Rev. Chil. Pediatr. 56(6): 445-449, 1985

Transferencia Plasmidial de Multirresistencia en Cepas Enteropatógenas de Escherichia Coli Serogrupo 0111

T.M. M. Eliana Bustos M.; T.M. Miriam Troncoso H.; M.A. M. Soledad Toledo B.;

T.M. Guillermo Figueroa G.¹

Transference of multiresistance to antibiotics by plasmids in enteropathogenic 0111 E. Coli.

Susceptibility to antibiotics was studied in 38 strains of enteropathogenic E. coli 0111 obtained from children under 2 years of age, 29 of these were obtained from patients with acute diarrhoea and the remainder from asymptomatic children. Fifty five percent of the strains were resistant to three or more antibiotics: 100% of these were resistant to ampicillin, 90% to kanamycin and carbenicillin, approximately 80% to streptomycin and cephalothin but they were all sensitive to furazolidone and 90% to gentamicin. In vitro conjugation tests showed that 34% of the multiresistant strains were capable of transferring 2 to 6 resistance traits. Molecular weights of plasmids associated to transference ranged between 41 and 80 Megadaltons (Md), but among the strains isolated from patients with acute diarrhoea there was a clear predominance of 54 to 55 Md plasmids. No differences were demonstrated in the frequency of multiresistance and/or the transference capacity of strains isolated from patients with diarrhoea and those coming from asymptomatic children.

(Key words: Antibiotic resistance. Enteropathogenic E. Coli. Plasmidial transference).

La Escherichia coli enteropatógena serogrupo 0111 (ECE-0111) ha sido asociada a brotes epidémicos y cuadros de enteritis infantil desde la década del 40¹⁻² hasta hoy; sin embargo, el o los mecanismos involucrados en dicha capacidad enteropatógena no han sido totalmente dilucidados.

Diversos estudios han demostrado que ECE-0111 no invade la mucosa intestinal, ni produce las enterotoxinas termoestable (ST) y termolábil (LT)³⁻⁵. En este grupo se ha detectado sin embargo un factor citotóxico capaz de estimular la adenil-ciclasa in vitro que tiene efecto biológico en el asa jejunal de conejo⁶. La actividad citotóxica ha sido estudiada en células Vero⁷, demostrándose que sólo cierta proporción de las cepas enteropatógenas de ECE-0111 ensayadas producen efecto sobre ellas, lo que sugiere que la citotoxicidad no sería común a todas las cepas.

Otros investigadores han demostrado una peculiar capacidad de las cepas de este serogrupo

para adherirse a la mucosa intestinal, originando en ella cambios morfológicos y fisiológicos⁸. La capacidad adhesiva ha sido confirmada in vitro mediante ensayos en líneas celulares HEp-2⁹ y Hela¹⁰. Al parecer la adherencia específica estaría ligada a la presencia en la bacteria de un plasmidio de peso molecular entre 50 y 70 Md¹¹.

En Chile, la ECE-0111 es, entre los denominados "serotipos clásicos", uno de los más frecuentemente aislados de niños con diarrea aguda epidémica o esporádica¹²⁻¹³. Estudios preliminares en nuestro medio han demostrado que este serogrupo presenta una elevada resistencia a los antibióticos¹⁴, generalmente asociada a plasmidios, pues ha sido posible transferirla mediante ensayos de conjugación in vitro.

Este estudio se hizo con el propósito de estudiar la frecuencia de cepas multirresistentes de E. coli serogrupo 0111; la capacidad de transferencia conjugacional de uno o más de los determinantes asociados con la resistencia; y si existen diferencias en dichos parámetros entre cepas provenientes de casos con diarrea o de niños aparentemente sanos (portadores).

MATERIAL Y METODOS

Entre Enero 1981 y Diciembre 1984 se estu-

1. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago.

Trabajo financiado parcialmente por el Proyecto N° 1764-852 F del Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile.

diaron 38 cepas de *E. coli* enteropatógenas serogrupo O111 aisladas de coprocultivos de niños menores de dos años, 29 provenían de pacientes con diarrea y 19 niños asintomáticos. En el momento de tomar las muestras ningún niño estaba hospitalizado ni había recibido antibióticos en las últimas 2 semanas.

Las cepas de *E. coli* fueron tipificadas con sueros poli y monovalentes O (Difco). La susceptibilidad a los antibióticos fue estudiada con el método de difusión en agar de Bauer¹⁵ utilizando sensidiscos comerciales (BBL).

Los ensayos de transferencia genética a través de conjugación *in vitro*, se realizaron según la técnica de Miller¹⁶ usando como cepa receptora *E. coli* K12 resistente a ácido nalidíxico (EC K12-RAN).

En las cepas multirresistentes y sus transconjugantes se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) según los métodos estándar de dilución en agar de Ericson y Sherris¹⁷.

Todas las cepas multirresistentes de ECE-0111, así como sus correspondientes transconjugantes, fueron sometidas a estudios de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) plasmidial según el método propuesto por Kudo y Lin¹⁸; las bacterias fueron destruidas con una solución de 50 mM (Hidroximetil) aminometano (Tris) y 3% Docecil sulfato de Sodio (SDS) (pH 12.6) y la extracción del ADN se hizo con una mezcla de fenol-cloroformo (1:1, v:v). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo durante 4 horas a 50 volts, con el gel sumergido en Tampón Tris-Borato (pH 7.7)¹⁹. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio y se observaron sobre una cámara con luz ultravioleta, fotografiándose con película Polaroid tipo 55.

El peso molecular (PM) de los plásmidos se calculó según el método de Meyers²⁰ que consiste en comparar la distancia recorrida por ellos con la de plásmidos de PM conocido durante la corrida electroforética. Los plásmidos utilizados y sus PM expresados en Megadaltons (Md) fueron: Plac (101 Md), R1 (61 Md), RP 4 (36 Md) y SA (26 Md).

RESULTADOS

De las 38 cepas de ECE-0111 estudiadas, 21 (55,3%) presentaron resistencia simultánea a 3 ó más antibióticos, 17 (44,7%) habían sido aisladas de casos de diarrea y 4 (10,5%) de niños asintomáticos; las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p > 0,20$ prueba exacta de Fisher).

El comportamiento de las cepas multirresistentes frente a 12 antimicrobianos se muestra en

Figura 1: Susceptibilidad de 21 cepas de *E. coli* O111 multirresistencia a 12 antibióticos

la Figura 1. Los niveles de resistencia de las cepas parentales mostraron CIM iguales o mayores a 128 µg/ml para ampicilina, cloramfenicol, estreptomycin y cotrimoxazol.

Las cepas de *E. coli* O111 que mostraron resistencia múltiple albergaban de 1 a 4 plásmidos, cuyos pesos moleculares calculados estaban en un rango de 28 a 107 Md (Tabla 1).

Trece (34%) cepas multirresistentes de *E. coli* O111 transfirieron algún determinante de resistencia mediante conjugación, 10 provenían de pacientes con diarrea y 3 de niños asintomáticos ($p = NS$); la frecuencia de transferencia de los marcadores genéticos estudiados fluctuó para las distintas cepas entre $7,29 \times 10^{-5}$ y $6,25 \times 10^{-9}$.

Los patrones de resistencia, el número de plásmidos identificados en cada cepa y los pesos moleculares calculados de éstos, tanto para las cepas parentales como para sus transconjugantes, se muestran en la Tabla 2.

La resistencia de las cepas transconjugantes, comparadas con las de las parentales fue semejante para la ampicilina en 60% y menor en 40%; La CIM del cloramfenicol se mantuvo en la mayoría de las cepas (87,5%), aumentando en una (12,5%); la de cotrimoxazol se mantuvo en todos los casos (100%), en cambio la CIM para estreptomycin sólo se mantuvo en 40% y disminuyó en el 60% restante.

Las cepas multirresistentes transfirieron en bloque de 2 a 6 determinantes genéticos de resistencia.

Los estudios de coelectroforesis del ADN plasmidial demostraron que las cepas de F95, O15, O3, A11, 42, 947, 34 y 102, que portaban un plásmido de 54-55 Md, comigraban originando una sola banda en los geles.

Tabla 1
Patrones de resistencia, número de plasmidios identificados
y sus PM en cepas multirresistentes de *Escherichia coli* 0111

Nº Cepa	Patrón de Resistencia*	Nº Plasmidios Identificados	PM (Md) Plasmidios
A274	Ap-Sm-Cb	1	42
CZ25	Ap-Sm-Cb-Tc-Km	1	47
791	Ap-Sm-Cb-Cp-Km-Pl-Cm	1	107
A52	Ap-Km-Nx	2	29-42
C12	Ap-Sm-Cp-Tc	2	32-87
20	Ap-Sm-Cb-Cm-Km	2	45-61
18	Ap-Cb-Km-Cp	2	36-48
C32	Ap-Sm-Cb-Cp-Km-Pl	2	32-47
H11	Ap-Sm-Cb-SuTp-Km-Pl	2	28-41
F95	Ap-Cm-Cb-Km	3	32-42-55
34	Ap-Cm-Cb-Km-Cp	3	30-42-55
015	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp	3	32-42-55
03	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp	3	32-42-55
A11	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp	3	30-41-54
42	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp	3	30-41-54
16	Ap-Cb-Km-Sm-SuTp-Pl	3	29-40-66
947	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp-Nx	3	30-41-54
27	Ap-Cm-Cb-Km-Sm-Cp-Tc	3	28-39-80
CZ10	Ap-Cm-Cb-Km-SuTp-Cp-Nx	3	32-47-61
102	Ap-Cm-Cb-Km-Cp-Gm	4	32-36-43-55
79	Ap-Cb-Km-Sm-SuTp-Tc	4	30-36-40-45

* Los símbolos de los antibióticos corresponden a los empleados en la Figura 1.

Tabla 2.
Patrones de resistencia, número de plasmidios identificados y determinantes
transferidos por cepas enteropatógenas de *E. coli* 0111 multirresistentes
a los antibióticos

Nº de Cepa	Patrón de Resistencia* Cepas Parentales	Nº Plasmidios Identificados	PM. (Md) Plasmidios	Patrón de Resistencia Cepas Transferidas	P.M. (Md) Plasmidios Transferidos
F95	Ap Cm Cb Km	3	55-42-32	Cm Km	55
015	Ap Cm Cb Km Sm Cp	3	55-42-32	Cm Km	55
013	Ap Cm Cb Km Sm Cp	3	55-42-32	Cm Km	55
18	Ap Cb Km Cp	2	48-36	Ap Cb Cp	48
16	Ap Cb Km Sm SuTp Pl	3	66-40-29	Ap Cb Sm	66
H11	Ap Cb Km Sm SuTp Pl Tc	2	41-28	Ap Cb Sm	41
79	Ap Cb Km Sm SuTp Pl Tc	4	45-40-36-30	Ap Cb Sm Cp	45
A11	Ap Cm Cb Km Sm Cp	3	54-41-30	Cm Km Sm	54
42	Ap Cm Cb Km Sm Cp	3	54-41-30	Cm Km Sm	54
947	Ap Cm Cb Km Sm Cp Nx	3	54-41-30	Cm Km Sm	54
34	Ap Cm Cb Km Cp	3	55-42-30	Cm Km Cb	55
102	Ap Cm Cb Km Cp Gm	4	55-43-36-32	Ap Cm Km Cb Cp Gm	55
27	Ap Cm Cb Km Cp Sm Tc	3	80-39-28	Ap Cm Km Cb Sm Tc	80

* Los símbolos de los antibióticos corresponden a los empleados en la Figura 1.

DISCUSION

Los resultados del estudio de 38 cepas de *E. coli* enteropatógeno serogrupo 0111 muestran que hay un elevado número de cepas multirresistentes (21/38), en su mayoría (13/21) capaces

de transferir por lo menos un plasmidio asociado a la resistencia. La multirresistencia se detectó con igual frecuencia en las cepas provenientes de niños con diarrea y asintomáticos, lo que sugiere una gran diseminación de cepas multirresistentes en nuestro medio. Este hecho tiene gran impor-

Tabla 3
Antibióticos que se transfirieron en
bloque mediante conjugación en cepas multirresistentes
de *E. coli* enteropatógenas 0111.

Nº de antibióticos	Nº de cepas (13)	Bloque de resistencia
2	3 (23%)	Cm Km
3	3	Cm Km Sm
4	3	Ap Cb Sm SuTp
6	2 (15%)	Ap Cb Km Cm Cp Gm

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del DNA
plasmidial de diferentes cepas de *E. coli* 0111 parentales
y su correspondiente transconjugante.
Línea 1: 03, línea 2: transconjugante.
Línea 3: 015, línea 4: transconjugante.
Línea 5: Plac (101 Md) y RP4 (36 Md).
Línea 6: R1 (61 Md) y SA (26 Md).
Línea 7: F95, línea 8: transconjugante.

tancia, ya que se sabe que la presencia de plasmidios R en las bacterias puede aumentar su virulencia²¹. Por otra parte, desde el punto de vista ecológico es posible el traspaso de estos determinantes de resistencia a cepas avirulentas de la flora intestinal, situación en que, eventualmente, pudieran transformarse en agentes potencialmente patógenos fuera del tubo digestivo, o en reservorios del material genético de la cepa original²².

Además, se podría especular que la presencia de plasmidios R podría constituirse en un mecanismo útil para movilizar otros plasmidios que codifican para diferentes propiedades bacterianas²³.

El patrón de resistencia plasmidial de las cepas parentales era muy parecido en el número y peso molecular de los plasmidios, en 8 de 13 cepas

enteropatógenas multirresistentes, hecho que se verificó al efectuar coelectroforesis con las transconjugantes, ya que los plasmidios de éstas comigraban originando una sola banda. El fenómeno es interesante, pues las cepas fueron aisladas de coprocultivos tomados de distintos individuos, a lo largo de 3 años, con varios meses de intervalo y provenientes de diferentes sitios geográficos de la ciudad, lo que sugiere que la mayoría de estas cepas tienen un origen clonal común.

Llama la atención la repetición de plasmidio de 54-55 Md en cepas provenientes de casos de diarrea (6/8). Este plasmidio podría corresponder a un elemento genético que codifique la capacidad de adherencia a las células intestinales⁸⁻¹¹ y permita como ha sido demostrado, que estas cepas se adhieran "in vitro" a células de líneas Hela y HEp-2. Estudios en este sentido serán motivo de una comunicación posterior. Es interesante anotar que plasmidios de 54-55 Md no se detectaron en las cepas multirresistentes que no transfirieron su material genético, lo que respaldaría la posibilidad de que dicho elemento fuese un plasmidio conjugativo.

Nuestros resultados indican que, generalmente, la multirresistencia se transfiere en bloque.

RESUMEN

Se estudió la sensibilidad de los antibióticos de 38 cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* 0111 provenientes de niños menores de dos años, 29 obtenidas de pacientes con diarrea, las restantes de sujetos asintomáticos. Se encontró que 55% de las cepas eran resistentes a 3 o más antimicrobianos simultáneamente; de ellas todas lo eran a ampicilina, 90% a kanamicina y carbenicilina y alrededor de 80% a estreptomycinina y cefalotina; todas las cepas eran sensibles a furazolidona y 90% a gentamicina.

Entre las cepas multirresistentes, 34% eran capaces de transferir, mediante conjugación, 2 a 6 determinantes de resistencia. El peso molecular de los plasmidios asociados a la transferencia fluctuaba entre 41 y 80 Megadaltons (Md), predominando el de 54-55 Md. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de multirresistencia y la capacidad de transferir entre cepas provenientes de niños con diarrea y asintomáticos.

REFERENCIAS

1. Bray, J.: Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli* neopolitanum from summer diarrhoea of infants. *J. Pathol.* 57: 239, 1945.

2. Neter, E., Korns, R.F., Trussell, R.E.: Association of *Escherichia coli* 0111 with two hospital outbreaks of epidemic diarrhoea of the newborn infant in New York State during 1947. *Pediatr.* 12: 377, 1953.
3. Echeverría, P., Chang, C., Smith, D., Anderson, G.: Enterotoxigeny and invasive capacity of "enteropathogenic" serotypes of *Escherichia coli*. *J. Pediatr.* 89: 8, 1976.
4. Gurwith, M., Wiseman, D., Chow, P.: Clinical and Laboratory Assessment of the Pathogenicity of Serotyped Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 135: 736, 1977.
5. Goldschmidt, M., Du Pont, H.: Enteropathogenic *Escherichia coli*: lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 133: 153, 1976.
6. Scheffel, J., Martín, C., Bober, C., Monteil, H.: Isolation of an enterotoxic factor elaborated by human enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 125, 1980.
7. Karmali, M., Steele, B., Petric, M., Lim, C.: Sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 19: 619, 1983.
8. Clausen, C., Christie, D.: Chronic diarrhoea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr.* 100: 358, 1982.
9. Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S., Rowe, B.: An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.*, 3: 95, 1979.
10. Scaletsky, J., Silva, M.L., Trabulsi, L.: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *Infect Immun.* 45: 534, 1984.
11. Baldini, M., Kaper, J., Levine, M., Candy, D., Moon, H.: Plasmid Mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2: 534, 1983.
12. Figueroa, G.: Estudio de prevalencia de serotipos enteropatógenos de *Escherichia coli* en deposiciones de niños que habitan una población suburbana de Santiago. *Rev. Chil. Pediatr.* 51: 225, 1980.
13. Prado, V., Braun, S., Bosch, P., Bercovich, M., Reyes, L., Sawada, M.: Análisis de *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (E.C.E.P.) como causa endémica de diarrea aguda en niños chilenos. *Rev. Chil. Pediatr.* 55: 171, 1984.
14. Figueroa, G., Troncoso, M., Araya, M., Espinoza, J., Brunser, O.: Enteropathogen carriage by healthy individuals living in an area with poor sanitation. *J. Hyg. (Camb.)*, 91: 499, 1983.
15. Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turk, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493, 1966.
16. Curtis, R.: III Gene Transfer Manual of Methods for General Bacteriology (ed. P. Gerhardt), pp. 243. American Society for Microbiology (ed) Washington, D.C., 1981.
17. Ericsson, H., Sherris, J.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Suppl.* 217: 1, 1971.
18. Kado, C., Liu, S.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365, 1981.
19. Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J.: Molecular cloning a laboratory manual. *coli* Spring Harbor Laboratory (ed) N. York. p.156, 1982.
20. Meyers, I.A., Sánchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S.: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529, 1976.
21. Elwell, L.: Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 465, 1980.
22. Burt, S., Woods, D.: R. Factor transfer to obligate anaerobes from *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 93: 405, 1976.
23. Anderson, E.S.: Plasmid transfer in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 137: 686, 1978.