

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO



Re-sensibilización de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por edición de genes asociados a multirresistencia antibiótica implementando CRISPR cas9  
Revisión Bibliográfica

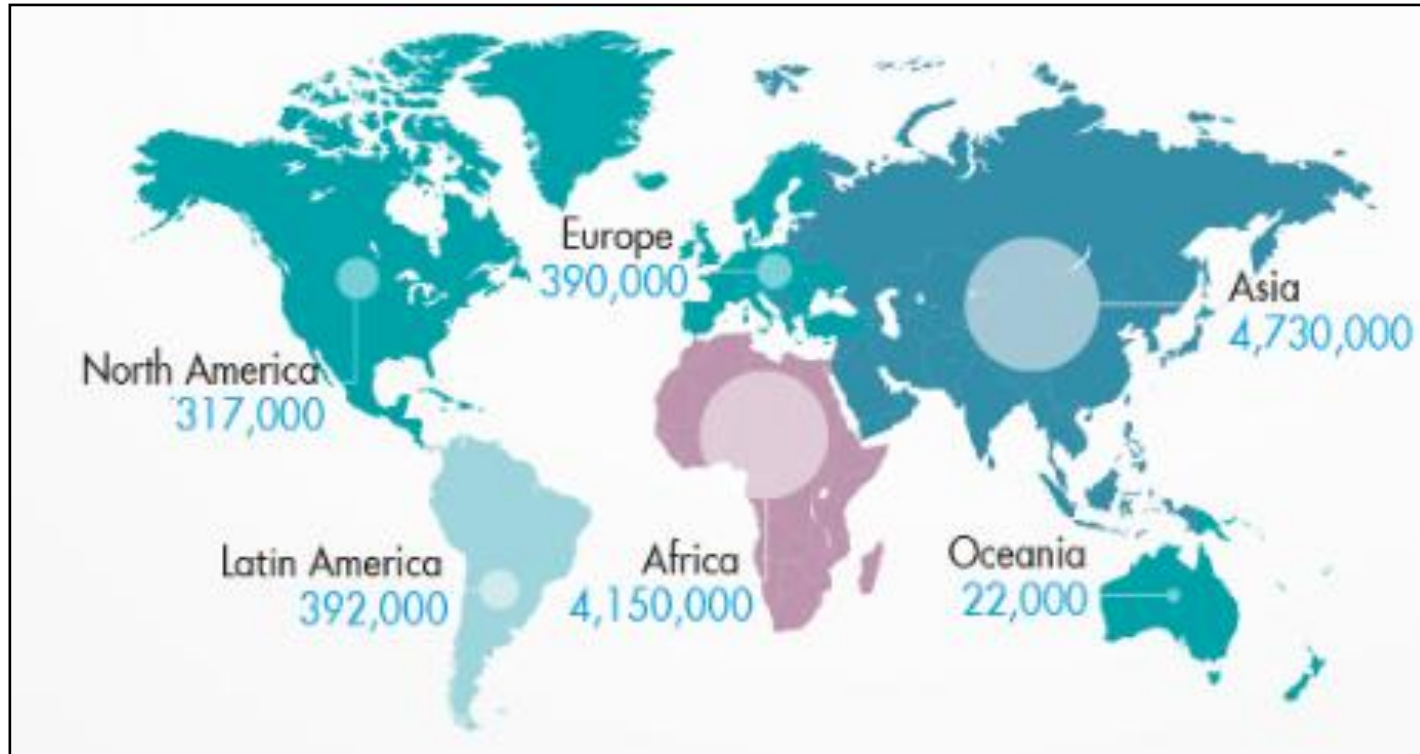
TESISTA:  
García Espinosa Yudy Catalina

ASESORA DE TESIS:  
MSc-PhD  
Ruth Sánchez Mora

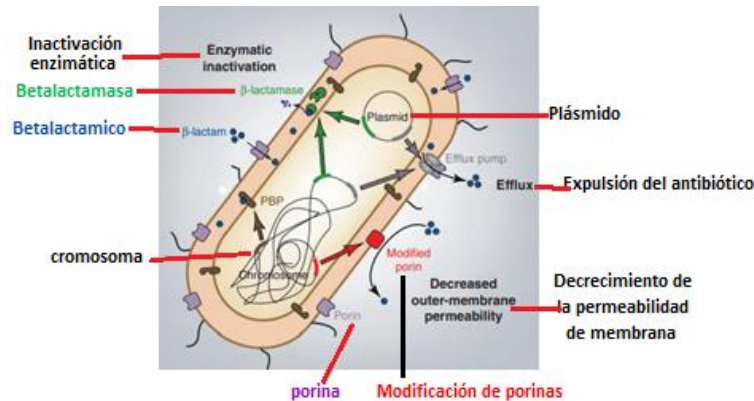
# TABLA DE CONTENIDO

- I. INTRODUCCIÓN
- II. OBJETIVOS
- III. ANTECEDENTES
- IV. METODOLOGÍA
- V. RESULTADOS
- VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES
- VII. RECOMENDACIONES

# Proyección de muertes al 2050



# Genes de resistencia en Colombia que expresan BLEES



Factores intrínsecos

Factores extrínsecos

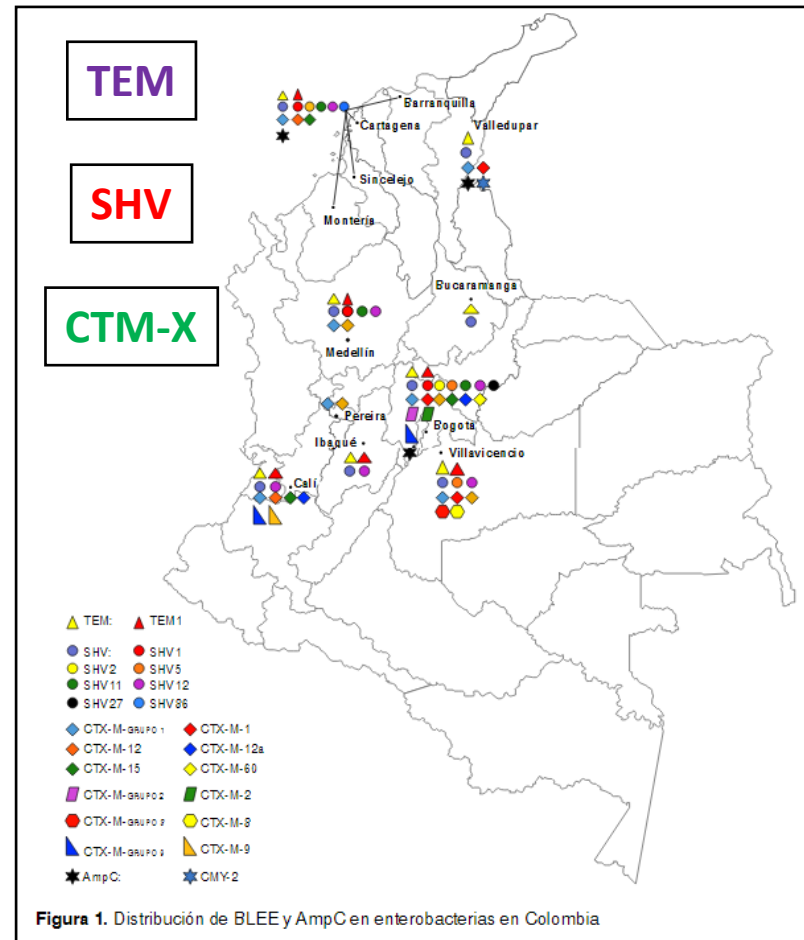


Figura 1. Distribución de BLEE y AmpC en enterobacterias en Colombia

# Genes de resistencia en Colombia para Carbapenemasas

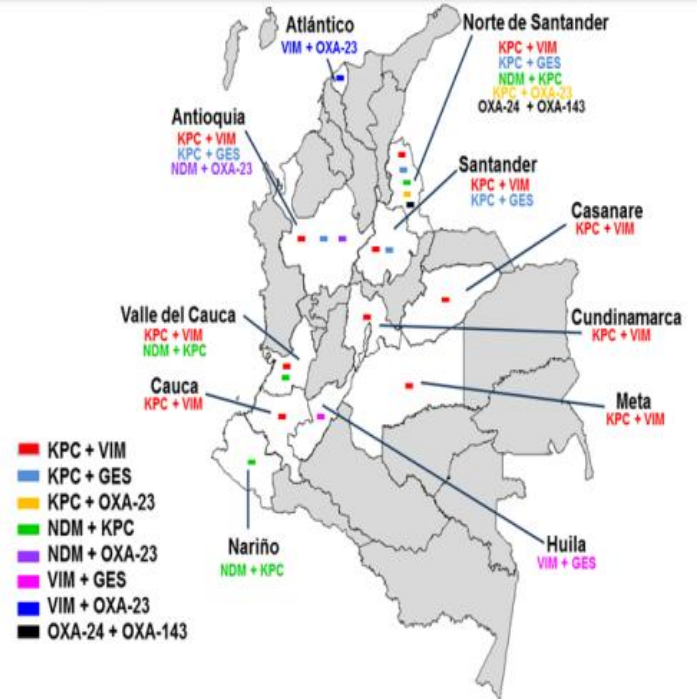
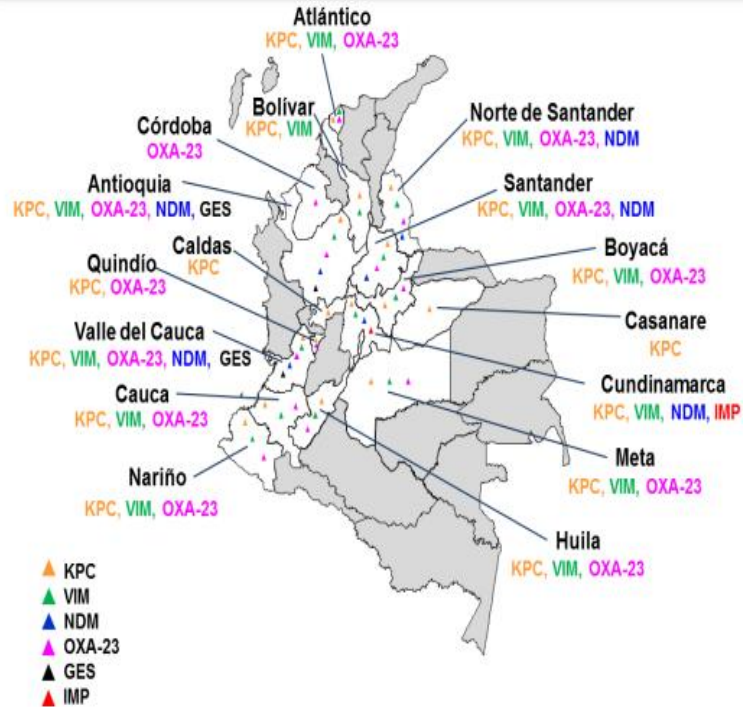
NDM

OXA-23

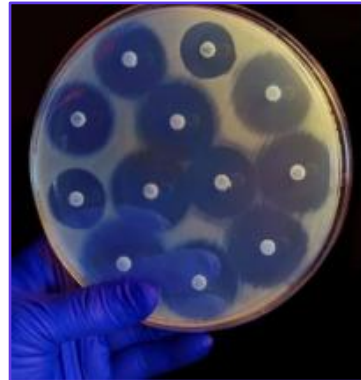
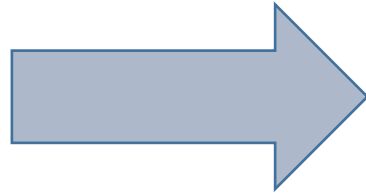
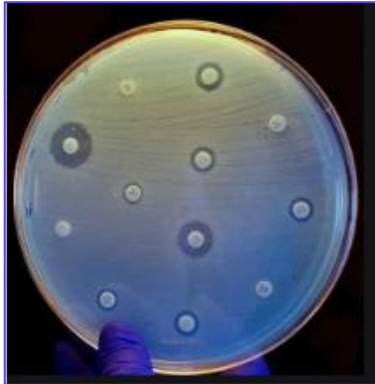
VIM

KPC

## CARBAPENEMASAS



**“Proceso de edición genética que al ser empleado en una bacteria que había adquirido previamente multirresistencia a antibióticos por transmisión horizontal de genes o mutación, devuelve a dicha bacteria sus características previas de susceptibilidad”.**



## OBJETIVO GENERAL

Analizar la tecnología CRISPR/Cas9 como una herramienta clave a emplearse para aminorar la resistencia a antibióticos relacionada con THG en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir algunos estudios que permiten considerar la tecnología CRISPR/Cas9 una herramienta útil en la edición de genomas bacterianos.
2. Demostrar los mecanismos por los cuales la tecnología CRISPR/Cas9 permite la Re-sensibilización de bacterias de interés clínico.
3. Presentar algunos hallazgos en la edición de genomas de *E. coli* y *P. Aeruginosa* que son relevantes para contrarrestar la resistencia a antibióticos producto de THG.





## Población

Revisión bibliográfica de artículos en bases de datos indexadas, publicados desde el 2010 en español o inglés, que cumplieran con los criterios de inclusión.

## Criterios de inclusión

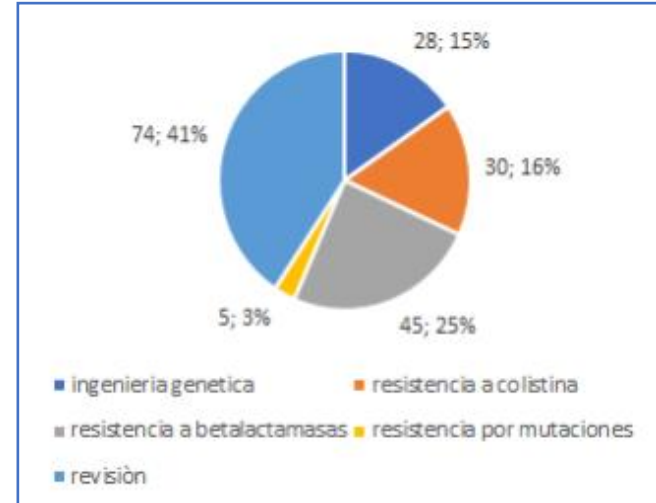


## Muestra

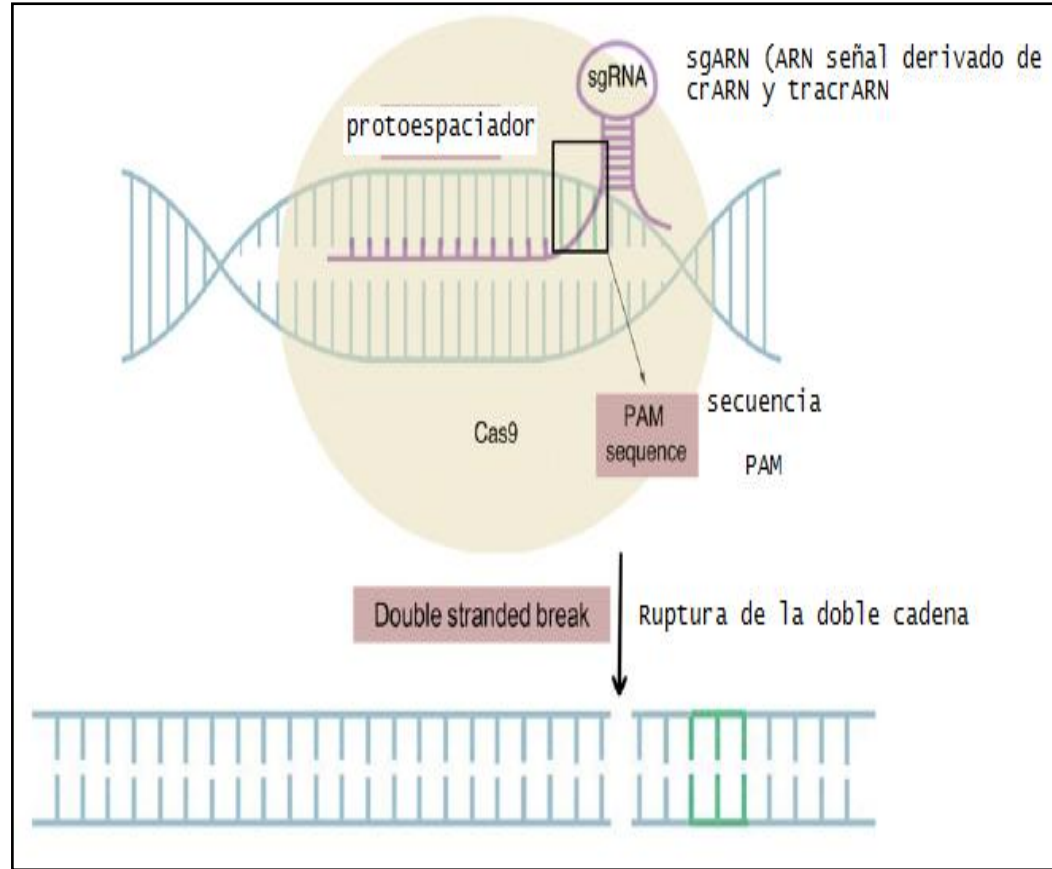
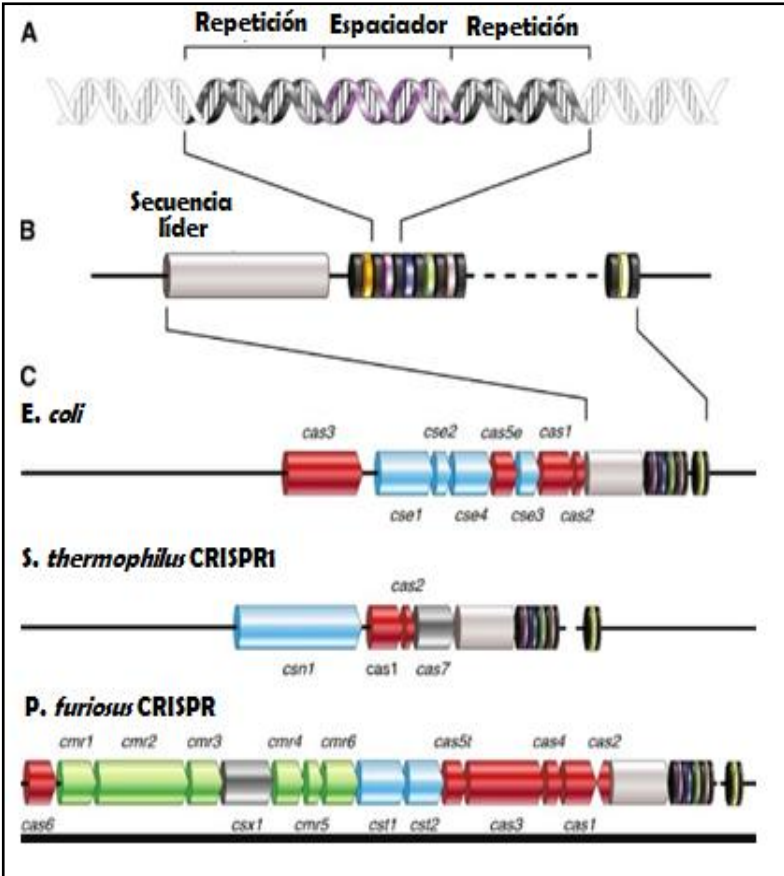
182 artículos entre revisión e investigaciones.

The screenshot shows a library interface with a search bar and navigation tabs. The main content area displays a list of documents with the following titles and authors:

- La revolución de la ingeniería genética (Gómez Márquez J. In: NACCC: Nueva academia científica colombiana. Biología (2013))
- La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas (Lammoglia-coeb M, Lozano-eyres R, Daniel, Arizpe-sahana C, et al. In: Investigador en discapacidad (2016))
- Ingeniería genética (Pascual Caaforra L, Latore Castro A In: Genética conceptos esenciales (2013))
- Colistin-resistant mcr-1-positive pathogenic Escherichia coli in Swine, Japan, 2007-2014 (Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, et al. In: Emerging Infectious Diseases (2016))
- CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects (De La Fuente-Núñez C, Lu T In: Integrative Biology (United Kingdom) (2017))
- CRISPR-Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant Escherichia coli harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (Yim J, Cho D, Park M, et al. In: Journal of Microbiology and Biotechnology (2015))
- CRISPR-Cas9-based Genome Editing in Pseudomonas aeruginosa and Cytidine Deaminase-Mediated Base Editing in Pseudomonas Species (Chen W, Zhang Y, Zhang Y, et al. In: Genome (2018))
- Exploiting a conjugative CRISPR-Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the mcr-1 gene from Escherichia coli (Dong H, Xiang H, Wu D, et al. In: International Journal of Antimicrobial Agents (2019))
- Generation of newly discovered resistance gene mcr-1 knockout in Escherichia coli using the CRISPR-Cas9 system (Sun L, He T, Zhang L, et al. In: Journal of Microbiology and Biotechnology (2017))



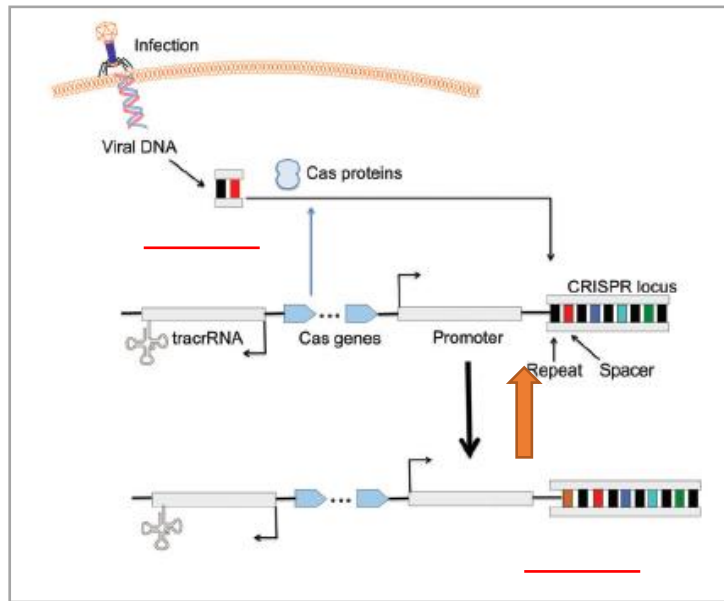
# 1. Herramienta de CRISPR/Cas9



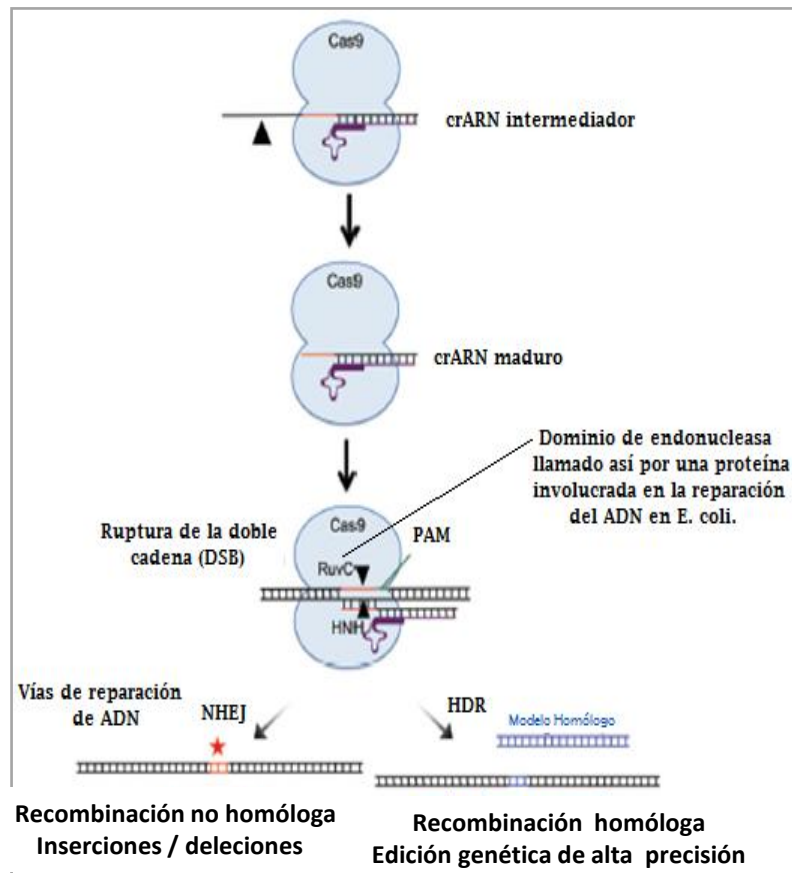
# Mecanismo de la inmunidad de CRISPR/Cas9 Tipo II

RESULTADOS

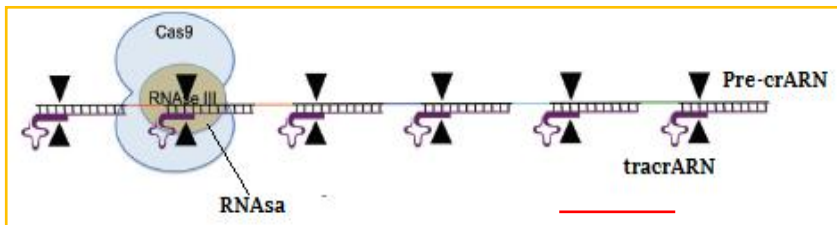
## Adaptación



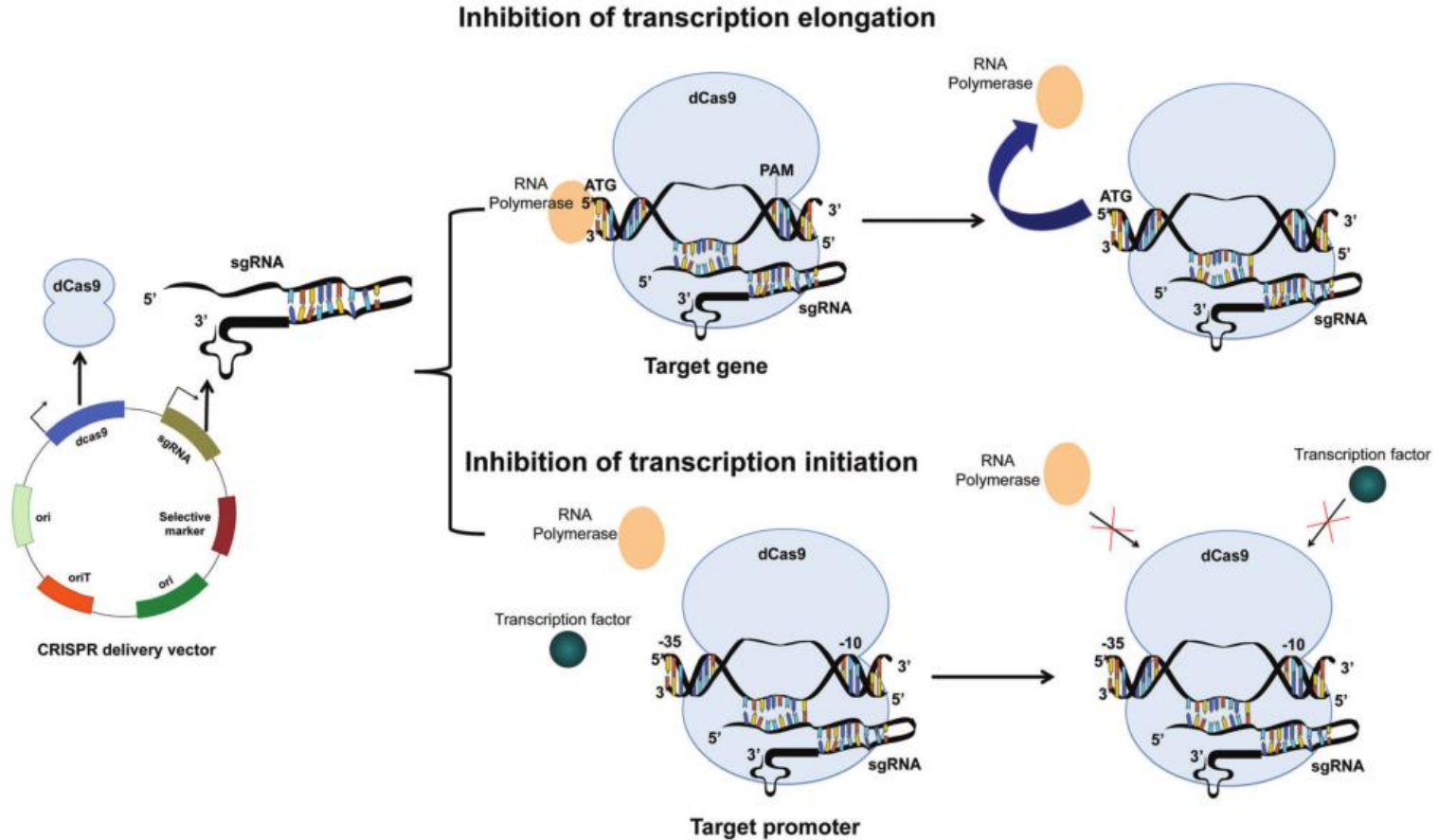
## Interferencia



## Expresión: síntesis de crARN

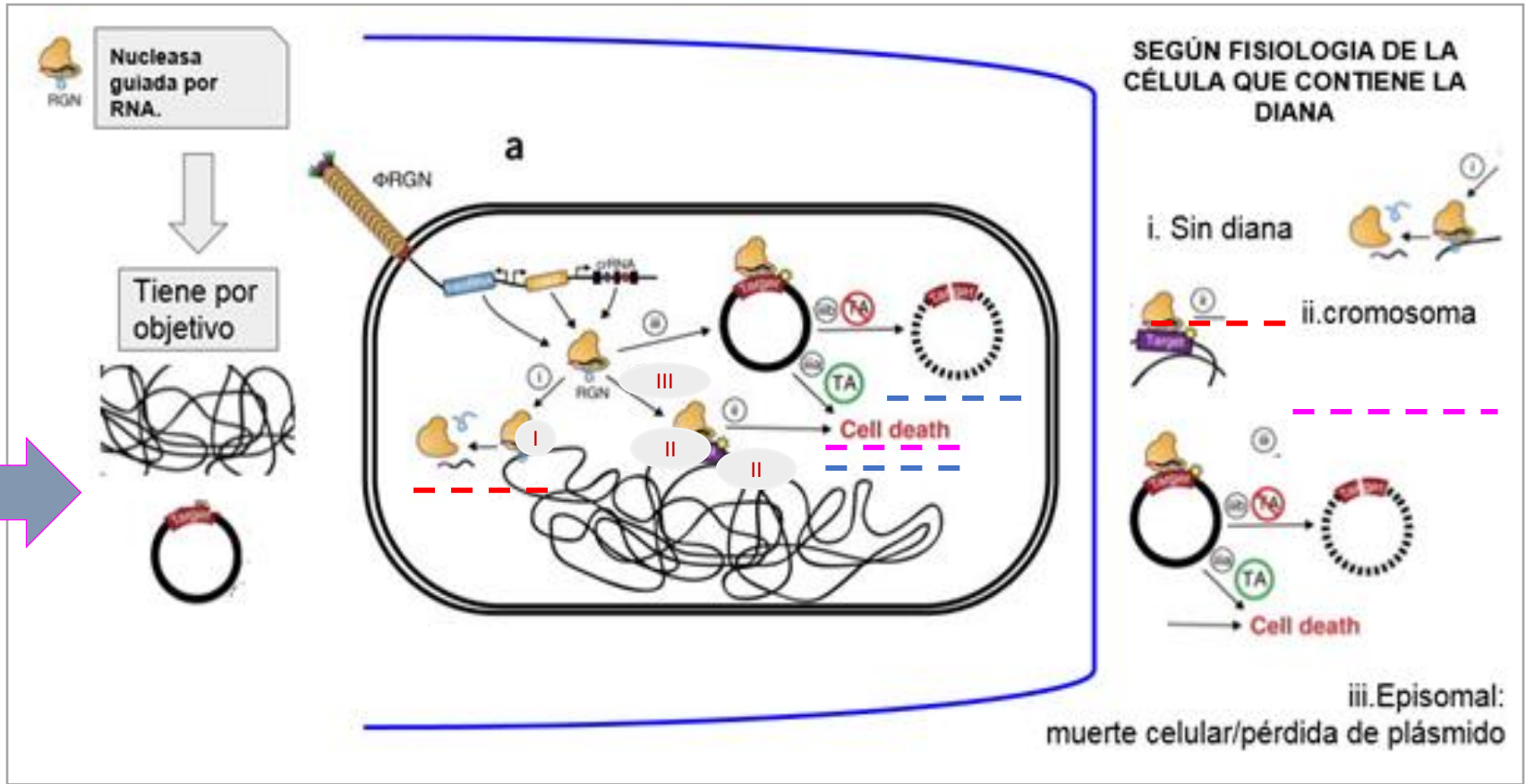


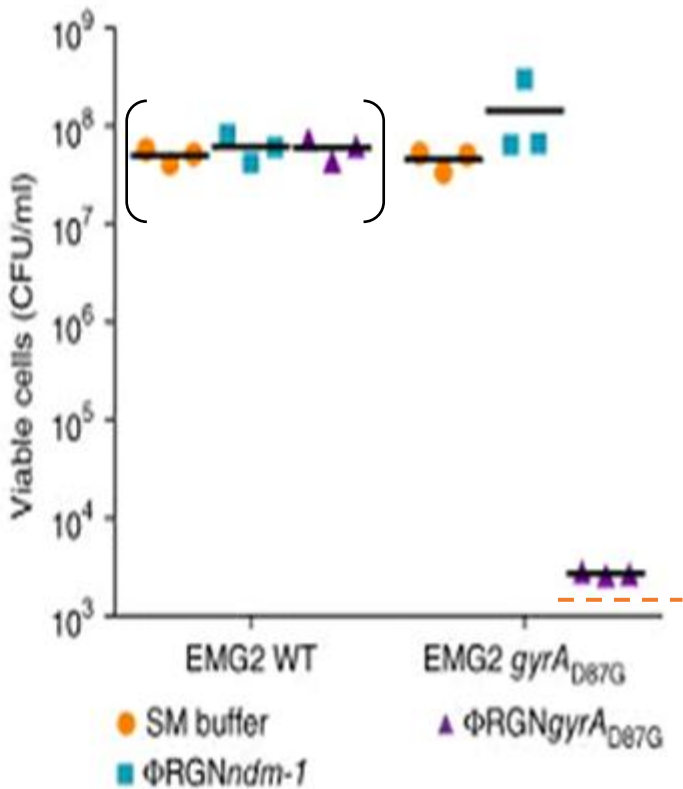
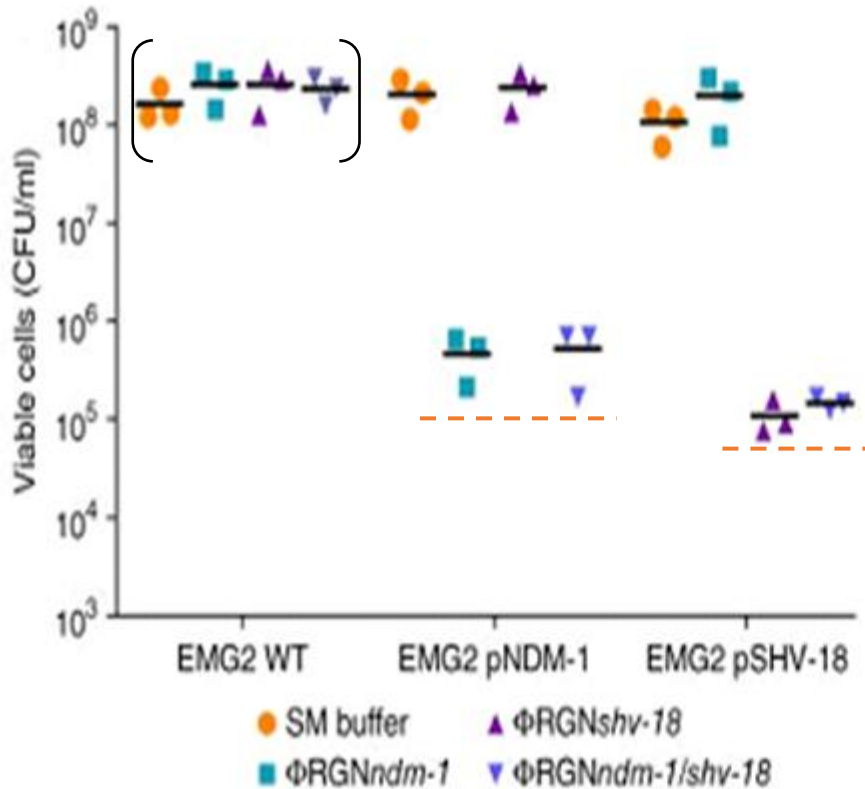
De La Fuente y Timothy K. Lu, 2017



# CRISPR/Cas asociado a nucleasas guiadas por RNA

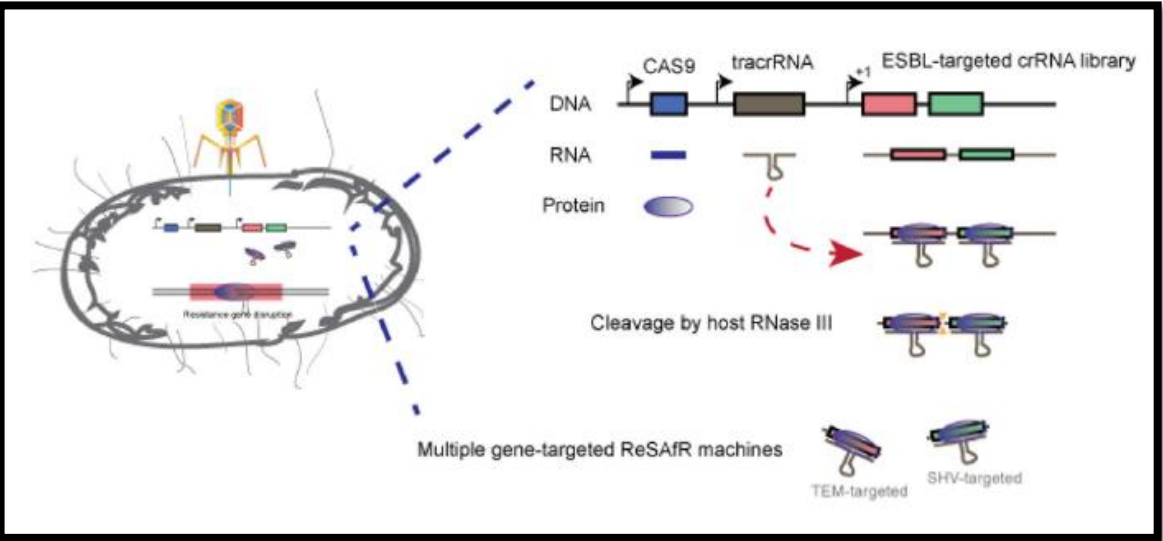
RESULTADOS



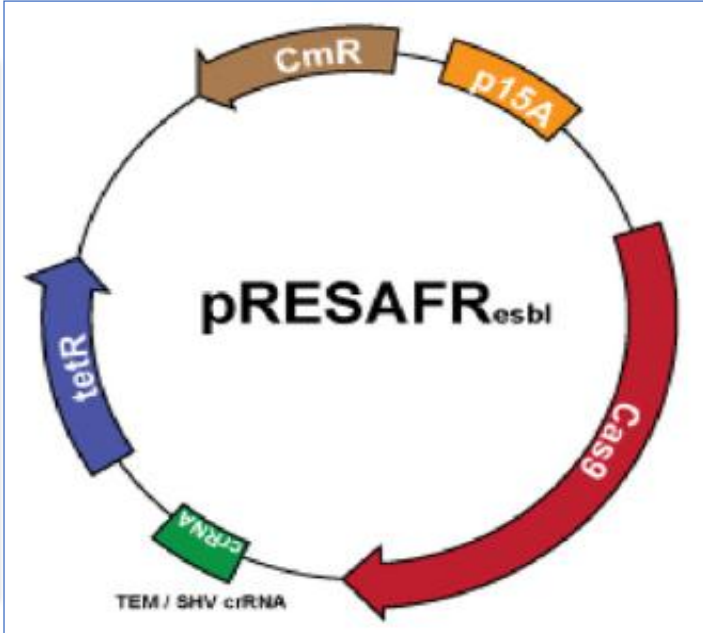


# 2.Re-sensibilización de *Escherichia coli* productora de BLEES

SHV, TEM



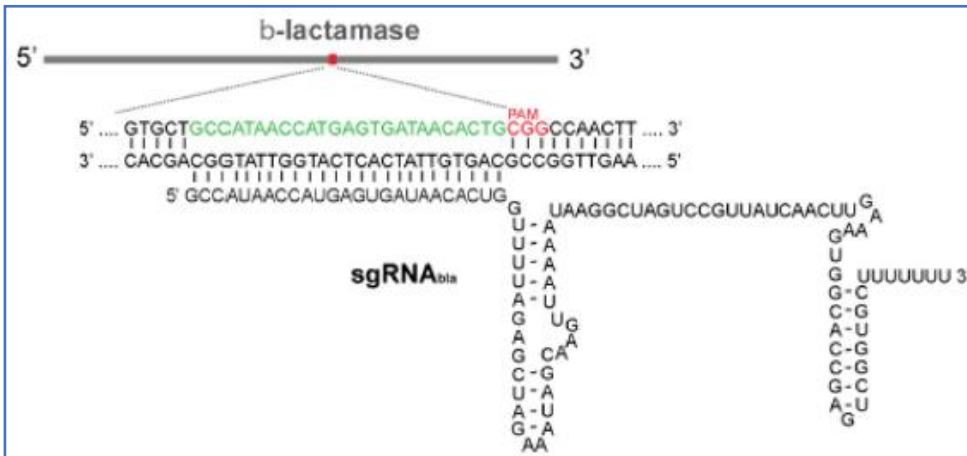
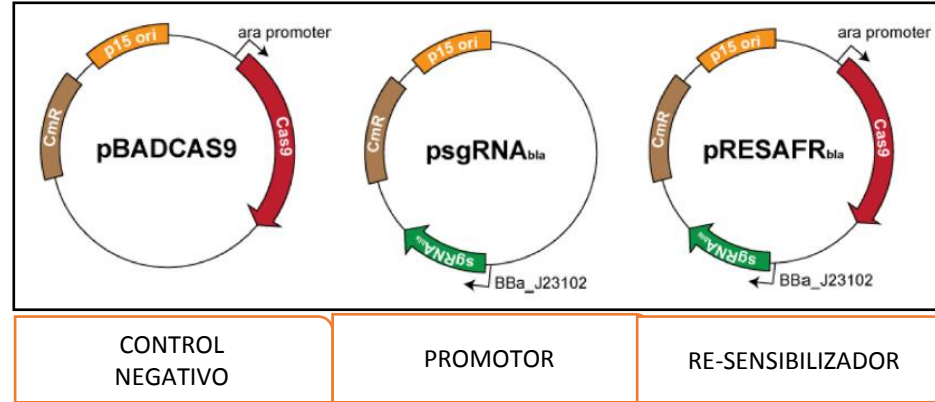
PLÁSMIDO pRESAFResbl



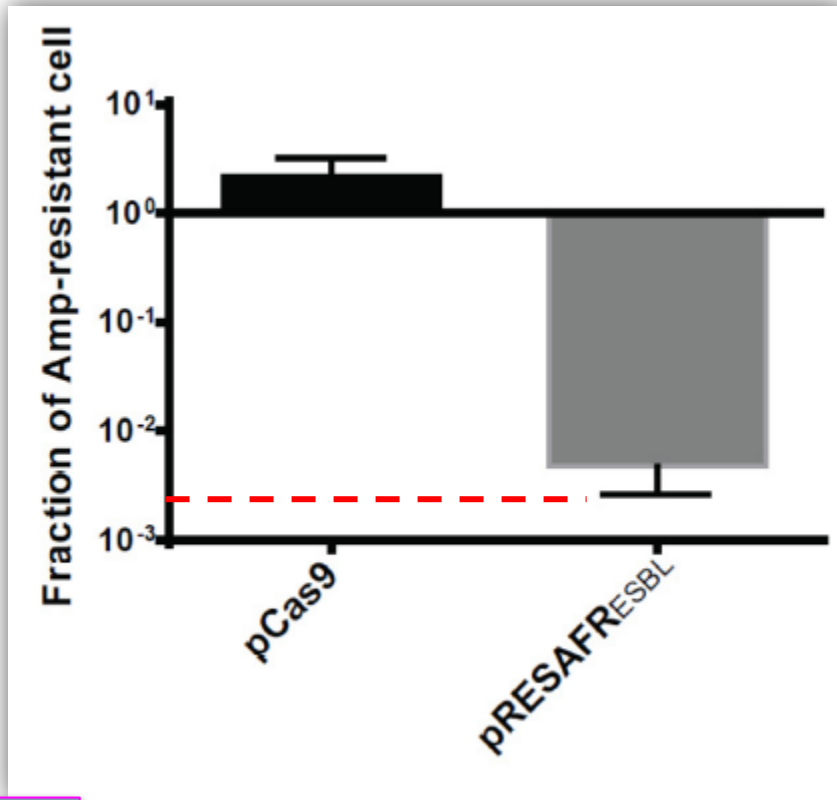
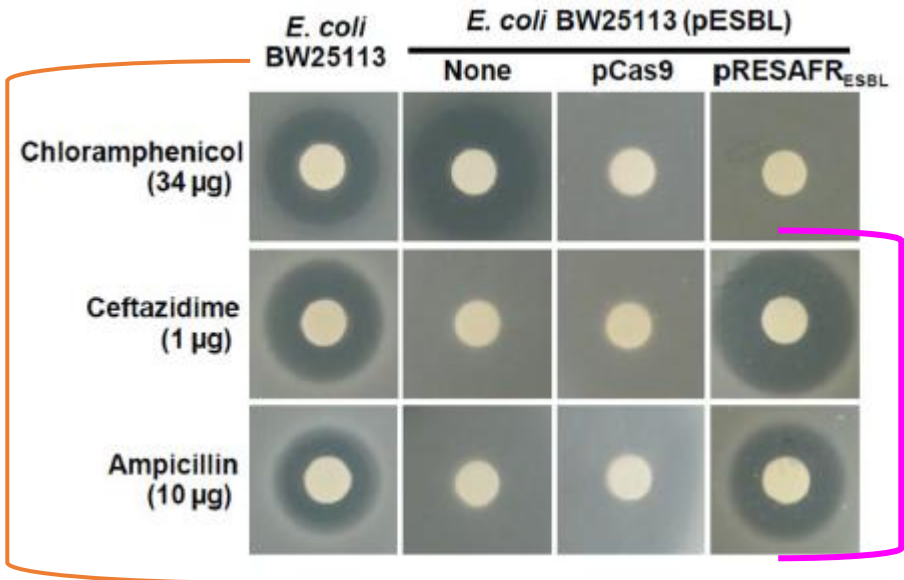


# Plásmidos de experimentación

## RESULTADOS



# Evaluación de la resistencia antes y después de la re-sensibilización

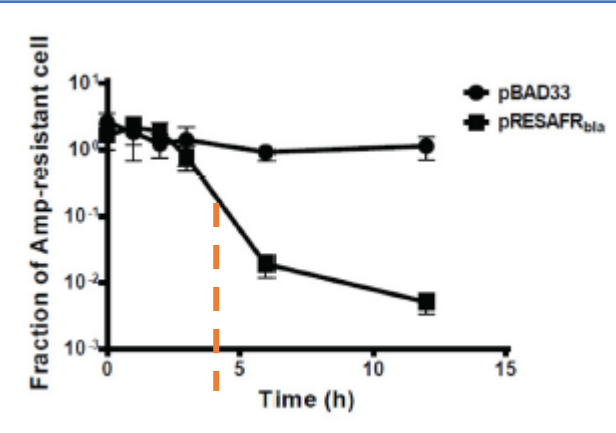
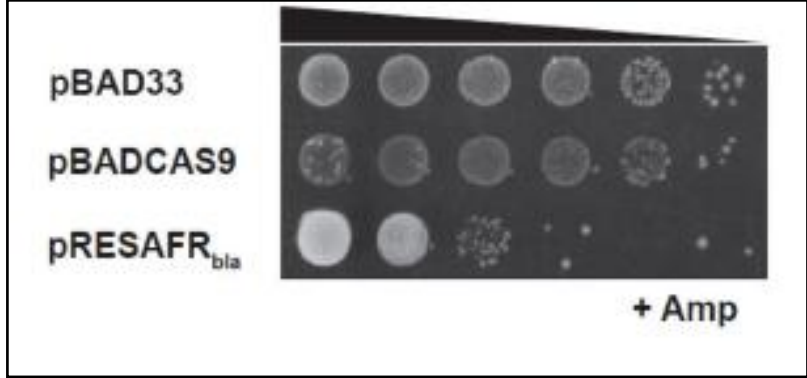


Antibiotics	Diameter of inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i> BW25113	<i>E. coli</i> BW25113 (pESBL)		
		None	pCas9	pRESAFR <sub>ESBL</sub>
Chloramphenicol (34 µg)	17	18	-	-
Ceftazidime (1 µg)	18	-	-	20.0±0.63
Ampicillin (10 µg)	15	-	-	16.6±1.02

# Re-sensibilización

# RESULTADOS

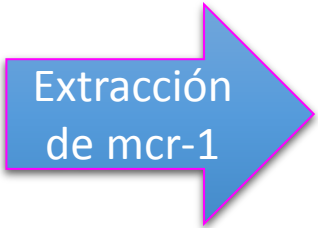
> 99 % 100 Ug/ml Amp



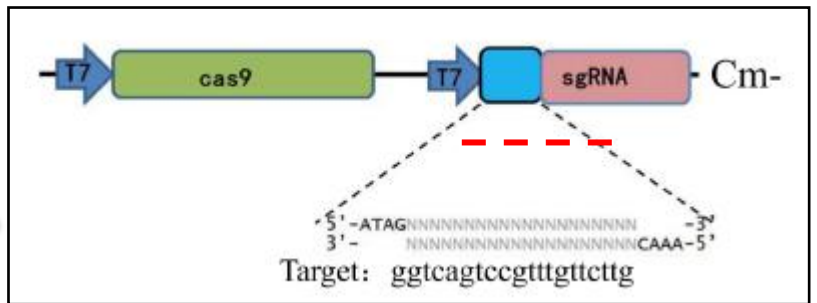
# 3. Intervención del gen mcr-1 con CRISPR Cas9



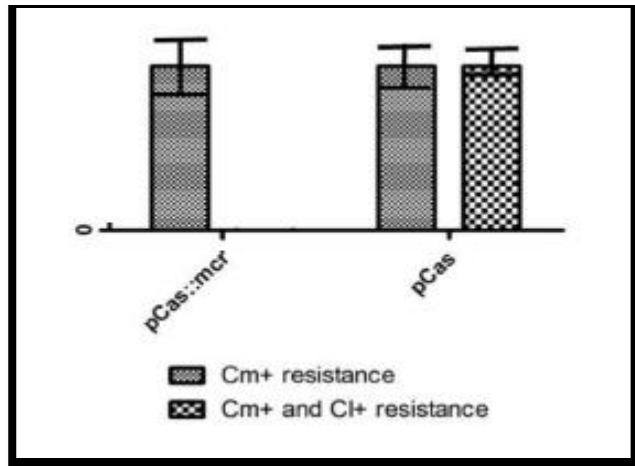
E. Coli N-J-15-3



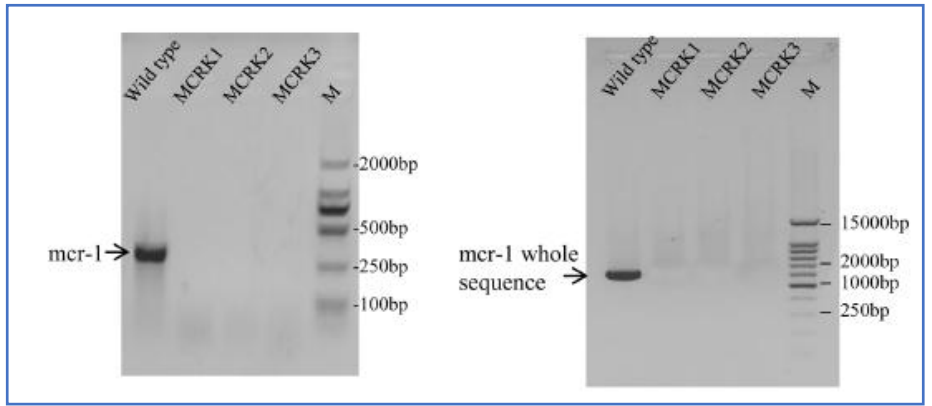
## Diseño del ARNsg



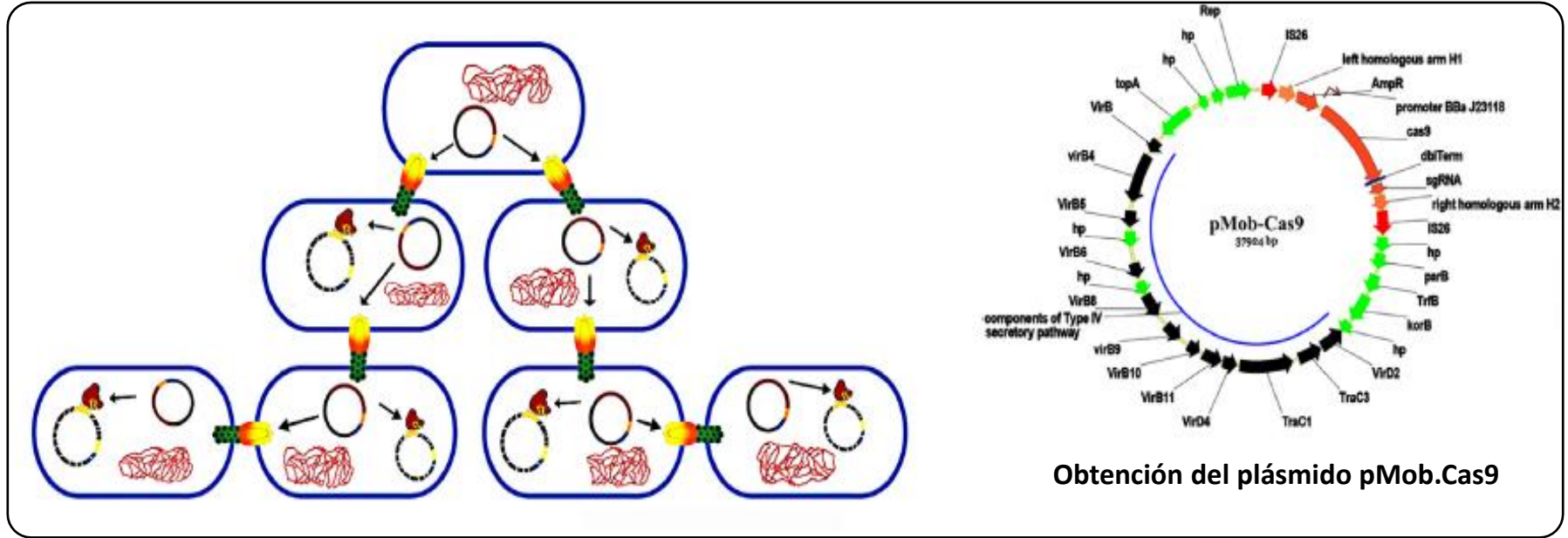
## Evaluación frente a antibióticos



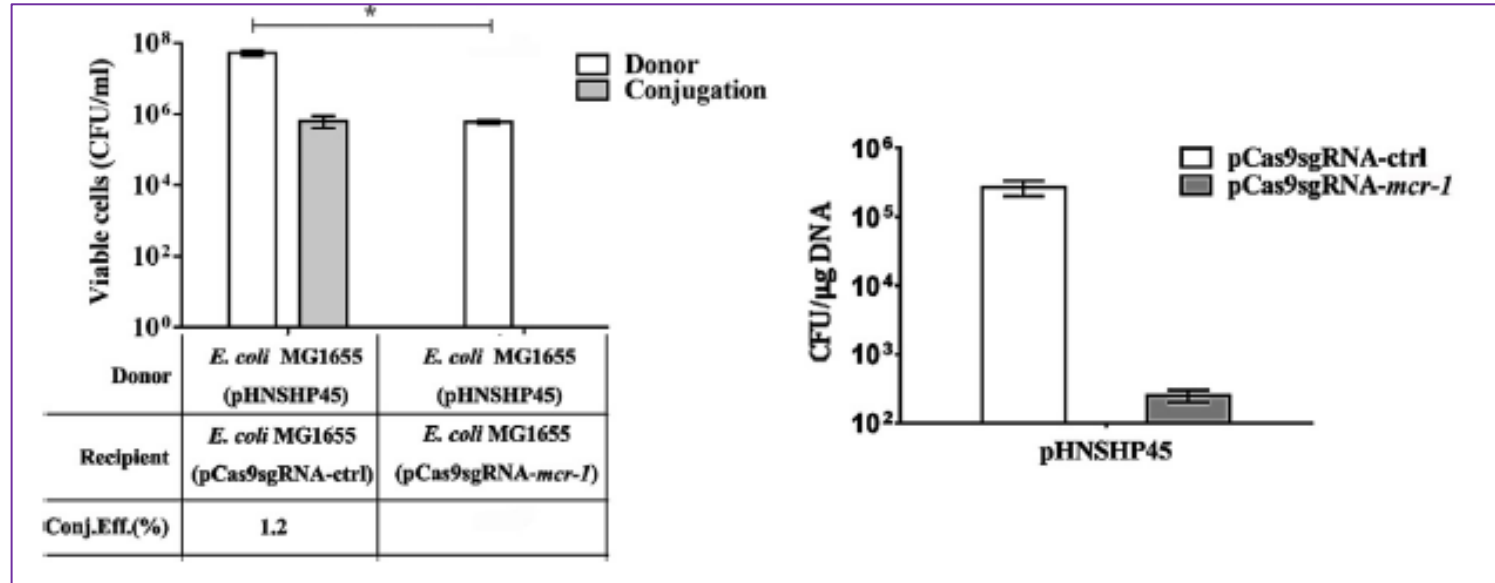
## Seguimiento del Gen mcr-1



# Eliminación de la resistencia mcr-1 en varios plásmidos RESULTADOS

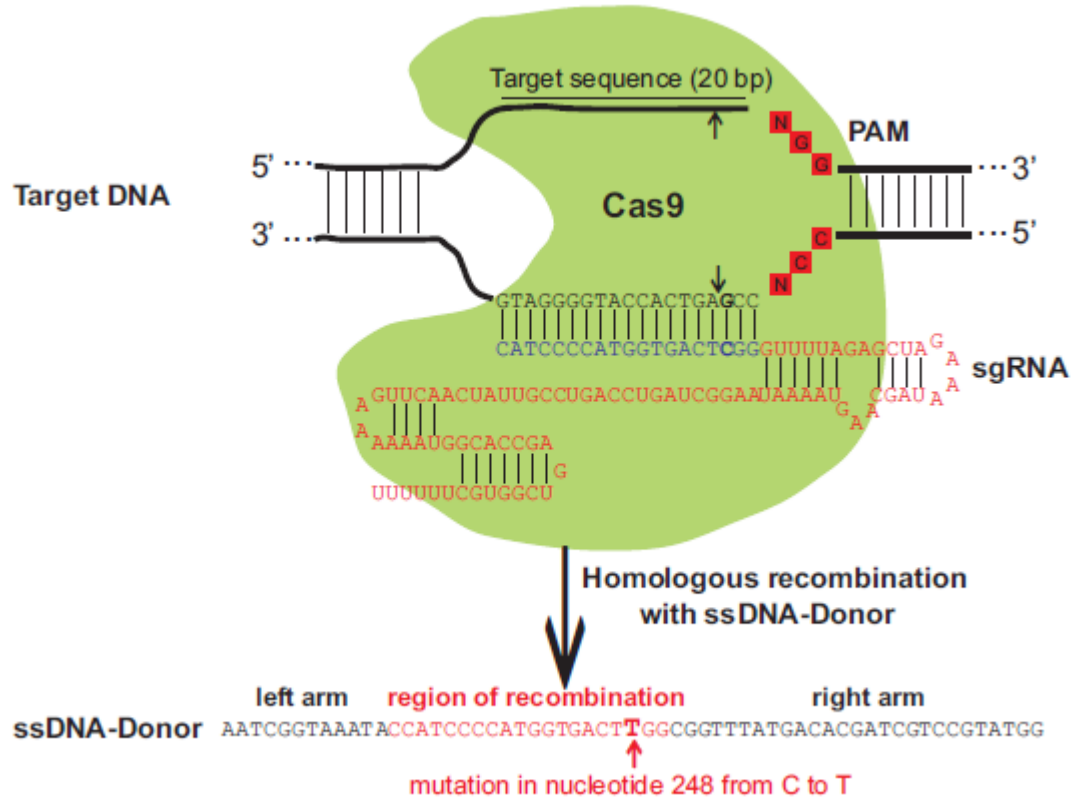


Obtención del plásmido pMob.Cas9



# 4.Efecto de CRISPR Cas9 en la mutación gyrA

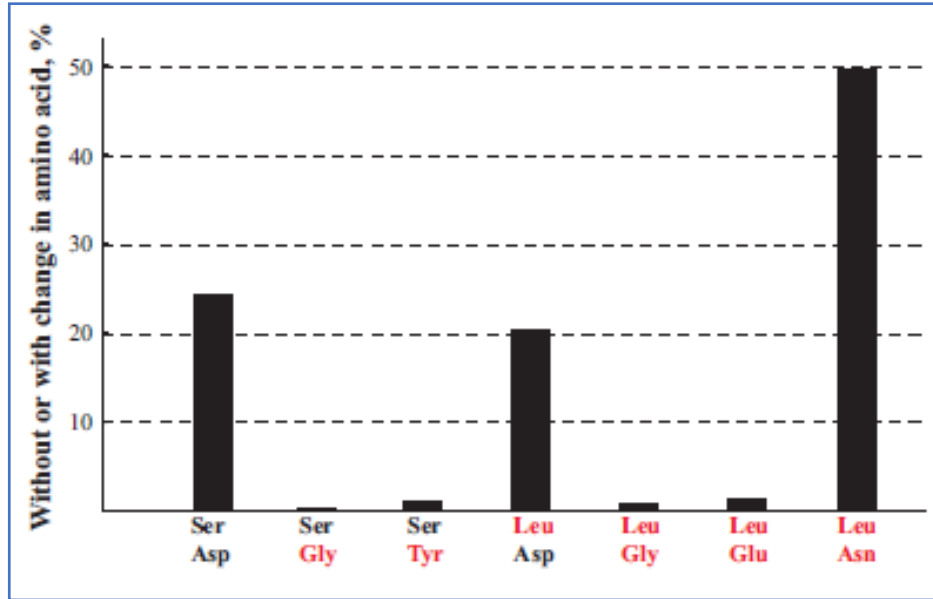
# RESULTADOS



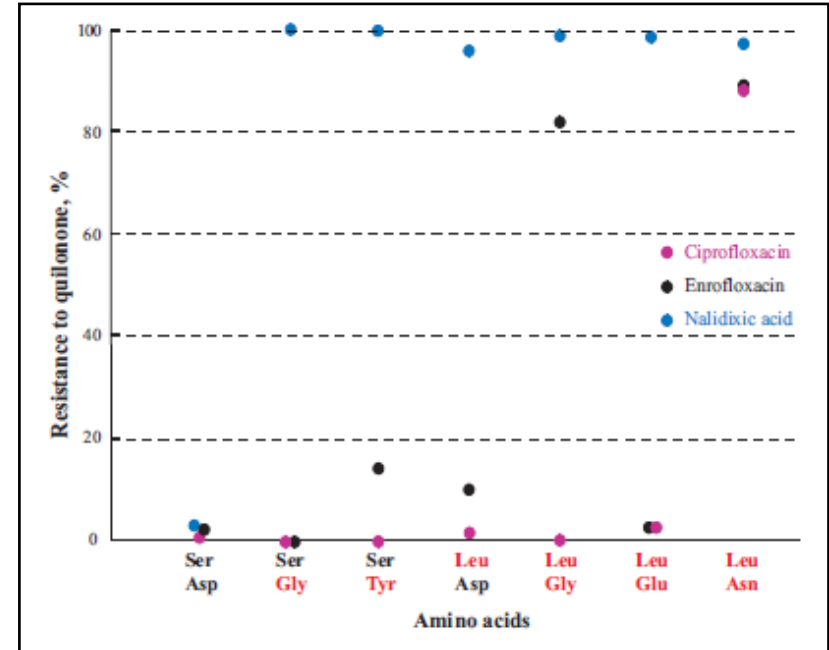
Esquema de la inducción de una mutación en el aminoácido 248

# Relación de la mutación y la resistencia a quinolonas

Cambio en los aminoácidos

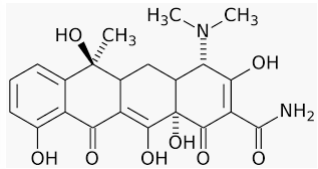
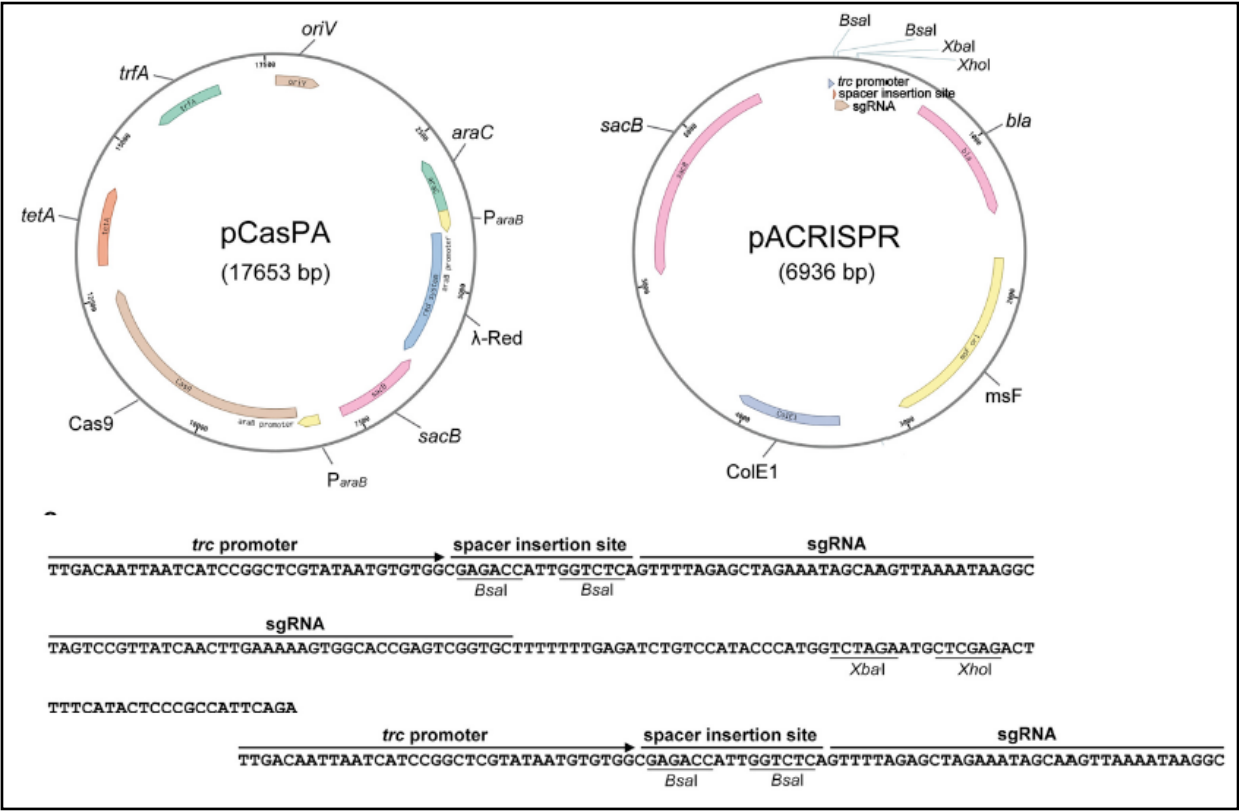
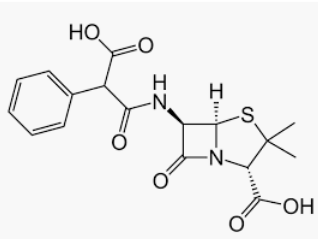


Resistencia a quinolonas



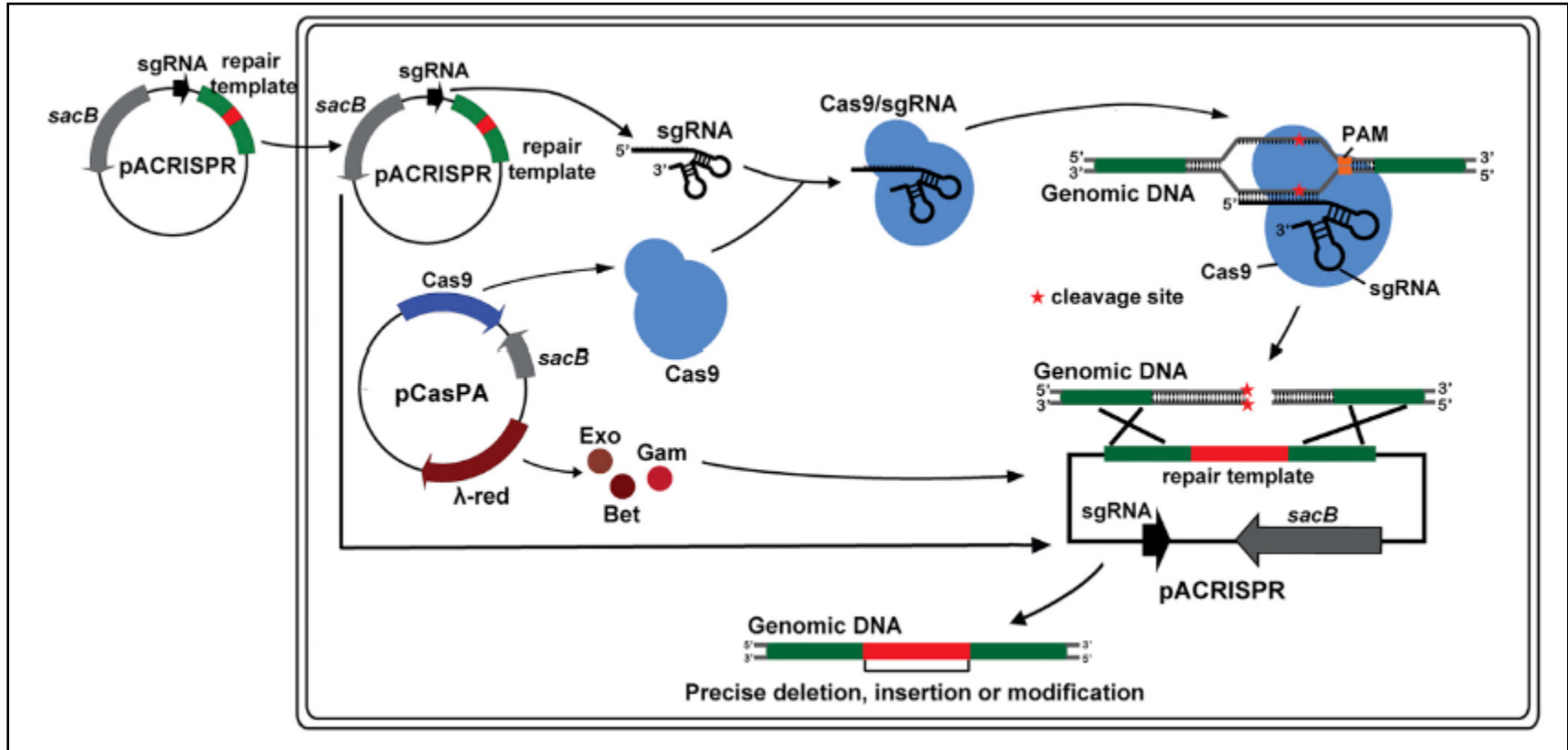


# 5. Re-sensibilización del Gen WspF en *Pseudomonas aeruginosa*.



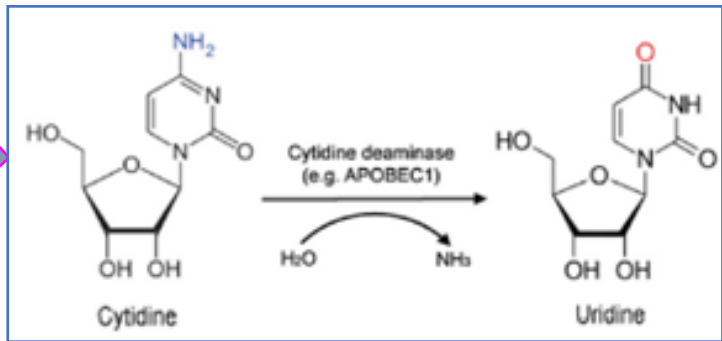
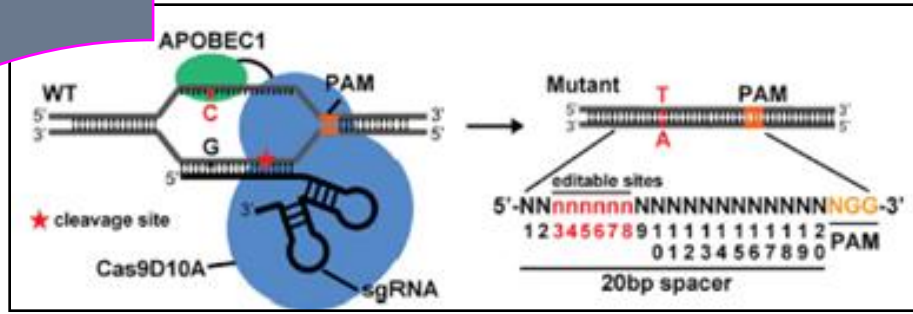
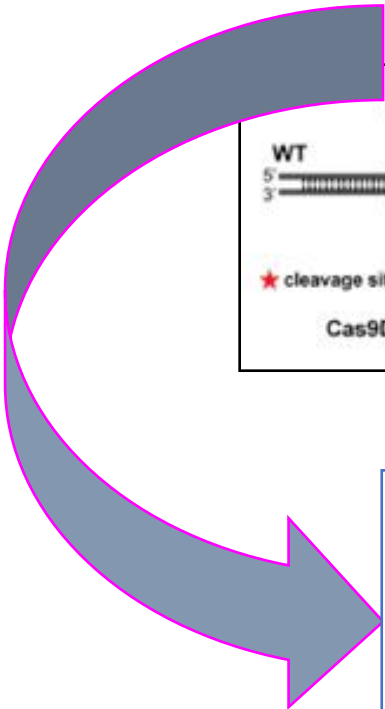
# Modificación genética precisa

RESULTADOS

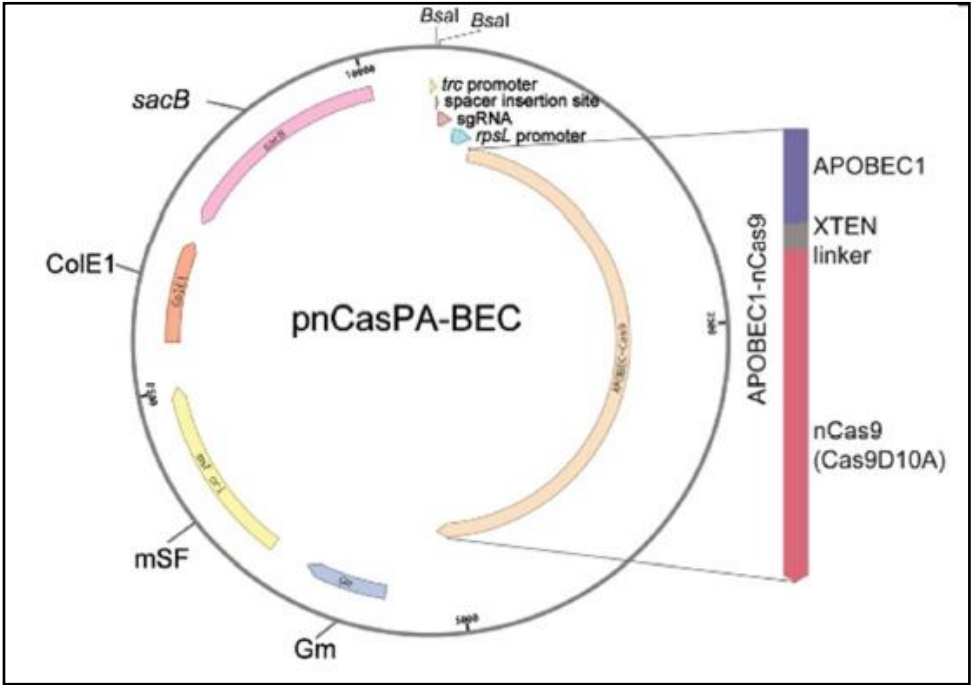
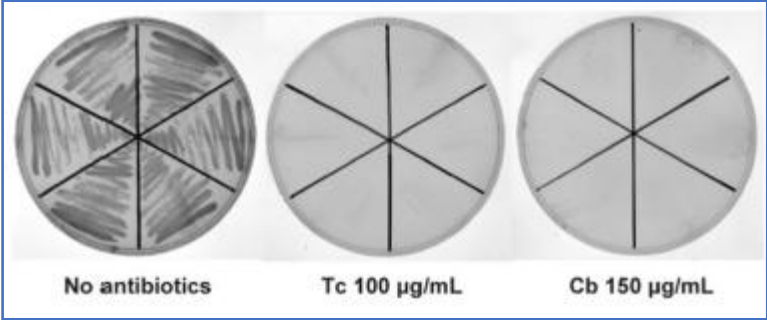


Weizhong Chen et al. , 2018

# Sistema guanina de citosina



# Plásmido que incluye el sistema deaminasa de citosina



Weizhong Chen, Qiu, Dong, Sun, Jun- Seob, Citorik han encontrado hallazgos similares de Re-sensibilización entre el 2015 y 2018, que sugieren que CRISPR/Cas9 demuestra ser una herramienta precisa para Re-sensibilizar superbacterias.

El Gen *mcr-1* apareció en 2016 en China y ese mismo año ya se tenía conocimiento de su presencia por parte del INS en aislamientos de *S. entérica typhimurium* y *E. coli*, recuperadas de 4 personas de distintas regiones del país, lo que confirma la capacidad de un gen de resistencia para diseminarse rápidamente gracias a plásmidos, la restauración de la sensibilidad bacteriana a polimixinas tiene un potencial importante en salud pública

Datos demográficos y características microbiológicas de aislamientos positivos para el gen *mcr-1*.

Microorganismo	<i>S. Typhimurium</i>			<i>E. coli*</i>
Código INS	GMR-S-1257	GMR-S-1454	GMR-S-356.16	GMR-RA-229.16
Departamento	Bogotá	Antioquia	Boyacá	Santander
Edad (años)	1	2	5	35
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino
Muestra	Materia fecal	Orina	Materia fecal	Secreción vaginal
Año de aislamiento	2015	2015	2016	2016
CIM (µg/mL) de colistina**	>4	>4	>4	16
Resistencia adicional (Resistente o intermedio)	AMP	TET, CHL, NAL, AMP, CIP	TET, CHL, NAL, AMP	AMK

\* Aislamiento de consulta externa remitido al programa IAAS por la alerta de enero de 2016, para confirmación de resistencia a colistina.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

\*\* CIM de colistina determinada por Microscan en *Salmonella Typhimurium* y por E-test en *E. coli*.

TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina, AMK: Amikacina.

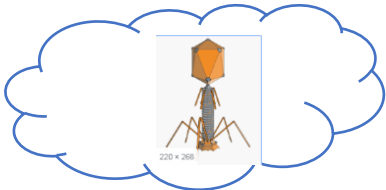
La vigilancia epidemiológica es insuficiente frente al control de infecciones intrahospitalarias, es interesante plantear al menos en teoría como desarrollar un programa de vacunación de bacterias que se implemente cuando emerge una resistencia por THG.

1. CRISPR Cas 9 puede re-sensibilizar bacterias Gram negativas como *E.coli* y *P aeruginosa*, por medio de la edición genética a través de plásmidos de diseño o fagos específicos que tienen la secuencia específica para un gen de resistencia.
2. Hay varios caminos de re-sensibilización implementando CRISPR Cas9, eliminación de un gen de resistencia a antibióticos, inserción de un plásmido compuesto que edita varios genes de resistencia a la vez, por electroporación e implementación de péptidos antimicrobianos o causando una mutación cromosómica como en el caso de la re-sensibilización en las quinolonas.
3. Es importante hacer la discusión y llegar a un consenso sobre el adecuado uso de CRISPR Cas9 en la lucha contra la resistencia a antibióticos, y verificar su implementación como re-sensibilizador y antimicrobiano.
4. La prevención de la distribución de genes de transmisión horizontal como *mcr-1* por medio de CRISPR Cas9 tiene un potencial en salud pública altamente importante.
5. A pesar de la diversidad de genes de resistencia y su alta distribución, es posible diseñar métodos de re-sensibilización compuestos que extingan la expresión de varias resistencias en un mismo ensayo.

# VIII.RECOMENDACIONES

UNIVERSIDAD CALIFORNIA DE BERKELEY INSTITUTO BROAD

AMPLIO ESPECTRO GENÓMICO



PATENTES OTROS LEGALES

BIOÉTICA

OTRAS PERSPECTIVAS



DIVERSIDAD GENES DE RESISTENCIA Y PLASMIDOS

PERFILES DE RESISTENCIA BACTERIANA

PAPEL DE LOS FAGOS

PROTOCOLOS

EJECUCIÓN

MDR, PDR, XDR





## IX.AGRADECIMIENTOS

### JURADOS

Sandra Mónica Estupiñan T.  
Mauricio Humberto Rodríguez P.  
Jennifer Carolina Gutiérrez S.

COORDINADORA TRABAJOS DE GRADO  
Judith Elena Camacho K.

ASESORA  
Ruth Mélida Sánchez M.

