

Factores de virulencia de uropatógenos aislados en Gran Canaria

MARÍA DE LOS ÁNGELES PÉREZ CERVANTES

RESUMEN

282 cepas aisladas de urocultivos procedentes del Hospital Insular de Gran Canaria fueron analizadas. En 81 *E. coli*, se investigaron sus factores de virulencia (FV): alfa-hemolisina (Hly), factor necrotizante citotóxico 1 (FNC1), hemaglutinación resistente a la manosa (MRHA), serogrupo, producción de colicina (ColV) y síntesis de sideróforos. Además, 56 cepas resistentes a trimetoprim y/o quinolonas fueron analizadas para tratar de dilucidar el soporte genético de la misma. 68 (83.9%) resultaron positivas para al menos uno de los FV determinados, siendo: 37% Hly(+), 27% FNC1(+), 36% MRHA (+), 83.9% siderofoforo (+) y el 3.7% ColV (+). Los serogrupos mayoritarios fueron O6, O2, O4. El 88% de las cepas de estos tres serogrupos presentaron alguno de los FV estudiados, frente al 29% de las cepas de otros serogrupos ($p < 0.001$). 34 cepas fueron Tp-resistentes, siendo en el 85.3% de los casos, debida a la producción de una DHFR tipo Ia. El análisis de *E. coli* resistentes a quinolonas por PCR-RFLP-*HinfI* se llevó a cabo en seis de las 13 cepas. En cinco (83.3%) la resistencia era debida a mutación en el punto de restricción *HinfI* correspondiente a la Ser-83 de la ADN-girasa.

ABSTRACT

Virulence factors of uropatogens isoleted in Gran Canaria

We examined 282 strains isolated from the urine of patients with UTI at the Hospital Insular de Gran Canaria. The following virulence factors (VF) were investigated in 81 *E. coli*: the alpha-haemolysin (Hly), the cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF-1), the mannose resistant haemagglutination (MRHA), serotyping, the Colicin V and the production of siderophore. 56 strains were tested for their susceptibility to trimethoprim (Tp) and quinolones using an agar diffusion method. 83.9% of the *E. coli* strains examined showed some of the VF investigated. 37% of the strains were Hly+, 27% CNF1+, 36% MRHA+, 83.9% aerobactine (+) and only 3 strains were Col V(+). 96.15% were from one of only 3 serogroups (O2, O4 and O6). 23 of the 26 strains of these 3 serogroups showed VF versus only 16 of 55 belonging to other serogroups ($p < 0.001$). 34 strains were considered as resistant to Tp and the dihydropholate reductase gene most prevalent was the type Ia. The analysis of resistance to the quinolones was performed by PCR-RFLP-*HinfI*. Six strains of the 13 isolated resistant to the quinolones were analyzed using this method. Five of these strains showed the disappearance of the Ser-83 *HinfI* restriction point of the ADN-girasa.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs), junto con las del tracto respiratorio, constituyen uno de los primeros motivos de consulta médica en el medio extrahospitalario y son, además, la primera causa de infección nosocomial.

Las bacterias implicadas en estos procesos pertenecen, por lo general, a la flora endógena del huésped, siendo su reservorio el tracto intestinal. *Escherichia coli* (*E. coli*) es el microorganismo oportunista que con mayor frecuencia se asocia a estos procesos: representando el 50% de las infecciones de vías urinarias en el área intrahospitalaria y el 85% de las que son adquiridas en la comunidad. Sin embargo, existen otras bacterias gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, etc.) y grampositivas (*Enterococcus faecalis*) que pueden invadir el tracto urinario y causar infección (Sobel, J.D., 1991). En los pacientes hospitalizados, sometidos a manipulaciones instrumentales y con tratamiento antibiótico, el porcentaje de *E. coli* disminuye en favor de bacterias propias del ecosistema hospitalario (*Enterobacter spp*, *Acinetobacter spp*, *Serratia spp*, *M. morgani*, *Pseudomonas spp*, etc.), así como de otros microorganismos (*C. albicans*, principalmente) (Wilkie, M.E. et al, 1993).

Las cepas de *E. coli* productoras de ITUs con frecuencia manifiestan una serie de características especiales que son poco comunes en *E. coli* aislados del contenido intestinal de sujetos sanos (Vidotto, M.C. et al, 1991).

Sólo aquellas cepas que posean estos factores de virulencia serán capaces de invadir, colonizar y dañar el tracto urogenital, provocando ITUs que pueden ir de leves (bacteriuria asintomática) a graves (cistitis y pielonefritis). La expresión de estos determinantes de patogenicidad sigue un orden secuencial en el transcurso de la infección. Así, por ejemplo, las adhesinas facilitan a *E. coli* la colonización inicial, al permitirle la unión a las células del tracto urogenital; los antígenos somáticos O y capsulares K protegen a las cepas de las defensas del huésped, y las toxinas elaboradas (alfa-hemolisina y factor necrozante citotóxico), junto a otros factores presentes en estas cepas (resistencia a la actividad bactericida del suero y a la fagocitosis, producción de colicinas y expresión de sideróforos), aportan ventajas adicionales a *E. coli*, que se traducen en una mayor capacidad de supervivencia en un medio, teóricamente, hostil (Johnson, J.R., 1991; Siitonen, A., 1992).

Si bien es cierto que los factores de virulencia en *E. coli* determinan en gran parte la gravedad de las ITUs, también lo

es que para erradicar este microorganismo del tracto urinario se precise la administración de antimicrobianos. En los últimos tiempos, se han incorporado al arsenal terapéutico existente nuevos antibióticos y quimioterápicos que se concentran y eliminan en el foco urinario, pero que no siempre consiguen resolver satisfactoriamente el problema. Al ser *E. coli* el principal responsable de ITUs, muchas de estas infecciones son tratadas de manera empírica, teniendo en cuenta consideraciones de tipo epidemiológico. No obstante, conviene recordar que el uso inadecuado de antimicrobianos facilita la selección y diseminación de microorganismos resistentes, lo cual dificulta y complica el tratamiento de estos procesos.

Un claro ejemplo de lo anteriormente expuesto lo tenemos en las fluoroquinolonas. A diferencia de las quinolonas clásicas o de primera generación (ácido nalidíxico, ácido piperímico, etc.), las fluoroquinolonas poseen un espectro de actividad más amplio y una mejor actividad intrínseca (Moniot-Ville, N. et al, 1991). Su introducción a la terapéutica supu-

TABLA 1

Frecuencia de microorganismos aislados a partir de urocultivos

Microorganismos	Frecuencia	%
<i>Escherichia coli</i>	108	39,29
<i>Enterococcus faecalis</i>	70	38,29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31	10,99
<i>Enterococcus durans</i>	17	6,03
<i>Proteus mirabilis</i>	13	4,61
<i>Acinetobacter anitratus</i>	9	3,13
<i>Morganella morgani</i>	5	1,77
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1,42
Otros	25	8,87

TABLA 2 Tipos de MRHA en *E. coli* uropatogénicos

Tipo de adhesina MRHA	MRHA con eritrocitos de					
	HA	C	Cb	Po	Ov	Ce
I	R	R	-	R	-	-
II	-	R	-	R	-	-
III	R	V	V	V	R	R
IVa	R	V	V	V	R	R
IVb	R	V	V	V	-	R
V	R	-	-	-	-	-
VI	-	V	V	V	V	V

HA: Hematias humanos grupo A
 C: Eritrocitos de cabra
 Cb: Eritrocitos de cobaya
 Po: Eritrocitos de pollo
 Ov: Eritrocitos de oveja
 Ce: Eritrocitos de cerdo
 R: Resistente
 V: Variable
 -: Negativo

so una mejora substancial en el tratamiento y prevención de las ITUs. Estos antimicrobianos inducen *in vitro* la aparición de mutantes resistentes que pueden expresar, además, resistencia cruzada entre los distintos miembros del grupo (Desgrandchamps, D. & Munzinger, J., 1989). A finales de la década de los ochenta la frecuencia de enterobacterias resistentes a las fluoroquinolonas era inferior al 1% en Europa y en los Estados Unidos de Norteamérica (Aguiar, J.M. et al, 1992). En España, López-Brea y Alarcón comunicaron en 1990 los primeros aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* con resistencia de alto nivel a la fluoroquinolonas. A partir de

entonces, el número de aislados clínicos de *E. coli* uropatogénicos resistentes a estos antimicrobianos se ha incrementado y coincide con el elevado consumo de norfloxacin y ciprofloxacina (Aguiar, J.M. et al, 1992; Pérez-Trallero, E. et al, 1993). En Gran Canaria, concretamente en el Servicio de Microbiología del Hospital Insular, la frecuencia actual de *E. coli* resistentes a ácido nalidíxico y ciprofloxacina esta próxima al 36% y 31% respectivamente (Ojeda-Vargas, M.M., comunicación personal).

Este estudio ha tenido por objetivo conocer los determinantes de patogenicidad presentes en cepas de origen urinario (*E.*

coli mayoritariamente), valorar su sensibilidad a determinados antimicrobianos (trimetoprim y quinolonas) de uso corriente en la terapéutica de infecciones del tracto urinario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias

Un total de 282 cepas aisladas de urocultivos positivos de pacientes intra y extrahospitalarios procedentes del Hospital Insular de Gran Canaria fueron estudiadas (Tabla 1, página anterior). De estas, se eligieron las siguientes enterobacterias: *E. coli*, *P. mirabilis*, *M. morgani*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. agglomerans* y *P. stuartii*, distribuyéndose en dos grupos de acuerdo al tipo de estudio a efectuar. De un lado, factores de virulencia (alfa-hemolisina, Factor necrotizante citotóxico 1, adhesinas, serogrupo, producción de colicinas y síntesis de sideróforos) en *E. coli* (81 cepas); de otro, 56 cepas de enterobacterias (34 *E. coli*, 10 *P. mirabilis*, 4 *M. morgani*, 3 *K. pneumoniae*, 3 *P. stuartii*, 1 *C. freundii* y 1 *E. cloacae*), seleccionadas en función del fenotipo de resistencia a los antimicrobianos (trimetoprim y quinolonas), analizadas para tratar de dilucidar el soporte genético de la misma.

Detección de toxinas

La producción de hemolisina se realizó en placas de agar sangre suplementadas con un 5% de eritrocitos de carnero lavados dos veces. Las cepas que producen una zona clara de hemólisis (beta-hemólisis), des-

TABLA 3 Plásmidos control de las DHFRs

DHFRs	Plásmido	Características	Referencia
Ia	pFE506	Tp ^r	B. Wylie
Ia	pLKO627	Tp ^r	E. Heikkilä
Ila	pFE364	Tp ^r	B. Wylie
Illa	pFE1242	Am-Tp ^r	H.G. Young
IV	pUK1148	Am-Te-Tp ^r	H.G. Young
V	pLKO022	Tp ^r	E. Heikkilä

pués de incubar las placas durante 24 horas a 37°C, fueron consideradas productoras de alfa-hemolisina (Hly+). Para la detección del Factor Necrotizante Citotóxico (FNC1) se utilizó el filtrado de cultivos de *E. coli* tratados con mitomicina C, añadidos a cultivos de células Vero y HeLa. Los ensayos de seroneutralización utilizando antisuero FNC1 fueron realizados para confirmar la producción del FNC1.

Detección de adhesinas

Cada una de las cepas fue inoculada en 5 ml de caldo Mueller Hinton (Difco, USA) (37°C/5 días/estático) y posteriormente sembradas en agar CFA (37°C/18 h). Para la hemaglutinación en presencia de D-manosa (Sigma) se utilizaron eritrocitos humanos (grupos A y O), ternera, cobaya, pollo, carnero y cerdo. La hemaglutinación se realizó en placas de micro-titulación. Los resultados se interpretaron siguiendo la clasificación de Blanco y cols. (1992a) (Tabla 2). Se consideró que una cepa posee actividad hema-glutinante resistente a la manosa (MRHA+) cuando presentaba aglutinación de uno o más tipos de eritrocitos en presencia o ausencia de la D-manosa con la misma intensidad. Cuando la cepa aglutina sólo los eritrocitos de cobaya en ausencia de D-manosa se considera que posee actividad hemaglutinante sensible a la D-manosa (MSHA+).

Serotipia de cepas de *E. coli*

La determinación del serogrupo O se efectuó según el método de Guineé y cols (1972), modificado por Blanco y cols (1992b). Los antisueros fueron seleccionados en función de su asociación con cepas patógenas de *E. coli* responsables de infecciones en humanos y animales.



Detección y determinación de sideróforos

Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo Mueller Hinton suplementado con 200 microM de 2-2'-dipiridil (Sigma), un agente quelante del hierro. El sobrenadante se utilizó para determinar la presencia de sideróforos por el método del Bioensayo (Carbonetti, N.H. & Williams, P.H., 1984), utilizando como cepa indicadora *E. coli* LG1522 (Dr. Peter H. Williams, Leicester, Inglaterra), como controles positivos las cepas *E. coli* 14TC y *E. coli* 29E (Dra. M.C. Vidotto, Londrina, Brasil) y como control negativo la cepa *E. coli* HB101. El medio de cultivo empleado fue el agar mínimo M9 suplementado con 2-2'-dipiridil.

Producción de colicinas

Se determinó por el método de la doble capa (Blanco, J. et al, 1992a), empleando como cepas indicadoras *E. coli* K12 711, *E. coli* K12 711 col V(+). Los aislados que inhibían a la cepa K12 711, pero no la K12 711 col V(+), se les consideró productores de colicina V. Las cepas que inhibían el crecimiento de ambos indicadores producen otros tipos de colicinas.

Para la detección de cualquier tipo de colicina se empleó como cepa indicadora *E. coli* K12S (CIP 54.117), sensible a la acción de cualquier bacteriocina.

Sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de sensibilidad antibiótica se efectuó por el método de difusión en placa (Kyrby & Bauer, 1966). Los antimicrobianos ensayados fueron amoxicilina más ácido clavulánico (Amc), ampicilina (Am), cefalotina (Cr), cloranfenicol (C), kanamicina (Kn), estreptomycin (Sm), ácido nalidíxico (Nal), rifampicina (Ra), co-trimoxazol (SxT), trimetoprim (Tp) y tetraciclina (Te). Los puntos de corte para cada antimicrobiano fueron los que establece el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1990). Las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas salvajes o de los transconjugantes, se realizó por el método de dilución en agar, según las normas establecidas por la NCCLS (1990).

Estudio de la resistencia al trimetoprim

Las cepas que presentaron resistencia al trimetoprim fueron

TABLA 4

Factores de virulencia de *E. coli* uropatógenos

Factores de virulencia	Cepas n = 81
Colicina V (ColV+)	3/81 (3,7%)
Alfa-hemolisina (Hly)	30/81 (37,04%)
FNC1	22/81 (27,2%)
MRHA	29/81 (35,8%)
Aerobactina	68/81 (83,9%)

analizadas para determinar su soporte genético (localización plasmídica o cromosómica). El análisis del origen plasmídico de la resistencia al Tp se llevó a cabo inicialmente por técnicas de conjugación bacteriana, empleando *E. coli* C1 Nal, resistente a ácido nalidíxico, y *S. typhi* T643, resistente a rifampicina, como cepas receptoras. En aquellos casos, en los que los ensayos de conjugación fueron negativos, o bien cuando se obtuvieron transconjugantes que albergaban más de un plásmido, se utilizó la técnica de transformación bacteriana (Sambrook, J. et al, 1989), empleando *E. coli* DH5a como cepa receptora. En aquellos aislados en los cuales no se obtuvieron resultados con las técnicas de conjugación o transformación, se realizaron intentos de movilización plasmídica con el plásmido Rp4 (AmR, KnR, TeR), albergado por la cepa *E. coli* Nal. Los plásmidos fueron aislados por el método descrito por Kado

y Liu (1981). La concentración mínima inhibitoria para el Tp de las cepas salvajes así como de los transconjugantes obtenidos se determinó por el método de dilución en agar siguiendo las normas establecidas por la NCCLS (1990). El Tp utilizado fue suministrado por la casa Fluka.

Para determinar el tipo de Dihidrofolato-reductasa (DHFR) en estos aislados, el ADN total de cada una de las cepas Tp-resistentes fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (dot-blott). La hibridación se llevó a cabo con una sonda de oligonucleótidos específica de la DHFR tipo Ia (5'-CAAGTTTACATCTGACAATGAACGTAT-3') marcada con biotina (Pharmacia Biotech). La detección se realizó con Phototope Detection Kit 6K (New England Biolabs Inc.). La tabla 3 (página 48) muestra los plásmidos utilizados como control.

TABLA 5

Concentración de FV en cepas de *E. coli* de serogrupos predominantes

Serogrupos	Nº de Cepas vir+/Total
O2, O4, O6	23/26 (88%)
Otros	16/55 (29,9%)

Estudio de la resistencia a quinolonas

Las cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas fueron analizadas para determinar su mecanismo de resistencia. La concentración mínima inhibitoria se efectuó por el método de microdilución en placa según las recomendaciones de la NCCLS (1990). Como caldo de cultivo se utilizó medio de Mueller-Hinton (Difco, Detroit, USA) suplementado con Mg²⁺ y Ca²⁺, y un inóculo final de 5 x 10⁵ UFC/ml. Los antibióticos utilizados en el estudio fueron suministrados en forma de sustancia valorada por las compañías farmacéuticas: ácido nalidíxico (Prodesfarma, Barcelona) y ciprofloxacino (Bayer, Alemania).

Para determinar si la resistencia a quinolonas era debida a una mutación puntual que afecta al codón de la Ser-83 de la ADN-girasa, lo cual genera una sustitución por otro aminoácido y afecta a un punto de restricción de la enzima *HinfI*, se obtuvo mediante PCR un amplicón de 648 pb, correspondientes al fragmento del gen *gyrA* comprendido entre los nucleótidos 24 y 671, ambos inclusivos. Para ello, utilizamos como cebadores 5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3' y 5'-TTAATGATTGCCGCCGTCCG-3'. Posteriormente, el producto resultante de la amplificación fue digerido con el enzima *HinfI* y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% + agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%. El codón 83 del gen *gyrA* descansa sobre un punto de digestión para la enzima *HinfI*, que desaparece en las cepas resistentes a quinolonas que expresan este mecanismo. En este trabajo, se valoró el uso de la PCR y el

polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción generados con la enzima *HinfI* (RFLP-*HinfI*), como técnica rápida para detectar la implicación de la sustitución de la Ser-83 en la resistencia a quinolonas en aislamientos clínicos de *E. coli*.

Análisis estadístico

Los resultados fueron comparados empleando la prueba de la chi-cuadrada con la corrección de Yate.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra las bacterias implicadas con mayor frecuencia en episodios de ITUs. *E. coli* y *E. faecalis* fueron los microorganismos predominantes. *E. coli* representó el 39.29% del total de aislados.

Sesenta y ocho cepas (83.9%) de *E. coli* presentaron, al menos, uno de los factores de virulencia estudiados. De éstas 30 (37%) fueron productoras de alfa-hemolisina (Hly+), 22 (27%) sintetizaron FNC1, 29 (36%) expresaron hemagglutininas resistentes a la manosa (MRHA III, IVa o IVb), 68 (83.9%) eran productoras de aerobactina y tan sólo tres (3.7%) eran productoras de colicina V (Tabla 4).

Cincuenta y cuatro (66%) de las cepas pudieron ser tipadas con los antiseros O utilizados, repartiéndose en 18 serogrupos O diferentes (Figura 1). Los serogrupos mayoritarios fueron, en orden de frecuencia, los siguientes: O6, O2, O4 y O15.

Con excepción de la síntesis de aerobactina, el resto de los factores de virulencia se con-

Fenotipos tóxicos	Total	MRHA III	MRHA IVa	MRHA IVb
Hly+CNF+	22	6 (27%)	10 (45%)	0
Hly+CNF-	8	0	4 (50%)	0
Hly-CNF+	0	0	0	0
Hly-CNF-	51	1 (2%)	6 (12%)	2 (4%)

centraron en las cepas de los tres serogrupos mayoritarios (O2, O4 y O6), ya que de las 26 cepas pertenecientes a estos serogrupos, 23 (88%) presentaban alguno de estos factores de virulencia (vease Tabla 5). De las 55 cepas restantes, pertenecientes a otros serogrupos, sólo 16 cepas (29%) mostraron algunos de los mecanismos de virulencia anteriormente reseñados. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

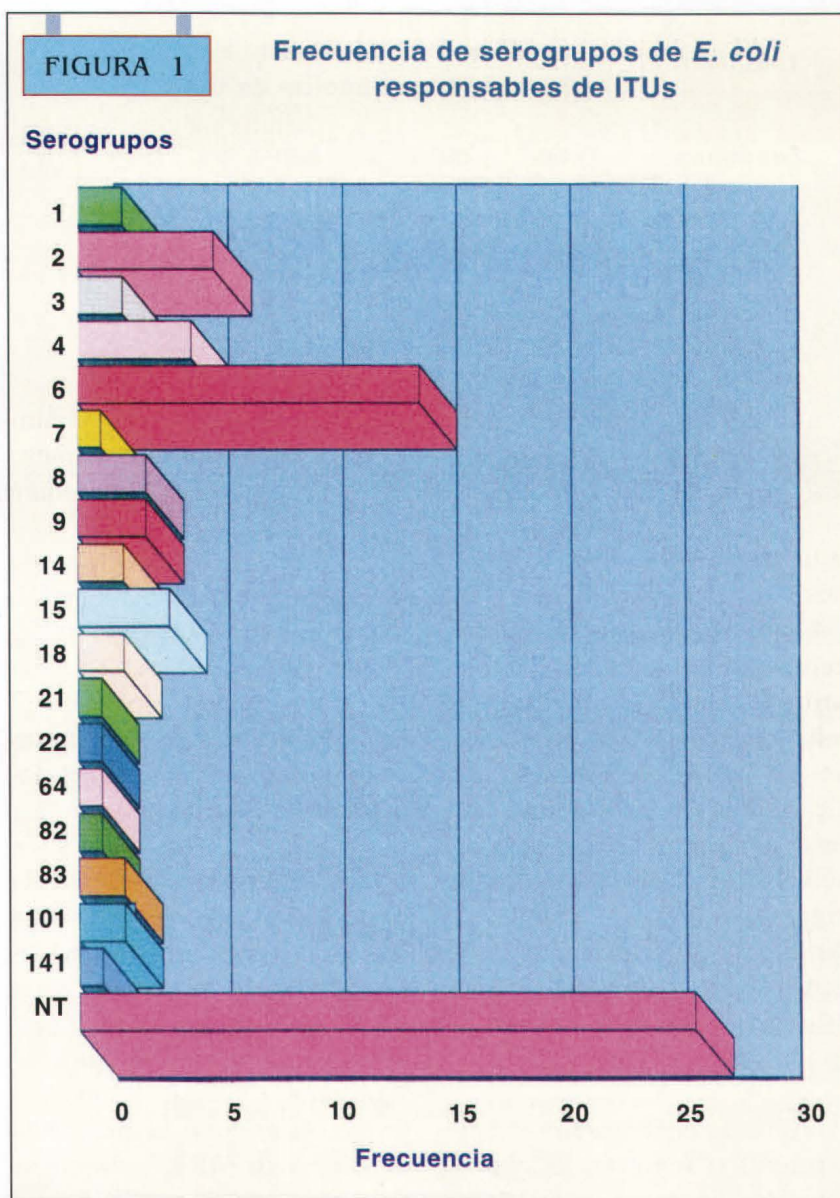
Además, se constató la asociación existente entre la producción de toxinas (Hly+ y

FNC1) y la expresión de adhesinas, dado que los tipo III, IVa y IVb se detectaron en 20 (67%) de las 30 cepas toxigenicas, frente a tan sólo 7 de las 51 cepas no productoras de toxinas ($p < 0.001$). Estos datos se muestran en la Tabla 6.

Asimismo, se puso de manifiesto la asociación existente entre la producción de FNC1 y la síntesis de Hly (Tabla 7). De igual forma, pudo constatar una fuerte correlación estadísticamente significativa entre la producción de aerobactina y la presencia de adhesinas MRHA o síntesis de alfa-hemolisina (Tabla 8).

Alfa-hemolisina	Nº deCepas CNF1+/Total
Hly+	22/30 (73%)
Hly-	0/51

Factor de virulencia	Aerobactina negativa (n=13)	Aerobactina positiva (n=68)
MRHA+	2	27
Hly+	2	28



No se observó ninguna correlación entre la síntesis de alfa-hemolisina y la presencia de adhesinas MRHA.

Treinta y cuatro cepas fueron consideradas Tp-resistentes; de éstas, el 47.05% (12 *E. coli*, 2 *P. mirabilis*, 1 *M. morgani* y 1 *K. pneumoniae*) pudieron transferir su resistencia al Tp a la cepa donadora por conjugación (29.4%), transformación (14.07%) o movilización (2.94%). El rango de pesos moleculares de plásmidos cotransferidos osciló entre 4.4 Kb y 83.7 Kb. Los otros marcadores de resistencia antibiótica transferidos con el Tp fueron: ampicilina (68.75%), cloranfenicol (37.5%), estreptomycin (56.25%) y tetraciclina (25%). Del total de cepas Tp-resistentes, 29 (85.3%) hibridaron con la sonda específica para la DHFR tipo Ia. Las CMI al Tp de las cepas salvajes, fenotipos de resistencia así como el tipo de DHFR detectado se muestra en la Tabla 9.

La resistencia al ácido nalidíxico (CMI > 32 g/L) se observó en 13 de las cepas de *E. coli*. El 54% de éstas, que presentaban una CMI de ciprofloxacino >0.5 g/L, fueron asimismo, resistentes al ácido nalidíxico con una CMI > 128 g/L. El resto de las cepas analizadas, resistentes al ácido nalidíxico con CMIs (rango: 64 - >128 g/L), presentaron CMIs para ciprofloxacino comprendidas entre 0.125 y 0.25 g/L. El análisis de *E. coli* resistentes a quinolonas por el método RFLP-*Hinf*I se llevó a cabo en seis de las 13 cepas (46.2%). En cinco de estas cepas (83.3%) se observó la desaparición del punto de restricción de la enzima *Hinf*I correspondiente a la



Ser-83, visualizándose en la electroforesis, tras digestión con la enzima, una única banda correspondiente a dos fragmentos no separables, de 320 y 328 pb respectivamente (Figura 2).

coli suele ser aislada con mayor frecuencia de ITUs, tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad, aunque su incidencia es mayor en pacientes no hospitalizados.

DISCUSIÓN

Las infecciones del tracto urinario siguen siendo un problema frecuente en la práctica médica habitual. Así, por ejemplo, las UTIs suponen mas de siete millones de consultas médicas ambulatorias y aproximadamente un millón de hospitalizaciones cada año en los Estados Unidos de América (Stratton, CH., 1996). De entre los muchos agentes etiológicos responsables de ITUs, las bacterias ocupan un lugar destacado y, dentro de ellas, *E.*

Por lo general, se acepta que la mayor parte de las ITUs siguen una vía ascendente y que, son causadas por microorganismos presentes en la flora intestinal, aunque ocasionalmente pueden producirse también por vía hematógena. Sin embargo, no toda las bacterias son capaces de desencadenar un proceso infeccioso y, además, incluso dentro de una misma especie bacteriana, no todas manifiestan idéntica capacidad para evadir las defensas del huésped e iniciar la infección. Es por ello por lo que se ha introducido el término de virulencia asociado a determinados microorganismos. Término, éste que defi-

TABLA 9

Fenotipos de resistencia de cepas salvajes así como transferidos a cepas receptoras, CMI al Tp y tipo de DHFR detectado

Cepas Tp-Resistentes	Fenotipo-Resistencia	Resistencia transferida a <i>E. coli</i>	CMI (mg/ml)	Tipo DHFR
<i>E. coli</i> EC3	SxT-Am-Cr ¹ -C-Sm-Tp	SxT-Am-C-Sm-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC4	SxT-Am-Te-Na ¹ -Cr-C-Sm-Tp	SxT-Am-Te-C-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC6	SxT-Am-Te-Sm-Tp	SxT-Am-C-Sm-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC8	SxT-Am-Cr ¹ -C-Sm-Tp	SxT-Am-C-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC9	SxT-Am-Te-Sm-Tp	SxT-Am-Sm-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC10	SxT-Sm-Tp	SxT-Sm-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC12	SxT-Am-Te-C-Sm-Tp	SxT-Am-Te-C-Sm-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC14	SxT-Am-Te-Tp	SxT-Am-Te-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC19	SxT-Am-Sm-Tp	SxT-Am-Tp	>1000	I
<i>E. coli</i> EC20	SxT-Am-Te-Sm-Tp	SxT-Am-Sm-Tp	>1000	ND
<i>E. coli</i> EC21	SxT-Sm-Tp	SxT-Tp	>1000	I
<i>P. mirabilis</i> PM2	SxT-Am-Te-Na ¹ -C-Sm-Tp	SxT-Am-C-Tp	>1000	I
<i>P. mirabilis</i> PM3	SxT ¹ -Am-Te-C ¹ -Sm ¹ -Tp	SxT-Am-C-Sm-Tp	>1000	I
<i>K. pneumoniae</i> KP1	SxT-Am-Te ¹ -Na ¹ -Sm-Tp	Tp	>1000	I
<i>M. morgani</i> MM1	SxT-Am-Te-Cr-Sm-Tp	Sm-Tp	>1000	I

SxT: co-trimoxazol; Am: ampicilina; Te: Tetracilina; Na¹: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; Sm: estreptomycin; Tp: trimetoprim; Cr: cefalotina; CMI: concentración mínima inhibitoria; DHFR: dihidrofolato reductasa; ND: no determinada.

niría a aquellas especies bacterianas, y cepas dentro de una misma especie como las únicas dotadas realmente con factores de virulencia especializados que facilitarían el ascenso de la bacteria desde la flora fecal hacia el introito o región periuretral, uretra, vejiga y, menos frecuente, riñón. Los organismos así equipados para ascender por el tracto urinario e inducir infección, especialmente en presencia de mecanismos defensivos del huésped, son denominados uropatógenos.

Aunque las implicaciones clínicas de los factores de virulencia no están claras, parece ser que la expresión de adhesinas y la producción de toxinas desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de ITU del tracto urinario superior. Más recientemente algunos autores han considerado también la producción de sideróforos (aerobactina) como un importante factor de virulencia en aquellas cepas uro-septicémicas.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la teoría de la especial patogenicidad, ya que aproximadamente el 84%

de las cepas presentaban alguno de los factores de virulencia estudiados.

Los *E. coli* uropatógenos responsables de ITUs en Gran Canaria, en su mayoría, pertenecían a los serogrupos O6, O2, O4 y O15. Serogrupos encontrados con frecuencia entre las cepas causantes de ITUs en otras zonas geográficas (Tabla 10). Algunos autores han sugerido que las cepas pertenecientes a estos serogrupos mayoritarios poseen mayor número de factores de virulencia que los otros *E. coli* implicados en procesos infecciosos de vías urinarias. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta idea, dado que pudo comprobarse que, con excepción de la síntesis de aerobactina, el resto de los factores de virulencia se concentraron en las cepas de los tres serogrupos mayoritarios (O2, O4 y O6). Así, 23 (88%) de las 26 cepas pertenecientes a estos serogrupos presentaron alguno de estos factores de virulencia estudiados, frente a tan sólo 16 (29%) de las 55 cepas restantes, pertenecientes a otros serogrupos ($p < 0.001$). Además, se constató la asociación

existente entre la producción de toxinas (Hly+ y FNC1) y la expresión de adhesinas, dado que los tipo III, IVa y IVb típicos de los *E. coli* que poseen fimbrias tipo P (Blanco et al. 1995).

De los resultados expuestos anteriormente, se deduce que el sistema de captación de hierro mediado por la aerobactina es un hecho frecuentemente hallado en cepas de *E. coli*, responsables de ITUs en Gran Canaria, dado que pudo demostrarse en el 83.9% de las cepas analizadas. Este resultado es ligeramente superior a los descritos por Johson et al. (1988) y Vidotto et al. (1991), quienes identificaron este sideróforo en el 79% y 78% de *E. coli* implicados en infecciones urinarias. Este hallazgo confirma la importancia de la producción de aerobactina como factor de virulencia en *E. coli* uropatógenos. La aerobactina ha sido reconocida desde hace mucho tiempo como un factor de virulencia asociado a un plásmido en *E. coli*, y ello puede explicar algunas de las propiedades de virulencia conferidas por el plásmido Col V (Williams, P.H., 1979). En este sentido, hemos encontrado tan sólo tres cepas Col V (+) productoras también de aerobactina, lo cual sugiere que en estas cepas la localización de los genes implicados en la síntesis de aerobactina poseen localización plasmídica (Col V). El resto de las cepas aerobactina-positivas (80%) no fueron productoras de colicina V, sugiriendo que los genes que la codifican se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano. Este dato corrobora las observaciones de Johson et al. (1988), quienes demostraron que en muchas cepas de *E. coli* uropatógenas, la aerobactina está codificada por genes cromosómicos.

TABLA 10

Frecuencia y distribución de serogrupos "O" en *E. coli* uropatógenos en diferentes zonas geográficas

Lugar	Serogrupos O predominantes
Galicia	O6, O18, O2, O4, O75
Bilbao	O6, O4, O2, O73, O18
Gran Canaria	O6, O2, O4, O15, O78
Finlandia	O6, O75, O2, O1, O8
Hungría	O6, O2, O4, O1, O18
Inglaterra	O6, O75, O1, O4, O18
Hong Kong	O2, O4, O6, O1, O8

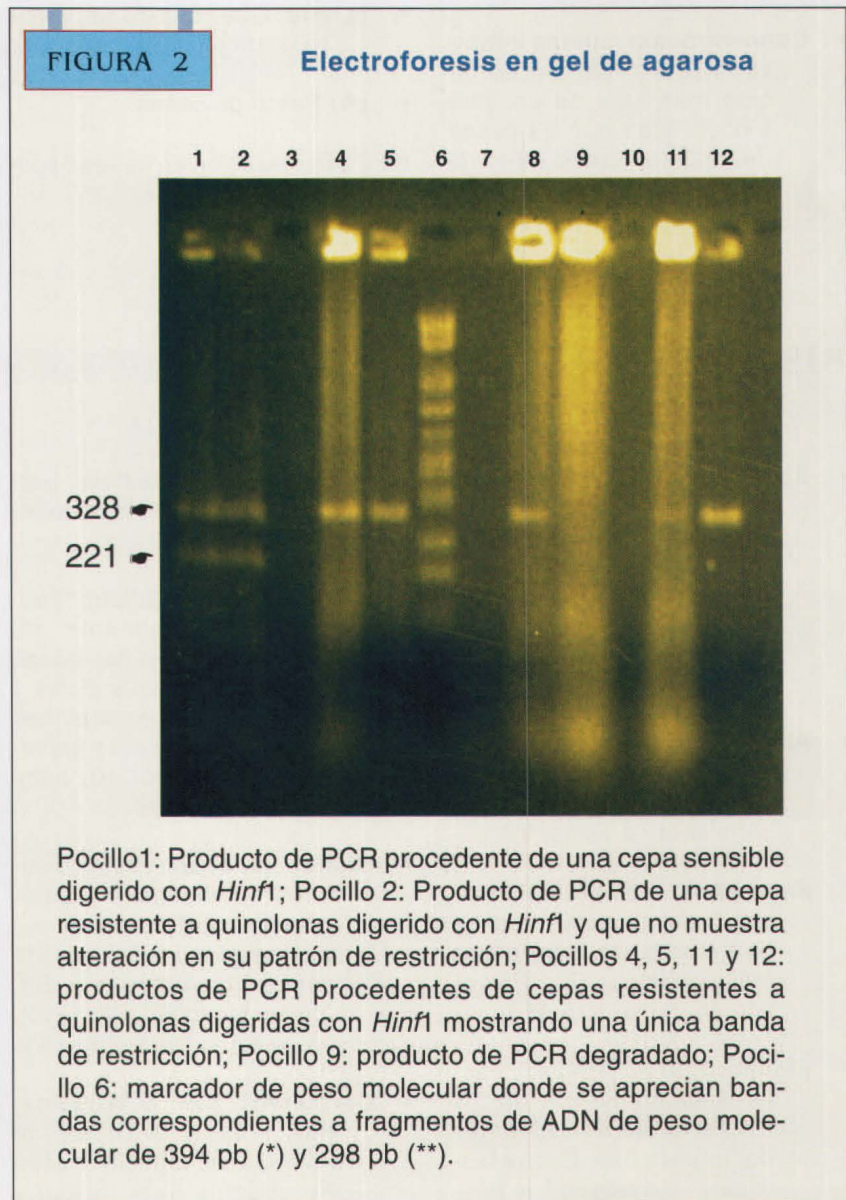
Independientemente del número o del tipo de factor de virulencia expresado por *E. coli* responsables de ITU, la erradicación del patógeno comporta tratamiento médico. El amplio arsenal terapéutico del que se dispone en la actualidad, la facilidad para adquirirlos sin prescripción facultativa y el mal uso que de los antimicrobianos se hace en la práctica médica, son algunos de los factores que han favorecido la selección de cepas resistentes a los antimicrobianos. La presión selectiva que éstos ejercen en las comunidades bacterianas ha tenido como consecuencia la selección de bacterias mejor dotadas para sobrevivir en un medio "contaminado" por antibióticos. De entre los antimicrobianos útiles en el tratamiento de ITUs no complicadas, el trimetoprim y las nuevas quinolonas siguen ocupando un lugar importante en la terapéutica de estos procesos infecciosos.

El trimetoprim es un antimicrobiano de amplio espectro que se usa en nuestro país, por lo general, asociado al sulfametoxazol. Ejerce su acción inhibiendo una enzima bacteriana que participa en la síntesis de precursores del ADN, la dihidrofolato-reductasa (DHFR). El mecanismo de resistencia al trimetoprim observado con mayor frecuencia entre las bacterias Gram negativas, consiste en la síntesis de una DHFR adicional y los genes que participan en su producción suelen tener localización plasmídica. Mediante técnicas de hibridación, hemos podido constatar que en el 85.3% de las cepas Tp-resistentes, la resistencia es debida a la síntesis de la DHFR tipo Ia. La gran cantidad de plásmidos que codifican esta enzima (47.05%),

sugiere que su amplia diseminación puede ser debida a la presencia de un transposon. En este sentido, la resistencia conjunta al trimetoprim y a la estreptomicina codificada por algunos de estos plásmidos sugiere que el tipo de DHFR pudiera estar localizado en el transposón Tn7. Asimismo, pudimos observar que la selección de cepas resistentes al Tp puede deberse al uso de otros antibióticos como la ampicilina, dado que la resistencia a este antibiótico está codificada por el mismo plásmido en el 75% de los casos. Este hecho pone

de manifiesto las consecuencias del consumo inadecuado de antimicrobianos entre la población general.

El análisis de la resistencia a quinolonas en las cepas estudiadas pone de relieve la alta fiabilidad de la técnica de PCR-RFLP con *HinfI*. Además, este método nos ha permitido constatar que el mecanismo de resistencia a quinolonas, observado con mayor frecuencia en cepas aisladas en nuestro medio, se debe a mutaciones que afectan a la Ser-83 de la ADN-girasa.



GLOSARIO

- **Adhesinas:** Estructuras proteicas que facilitan la unión de la bacteria a las células.
- **Bacteriuria:** Presencia de bacterias en la orina.
- **Cepa:** Grupo de organismos dentro de una especie o variedad caracterizados por alguna cualidad particular.
- **Codón:** Serie de tres bases en una molécula de ADN o ARN que codifica un aminoácido específico.
- **Colicinas:** Proteínas antibacterianas que ejercen acción letal sobre otras bacterias.
- **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** La concentración más baja de un antibiótico dado que es capaz de inhibir el crecimiento de un organismo específico.
- **Conjugación:** Forma de transferencia de material genético entre dos bacterias.
- **Fenotipo:** Expresión de un gen simple o una pareja de genes.
- **Fragmento de restricción:** Fragmento de ADN que se produce tras ser cortado por una determinada enzima (endonucleasa de restricción).
- **Gen:** Unidad biológica de la herencia.
- **Mutación:** Cambio de forma, cualidad o alguna otra característica.
- **In vitro:** Que ocurre o se produce en un ambiente artificial.
- **pb:** Pares de bases.
- **PCR:** Reacción en cadena polimerasa.
- **RFLP:** Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.
- **Plásmido:** ADN extracromosómico presente en algunas bacterias y no indispensable para su supervivencia. Aporta caracteres adicionales a quienes lo poseen (resistencia antibiótica, etc.).
- **Sonda oligonucleotídica:** Secuencia pequeña sintetizada para igualar a una región donde se sabe que ocurre una mutación y luego usada como detector.
- **UFC:** Unidades formadoras de colonias.
- **Sideróforos:** Compuestos quelantes de hierro de bajos peso molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- **Aguiar, J.M. et al.** (1992): "The emergence of highly fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in community-acquired urinary tract infections", *J. Antimicrob. Chemother*, vol. 29, págs. 349-350.
- **Ausubel, F.M. et al.** (1994): *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York. John Wiley & Sons, Inc.
- **Bauer, A.W. et al.** (1966): "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method", *AM. J. Clin. Pathol*, vol. 45, págs. 493-496.
- **Blanco, J. et al.** (1992a): "Factores de Virulencia de los *Escherichia coli* Causantes de Infecciones Extraintestinales". Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico.
- **Blanco, J. et al.** (1992b): "Factores de virulencia de *Escherichia coli* causantes de peritonitis, apendicitis y otras infecciones extraintestinales", *Enf. Infec. y Microbiología. Clin*, vol. 10, núm. 7, págs. 393-398.
- **Blanco, M. et al.** (1995): "Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias", *Enf. Infecc Microbiol Clin*, vol. 13, núm. 4, págs. 236-241.
- **Carbonetti, N.H. & Williams, P.H.** (1984): "A Cluster of Five Genes Specifying the Aerobactin Iron Uptake System of Plasmid ColV-K30", *Infect. Immun*, vol. 46, núm. 1, págs. 7-12.
- **Desgrandchamps, D. & Munzinger, J.** (1989): "Increasing Rates of In Vitro Resistance to Ciprofloxacin and Norfloxacin in Isolates from Urine Specimens", *Antimicrob. Agents Chemother*, vol. 33, núm. 4, págs. 595-596.
- **Guineé, P.A.M. et al.** (1972): "*E. coli* O antigen typing by means of mechanized micro-technique", *Appl. Microbiol*, vol. 24, págs. 127-131.
- **Johnson, J.R. et al.** (1988): "Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient charac-

- taristics", *Infect. Immun*, vol. 56, núm. 2, págs. 405-412.
- **Johnson, J.R.** (1991): "Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection". *Clin. Microb. Rev.*, vol. 4, núm. 1, págs. 80-128.
 - **Kado, C.I. & Liu, S.T.** (1981): "Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids", *J. Bacteriology*, vol. 145, núm. 3, págs. 1365-1373.
 - **López-Brea, M. & Alarcon, T.** (1990): "Isolation of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from an infected Hickman catheter", *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.*, vol. 9, págs. 345-347.
 - **Moniot-Villen, N. et al.** (1991): "Mechanisms of Quinolone Resistance in a Clinical Isolate of *Escherichia coli* Highly Resistant to Fluoroquinolones but Susceptible to Nalidixic Acid", *Agents Chemother.*, vol. 35, núm. 3, págs. 519-523.
 - **National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)** (1990): "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically", 2nd edn. Approved standard M7-A2. NCCLS, Villanova, PA.
 - **Pérez-Trallero, E. et al.** (1993): "Ten-Year Survey of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 12, págs. 349-351.
 - **Ruiz, J. et al.** (1996): "Detección de la resistencia a las quinolonas producidas por mutación en la Ser-83 de la ADN-girasa mediante PCR y RFLP con *Hinfl* en *Escherichia coli*", *Rev Esp Quimioterapia*, vol. 9, núm. 3, págs. 206-210.
 - **Sambrook, J. et al.** (1989): "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
 - **Siitonen, A.** (1992): "*Escherichia coli* in Fecal Flora of Healthy Adults: Serotypes, P and type 1C Fimbriae, Non-P Mannose-Resistant Adhesins, and Hemolytic activity", *J. Infect. Dis.*, vol. 166, págs. 1058-1065.
 - **Sobel, J.D.** (1991): "Bacterial Etiologic Agents in the Pathogenesis of Urinary Tract Infection", *Medical Clinics of North America*, vol. 75, núm. 2, págs. 253-273.
 - **Stratton, Ch.W.** (1996): "A Practical Approach to Diagnosing and Treating Urinary Tract Infections in Adults", *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, vol.15, núm. 6, págs. 37-40.
 - **Vidotto, M.C. et al.** (1991): "Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates", *Brazilian J Med Biol Res.*, vol. 24, págs. 365-373.
 - **Wilkie, M.E. et al.** (1993): "Diagnóstico y tratamiento de la infección del tracto urinario en los adultos", *British Medical Journal*, vol. 8, núm. 9, págs. 45-53.
 - **Williams. P.H.** (1979): "Novel iron uptake system specified by Col V plasmid: an important component in virulence of invasive strains of *Escherichia coli*"; *Infect. Immun.* vol. 26, núm. 3, págs. 925-932.

BIOGRAFÍA

María de los Ángeles Pérez Cervantes

Licenciada en Farmacia por la Universidad de Guanajuato (México). Efectuó los cursos de doctorado "Avances en Microbiología Clínica" durante el bienio 1992/94 en la ULPGC.

En la actualidad ultima su tesis doctoral, titulada: "*Infecciones de vías urinarias: factores de patogenicidad de las bacterias más frecuentes*". Es autora de varias comunicaciones a

congresos nacionales e internacionales, así como de artículos especializados.

Dirección:

U.D. Microbiología.
Centro de Ciencias de la Salud (Facul. de Medicina).
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
Apartado de correos, 550.
35080 - Las Palmas de Gran Canaria.

Este trabajo ha sido patrocinado por:

COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE LAS PALMAS