

COMUNICACION CORTA

Electroforesis de campos pulsantes para la diferenciación genotípica de dos aislados de *Escherichia coli* fenotípicamente indistinguibles

Hilda Teresa Clark Dondériz, Axel Sánchez Alonso,* María Concepción Ariosa Acuña, Enrique Rodríguez, María del Carmen Pérez González, Lilia López Cánovas* y Ana María Riverón Rojas.*

Departamento de Microbiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. *Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Recibido: 25 de febrero de 2002. Aceptado: 7 de mayo de 2002.

Palabras clave: *E. coli*, tipificación molecular, ECP, infección nosocomial.
Key words: *E. coli*, molecular typing, PFGE, nosocomial infection.

Las infecciones nosocomiales contribuyen marcadamente a la morbilidad y mortalidad y elevan el costo de las hospitalizaciones. La proporción de enfermedades nosocomiales en el mundo está en el intervalo de 3,5 a 12 %.¹

La *Escherichia coli* es un patógeno asociado a infecciones del tracto urinario, neumonías y bacteriemias nosocomiales. Se aísla entre un 16,3 y un 17,7 % de los pacientes que reciben ventilación asistida y se ha encontrado como causa de sepsis en las heridas quirúrgicas entre un 15 y un 33,1 %.²

La identificación y caracterización fenotípica de microorganismos, se realiza basándose en caracteres microbiológicos, bioquímicos, serológicos y fisiológicos.³ Los métodos de caracterización del fenotipo de los gérmenes presentan desventajas, ya que se limitan a analizar un número limitado de características y pueden generar información errónea debido a la variabilidad de la expresión genética.¹ Estos métodos combinados con técnicas moleculares de alta resolución permiten una mejor discriminación a un nivel intraespecie.³

Los métodos de caracterización del genotipo (caracterización mole-

cular) se basan en estudiar directamente la dotación genética del microorganismo y poseen un mayor nivel de discriminación que los de caracterización del fenotipo ya que permiten identificar en el genoma del microorganismo los elementos responsables de las características "externas" (fenotípicas) aún cuando los cambios en ellas no sean perceptibles.⁴ En microorganismos de una misma especie, pero con patrones diferentes de susceptibilidad a antibióticos, es posible identificar las características de su genoma que los diferencian inequívocamente y que probablemente sean las responsables de la resistencia a determinados antibióticos.

La electroforesis de campos pulsantes (ECP) se considera uno de los métodos con mayor poder de discriminación en la diferenciación de microorganismos.^{4,5} La ECP separa los macrofragmentos de restricción de ADN bacteriano en un patrón de bandas característico o pulsotipo.

El objetivo del presente trabajo consistió en el estudio de dos aislados de *Escherichia coli* (*E. coli*) responsables de infecciones nosocomiales. El aislado I procedía de secreciones traqueobronquiales de un

paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y el II de secreciones de una herida quirúrgica de un paciente ingresado en el servicio de cirugía. Esta institución dispone de 62 camas y el personal médico y paramédico se traslada de un área a otra con frecuencia, lo que unido a que ambas infecciones se presentaron en un intervalo de tiempo relativamente breve sugirió una posible relación epidemiológica entre ambos aislados. La coincidencia en el fenotipo y el patrón de resistencia a antibióticos sugerían, además, que los aislados podrían provenir de una fuente común, de ahí, el interés en la caracterización genotípica, para determinar si era una misma cepa y tratar de eliminar dicha fuente de infección.

Por otra parte, la aplicación de la ECP a la tipificación molecular de aislados clínicos resulta novedosa en el sistema de salud cubano y contribuirá a determinar las cepas endémicas en el hospital.

Las muestras se sembraron en caldo de tioglicolato y en placas de agar sangre y agar *McConkey* (todos los medios de cultivo procedieron de BIOCEN, Ciudad de La Habana), los que fueron incubados a 35 °C durante 18 a 24 h .

Correspondencia

Dra. Lilia López Cánovas, Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba. Calle 158, No. 15802, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

En agar sangre se seleccionaron las colonias grises y regulares de bordes bien definidos que predominaban en las placas y en agar *McConkey* creció un único tipo de colonia.

La caracterización fenotípica se realizó mediante coloración de Gram⁶ y subcultivo en medio *Kliger*.⁷ La coloración de Gram de los microorganismos aislados mostró una morfología de bacilos cortos gram negativos. En medio *Kliger* se observó que utilizaban glucosa y lactosa, que producían gas y no H₂S.

El estudio fisiológico incluyó la siembra en agar citrato de *Simmons*, agar urea de *Cristensen*, agar acetato de sodio, medio de motilidad y caldo de indol. Se ensayó la producción de ácido a partir de los azúcares siguientes: glucosa, lactosa, manitol, inositol y sorbitol.⁷ Se obtuvo formación de indol a las temperaturas ensayadas y producción de ácido a partir de glucosa, lactosa y manitol. No se produjo hidrólisis de urea ni utilización de citrato y se observó que los microorganismos presentaron motilidad. Estos resultados se corresponden con lo descrito para *E. coli*.⁷

Se determinó la sensibilidad a antibióticos por el método de difusión en placa⁸ utilizando discos comerciales (OXOID) y por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) según ha sido establecido.^{9,10} Se usó como control la cepa *E. coli* ATCC 25922, recomendada por el Comité Nacional de Normas para Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos. Por el método de CIM resultaron resistentes a azlocilina, cefotaxima, cefuroxima y gentamicina. En la difusión en placa mostraron resistencia a gentamicina, cefazolina, cefotaxima, amikacina, ceftriaxona, ciprofloxacina, ceftazidina y cefuroxima. Ambos fueron sensibles al imipenem y a la combinación piperacilina-tazobactam.

La preparación de las muestras de ADN inmovilizado a partir de los aislados y de la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se realizó según método descrito.¹¹ El ADN inmovilizado se digirió con la enzima *Xba*I (Amersham).¹¹

Los fragmentos de restricción del ADN cromosómico bacteriano se separaron mediante ECP utilizando la cámara miniCHEF (CHEF: *Contour Clamped Homogeneous Electric Field*) del sistema GUEPARD 04 (NEURONIC SA, Ciudad de La Habana).¹² La electroforesis se

realizó en gel de agarosa (Lachema) al 1,5 %, en disolución amortiguadora TBE 0,5x (TBE 1x: Tris (Sigma) 89 mmol/L, ácido bórico (Sigma) 89 mmol/L, EDTA (Sigma) 2 mmol/L, pH 8,0) a una temperatura de 20 °C. El campo eléctrico fue de 10 V/cm, el tiempo de electroforesis de 5 h y se utilizó una rampa descendente de tiempo de pulso de 25, 20, 15, 10 y 5 s, con 35, 40, 50, 140 y 800 pulsos, respectivamente. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con disolución de bromuro de etidio (Sigma) 0,5 mg/mL y se fotografiaron.

La talla de los fragmentos de restricción de las moléculas de ADN digeridas con *Xba*I se determinó por comigración con concatámeros de ADN de fago lambda (Fig. 1, carrilera 1).

Para la *E. coli* ATCC 25922, que se empleó como control de la buena calidad del pulstipo, se obtuvo un patrón de 15 bandas y un barrido que corresponde a los fragmen-

tos de menor talla que se apilan al final del gel en estas condiciones de electroforesis (Fig. 1, carrilera 2). Las tallas estuvieron comprendidas entre 20 y 434 kb (kilopares de bases) lo que se corresponde con lo reportado^{13,14} y son similares a las que se obtienen cuando la secuencia reportada del ADN cromosomal de *E. coli*¹⁵ se corta con la enzima *Xba* I. La particularidad del patrón consiste en que los fragmentos de talla similar comigran durante la electroforesis, lo que provoca la presencia de bandas gruesas en algunas zonas del patrón. Por ejemplo, la banda a la altura del marcador de 291 kb de la carrilera 2 (Fig. 1, carrilera 2). No obstante, las condiciones de electroforesis empleadas en este trabajo permiten una buena resolución de los fragmentos en este intervalo de tallas.

A modo de comprobación, se calculó la suma de las tallas de todos los fragmentos resueltos, la que fue de 3 480,64 kb, y correspondió

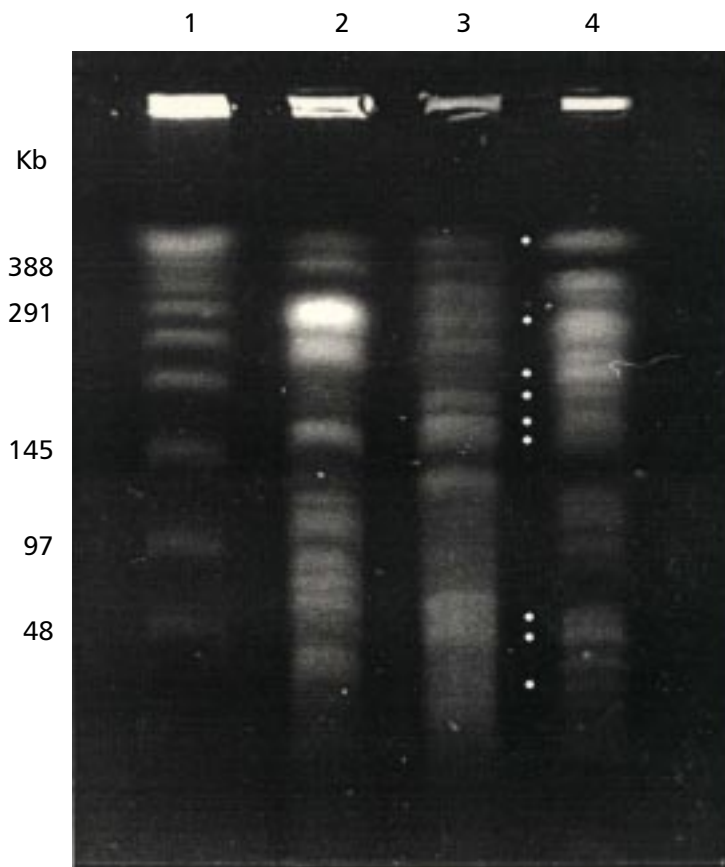


Fig. 1. Pulstipos con *Xba*I de dos aislados de *E. coli*. Electroforesis realizada en cámara MiniCHEF. Condiciones de electroforesis: 10 V/cm, TBE 0,5x, agarosa 1,5 %, 20 °C, tiempo de electroforesis 5 h. Se utilizó una rampa descendente de tiempo de pulso de 25, 20, 15, 10 y 5 s, con 35, 40, 50, 140 y 800 pulsos, respectivamente. Tamaño del gel: 3,9 cm. Factor de magnificación: 3,23. Carrileras: 1. Marcador de talla de concatámeros de ADN de fago lambda. 2. Cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. 3. Aislado I. 4. Aislado II. ● Bandas comunes entre los aislados. kb Kilopares de bases.

al 75 % de la talla real del cromosoma de *E. coli*.¹⁵ Esta diferencia es explicable sobre la base de los fragmentos que comigraron y no se observaron como bandas resueltas. Por ejemplo, si se considera como un triplete a la banda que está a la altura del marcador de 291 kb y como un doblete a la inmediatamente inferior, se logran explicar 800 kb no contempladas en el cálculo, lo que representa un 16 % adicional al 75 % previamente estimado. Estos resultados indican que las condiciones empleadas son adecuadas para estudiar los aislados clínicos.

Por último, fueron apreciables 15 bandas en el aislado I (Fig. 1, carrilera 3), mientras que en el aislado II aparecen 16 (Fig. 1, carrilera 4). Sus tallas están comprendidas entre 16 y 434 kb para ambos aislados. De ellas, solo nueve coinciden (señalados con un círculo blanco en la figura 1) y se corresponden con tallas de 435, 255, 194, 180, 165, 154, 54, 42 y 22 kb.

En el aislado I, se observaron seis bandas que no aparecieron en el aislado II (385, 330, 223, 134, 87 y 60 kb), mientras que en el II hubo siete bandas que no aparecieron en el I (352, 234, 213, 121, 110, 93 y 30 kb), lo que hizo un total de 13 bandas diferentes. Teniendo en cuenta los criterios aceptados,¹³ la diferencia de más de siete bandas entre los pulstipos indica que los aislados no están relacionados genéticamente, es decir, no derivan de un origen

común. La susceptibilidad a antibióticos, como marcador epidemiológico, sugirió una propagación horizontal de los microorganismos. Sin embargo, la diversidad clonal revelada por la tipificación genotípica indica un desarrollo independiente de la resistencia en estos aislados.

Estos resultados resaltan el poder discriminatorio de la tipificación molecular mediante ECP, en particular, cuando se aplica a un número pequeño de aislados relacionados epidemiológicamente.¹³

BIBLIOGRAFIA

1. Busch U. and Nitschko H. Methods for the differentiation of microorganisms. **J. Chromatography B**, **722**, 263, 1999.
2. Bennett J. Hospital Infections. 4th Ed., Lippincott-Raven, New York, 373-374, 1997
3. Stefani S. and Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **13**, 143, 2000.
4. Struelens M. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clin. Microbiol. Inf.**, **2**, 2, 1996.
5. Tenover F, Arbeit R. and Goering R. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **18**, 426, 1997.
6. Howard B. Clinical and Pathogenic Microbiology. Chapter VI Microscopy and Staining. 2nd. Edition, Mosby, St Louis, 107-130, 1994.
7. OXOID. Vademecum of Microbiology. Basingstoke, UK, 34-39, 1993.
8. NCCLS. Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved standard-Seventh Edition. NCCLS document M2-A7 [ISBN 1-56238-393-0]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.
9. NCCLS. Standard methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically 2nd edition. Approved standard M7-A2. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 1996.
10. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved standard- Fifth Edition NCCLS document M7-A5 [ISBN 1-56238-394-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2000.
11. López L. *et al.* Process for rapid microorganism typing and associated kit of reagents. Patente PCT/CU01/00008, 2001.
12. Riverón A. *et al.* Fast Pulsed Field Minigel Electrophoresis of Large DNA Molecules. **Analytical Letters**, **28**, 1973, 1995.
13. Tenover F *et al.* Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **J. Clin. Microbiol.**, **33**, 2233, 1995.
14. Lehn N. *et al.* Characterization of Clinical Isolates of *Escherichia coli* Showing High Levels of Fluoroquinolone Resistance. **J. Clin. Microbiol.**, **34**, 597, 1996.
15. European Bioinformatics Institute. URL: <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>. 2002.

MS ACTIVIDADES CIENTIFICAS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

TALLER INTERNACIONAL DE ORQUIDEAS

Del 11 al 17 de noviembre del 2002.

TEMATICAS:

*Cultivo y Colecciones. Biología Molecular.
Marketing. Micropropagación.
Fitopatología y Entomología.
Biodiversidad y Conservación.
Ecología. Fitogeografía.
Taxonomía y Sistemática.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 100.00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Ing. Rolando Pérez Márquez.
E-mail: rperez@vrect.upr.edu.cu
Fax: (5382) 2558