previamente caracterizados por la resistencia a múltiples antibióticos incluyendo beta-lactámicos, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos (Miranda *et al.*, 2004). La presencia de un fenotipo de CrR en los aislados de estudio se evaluó por la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cromato. Las bacterias se clasificaron como sensibles, intermedias o resistentes con base en la distribución de los valores de MIC obtenidos. En la Tabla 1 se muestra la susceptibilidad a cromato encontrada para los 133 aislados. Se encon-

tró que 64 de los 112 aislados de enterobacterias tuvieron valores de MIC entre 0.2 y 0.4 mM de cromato y se consideraron sensibles, al igual que el control *E. coli* W3110; 15 aislados presentaron valores de inhibición claramente superiores al resto (= 1 mM) y se consideraron resistentes, mientras que 33 aislados, con valores de 0.8 mM, se consideraron intermedios (Tabla 1).

Especie	Fenotipo de susceptibilidad a cromato*			Total
	Cr ^S	Cr ^I	Cr ^R	
<i>Escherichia coli</i>	37	17	2	56
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	7	12	31
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	9	1	18
<i>Salmonella sp.</i>	7	0	0	7
TOTAL (%)	64 (57)	33 (29)	15 (14)	112
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)	8 (38)	3 (14)	(48)	21

*Cr^S= Sensibles, Cr^I= Intermedias, Cr^R= Resistentes.

Por otro lado, los aislados de *P. aeruginosa* presentaron valores más altos de MIC, con respecto al resto de las cepas. De los 21 aislados de esta especie, ocho presentaron valores de MIC de 0.5 a 1 mM de cromato y se consideraron sensibles, al igual que el control PU21; 10 aislados se inhibieron a concentraciones de entre 2 y 3 mM, al igual que el control positivo PU21 (pUM505), considerándose como resistentes; finalmente, tres aislados con valores de 1.5 mM fueron considerados intermedios (Tabla 1).

Con el fin de evaluar la distribución del gen *chrA* en los aislados, inicialmente se llevó a cabo la detección de este gen por hibridación en colonia utilizando la sonda *chrA*. Se encontró que 21 de los 133 aislados de la colección presentaron señales de hibridación positiva, similares al control PU21 (pUM505). La Figura 2 muestra de forma resumida los resultados de hibridación de esos 21 aislados; los controles negativos no mostraron señal en las hibridaciones. Estos resultados indican la presencia en estos aislados de secuencias de DNA con alta identidad con el gen *chrA* del plásmido pUM505, los cuales fueron denominados como aislados *chrA*⁺. De los 21 aislados positivos a hibridación, 12 pertenecen a *P. aeruginosa* y nueve son enterobacterias [*K. pneumoniae* (6), *E. cloacae* (2) y *E. coli* (1)]. Respecto a la susceptibilidad, 18 de estos aislados (86%) presentaron fenotipos intermedios o resistentes a cromato y sólo tres se consideraron sensibles.

Dado que diversos genes *chrA* están codificados en replicones conjugativos, se decidió evaluar el contenido de plásmidos de las cepas *chrA*⁺. Se determinó que cinco de las 12

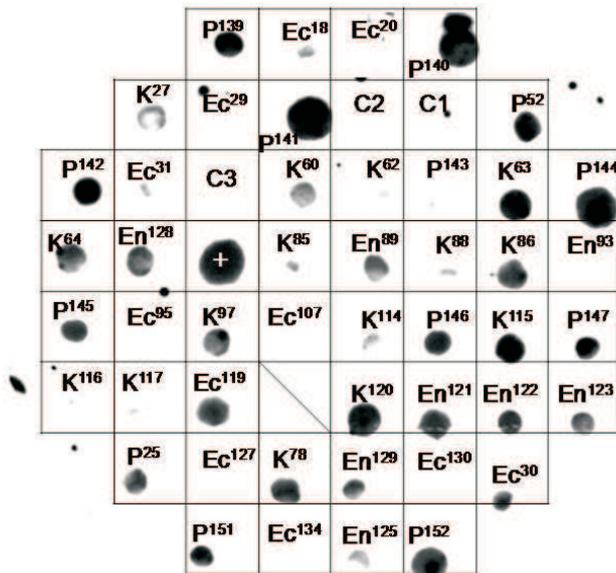
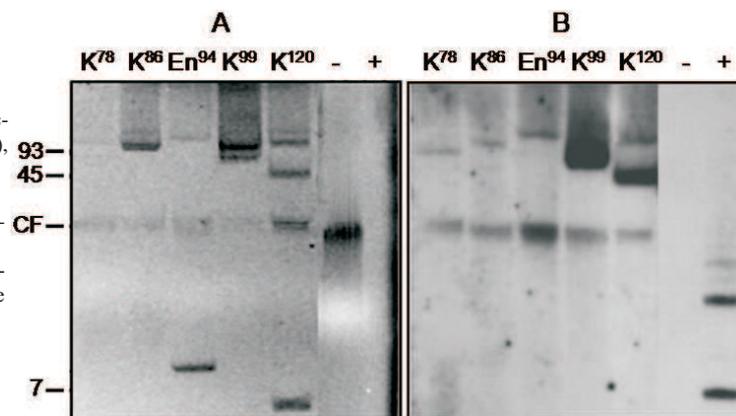


Figura 2. Aislados bacterianos positivos a hibridación con el gen *chrA* de *P. aeruginosa* pUM505. La hibridación se realizó por duplicado a 63°C con la sonda *chrA*, de *P. aeruginosa* pUM505 como se describe en Métodos. Se incluyeron sólo las 21 cepas consideradas *chrA*⁺. La cuadrícula indica la posición de los inóculos bacterianos (número de aislado) en la membrana. Abreviaturas de los aislados, En, *E. cloacae*; Ec, *E. coli*; K, *K. pneumoniae*; P, *P. aeruginosa*. Control positivo (+), *P. aeruginosa* PU21 (pUM505); controles negativos: C1 y C2, *E. coli* W3110 y DH5α, respectivamente; C3, pUCShe.

cepas de *P. aeruginosa chrA*⁺ presentaron plásmidos de un tamaño de entre 30 y 45 kb, dos cepas mostraron bandas de tamaño superior a 100 kb y cinco no presentaron plásmidos con el método de extracción empleado (datos no mostrados). Por otro lado, ocho de las nueve cepas de enterobacterias *chrA*⁺ presentaron un contenido variado de bandas de plásmidos, de tamaños desde ~7 hasta 100 kb.

Figura 3. Hibridación Southern de los plásmidos de aislados de enterobacterias *chrA*⁺. A, Separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% de los productos de extracción de DNA. Números en los carriles, DNA extraído de cepas de enterobacterias como se indica en métodos. (-), *E. coli* DH5α; (+), plásmido pEPL1; en el resto de los carriles se muestra la especie (Abreviaturas: K, *K. pneumoniae*, E, *E. cloacae*) y número de aislado (78, 86, 94, 99 y 120). Se indican a la izquierda las posiciones de los marcadores R1 (93 kb) y 2F10 (45 kb) y de pEPL1 (7 kb); CF, región de los fragmentos del cromosoma. B, Autorradiografía de la hibridación a 60°C del gen en (A) con la sonda *chrA* de *P. aeruginosa* pUM505 marcada.



Con el objetivo de identificar si los genes *chrA* estaban contenidos en plásmidos implicados en la distribución de la resistencia en ambientes clínicos, se llevaron a cabo ensayos de hibridación tipo Southern sólo con el grupo de las enterobacterias positivas a hibridación (Figura 3A); esto debido a que se sabe que el gen *chrA* está codificado en plásmidos de *Pseudomonas* y hasta donde sabemos no existen reportes de plásmidos de enterobacterias con genes *chrA* que confieran resistencia a cromato. Se encontró que cinco de las nueve enterobacterias *chrA*⁺ presentaron señales de hibridación tanto en la región del cromosoma como en bandas de posibles plásmidos (Figura 3B). El control positivo arrojó una serie de señales, correspondientes a las diferentes isoformas del plásmido pEPL1, mientras que el control negativo no mostró señal (Figura 3B). Esto indica la presencia de secuencias de DNA con alta identidad con el gen *chrA* en el cromosoma y en los plásmidos presentes en estas bacterias. Con respecto a las señales obtenidas en las bandas de plásmidos, las cepas de *K. pneumoniae* 78, 86 y *E. cloacae* 94, mostraron señales de hibridación en bandas únicas, de tamaños aproximados de 80, 95 y 100 kb, respectivamente. El aislado de *K. pneumoniae* 99 arrojó una intensa señal en la región correspondiente a las bandas de 65 y 85 kb, mientras que el aislado de *K. pneumoniae* 120 presentó señales en bandas de 40 y 95 kb, respectivamente (Figura 3B).

Para determinar si los plásmidos que hibridaron con el gen *chrA* identificados en las cinco enterobacterias están relacionados con la distribución de dichos genes en ambientes hospitalarios, se realizaron ensayos de conjugación empleando como receptora la cepa de *E. coli* J53-2. Cuatro plásmidos de cinco cepas distintas se transfirieron por conjugación a *E. coli*. La extracción del DNA de las transconjugantes mostró que los aislados de *K. pneumoniae* 78, 86 y 99 transfirieron plásmidos de 80, 95, y 85 kb, respectivamente (Figura 4A), mientras que *E. cloacae* 94 transfirió el plásmido de 100 kb (Figura 4B). Además, se encontró que todos los plásmidos transferidos coincidieron en tamaño con bandas que arrojaron señal de hibridación con el gen *chrA* en las cepas donadoras (Figura 3B).

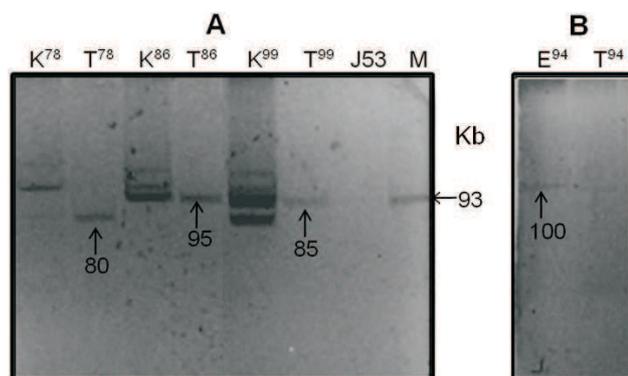


Figura 4. Transferencia por conjugación de plásmidos de enterobacterias *chrA*⁺. Plásmidos transferidos a la cepa receptora *E. coli* J53-2 procedentes de las cepas donadoras A) *Klebsiella* y B) *Enterobacter*. La conjugación se llevó a cabo como se indica en Métodos, seleccionando en agar LB con rifampicina y cromato. Se muestra la separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% del DNA extraído de las cepas donadoras y las transconjugantes. Se señalan con flechas los tamaños (kb) de los plásmidos transferidos y del marcador R1 (93 kb). Abreviaturas: K, *K. pneumoniae*, E, *E. cloacae*, J53, *E. coli* J53-2; T, transconjugantes. Números 78, 86 y 99, corresponden al número de aislado bacteriano.

Finalmente, para determinar si los genes *chrA* codificados en los plásmidos transferidos a *E. coli* J53-2 son capaces de conferir resistencia a cromato, se realizaron pruebas de susceptibilidad al ión en las transconjugantes. Se encontró que todos los plásmidos fueron capaces de conferir resistencia a cromato, en comparación con la cepa receptora sin plásmido. En la Figura 5 se muestra la resistencia a cromato adquirida en las transconjugantes de *E. coli* J53-2 con los plásmidos de 80 y 100 kb procedentes de los aislados de *K. pneumoniae* 78 y *E. cloacae* 94, respectivamente. Estos datos indican que los plásmidos conjugativos presentes en los aislados de origen clínico confieren resistencia a cromato.

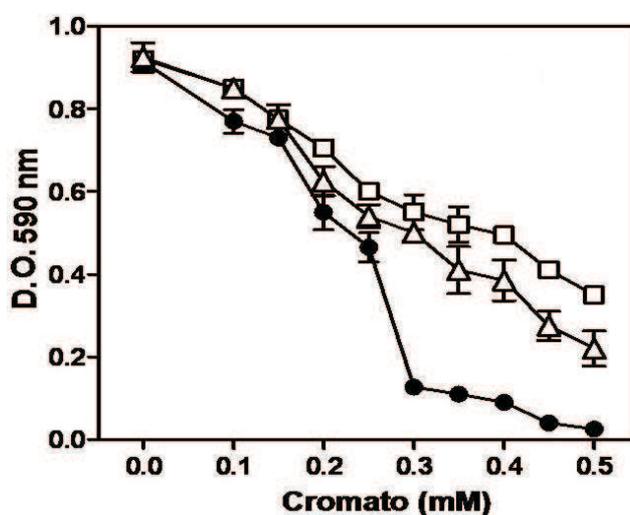


Figura 5. Susceptibilidad a cromato de las transconjugantes de *E. coli* con plásmidos de aislados *chrA+*. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo a 37°C por 18 h con agitación con las concentraciones de cromato indicadas y se determinó el crecimiento bacteriano por densidad óptica (D.O.) a 590 nm. Cepa receptora de *E. coli* J53-2 (●); transconjugante de J53-2 con el plásmido de 100 kb de *E. cloacae* 94 (Δ); transconjugante de J53-2 con el plásmido de 80 kb de *K. pneumoniae* 78 (□). Cada valor representa el promedio de dos ensayos independientes por duplicado mostrando las barras de error estándar.

Discusión

El gen *chrA* de pUM505, además de estar codificado en un replicón conjugativo forma parte de un probable transposón localizado en una isla genómica de resistencia a metales (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011). Esto hace posible que este gen sea transferido a huéspedes bacterianos de ambientes hospitalarios, funcionando como un factor selectivo para la prevalencia y distribución de este plásmido. El posible transposón de resistencia a cromato del plásmido pUM505, que incluye el grupo de genes *chrBAC* (Figura 1B), podría representar un mecanismo adicional de transferencia horizontal, como se ha propuesto para los transposones Tn5719 del plásmido pB4 de *Pseudomonas sp.* (Tauch *et al.*, 2003) y Tn*OtChr* del cro-

mosoma de *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (Branco *et al.*, 2008), los cuales poseen genes homólogos de *chrA*.

Los ensayos de MIC mostraron diferentes valores de resistencia a cromato para cada especie bacteriana (Tabla 1); esta variabilidad en la resistencia al oxianión probablemente se debe a la diferencia entre especies de los genes implicados en la resistencia a cromato y a la diferencia en la expresión de los mismos. Los ensayos de MIC, por otra parte, determinaron que en la colección de aislados un pequeño porcentaje de enterobacterias (14%) y gran parte de las cepas de *Pseudomonas* (48%) presentaron resistencia a cromato (Tabla 1). No tenemos una explicación para estos resultados, sin embargo, estos datos pueden sugerir que el 'estilo de vida' de las especies bacterianas podría ser un factor importante en la resistencia al oxianión. Así, el cromato en suelos o ambientes acuáticos contaminados podría favorecer la selección de cepas de *P. aeruginosa* resistentes al oxianión que posteriormente pueden infectar humanos y llegar al hospital. La baja proporción de aislados de enterobacterias resistentes a cromato se puede deber a que no se conocen fuentes del oxianión en los hospitales que pudieran funcionar como factores de selección.

Los resultados de hibridación en colonia mostraron que secuencias similares al gen *chrA* se encuentran distribuidas en aislados de enterobacterias y *Pseudomonas* (Figura 2), lo cual sugiere que estos genes pueden ser transferidos entre bacterias hospitalarias de diversas especies y que podrían servir como un factor de selección de plásmidos en los hospitales. Se obtuvieron resultados positivos de hibridación en colonia con la sonda *chrA* en aislados de cuatro de las cinco especies analizadas (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) (Figura 2), indicando que estos genes se encuentran ampliamente distribuidos entre bacterias de origen hospitalario.

Además, se encontró una clara relación entre la presencia de secuencias similares a *chrA* y la expresión de resistencia a cromato, ya que 18 de las 21 cepas positivas a hibridación (*chrA*⁺) fueron resistentes al oxianión, lo cual sugiere que los genes *chrA* son los responsables de dichos fenotipos en estas bacterias. Debido a que los aislados positivos a hibridación provienen de diferentes sitios y fechas de aislamiento (datos no mostrados), esto sugiere que los genes *chrA* pueden ser un factor de prevalencia y distribución. Sin embargo, tres aislados de *P. aeruginosa* que hibridaron con *chrA*⁺ fueron sensibles a cromato, lo cual probablemente se debe a que los genes *chrA* presentes en estos aislados no se expresan en las condiciones en que se realizaron los ensayos de susceptibilidad. Lo anterior se basa en evidencias que indican que los genes *chrA* de *Burkholderia xenovorans* LB400 se expresan de manera diferencial, según las condiciones crecimiento (Luna-Luna, 2010). También podría ser que los genes *chrA* de los aislados se encuentren incompletos o interrumpidos provocando ser no funcionales. De los aislados resistentes a cromato, 10 presentaron resultados negativos de hibridación (8 *K. pneumoniae*, 1 de *E. coli* y 1 de *P. aeruginosa*), lo cual sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia a este oxianión en dichos aislados,

Los ensayos de hibridación tipo Southern revelaron la presencia de bandas de plásmidos con secuencias similares al gen *chrA* en cinco de los nueve aislados de enterobacte-

rias *chrA*⁺ (Figura 3B). Cabe resaltar que, aunque se han reportado decenas de homólogos de la superfamilia CHR en diversas especies bacterianas (Díaz-Pérez *et. al.*, 2007), este es el primer reporte de la presencia de genes *chrA* en plásmidos de enterobacterias. Lo anterior podría reflejar la falta de estudios de distribución de genes *chr* en bacterias de origen hospitalario o bien una baja abundancia de este tipo de genes en enterobacterias.

Debido a que se conoce que los genes *chrA* codificados en plásmidos de *Pseudomonas* pueden ser transferidos de manera horizontal y al hallazgo en este estudio de la presencia de genes *chrA* en replicones de enterobacterias, se analizó la transferencia de los plásmidos sólo con el grupo de las enterobacterias. De los cinco plásmidos de enterobacterias, cuatro se transfirieron a *E. coli* (Figura 4), lo cual indica que éstos son conjugativos y son funcionales en un huésped heterólogo (Figura 5). Estas características sugieren que los genes *chrA* son un factor importante en la distribución y prevalencia de los plásmidos entre bacterias de origen clínico.

Por otro lado, la señal de hibridación obtenida en los fragmentos del DNA cromosómico (Figura 3B), probablemente refleja la presencia de copias adicionales de estos genes en el cromosoma de estas bacterias. Se ha reportado la presencia de múltiples copias de genes *chrA* en el cromosoma y en plásmidos de bacterias como *C. metallidurans* CH34 y *B. xenovorans* LB400 (Díaz-Pérez *et. al.*, 2007). Aunque las señales en la región cromosómica también pudieran ser producto de la degradación de los plásmidos durante el proceso de extracción.

En conclusión, el gen *chrA* de resistencia a cromato se encuentra presente en plásmidos de *P. aeruginosa* y enterobacterias de origen clínico.

Agradecimientos

Trabajo realizado con apoyos de la Coordinación de Investigación Científica (UMSNH, No. 2.6 y No. 2.35) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. 79190).

Bibliografía

1. 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.
2. Branco, R., Chang, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible *chrBACF* from the transposable element Tn*OtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. J. Bacteriol. 172: 287-291.
3. 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.

4. Cai, L., Liu, 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.
5. Cervantes, C. y Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria In: Nies, D. H. y Silver, S. (Ed.) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Springer-Verlag, Berlin. p. 407-420.
6. Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, N. A., de la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159-163.
7. 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.
8. 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.
9. Gupta, A., Phung, L. T., Taylor, D. E. y Silver, S. (2001). Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiol.* 147: 3393-3402.
10. 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.
11. 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.
12. Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12: 10-36.
13. Luna-Luna, M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
14. 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.
15. Metz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123: 626-633.
16. Miranda, G., Castro, N., Leanos, B., Valenzuela, A., Garza-Ramos, U., Rojas, T., Solórzano, L. y Silva-Sánchez, J. (2004). Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 30-35.
17. 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.

18. Plaper, A., Jenko-Brinovec, S., Premzl, A., Kos, J. y Raspor, P. (2002). Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 943-949.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Shi, X. G. 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.
23. Silver, S. y Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 587-605.
24. Tato, M., Coque, T. M., Baquero, F. y Cantón, R. (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.
25. 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 β 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.
26. 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.
27. Vasconcelos-Morais, P., Branco, R. y Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 a strain highly resistant. *Biometals* 24: 401-410.