

SEROTIPIA, RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y PERFILES PLASMÍDICOS DE BACTERIAS ENTEROPATOGENAS AISLADAS DE PROCESOS DIARREICOS DE COLOMBIA

Claudia Vergara, Jorge Visbal †, * Salim Máttar

Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria, Instituto de Investigaciones Biológicas del Tropico.

* Correspondencia: smattar@escarsa.net.co - A.A. 354, Montería, Colombia

RESUMEN

Se analizaron 107 cepas provenientes de diferentes regiones de Colombia de brotes diarreicos de pacientes pediátricos distribuidas de la siguiente forma: 50 aislamientos de *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP), 44 de *Salmonella* sp y 13 de *Shigella* sp. Los serotipos de ECEP más frecuentemente aislados correspondieron a O:111, O:127, O:124, O:55 y O:119. La susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó empleando la técnica Bauer & Kirby. Los resultados mostraron que las cepas de ECEP fueron resistentes a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazole y tetraciclina. Las cepas de *Salmonella* sp fueron resistentes a todos los antimicrobianos empleados incluyendo cloranfenicol, las cepas de *Shigella* sp mostraron solamente susceptibilidad frente a furazolidona. El análisis plasmídico demostró que todas las cepas de ECEP presentaron plásmidos con pesos moleculares entre 4.2 y 21.2 Kb. En las cepas de *Salmonella* sp se observaron 2 perfiles con 1 y 4 plásmidos de pesos moleculares entre 1.6 y 21.2 Kb. En las cepas de *Shigella* sp se observaron 3 perfiles con 3,4 y 5 plásmidos con pesos moleculares aproximados entre 1.2 y 21.2 Kb. *Salmonella* sp mostró perfiles de 1 y 4 plásmidos, mientras que los perfiles de *Shigella* sp revelaron la presencia de mayor número de plásmidos con tamaños menores. El plásmido de 21.2 Kb aislado en cepas de ECEP, *Salmonella* sp y *Shigella* sp podría ser utilizado como marcador epidemiológico de la EDA en Colombia.

Palabras claves: Diarrea, resistencia, plásmidos, *E.coli*, *Salmonella*.

ABSTRACT

107 strains were analyzed of different regions of Colombia of diarrheal outbreak of pediatric patient distributed as follow: 50 isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (ECEP), 44 of *Salmonella* sp and 13 of *Shigella* spp. The serotypes gives isolated more frequent ECEP antimicrobial agents was corresponded at O: 111, O: 127, O: 124, O: 55, and O: 119. The susceptibility to the antimicrobianos carried out by using Bauer and Kirby method. The results showed that the strains of give ECEP were resistant to ampicilina, trimetroprin-sulfametoxazole and tetracycline. The strains of *Salmonella* spp were resistant to all of the antimicrobial including chloramphenicol, the strains of *Shigella* spp showed only susceptibility to furazolidon. The plasmid analysis demonstrated that all the strains of ECEP presented plasmid with molecular weights between 4.2 and 21.2 Kb. In the strains of *Salmonella* spp 2 profiles they were observed with 1 and 4 plasmid of molecular weights between 1.6 and 21.2 Kb. In the strains of *Shigella* spp 3 profiles were observed with 3.4 and 5 plasmid with approximate molecular weights between 1.2 and 21.2 Kb. *Salmonella* spp showed profiles of 1 and 4 plasmids, while the profiles of *Shigella* spp revealed the presence of bigger I number of plasmids with smaller sizes. The plasmids of 21.2 Kb isolated in of ECEP, *Salmonella* spp and *Shigella* spp it could be used as epidemic marker of acute diarrhoeal disease in Colombia the EDA in Colombia.

Key words: Diarrhea, Resistance, Plásmidos, *E. coli*, *Salmonella*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica aguda (EDA) de etiología bacteriana ocupa en Colombia uno de los primeros lugares en morbi-mortalidad, principalmente en la población infantil. En nuestro medio, *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP), *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. son los agentes etiológicos bacterianos más comúnmente aislados en pacientes con EDA (Brian et al 1993) y la mayoría de ellas provienen de alimentos contaminados. Estas bacterias se han identificado con técnicas fenotípicas como son biotipificación, serotipificación, perfiles proteicos de membrana externa, patrones de resistencia a antimicrobianos y fagotipificación (Lujan et al 1990).

La biología molecular permite realizar estudios epidemiológicos más precisos en las poblaciones pediátricas (Lujan et al 1990, Luque et al 1994, Marco 1993). Una de las técnicas más empleadas para este fin es el análisis plasmídico (Lujan et al 1990), que ha mostrado más sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos (Lujan et al 1990, Maslow et al 1993, Máttat et al 1994). Estas técnicas se basan en el empleo de moléculas extracromosomales de ADN circular bicatenario (plásmidos). Los plásmidos se identifican y caracterizan con propósitos epidemiológicos ya que son marcadores útiles en el seguimiento de cepas bacterianas indistinguibles por los métodos de tipificación tradicionales (Máttar et al 1995; Doughty S. et al 2002; Bernier C. et al 2002). El análisis plasmídico se puede utilizar para determinar si una epidemia es producida por bacterias de igual fenotipo en diferentes lugares o si se trata de aislamientos similares pero no idénticos (Maurelli et al 1985).

El objetivo de este trabajo fue analizar bacterias enteropatógenas aisladas de brotes diarreicos en pacientes pediátricos desde el punto de vista de la serotipia, resistencia a los antimicrobianos, características de los plásmidos y la utilización de éstos para intentar establecer un método de tipificación epidemiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 107 cepas de bacterias enteropatógenas aisladas de pacientes pediátricos en 4 hospitales de Colombia. Los pacientes tenían edades entre 0-5 años con brotes diarreicos de enfermedad diarreica aguda EDA. Los episodios diarreicos

estudiados se presentaron en las ciudades de Bogotá, Cartagena, Florencia y Popayán. Todos los aislamientos se realizaron siguiendo métodos convencionales para tal efecto (Brian et al 1993). La identificación se realizó utilizando el sistema API 20E (API system S.A., Montalieu-Vercieu, France) y se realizaron pruebas serológicas de aglutinación con antisueros monovalentes y polivalentes (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA). Las cepas fueron conservadas en 200 µl de una solución de leche descremada al 20% p/v y mantenidas a -70°C hasta su empleo.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Se utilizó el método de difusión en placa de Bauer & Kirby (Riley et al 1984) para determinar la resistencia de los aislamientos a los siguientes antimicrobianos: ampicilina (20 ug), furazolidona (300 ug), norfloxacina (10 ug), trimetropim-sulfametoxazole (25 ug), tetraciclina (30 ug) y cloranfenicol (30 ug). Los resultados fueron confirmados con la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Riley et al 1984).

Extracción del ADN plasmídico: Se utilizó el método de lisis alcalina de Sambrook et al (1989). Luego de cultivar en caldo BHI el microorganismo, se centrifugó a 10.000 rpm/10 minutos/4°C, el sedimento fue resuspendido en 200 µl de una solución de Tris-HCL 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, RNAasa A 100 ug/ml (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo, USA). A esta suspensión se le adicionaron 200 µl de una solución de lisis celular (NaOH 0.2 M y SDS 1%). Luego se adicionaron 50 µl de lisozima (20 mg/ml) y se mezcló por inversión hasta observar un completo aclaramiento de la solución. Luego se agregaron 200 µl de una solución de acetato de potasio 1.32 M pH 4.8 y se mezcló varias veces por inversión para precipitar todos los restos celulares y ADN cromosomal. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm/10 minutos/4°C y el sobrenadante con el ADN plasmídico fue separado en un microtubo de 1.5 ml para la purificación. Luego se adicionó 1 ml de guanidina-HCL 7M (Promega corporation, Madison WI, USA) y se mezcló por inversión. Esta mezcla se filtró a través de una minicolumna de sefarosa (CL-4B). El ADN plasmídico se eluyó en la minicolumna por adición de 50 µl de buffer TE.

Cepa control y marcador de peso molecular: Como control de la metodología empleada se utilizó una cepa de *E. coli* V517 con 8 plásmidos de pesos moleculares: 1.8, 2.2, 2.5, 2.7, 4.5, 5.2, 7.7 y 48 Kb. Como marcador de peso molecular se utilizó el Fago Lambda digerido con Hind III y EcoRI (Sigma

Chemical Co. St. Louis. Mo, USA). La electroforesis se llevo a cabo en un gel de agarosa al 0.8% p/v en buffer TBE 1X. Las preparaciones de ADN plasmídico fueron adicionadas al gel con 10 µl de solución indicadora de corrido. El minigel se sometió a una corriente de 55 voltios y 20 miliamperios durante 4 horas, el gel se tiñó durante toda la noche con una solución de bromuro de etidio.

RESULTADOS

Etiología y serotipia: Las bacterias aisladas de pacientes pediátricos con EDA fueron ECEP (n=50) correspondientes a los serotipos 0:111 (n=26; 52%), 0:127 (n=8; 16%), 0:124 (n=6; 12%), 0:55 (n=6; 12%) y 0:119 (n=4; 8%). *Salmonella* sp (n=44) de los siguientes serotipos: grupo E (n=18; 41%), grupo B (n=13; 29%), grupo C2 (n=7; 16%), grupo A (n=2; 5%), y grupo D (n=4; 9%). Respecto a *Shigella*, las cepas pertenecieron al grupo B (*S. flexneri* n=6, 46%) y al grupo C (*S. boydii* n=7, 54%). **Resistencia a antimicrobianos:** Las cepas de ECEP fueron resistentes a ampicilina (n=36; 72%), trimetoprin-sulfametoxazole (n=44; 88%) y tetraciclina (n=50; 100%). Ninguna de las cepas de ECEP mostró resistencia a furazolidona y norfloxacin. Respecto a la resistencia de *Salmonella*, 48% de las cepas (n=21) presentaron resistencia a ampicilina, 25% (n=11) a trimetoprin-sulfametoxazole, 25% (n=11) a tetraciclina, 2% (n=1) a furazolidona, 4% (n=2) a norfloxacin y 95% (n=42) a cloranfenicol.

Las cepas de *Shigella* fueron resistentes a ampicilina (n=4; 31%), trimetoprin-sulfametoxazole (n=7; 54%), tetraciclina (n=11; 85%) y norfloxacin (n=2; 15%). Todas las cepas fueron sensibles a furazolidona.

Perfiles plasmídicos: todas las cepas de ECEP presentaron plásmidos. Las cepas ECEP de Bogotá (n=28) presentaron 1 perfil plasmídico con 2 plásmidos de 4.2 y 21.2 Kb. Las cepas de Cartagena (n=22) presentaron 1 plásmido de 5.1 Kb. En las cepas de *Salmonella* sp se observaron 2 perfiles plasmídicos: uno con 4 plásmidos presente sólo en las cepas de Cartagena de pesos moleculares 1.6, 3.0, 4.5 y 21.2 Kb presentes en 9% de las cepas (n=4) y otro perfil con 1 plásmido de 21.2 Kb presente en 66% de las cepas (n=29) de Cartagena y Bogotá. Veinticinco por ciento (25%) de las cepas de *Salmonella* sp (n=11) no presentaron plásmidos, correspondiendo estos aislamientos a las ciudades de Cartagena y Bogotá.

Con respecto a *Shigella* sp se observaron 3 perfiles plasmídicos diferentes de las cepas aisladas en Cartagena, uno de 3 plásmidos de 2.5, 3.5 y 21.2 Kb presente en 8% (n=1) de las cepas, otro de 4 plásmidos de 1.2, 1.9, 5.0 y 21.2 Kb presente en 23% (n=3) de las cepas y otro de 5 plásmidos de 1.2, 1.4, 2.5, 3.5 y 21.2 Kb presente en 23% (n=3) de las cepas. Las cepas aisladas en Bogotá mostraron 1 perfil con 3 plásmidos con pesos moleculares de 1.6, 1.9 y 21.2 Kb presente en 38% (n=5) de las cepas. Ocho por ciento (8%) (n=1) de las cepas no presentaron plásmidos.

DISCUSIÓN

Este estudio confirma una vez más que las bacterias enteropatógenas más aisladas de brotes diarreicos en Colombia son ECEP, *Salmonella* sp y *Shigella* sp; como lo muestran los resultados obtenidos previamente por Máttar et al (1994).

La presencia de plásmidos se considera como una característica genotípica que permite establecer diferencias entre aislamientos de bacterias pertenecientes a un mismo género y especie.

En este estudio las cepas de ECEP mostraron 2 perfiles plasmídicos diferentes de acuerdo a la región geográfica en la cual se aislaron (Cartagena 1 plásmido de 5.1 Kb y Bogotá 2 plásmidos de 21.2 y 4.2 Kb). Asimismo los perfiles plasmídicos de *Salmonella* sp y *Shigella* sp mostraron una distribución diferente. Esta variabilidad geográfica de los perfiles plasmídicos obtenidos en diferentes regiones de Colombia (Cartagena, Popayán, Bogotá y Florencia) podría ser consecuencia de diferencias en el uso de antimicrobianos en cada área y de factores ambientales como lo refiere un estudio realizado por (Rodrigue et al 1992). Un número elevado, de las cepas analizadas (n=73; 68%) presentaron 1 plásmido de 21.2 Kb que podría utilizarse como marcador epidemiológico de la EDA en Colombia ocasionada por ECEP, *Salmonella* sp y *Shigella* sp.

Por otra parte, la presencia de plásmidos asociada con la resistencia a antimicrobianos ha sido demostrada en varios estudios (Rodrigue et al 1992, Sasakawa 1986, Chu C. et al 2001). Luque et al (1994), encontraron cepas de *Salmonella* sp con 2 plásmidos de 1.8 y 2.3 Kb resistentes a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina. En el presente estudio las cepas de *Salmonella* sp aisla-

das en Cartagena con este mismo patrón de resistencia presentaron plásmidos de pesos moleculares similares de 1.6 y 3.0 Kb que podrían corresponder a los obtenidos por estos autores sin embargo, son necesarios estudios moleculares más extensos para atribuir la resistencia a estos plásmidos. Con respecto a los plásmidos de *Shigella* sp nuestros resultados coinciden con los de otros autores (Tenover 1985, Thornsberry 1991, Herrera S. et al 2002, Faruque S. et al 2002) que demostraron plásmidos crípticos de 3.3 y 4.2 Kb característicos de la mayoría de cepas de *Shigella* sp. En este estudio se encontraron plásmidos de pesos moleculares semejantes de 3.5 y 5.0 Kb.

Los plásmidos de virulencia de 180 y 210 Kb, descritos por varios autores (Wachsmuth 1986, Woodward 1989), no fueron aislados en este estudio quizá debido a su elevado peso molecular y por tanto poseen pocas copias por célula, además porque el método empleado por nosotros recupera plásmidos con pesos moleculares entre 1 y 50 Kb.

Los resultados obtenidos muestran que las bacterias más comúnmente aisladas de pacientes con EDA en Colombia son ECEP, *Salmonella* sp y *Shigella* sp, existiendo relación entre la presencia de plásmidos y la resistencia a antimicrobianos. Además la presencia de un plásmido común de 21.2 Kb podría ser empleado como marcador epidemiológico en nuestro país. Este estudio aporta elementos interesantes al estudio de la EDA, se requieren trabajos más amplios que permitan tener una mayor casuística para proveer datos más precisos, el análisis de cepas aisladas de animales es un punto importante a tratar en el futuro. Aunque los plásmidos pueden perderse por ausencia de presión selectiva, este estudio demuestra entre otras cosas los problemas del uso indiscriminado de los antibióticos, tanto a nivel veterinario como humano, los cuales se adquieren libremente y se utilizan sin ningún control en los países en vías de desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bernier C, Gounon P, Le Bouguenea C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AFF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun.* 2002; 70: 4302-11.
2. Brian M.J, Van R, Townsend I, Murray B.E, Cleary T.G and Pickering L.K. Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a day care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:2152-2156.
3. Chu C, Chru CH, Wu WY, Chu CH, Liu TP, Ou JT. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar *Cholerasuis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2299-303.
4. Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2002; 70:6761-9.
5. Faruque SM, Khan R, Kamiruzzaman M, Yamasaki S, Ahmad QS; Azim T, Nair GB, Takeda Y, Sack DA. Isolation of *Shigella dysenteriae* type I and *Shigella flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental isolates versus clinical strains. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:3908-13
6. Herrera S, Cabrera R, Ramirez MM, Usera MA, Echeita MA. Use of AFLP, plasmid typing and phenotyping in a comparative study to assess genetic diversity of *Shigella flexneri* strains. *Epidemiol Infect.* 2002; 129:445-50.
7. Lujan R, Echeita A, Usera M.A, Martínez-Suárez J.V, Alonso R, Sanz-Nieto A. Plasmid profiles as an epidemiological marker for *Salmonella enterica* serotype enteritidis foodborne outbreaks. *Microbiol SEM.* 1990; 6:45-50.

8. Luque A, Moriñigo M.A, Rodríguez-Avial C, Picazo J.J y Borrego J.J. Resistencias a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1994; 12:187-192.
9. Marco F, Jiménez de Anta M.T. Métodos de tipificación: análisis de plásmidos: ventajas e inconvenientes. *Enferm Infecc y Microbiol Clin*. 1993; 11:97-101.
10. Maslow J.N, Mulligan M.E and Arbert R.D. Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganism. *Clin Infect Dis*. 1993; 17:153-164.
11. Máttar S, Centella A, Daza C y García J. valoración de tres nuevos medios de cultivo: agar novobiocina-verde brillante-glicerol-lactosa, agar lisina-hierro modificado y agar Rambach para el aislamiento de *E. coli* enteropatógeno, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. en la gastroenteritis aguda. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1994; 12:484-489.
12. Máttar S, Escalante M, Vergara C.A. Síndrome diarréico bacteriano. En *Infecciones Hospitalarias*. Malagón-Londoño & Hernández Esquivel. Edit Médica Panamericana, Bogotá, D.C. Colombia. 1995; 803-814.
13. Maurelli A.T, Bandry B, D'hanteville H., Hale T.L and sansonetti P.J. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of Hela cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. 1985; 49:164-171.
14. Mirza S.H and Hart C.A. Plasmid encoded multi-drug resistance in *Salmonella typhi* from Pakistan. *Ann Tropic Med Parasitol*. 1993; 87:373-377.
15. Riley L.W, Cohen M.L, Seals J.E, Blaser M.J and Feldman R.A. Importance of host factors in human salmonellosis caused by multiresistant strains of *Salmonella*. *J Infect Dis*. 1984; 149:878-883.
16. Rodrigue D.C, Cameron D.N, Puhr N.D, Brenner F.W, St Louis M.E and Tauxe R.V. Comparison of plasmid profiles, phage types and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:854-857.
17. Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. *Molecular cloning: a Laboratory manual* 2a. Ed. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989; 1:211,52.
18. Sansonetti P.J, Ryter A, Cierc P, Maurelli A.T and Mounier J. Multiplication of *Shigella flexneri* within Hela cells; lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun*. 1986; 51:461-469.
19. Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Murayama S, Makino S and Yoshikawa M. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. 1986; 51:470-475.
20. Tacket C.O. Molecular epidemiology of *Salmonella*. *Epidemiol Rev*. 1989; 11:99-108.
21. Tenover F.C. Plasmid Fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. *Clin Lab Med*. 1985; 5:413-436.
22. Thornsberry C. Antimicrobial agents and susceptibility tests. In *Manual of Clinical Microbiology* fifth edition. Balows A, Hausler W.J, Herrmann K.L, Isenberg H.D and Shadomy H.J. 1991. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
23. Wachsmuth K. *Molecular Epidemiology of Bacterial Infections: Examples of Methodology and of Investigations of Outbreaks*. *Rev Infect Dis*. 1986; 8:682-692.
24. Woodward M.J, McLaren I, Wray G. Distribution of Virulence Plasmids within *Salmonellae*. *J Gen Microbiol*. 1989; 135:503-511.