

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas*

Rivas Jomar ¹, Redondo Carlos ^{1,2}, Alonso Guillermina ¹

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales pueden ser producidas por microorganismos resistentes a la acción de los antimicrobianos que han sido seleccionados por el mal uso ó el uso indiscriminado de los antibióticos en el ámbito hospitalario. En los últimos años se han desarrollando nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han representado un avance importante en el estudio de las enfermedades infecciosas, siendo muy útiles al permitir diferenciar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, debido a su gran poder discriminatorio. En Venezuela, son pocos los estudios de epidemiología molecular de las infecciones intrahospitalarias, y por esta razón nos propusimos genotipificar cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de aislados nosocomiales de cuatro centros de salud del área metropolitana (Hospital “Dr. José María Vargas”, Hospital “Dr. Domingo Luciani”, Centro Médico de Caracas y Policlínica Metropolitana) con la finalidad de determinar la relación clonal existente entre estas cepas. El uso de ERIC-PCR permitió relacionar parcialmente las especies de *E. coli* aisladas en los cuatro centros de salud, sin embargo la técnica de REP-PCR permitió discriminar entre los patrones de bandas similares, mostrando un poder de resolución mayor. El uso de ERIC-PCR y REP-PCR no permitió tipificar la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas en los cuatro centros de salud en estudio. En el Centro Médico de Caracas se identificaron dos aislados clonales provenientes de diferentes áreas del hospital, Unidad de Terapia de Adultos y Hospitalización. En la Policlínica Metropolitana se identificaron tres aislados clonales, dos en la unidad de Terapia y uno en Hospitalización. En el Hospital “Dr. Domingo Luciani” y en el Hospital “Dr. José María Vargas” no se identificaron clones. Estos resultados proporcionan un aporte a los programas de vigilancia y control de las infecciones bacterianas, que contribuyen al establecimiento de medidas eficientes que conlleven a disminuir el número y costo de las infecciones nosocomiales.

Palabras clave: ERIC-PCR, REP-PCR, Clones, diseminación clonal, métodos genotípicos, infección nosocomial.

Genotyping of enterobacterias strains from 4 healthcare centers in Caracas*

SUMMARY

Nosocomial infections can be produced by microorganisms resistant to antimicrobial agents, and they have been selected by the bad use or abuse of antibiotics in the hospital environment. Recently, new molecular typing techniques have been developed, based on polymerase chain reaction (PCR). These techniques represent an important advantage the study of infectious diseases; they are able to discriminate related closed serovars and groups of nonrelated isolates due to its great power discriminatory. In Venezuela, there is a small number of molecular epidemiology researches. The goal of the present study is genotyping *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated of nosocomial infected patients from four healthcare centers in the metropolitan area (Hospital “Dr. José María Vargas”, Hospital “Dr. Domingo Luciani”, Centro Médico de Caracas, y Policlínica Metropolitana) in order to investigate the clonal relationship between the isolates. ERIC-PCR allowed us to correlate *E. coli* isolates however REP-PCR shows greater resolution. The use of both ERIC-PCR and REP-PCR, did not permit us typing *K. pneumoniae* isolates. Two clonally related isolates from Centro Medico of Caracas were identified. Three clonally related isolates from the Policlínica Metropolitana were identified. No clones were identified in samples from Hospital “Dr. Domingo Luciani” and the Hospital “José María Vargas”. These results contribute to monitoring programs, to improve the control of the bacterial infections, helping to establish efficient procedures and reduce nosocomials infections.

Key words: ERIC-PCR, REP-PCR, clons, clonal dissemination, genotyping methods, nosocomial infections.

* Trabajo presentado en poster, ganador del premio “Josefina Guariguata” en el XI Congreso Venezolano de Bioanálisis, mayo de 2006.

1. Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental. U.C.V.
2. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Las infecciones nosocomiales representan hoy en día una de las complicaciones mas comunes que afectan el ambiente hospitalario, generalmente estas infecciones son ocasionadas por microorganismos que han acumulado determinantes de resistencia mediante un acelerado proceso selectivo, ejercido por el uso y el abuso de los antimicrobianos como agentes terapéuticos y profilácticos dentro del recinto hospitalario (1).

Un aspecto importante de la epidemiología de las infecciones nosocomiales es comprender como se diseminan las cepas bacterianas involucradas y los determinantes de resistencia, dentro de un hospital e incluso en hospitales de un área determinada, la determinación de la relación genética entre los patógenos nosocomiales ha sido utilizado para la vigilancia epidemiológica (2).

En los últimos años se han desarrollando nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han representado un avance importante en el estudio de las enfermedades infecciosas, siendo muy útiles al permitir discriminar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, debido a su gran poder discriminatorio.

Los métodos genotípicos epidemiológicos están basados en el estudio del ADN, cromosómico o extracromosómico. En la tipificación molecular se comparan las secuencias nucleotídicas de los microorganismos de manera directa e indirecta, permitiendo determinar la relación clonal entre cepas de una misma especie bacteriana. Una alternativa para genotipificar son las técnicas basadas en la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (3).

El genoma de las enterobacterias contiene dos tipos de secuencias cortas, repetidas y esparcidas, llamadas ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) y secuencias REP (Repetitive Extragenic Palindromic), las cuales han sido usadas ampliamente en tipificación, análisis genético y en la identificación de brotes infecciosos bacterianos (4-6). Estos análisis están basados en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores específicos para cada tipo de secuencia. El polimorfismo detectado resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Usando estas secuencias ha sido posible, discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (4).

El objetivo de este trabajo consistió en genotipificar mediante

REP PCR y ERIC-PCR, cepas de *E. coli* y de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de aislados nosocomiales de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas.

Materiales y métodos

Aislados bacterianos y métodos bacteriológicos

Se recolectaron 60 cepas de *Escherichia coli* y 26 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas: Hospital "Dr. José María Vargas" Hospital "Dr. Domingo Luciani", "Centro Médico de Caracas" y "Policlínica Metropolitana".

Susceptibilidad antimicrobiana: se empleó el método de difusión en disco siguiendo los lineamientos propuestos para enterobacterias por la CLSI. La cepa *E.coli* ATCC (25922) fue utilizada como control de calidad de las pruebas de susceptibilidad.

Lisados celulares de las cepas nosocomiales: como templado para la reacción de PCR, se utilizó ADN total proveniente de la preparación de lisados celulares obtenido mediante el método de Levesque *et. al.* (5).

Genotipificación de las cepas nosocomiales

ERIC-PCR: se emplearon iniciadores que hibridan las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (secuencias ERIC). Las secuencias de los iniciadores son: ERIC1 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'. Se utilizaron condiciones estándar en la PCR. Los parámetros empleados fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridación a 45°C por 1 minuto, y una extensión a 72°C por 2,5 minutos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos (4).

REP-PCR: se empleó un iniciador que hibrida con las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) cuya secuencia es REP 1: 5'-GCG CCG ICA TGC GGC ATT-3'. Se utilizaron condiciones estándar en la PCR. Los parámetros empleados fueron: desnaturalización de 95°C por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 38°C por 1 minuto y 65°C por 8 minutos, con una extensión final de 65°C por 15 minutos (6,7) (Figura 1).

Criterios de interpretación:

Las cepas fueron agrupadas según las relaciones clonales, establecidas por ambas técnicas. Se utilizó la clasificación de interpretación establecida por Tenover *et al.* Fundamentada en los eventos genéticos como mutaciones puntuales, inserciones ó deleciones que pueden ocurrir de manera espontánea y al azar que pueden alterar el patrón de bandas (8).

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas

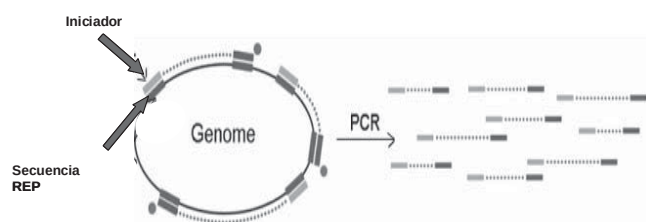


Figura 1. Iniciador REP- PCR hibrida específicamente con secuencias REP distribuidas aleatoriamente en el cromosoma bacteriano. Múltiples fragmentos de diferentes longitudes son amplificados. Los fragmentos amplificados son separados por tamaño y carga, obteniéndose un único perfil REP-PCR, el cual contiene múltiples bandas de varios tamaños e intensidad.

Resultados

En el Centro Médico de Caracas se determinó que 4 cepas las 25,35,40 y 43 eran clones genéticamente relacionados (Figura 2-A), todas estas cepas fueron aisladas de pacientes ubicados en el área de hospitalización y 3 asociadas a sepsis. El perfil de resistencia de estas cepas relacionadas genéticamente es variable (Tabla 1).

En la Policlínica Metropolitana se encontraron un grupo de clones de *E. coli* estrechamente relacionados, estas son la 51,52,57,58 y 59. Las cepas 51 y 52, fueron clasificadas como aislados genéticamente indistinguibles, al igual que las cepas 57 y 58 (Figura 2-B). Los perfiles de resistencia entre las cepa 51/52 y 57/58 son idénticos. Las cepas fueron aisladas en pacientes ubicados en las áreas de Hospitalización, Unidad de Terapia Infantil y Unidad de Terapia de Adultos. Los perfiles de resistencia entre las 5 cepas, varían por la presencia de resistencias a Trimetoprima/Sulfametoxazol en las cepas 51 y 52, y la falta de resistencia a Ampicilina/Sulbactam de la cepa 59 (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* con relación clonal, establecidos por REP-PCR y ERIC-PCR, pertenecientes a 4 centros de salud del área metropolitana de Caracas.

Genero	Nº Cepa	Origen de los aislados	Tipo de muestra	Centro de salud	Perfil de resistencia
<i>E. coli</i>	25	HP	Sangre	C.M.C	AMP, ATM, CAZ, CTX, CRO
<i>E. coli</i>	35	HP	Orina	C.M.C	AMP, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	40	HP	Sangre	C.M.C	AMP, ATM, CAZ, CTX, CRO, SAM, MEN, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	43	HP	Sangre	C.M.C	CIP
<i>E. coli</i>	51	HP	Bilis	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	52	HP	Sec.Herida operatoria	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	57	UTIN	Lavado bronquial	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, CIP
<i>E. coli</i>	58	UTA	Secreción endotraqueal	P.M	AMP,CAZ,CTX,KF,PIP,SAM,CIP
<i>E. coli</i>	59	UTIN	Sonda de Foley	P.M	AMP, CAZ, CTX, PIP, KF, CIP
<i>E. coli</i>	159	UCIN	Sonda	H.D.L	AMP, ATM, CTX, KF, C, TE
<i>E. coli</i>	162	UCIN	Secreción	H.D.L	AMP, ATM, CTX, KF, SXT, CIP, TE
<i>E. coli</i>	182	UCIN	Liq. Peritoneal	H.D.L	AMP, ATM, KF, C, SXT, TE
<i>E. coli</i>	196	HP	Orina	H.D.L	AMP, SXT, CIP,TE
<i>E. coli</i>	198	HP	Orina	H.D.L	AMP, SXT, CIP, TE, C
<i>K. pneumoniae</i>	101	UTA	Secreción	H.J.M.V	AMP, ATM, CAZ, CTX, FEP, KF
<i>K. pneumoniae</i>	112	CIR	Secreción	H.J.M.V	AMP, ATM, CAZ, CTX, FEP, KF

HP: hospitalización; UTIN: Unidad de Terapia Infantil; UTA: Unidad de Terapia de Adulto; UCIN: Unidad de Cuidados Intermedios; CIR: Cirugía. AMP: Ampicilina; CAZ: Cefazidima; CTX: Cefotaxime; CRO: Ceftriaxone; KF: Cephalotin; PIP: Piperacilina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; FEP: Cefepime; CIP:Ciprofloxacina; MEN: Meropenem; SXT: Sulphamethoxazole/Trimethoprim ; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina C.M.C: Centro Médico de Caracas; P.M: Policlínica Metropolitana; H.D.L: Hospital "Dr. Domingo Luciani"; H.J.M.V: Hospital "Dr. José María Vargas".

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas

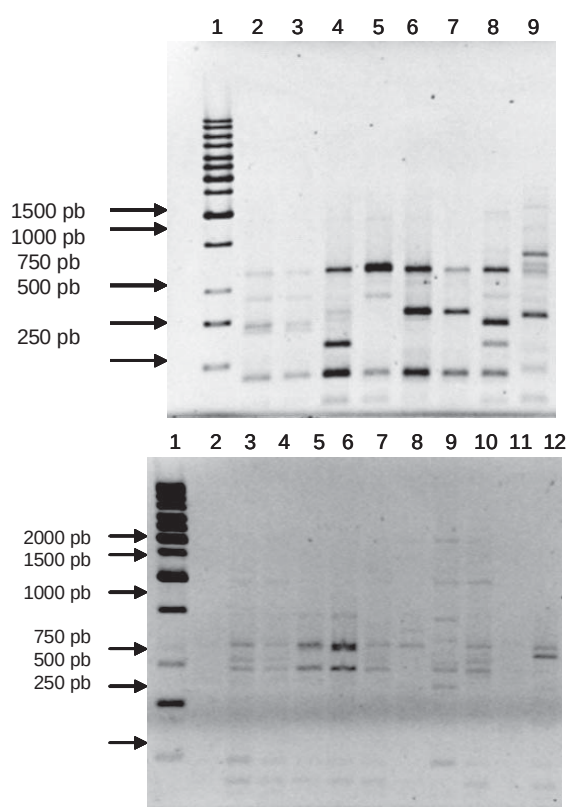


Figura 2-A. Patrones de bandas obtenidas con ERIC-PCR, de los aislados provenientes de la Policlínica Metropolitana de Caracas. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb; carril 2: *E. coli* 51; carril 3: *E. coli* 52; carril 4: *E. coli* 54; carril 5: *E. coli* 55; carril 6: *E. coli* 57; carril 7: *E. coli* 58; carril 8: *E. coli* 59; carril 9: *E. coli* 60; carril 10: *E. coli* 61.

Figura 2-B. Patrones de bandas obtenidas a través de REP-PCR, de los aislados nosocomiales de la Policlínica Metropolitana de Caracas. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb; carril 2: control negativo; carril 3: *E. coli* 51, carril 4: *E. coli* 52; carril 5: *E. coli* 57; carril 6: *E. coli* 58; carril 7: *E. coli* 59; carril 8: *E. coli* 60; carril 9: *E. coli* 61; carril 10: *E. coli* 62; carril 11: *E. coli* 55; carril 12: *E. coli* 64.

En el Hospital “Dr. José María Vargas” se encontraron cepas de *Klebsiella pneumoniae*, cepas 101 y 112 que presentaron una estrecha relación clonal. El fenotipo de resistencia entre ambas es idéntico, indicativo de su relación clonal (Tabla 1).

En el Hospital “Dr. Domingo Luciani” se encontraron 3 cepas de *E. coli* 182, 196 y 198 clasificadas por ERIC-PCR como relacionados clonalmente y por REP-PCR como aislados con una posible relación clonal. Los perfiles de resistencia entre las tres cepas varían por la resistencia a cefalotina, aztreonam,

cloramfenicol, cepa 182 y ciprofloxacina, 196 y 198. Estas cepas fueron aisladas de la Unidad de Cuidados Intermedios (U.C.I.) y de Hospitalización. Así mismo se encontraron 2 cepas de *E. coli*, cepas 159 y 162 clasificadas por ERIC-PCR como de una estrecha relación clonal y por REP-PCR como con una posible relación clonal. Estas 2 cepas fueron aisladas de la U.C.I. y presentaron un perfil de resistencia similar, a excepción de las resistencias a cloramfenicol, trimetoprima/sulfametoxazol y ciprofloxacina (Tabla 1).

Discusión

Cuando varios aislados son clasificados como genéticamente indistinguibles, mediante un método de tipificación molecular, se puede asumir que estos derivaron recientemente de un ancestro común, a través de una cadena de eventos relacionados.

Según nuestros resultados, la tipificación molecular reveló una considerable variabilidad genética entre las cepas de la misma especie. No se detectó diseminación de clones bacterianos entre los hospitales que conformaron nuestro estudio.

En el Centro Médico de Caracas y en la Policlínica Metropolitana se encontraron clones en diferentes servicios, sugiriendo la diseminación de clones bacterianos dentro de los centros de salud.

Nuestros resultados nos permiten inferir como se están diseminando los determinantes de resistencia. La mayoría de las cepas analizadas presenta variabilidad en sus perfiles de resistencia y en su mayoría presentan variabilidad genética cromosomal. Ambos resultados sugieren, que en los cuatros centros hospitalarios, la diseminación de los determinantes de resistencia principalmente no es por la propagación de clones bacterianos sino por vía horizontal.

Así mismo, las cepas relacionadas clonalmente presentan diferencias en los fenotipos de resistencia, sugiriendo una adquisición de los determinantes de resistencia por vía horizontal, posiblemente vía plásmidos conjugativos portadores de genes de resistencia. Las cepas clonalmente relacionadas encontradas en el Centro Médico de Caracas, que poseen perfiles de resistencia diferentes, representan una prueba que apoya nuestra proposición.

- La tipificación molecular reveló una considerable variabilidad genética entre las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*
- En el Centro Médico de Caracas y en la Policlínica Metropolitana se encontraron clones diseminados en diferentes servicios de los centros de salud.
- En los cuatros centros hospitalarios, la diseminación de los determinantes de resistencia no pareciera ser por la propagación de clones bacterianos sino por transferencia horizontal.

Agradecimientos

A los Licenciados, Alberto Calvo y Nicolás Rodríguez (Policlínica Metropolitana), Adela Rizzi (Centro Médico de Caracas), José Luís Rodríguez (Hospital “Dr. José María Vargas”), Ninoska Montilla (Hospital “Dr. Domingo Luciani”); y al Dr. Manuel Guzmán, por el apoyo brindado para la realización de este estudio. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a GA (03-33-5417-2004 y 03-33-5416-2004)

Referencias

1. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infections diseases practicality and costs. *Emerging Infections Diseases*. 2001;7: 312-318
2. Tosin I, Silbert S, Sader H. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative in Brazilian hospitals. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2003;7:360-369.
3. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22:355-360.
4. Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterias and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991;19:6823-6831.
5. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995;39:185-188
6. Rademaker JLW, Louws FJ, De Bruijn FJ. Characterization of diversity of ecologically important microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Pp. 1-26. Kluwer Academic publishers dordrecht.1997.
7. Horcajada J, Vila J, Moreno-Martinez J., et al. Molecular Epidemiology and evolution to resistance to quinolones in *Escherichia coli* alter prolonged administration of ciprofloxacin in patients whit prostatitis, *Journal of Microbial Chemotherapy* 2002;49:(55-59)
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE., Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain syring. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995;33:2233-2239.