

ARTÍCULO ORIGINAL

Claudia Rodas*
Kjetil Halvorsen**
Volga Iñiguez***

Multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones en enteropatógenos de la diarrea infantil y *Escherichia coli* de la flora normal en niños menores de 5 años en la ciudad de La Paz

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la resistencia antimicrobiana a 11 antibióticos y su relación con la presencia de integrones (clase 1-3), se analizó un total de 138 muestras que incluyen enteropatógenos (*Shigella* spp, EPEC, ETEC y EHEC) aislados de heces de niños con diarrea, así como *E. coli* no diarreogénica, aislada de heces de niños sanos de la ciudad de La Paz. Entre los marcadores de resistencia más frecuentemente encontrados, se destacan Ampicilina (95%) y Estreptomicina (90%) seguido por Cotrimoxazol (60%). Se encontró un elevado porcentaje (96%) de aislados resistentes al menos a 1 antibiótico, donde la multiresistencia de 3 hasta 6 antibióticos representó el 82%. Los aislados de *Shigella* spp y *E. coli* no diarreogénica presentaron perfiles de resistencia similares, predominando la multiresistencia (a 4 antibióticos, en contraste a ETEC y EPEC, con menores porcentajes de resistencia. Esto sugiere que *E. coli* no diarreogénica puede servir de reservorio de genes de multiresistencia a otros patógenos y viceversa y que la expansión de la multiresistencia estaría relacionada a la prevalencia de enteropatógenos circulantes. Se observó una asociación significativa

entre la presencia del integrón de clase 2 con la multiresistencia (a 4 antibióticos en todos los aislados analizados y con el integrón de clase 1 (*Shigella* spp y *E. coli* no diarreogénica). La presencia de integrones estuvo asociada en mayor frecuencia a aislados resistentes a 7 antibióticos analizados. Este estudio constituye el primer reporte en nuestro medio de la multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones detectados por métodos moleculares, y refleja la amplia distribución de los mismos, tanto en la flora normal como patológica de la población infantil de la ciudad de La Paz. En conjunto, los datos obtenidos tienen relevancia para el tratamiento antimicrobiano de enfermedades diarreicas y control de la diseminación de la resistencia.

Palabras clave

Rev. Cuadernos 2005;50(2):38-48
Multiresistencia a antibióticos, integrón, enteropatógeno, *E. coli* ND (*E. coli* no diarreogénica) EPEC (*E. coli* enteropatógena), ETEC (*E. coli* enterotoxigénica); EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), *Shigella* spp.

ABSTRACT

A total of 138 samples collected in the city of La Paz, including enteropathogens isolated from stools of children with diarrhea as well as fecal *E. coli* from healthy children, were analyzed to evaluate integron-associated antimicrobial multi-resistance distribution. The highest rate of resistance was against Ampicillin (95%), Streptomycin (90%) followed by Cotrimoxazole (60%). A high percentage (96%) of antimicrobial resistance

isolates to at least one antibiotic and multi-resistance to between 3-6 antibiotics (82%) was found. Resistance patterns were similar among *Shigella* spp and non-diarrheogenic *E. coli*, showing high multi-resistance prevalence to (4 antibiotics, in contrast to ETEC and EPEC. These data suggest, that non-diarrheogenic *E. coli* can serve as multi-resistance genes reservoir to other pathogens and vice versa,

* Lic. Bioquímica
** Ph. D Estadística
*** Ph. D Biología

and that multi-resistance expansion may be associated with the circulating enteropathogens prevalence. In all isolates, a significant association among class 2 integron and (4 antibiotic multi-resistance was found, as well as between class 1 integron and isolates from *Shigella* and non-diarrheogenic *E. coli*. Integron presence was associated with the resistance to 7 antibiotics. This is the first report of molecular detection of integrons among pathogenic and normal flora of child population of city of La Paz demonstrating

a wide integron-associated antimicrobial multi-resistance. These results are relevant to antimicrobial diarrhea treatment and resistance dissemination control.

Key words

Antibiotic multiresistance, Int (integron), enteropathogen, *E. coli* ND (*E. coli* non diarrheogenic), EPEC (*E. coli* enteropathogenic), ETEC (*E. coli* enterotoxigen); EHEC (*E. coli* enterohemorrhagic).

INTRODUCCION

El aumento progresivo de resistencia antimicrobiana de los patógenos entéricos, particularmente *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, es un problema crítico para la población que vive en países en vías de desarrollo donde existen altos porcentajes de enfermedades diarreicas agudas (EDA) que están generalmente asociadas a la mortalidad infantil ^(1, 2, 3). Se estima que en países subdesarrollados, cerca de 4 millones de niños menores de 5 años mueren por año por gastroenteritis aguda ⁽⁴⁾ donde la desnutrición es un factor adicional de alto riesgo tanto en la diarrea aguda como en la persistente donde en muchos casos, se requiere tratamiento antimicrobiano ^(5,6).

A pesar de que una proporción importante de las EDA son de origen infeccioso que incluye en parte a enteropatógenos bacterianos, la terapia antimicrobiana tiene un rol limitado, dependiendo del patógeno, estado del paciente, curso de la enfermedad y otros factores. En Bolivia, para tratar la shigellosis se administra como norma Sulfametoxazol-Trimetoprim (Cotrimoxazol) ⁽⁷⁾. Así también, en Chile, El Salvador, Brasil y México, el tratamiento con antimicrobianos sigue siendo la herramienta de elección para disminuir la severidad y/o muerte por shigellosis, diarrea del infante y otras enfermedades entéricas como colitis ^(8, 9, 10, 11, 12).

La creciente resistencia a antimicrobianos en aislados patógenos es de gran preocupación especialmente en países en vías de desarrollo, donde los antibióticos alternativos no están muy comercializados o son muy caros ⁽¹³⁾. La auto administración de antibióticos, la facilidad al acceso sin prescripción médica y su uso inapropiado y excesivo son los principales condicionantes de la resistencia bacteriana que sumadas a las condiciones sanitarias deficientes y hacinamiento permiten su rápida diseminación en regiones pobres y en desarrollo ⁽¹⁴⁾. Así, el proceso de selección de la resistencia es un fenómeno

natural que se incrementa con el abuso y el uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas ^(15, 16).

Este fenómeno afecta no solo a los patógenos bacterianos sino también a las bacterias de la flora normal, sobre todo a las provenientes del tracto intestinal que podrían adquirir multiresistencia a diferentes antibióticos debido a la frecuente exposición por la administración vía oral de los mismos. De esta manera la flora comensal puede constituirse en un reservorio de genes de resistencia ^(17, 18).

La resistencia a diferentes antimicrobianos se encuentra en genes localizados en cromosomas, plásmidos o transposones. La transferencia horizontal de genes de multiresistencia favorece su distribución entre diferentes bacterias de una y de diferente especie ⁽¹⁹⁾.

En 1990, se descubrió además, un elemento genético asociado a la resistencia que involucra la integración, por el mecanismo de recombinación específica, de uno o varios genes de resistencia bajo el control de un solo promotor. Este elemento se conoce como integrón y se encuentra como parte de los transposones de la familia Tn21 o independientemente, en diferentes grupos de plásmidos y cromosomas ⁽²⁰⁾.

Los integrones son sistemas de expresión genética que incorporan varios marcos de lectura abierta (ORF's) y los convierten en genes funcionales. Los integrones promueven la captura de uno o más cassettes genéticos dentro del mismo sitio de unión, por lo tanto, forman grupos o clusters de genes de resistencia antimicrobiana ⁽²¹⁾. Se conocen hasta el presente 5 diferentes clases de integrones, que se distinguen por su respectivo gen de la integrasa y que comprenden alrededor de 60 genes de resistencia organizados en cassettes de resistencia ^(22, 23, 24).

La asociación de integrones con elementos móviles promueve la transmisión horizontal entre plásmidos y cromosomas así como entre diferentes replicones, contribuyendo de esta manera a la diseminación de genes de resistencia ^(25, 26). Los integrones han sido encontrados en bacterias patógenas resistentes a antibióticos Gram negativas y Gram positivas que circulan en hospitales y en la comunidad ^(27, 28).

En el presente trabajo, se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos de resistencia antimicrobiana en enteropatógenos aislados de heces de niños con procesos diarreicos y en *Escherichia coli* de la flora comensal aislada de muestras control (niños sanos), mediante el análisis de la resistencia a 11 diferentes antimicrobianos, asociada a la presencia y distribución de las diferentes clases de integrones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de estudio. Se analizaron un total de 138 aislados bacterianos, de las cuales 100 muestras provenían de la colección de cepas de enterobacterias patógenas del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (I.B.M.B.) aisladas entre los años 1994 y 2002 a partir de heces de niños menores a 5 años con procesos diarreicos infecciosos; y las restantes 38 muestras se aislaron de niños sanos considerados como muestras control aisladas entre el 2002 y 2005.

Aislamiento, cultivo e identificación de los aislados bacterianos. Las muestras de heces fecales fueron sembradas en agar MacConkey, agar XLD y agar SS donde las colonias que crecieron fueron identificadas por las respectivas pruebas bioquímicas: SIM, TSI, LIA, Citrato de Simmons, Ureasa, Rojo Congo ⁽²⁹⁾ para la identificación de aislados de *Escherichia coli* y *Shigella* spp.

Identificación de genes patógenos por medio de PCR. A los aislados que provenían de niños sanos como de niños con procesos diarreicos, se verificó la presencia de genes de patogenicidad de las siguientes categorías de *E. coli* diarreogénica: EPEC (eae), ETEC (lt y st) y EHEC (stx1 y stx2) por medio de PCR con los cebadores característicos para cada uno de estos genes ⁽³⁰⁾. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biorad Serie 5615 - B. Los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% a 100 Voltios en 0.5X de buffer TBE y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta en presencia de bromuro de etidio (5mg/ml).

Resistencia a antibióticos. Se determinó los patrones de resistencia de los aislados bacterianos

por el método de difusión en agar según las normas del NCCLS ⁽³¹⁾. Como control de calidad se emplearon las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* productora de beta-lactamasa ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, con los cuales se comparó las dimensiones de las zonas de inhibición. Los agentes antimicrobianos en disco utilizados fueron; Ampicilina (Amp): 10 (g/ml, Cloranfenicol (Cm): 30 (g/ml, Estreptomina (Sm): 10 (g/ml, Cotrimoxazol (SXT): 25 (g/ml, Tetraciclina (Tet): 30 (g/ml, Gentamicina (Gm): 10 (g/ml, Ciprofloxacina (Cip): 5 (g/ml, Cefoxitina (Fox): 30 (g/ml, Cefotaxima (CTX): 30 (g/ml, Ampicilina - Sulbactam (AmpSul): 10 - 10 (g/ml y Ácido Nalidíxico (AcN): 30 (g/ml).

Detección de integrones de clase 1, 2 y 3. A todos los aislados bacterianos se realizó la detección de las diferentes clases de integrones (clase 1, clase 2 y clase 3) mediante PCR utilizando cebadores específicos ⁽³²⁾. La mezcla de reacción contenía: 0,4 (l de dNTPs (1,25 mM de cada desoxiribonucleótido), 1 (l de MgCl₂ (50mM), 2 (l de tampón PCR 10x, 0.12 (l de taq DNA polimerasa (Promega), 0.5 (l de cada cebador (20 (M) (Promega) y agua destilada (5,48 (l) hasta completar un volumen total de 10 (l. La amplificación se realizó en el termociclador BioRad Serie 5615 - B con las siguientes condiciones de ciclaje: un ciclo a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto 30 segundos y 72°C por dos minutos y finalmente una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por los mismos anteriormente descritos. Los tamaños esperados de los productos de PCR fueron de 892 pb (intI1), 467 pb (intI2) y 760 pb (intI3).

Análisis de restricción de los productos génicos amplificados de integrones de clase 1, 2 y 3 (PCR - RFLP). Los productos de PCR fueron confirmados por medio de restricción enzimática del producto de amplificación de intI1 con la enzima SphI. De igual manera se verificaron los productos amplificados de los genes intI2 e intI3 por restricción enzimática con HaeIII y RsaI, respectivamente.

Métodos estadísticos. Los datos obtenidos se analizaron mediante el "Programa R" con un valor de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el "Test de Chisq" ⁽³³⁾ para comparar los valores de significancia de las muestras patógenas y las muestras control. Asimismo, se utilizó el "Test de Wilcoxon" ⁽³³⁾ para evaluar los valores p de multiresistencia

antimicrobiana asociada con la presencia de integrones.

RESULTADOS

Análisis de las muestras. Del total de muestras analizadas, un 72% provinieron de niños con procesos diarreicos y un 28% de niños sanos; en estos últimos, los aislados de *E. coli* fueron definidos como *E. coli* ND (*E. coli* no diarreogénica), los cuales no presentaron los genes de patogenicidad analizados por PCR. El porcentaje de cada tipo de aislado bacteriano entérico se muestra en el Cuadro Nº 1 con un promedio de 29 muestras.

Cuadro Nº 1. Tipos de aislados bacterianos

AISLADOS BACTERIANOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)	AÑO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
Shigella	45	33	1994-2004	H. Materno Infantil
EPEC* Infantil	29	21	2000	H. Materno
ETEC†	22	16	2002	H. Materno Infantil
EHEC‡ Infantil	4	3	2002	H. Materno
<i>E. coli</i> ND¶	8	6	2002	Guardería infantil
<i>E. coli</i> ND¶	30	21	2004-2005	Guardería infantil

**Escherichia coli* enteropatógena

†*Escherichia coli* enterotoxigénica

‡*Escherichia coli* enterohemorrágica

¶*Escherichia coli* no diarreogénica.- Comprende aislados de *E. coli* que provienen de heces fecales de niños sanos menores de 5 años (muestras control) que no presentaron ninguno de los genes de patogenicidad (*eae*, *lt*, *st*, *stx1* y *stx2*)

Análisis bacteriano y perfiles de resistencia.

EL 96% (132) de los 138 aislados analizados, presentaron resistencia a por lo menos 1 antibiótico. En la Figura 1A se observa el porcentaje de resistencia a entre 1 y 8 antibióticos en el total de los aislados bacterianos estudiados, donde predominaron los aislados resistentes de 3 hasta 6 antibióticos que, en conjunto, representaron el 82% ($n = 110$). El análisis estadístico de la distribución del porcentaje de aislados resistentes al número de antibióticos analizados, mostró que la proporción de resistencia observada fue significativamente diferente a los valores esperados ($p < 0.05$) (Figura Nº 1B) bajo un modelo de independencia. Esto es evidente sobre todo para los valores de resistencia a 3, 4, 5, 7 y 8 antibióticos así como para la sensibilidad a todos los antibióticos.

Figura Nº 1-A

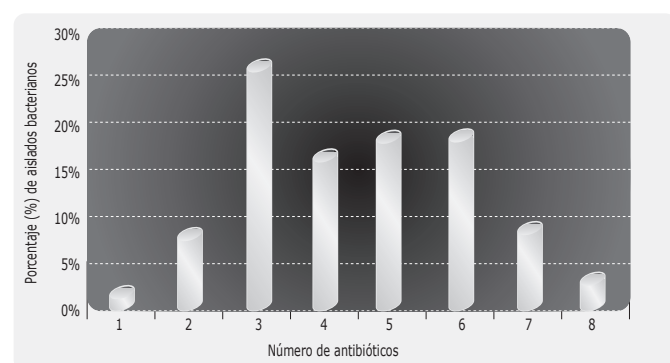
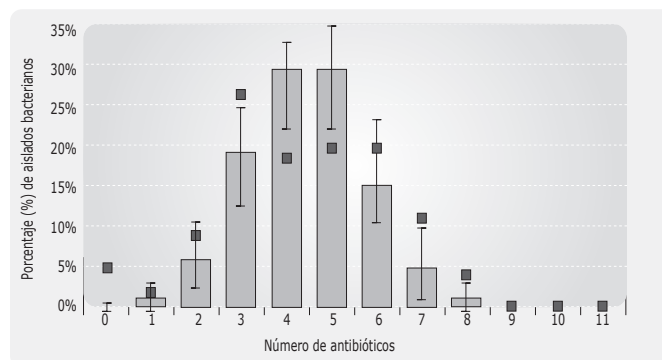


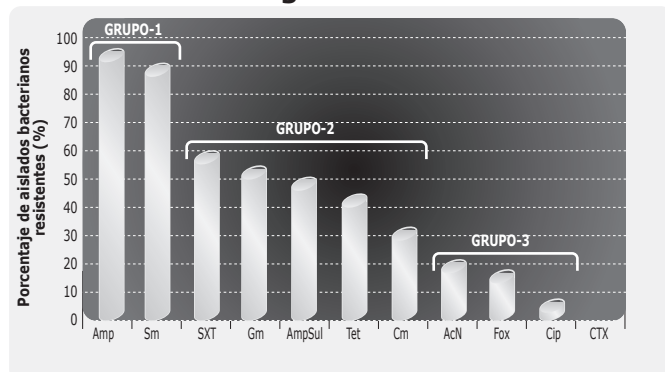
Figura Nº 1-B



Distribución de la resistencia del total de aislados bacterianos en relación al número de antibióticos. A. Valores observados. B. Valores esperados bajo modelo de independencia (los cuadrados negros representan a los valores observados)

En la Figura Nº 2 se observa el porcentaje de resistencia que presentaron los aislados bacterianos a cada uno de los 11 antimicrobianos por separado, siendo la resistencia a Amp la más frecuentemente encontrada, seguida por la resistencia a Sm. Estos dos marcadores de resistencia se encontraron en porcentajes mayores al 90% en los aislados bacterianos estudiados por lo que se los clasificó convencionalmente como pertenecientes al Grupo 1 (alta frecuencia). En el Grupo 2 (frecuencia intermedia) se encontraron a los marcadores de resistencia a SXT (60%), Gm (54%), AmpSul (48%), Tet (42%) y Cm (30%). Finalmente, el Grupo 3 (baja frecuencia) que comprende al AcN (15%), Fox (13%) y Cip (2%) hacia los cuales los porcentajes de resistencia en los aislados bacterianos fueron menores al 20%.

Figura Nº 2

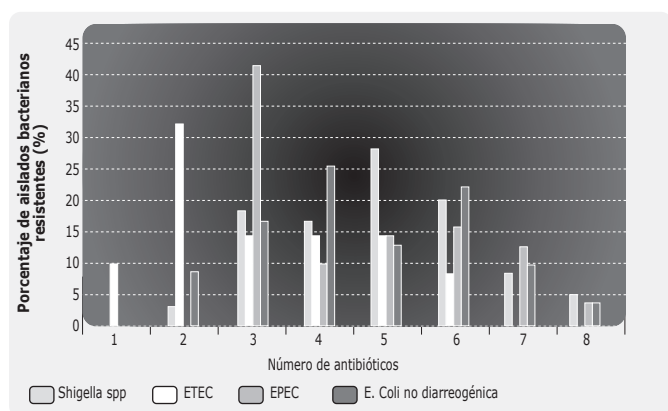


Porcentaje de resistencia del total de aislados bacterianos a 11 diferentes antibióticos

Resistencia a antibióticos en los aislados de *Shigella* y en las diferentes categorías de *E. coli*. Se analizó el porcentaje de aislados resistentes en relación al número de antibióticos analizados en cada

enteropatógeno por separado así como en *E. coli* no diarreogénica (Figura 3). En los aislados de *Shigella*, se observó la resistencia desde 2 hasta 8 antibióticos con predominio de la multiresistencia a 5 (29%) y 6 antibióticos (20%). Los aislados de *E. coli* no diarreogénica mostraron resistencia desde 2 hasta 8 antibióticos con porcentajes máximos de multiresistencia a 4 y 6 antibióticos (26 y 24%, respectivamente) donde los aislados resistentes a 2, 3, 5, 7 y 8 antibióticos no fueron mayores al 16%. En EPEC, se encontraron aislados resistentes desde 3 hasta 8 antibióticos, siendo la multiresistencia a 3 antibióticos la más común y la que alcanzó el 41% en contraste a la multiresistencia a 4 y 5 antibióticos (10% y 13%, respectivamente). Los aislados de ETEC, mostraron resistencia a un solo antibiótico en un 8%, siendo la única categoría que presentó este patrón. El rango de aislados resistentes comprendió desde 1 hasta 6 antibióticos en contraste a *Shigella*, EPEC y *E. coli* no diarreogénica. Por una parte, no se observó multiresistencia a 7 y 8 antibióticos, por otra, predominó la resistencia a 2 antibióticos (32%). Finalmente, se observaron 3 aislados de ETEC y 2 aislados de *E. coli* no diarreogénica que fueron sensibles a los 11 antibióticos analizados (datos no mostrados). Los datos de EHEC, no fueron incluidos en los porcentajes de aislados resistentes presentados por no ser significativamente equivalentes con los otros aislados bacterianos. Sin embargo, en estos aislados la proporción de multiresistencia a 3 y 4 antibióticos fue de 2/4 (datos no mostrados).

Figura Nº 3

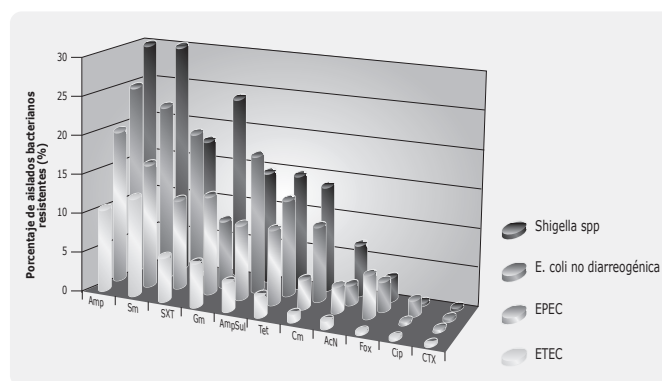


Distribución de la resistencia de diferentes tipos de aislados bacterianos en relación al número de antibióticos

A su vez, el análisis de la resistencia a cada antibiótico por separado mostró que los aislados de *Shigella* spp, *E. coli* no diarreogénica y EPEC fueron los que presentaron patrones similares de resistencia a Amp, Sm, SXT, Tet, AcN y Fox. Se observaron diferencias en relación al mayor porcentaje de aislados resistentes a Gm en *Shigella* spp (78%) en contraste a *E. coli* no diarreogénica; y a AmpSul en *E. coli* no diarreogénica (70%) en contraste a *Shigella* spp. Por su parte, ETEC presentó en todos los aislados analizados menores porcentajes de resistencia a todos los antibióticos analizados a excepción de Sm.

Estos datos fueron corroborados en el análisis de la resistencia de cada tipo de aislado bacteriano sobre el total de aislados resistentes, observándose que *Shigella* spp y *E. coli* no diarreogénica representan la mayor proporción, seguidos de EPEC y finalmente ETEC (Figura Nº 4).

Figura Nº 4



Proporción de tipos de aislados bacterianos resistentes sobre el total de muestras resistentes analizadas

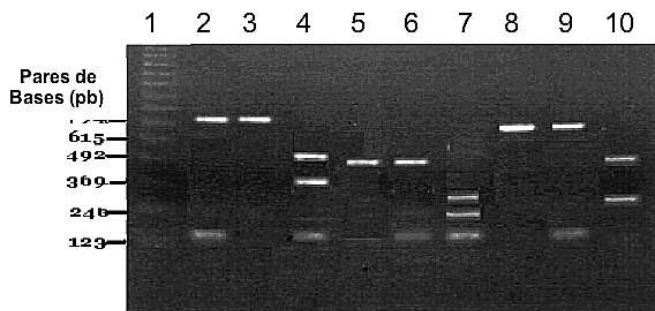
Nivel de multiresistencia a antibióticos en aislados bacterianos entéricos. Se consideraron 2 criterios de multiresistencia: la asociada a entre 2 y 3 antibióticos y la multiresistencia (a 4 antibióticos). En *Shigella* como en *E. coli* no diarreogénica, el total de aislados resistentes estuvieron asociados significativamente ($p < 0.05$) a la multiresistencia (a 4 antibióticos, en contraste tanto a EPEC donde la multiresistencia a 5 antibióticos (Amp, Sm, AmpSul, Gm y Cm), como a ETEC donde la resistencia a solo 2 antibióticos (SXT y Gm) estuvieron asociados a la multiresistencia) a 4 antibióticos (Cuadro Nº 2).

Cuadro Nº 2. Tipos de aislados bacterianos y niveles de multiresistencia

ANTIBIÓTICO	Nº de aislados bacterianos multiresistentes							
	Shigella spp (4Ab) (2-3 Ab)		E. coli no diarreogénica (4Ab) (2-3 Ab)		EPEC (4Ab) (2-3 Ab)		ETEC (4Ab) (2-3 Ab)	
Ampicilina	35	8	24	7	17	11	8	8
Estreptomina	33	9	22	6	15	8	8	10
Cotrimoxazol	36	0	22	1	9	8	6	3
Gentamicina	26	9	11	1	6	4	7	2
Ampic-Sulbac	21	0	21	1	13	1	5	0
Tetraciclina	23	0	15	2	14	0	2	2
Cloranfenicol	19	1	9	2	3	2	2	0
Ácido Nalidíxico	10	0	4	0	2	2	1	0
Cefoxitina	5	0	3	1	7	0	NA	NA
Ciprofloxacina	NA	NA	2	0	NA	NA	NA	NA

NA = No aplicable

Integrones y resistencia antimicrobiana. La presencia de integrones en los aislados bacterianos fue analizada por la amplificación de los fragmentos de los genes correspondientes a las clases 1, 2 y 3. En la Figura 5 se observa las tres clases de integrones, con su respectivo marcador de peso molecular. El 74% del total de aislados bacterianos analizados presentaron integrones (clase 1, 2 o 3); siendo el integrón de clase 2 el de mayor frecuencia (62%), en comparación con los integrones de clase 1 (37%) y clase 3 (5%) ($p < 0.05$).

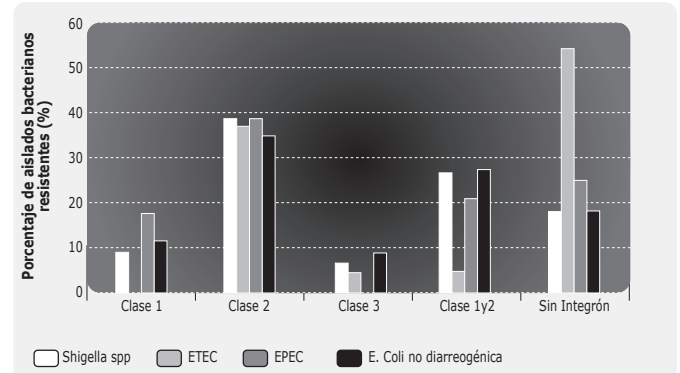
Figura Nº 5.

Carriles: 1, marcador de peso molecular (2693, 1603, 1198, 794, 615, 492, 369, 246, 123); 2 y 3, integrón de clase 1 (892 pb); 4, restricción enzimática con SphI (493 y 399); 5 y 6, integrón de clase 2 (467 pb); 7, restricción enzimática con HaeIII (270 y 197 pb); 8 y 9, integrón de clase 3 (760 pb); 10, restricción enzimática con RsaI (500 y 260 pb).

Identificación molecular y restricción enzimática de los integrones de clase 1, 2 y 3

El integrón de clase 2 se observó en proporciones similares en todos los aislados analizados en un rango de 35% a 38%. Resalta la ausencia de integrones en los aislados de ETEC (55%) en

comparación con Shigella y E. coli no diarreogénica (18%) y EPEC (22%). Tanto en Shigella como en E. coli no diarreogénica se observaron proporciones similares del integrón de clase 1 y en combinaciones conjuntas de la clase 1 y clase 2 que contrastan con los aislados en ETEC. Se observó también que EPEC fue la categoría bacteriana que relativamente presentó la mayor proporción del integrón de clase 1 (Figura 6). El análisis de los datos estadísticos mostró que la asociación con el integrón de clase 2 es la más significativa ($x^2_{g} = 45.46$).

Figura Nº 6

Distribución de las clases de integrones en cada tipo de aislado bacteriano

Nivel de multiresistencia y presencia de integrones. La presencia de integrones (clase 1 y 2) fue analizada entre los aislados bacterianos con distintos niveles de multiresistencia. En el Cuadro 3 se observa que el integrón de clase 2 fue el que presentó asociación significativa a la multiresistencia (a 4 antibióticos en todos los tipos de aislado bacteriano, en contraste al integrón de clase 1 que solo mostró este patrón en Shigella y E. coli no diarreogénica) ($p < 0.05$).

Cuadro Nº 3 Niveles de multiresistencia antimicrobiana y presencia de integrones

AISLADOS BACTERIANOS	Nº de clases de integrones	
	INTEGRON CLASE - 1	INTEGRON CLASE - 2
Shigella spp (45)	20 (44)*	31 (69)*
+Resistente (4 AB)	19 (42)	26 (58)
-Resistente (2-3 AB)	1 (2)	5 (11)
ETEC (22)	2 (9)	10 (45)*
+Resistente (4 AB)	2 (9)	8 (36)
-Resistente (2-3 AB)	0 (0)	2 (9)
EPEC (29)	11 (38)	17 (58)*
+Resistente (4 AB)	7 (24)	14 (48)
-Resistente (2-3 AB)	4 (14)	3 (10)
E. coli no diarreogénica (34)	17 (44)*	27 (71)*
+Resistente (4 AB)	15 (39)	24 (63)
-Resistente (2-3 AB)	2 (5)	3 (8)

*Valores significativos ($p < 0.05$)

Resistencia antimicrobiana y asociación con integrones. El análisis entre la presencia de integrones y resistencia a los antibióticos analizados mostró que en el total de aislados que presentaron integrones (Cuadro 4) se observaron mayores frecuencias de resistencia ($p < 0.05$) para los siguientes antibióticos Tet, SXT, AmpSul Amp, Gm (excepto en *Shigella* spp) y Sm con porcentajes mayores en un 37%, 34%, 37%, 19%, 34% y 18%, respectivamente, en comparación a los no portadores de integrones.

Cuadro Nº 4. Distribuciones de aislados resistentes y la presencia/ausencia de Integrones

Nº (%) de aislados resistentes y presencia de integrones		
INTEGRONES	TOTAL	
	int+ (n=96)	int- (n=34)
Ampicilina	92 (95)	26 (76)
Estreptomina	85 (88)	24 (70)
Cotrimoxazol	44 (66)	11 (32)
Gentamicina	64 (66)	11 (32)
Ampicil-Sulbact	55 (57)	7 (20)
Tetraciclina	52 (54)	6 (17)
Cloranfenicol	33 (34)	8 (24)
Á. Nalidixico	13 (13)	7 (20)*
Cefoxitina	13 (13)	3 (8) *
Ciprofloxacina	1 (1)	2 (2) *

int + = presencia de integrón (clase 1 y/o clase 2)

int - = ausencia de integrón

n = número de aislados

(..) = porcentaje del aislados resistentes

*Valor estadístico no significativo

Valor de significancia $p > 0.05$

DISCUSIÓN

Población estudiada y resistencia a antibióticos

En el presente estudio, en la muestra analizada representativa de 4 diferentes enteropatógenos aislados a partir de procesos diarreicos infecciosos y de *E. coli* de la flora comensal de niños sanos, se observa que la multiresistencia a antibióticos está ampliamente diseminada. Estos datos reflejan claramente la presión de selección existente, por el extensivo e inadecuado uso de antibióticos en nuestro medio, donde pese al costo biológico de la resistencia conjunta a diferentes antibióticos, las bacterias multiresistentes a 3 y 6 antibióticos fueron las más frecuentemente encontradas (82%) en significativo contraste a una reducida proporción (4%) de bacterias sensibles a los 11 antibióticos testados.

Por una parte, la flora normal comensal del tracto

intestinal al estar sujeta a una exposición frecuente a los antibióticos, sobre todo de aquellos que se administran por vía oral, sería un reservorio importante de genes de multiresistencia^(34, 17, 18) con capacidad potencial de transmisión a organismos patógenos y podría además considerarse una bacteria indicadora de la multiresistencia circulante en otros patógenos. Se esperaría entonces, mayor similitud entre los patrones de multiresistencia de los enteropatógenos más prevalentes con los de las bacterias de la flora normal, como lo observado en este trabajo entre *Shigella* y *E. coli* no diarreogénica, en contraste a EHEC y ETEC. Esto implicaría, que existen diferencias en cuanto a la exposición a los antimicrobianos, que estarían también dependiendo de factores como el grado de circulación en la población humana, reservorios animales, etc. Al respecto, es interesante observar que aunque EPEC y ETEC tienen porcentajes de prevalencia similares, esta última categoría contrasta por su sensibilidad a varios de los antibióticos testados, por lo que futuros estudios deberán confirmar estos resultados, así como validar los datos de EHEC en un número mayor de muestras.

Es importante considerar además, que en el trabajo se consideraron antibióticos utilizados en el tratamiento de gastroenteritis, así como de otras enfermedades infecciosas que permite evaluar la magnitud y extensión de los marcadores de resistencia circulantes, observándose tanto en *E. coli* no diarreogénica como en los patógenos entéricos, resistencia a ambos tipos de antibióticos.

En este contexto, pese a que los antimicrobianos suministrados a niños son más restringidos que los de adultos, la resistencia observada al marcador Tet, indicaría que la colonización de la flora intestinal a través de la transmisión de bacterias multiresistentes presentes en la comunidad, es muy común, por lo que los niños portarían bacterias multiresistentes a antibióticos a los cuales no habrían estado necesariamente expuestos.

En cuanto a la distribución de los diversos marcadores de resistencia en la población analizada se puede inferir que dado que las muestras provienen de diversos periodos, la multiresistencia no es un fenómeno exclusivo a los últimos años por lo que periódicamente deberán evaluarse las tendencias de incremento/decremento de la resistencia a los antibióticos más utilizados.

Los marcadores de resistencia a Amp y Sm resaltan por su elevada frecuencia en la población analizada, que en caso de confirmarse éstos valores en estudios más extensivos, deberá considerarse la eliminación de su uso en los tratamientos de

enfermedades infecciosas, puesto que además de inefectivos, contribuirían a limitar aun mas las opciones de la terapia antimicrobiana, co-seleccionando a otros marcadores de resistencia asociados.

Tradicionalmente, la Ampicilina, Trimetoprima y Cotrimoxazol, se han usado mundialmente en el tratamiento de la diarrea, siendo este ultimo considerado la droga de elección en el tratamiento de shigellosis en nuestro país ⁽⁷⁾. La resistencia al Cotrimoxazol, que constituye el tercer marcador de mayor frecuencia, es significativa por la alta proporción de aislados resistentes (60%), por presentar porcentajes similares de resistencia en *E. coli* no diarreogénica, *Shigella* y EPEC, así como por su asociación a la multiresistencia (a 4 antibióticos, estando presente en 5 de las 9 combinaciones significativas encontradas. Estos datos apuntan en conjunto, a una reconsideración del uso extensivo del Cotrimoxazol y a un control estricto en base a la información del patrón de sensibilidad de las cepas circulantes, para prevenir la expansión de bacterias resistentes, la cual tendría un efecto negativo en el control de la diarrea sanguinolenta causada por *Shigella*. En otros estudios a nivel mundial, se ha reportado de forma similar la resistencia a antimicrobianos de patógenos entéricos ^(1, 10, 11, 15, 35, 36,37) y de *E. coli* proveniente de heces fecales de niños sanos ⁽³⁴⁾ a los antimicrobianos mas comunmente usados como el Cotrimoxazol.

Por otra parte, los marcadores de resistencia que se encuentran en baja frecuencia (Grupo 3), en particular AcN, Fox y Cip podrían servir como alternativa, en caso de ser necesario, en el tratamiento de diarreas bacterianas ⁽³⁸⁾ y se diferencian por su distribución en aislados de otras regiones ⁽³⁹⁻⁴¹⁾ donde se observan porcentajes de resistencia mayores.

Integrones y resistencia a antibióticos

Dada la creciente relevancia de los integrones como factores principales de acumulación y diseminación de la multiresistencia a antibióticos, los estudios de asociación de la multiresistencia con la distribución y prevalencia de las clases de integrones son importantes para comprender a nivel molecular los mecanismos de resistencia.

Del conjunto de tipos de integrones, los de clase 1 y 2 son generalmente los más frecuentes en bacterias resistentes. En este trabajo, la alta prevalencia de integrones encontrada en el total de aislados mayoritariamente resistentes (Figura

6, Cuadro Nº 4), refleja que estos elementos son comunes en los genomas de la población estudiada, en particular el integrón de clase 2 encontrado en todos los tipos de aislados analizados, seguido del de clase 1 y en contraste al integrón de clase 3. Estos datos, difieren de otros estudios ^(8, 42 - 47) donde el integrón de clase 1 es el mas encontrado en aislados Gram negativos, particularmente en Enterobacterias, aunque coincide con lo reportado recientemente por Peirano et al. 2005 ⁽⁴⁸⁾ en aislados de *Shigella*.

La asociación entre los integrones de clase 1 y/o 2 con la multiresistencia a antibióticos se puede inferir a partir de las siguientes observaciones:

1. La presencia de integrones (clase 1 y 2) esta significativamente asociada a la resistencia a gran parte de los antibióticos analizados (Cuadro Nº 3 y 4).
2. La ausencia de integrones es mas común en los aislados de ETEC (55%) y EHEC (datos no mostrados) que son las categorías patógenicas de *E. coli* que presentaron menores proporciones de resistencia a los antibióticos analizados, en comparación a *Shigella* y *E. coli* no diarreogénica (mayoritariamente resistentes), donde la prevalencia de los integrones de clase 1 y 2 fue la mayor (Figura Nº 6).
3. En todos los aislados (Cuadro Nº 3), a excepción de EHEC (datos no mostrados), la multiresistencia (a 4 antibióticos está significativamente asociada a la presencia de al menos uno de los integrones analizados).

La adquisición de integrones es considerada como una de las principales causas de multiresistencia antimicrobiana en aislados Gram negativos, especialmente en aislados entericos. Se ha reportado que aislados que portan integrones, presentan mayor resistencia a los antibióticos, que aquellos que no los portan, así como la presencia de integrones en la flora normal de adultos ^(45,49-50). Se podría deducir que la transferencia de integrones entre bacterias de una misma especie y entre especies diferentes se lleva a cabo a partir de una estructura básica y no mediante genes individuales que facilitaría la diseminación de los integrones y por consiguiente, de las resistencias relacionado a ellos ⁽²⁷⁾.

La alta prevalencia de la multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones en la flora comensal y en patógenos que afectan a la población infantil que es mas vulnerable a las enfermedades infecciosas, significa un riesgo a la salud pública, en el contexto global donde éstas, provocan

anualmente la muerte de alrededor de 11 millones de niños, mas del 90% de los cuales se producen en países en desarrollo. Si bien muchas diarreas de origen bacteriano son auto-limitantes y no justifican el tratamiento antimicrobiano, las complicaciones asociadas a la desnutrición o a otras enfermedades intercurrentes pueden requerir su uso. Así, en el manejo de la shigellosis, el uso apropiado de antibióticos juega un papel importante en el tiempo de recuperación, y disminución de la excreción del patógeno. El incremento de la multiresistencia disminuye el espectro de antibióticos efectivos disponibles, que desde ya es limitado en niños, sin considerar las limitaciones económicas del costo de las nuevas generaciones de antibióticos.

Al ser éste, el primer reporte de la asociación entre

multiresistencia e integrones, futuros estudios deberán analizar el contenido genético de los casettes genéticos presentes en los integrones encontrados así como su relación con los fenotipos de resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (I.B.M.B.) con el apoyo parcial del Programa de colaboración sueca ASDI - SAREC: Proyecto Enterobacterias y constituyo parte del trabajo de tesis de grado en Bioquímica de la Lic. Claudia Rodas. Los autores agradecen al personal del Hospital del Niño Ovidio Aliaga y Hospital Materno Infantil CNS.

REFERENCIAS

- Guerrero I. Changing resistance in enteric pathogens. *Jacksonville Med* 2001; 2: 1 -3
- Tarreja N, Mohan B. Antimicrobial resistance in selected bacterial enteropathogens in north India. *J. Indian Med Res* 2004; 120: 39 - 43
- Bennish M. Treatment of infectious diarrhea: the role of antimicrobial therapy. *APUA Newsletter* 1995; 13 (4): 1 - 6
- Torres M, Pérez M. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J. Clin Microbiol* 2001; 39 (6): 2134 - 2139.
- Lawler J, Wallace M. Diagnosis and treatment of bacterial diarrhea. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 287 - 294
- Okeke I, Fayinka S. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from Nigerian students, 1986 - 1998. *Emerg Infect Dis* 2000; 6 (4): 393 -395
- Zamora A, Cordero G. Evaluación de la Estrategia "Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes de la Infancia" (AIEPI) en Servicios de Salud, Bolivia. Ministerio de Salud y Previsión Social 1999
- Reyes A, Bello H, Domínguez M. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside - resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. *J. Antimicrob Chemother* 2003; 51: 317 - 321
- Nolasco C. AIEPI: Argumentos técnicos para la estrategia de atención integral al niño. *Rev Pediatr El Salvador* 2005; 1 (8):1 - 15
- Lima A, Pinho C. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolated from patient with shigellosis in Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 256 - 259
- Solórzano - Santos F. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud Pública Mex* 2003; 40 (6): 510 - 516
- Tolia V. Acute infectious Diarrhea in Children. *Curr Treat Opt Infect Dis* 2002; 4: 183 - 194
- Vila J, Vargas M. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother* 1999. 43 (12): 3022 - 3024
- Ashkenzi S. Antibiotic treatment of bacterial gastroenteritis. *J. Pediatr Infect Dis* 1991; 10: 140 - 148.
- Sack R. Antimicrobial resistance in organism causing diarrheal diseases. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 102 - 105.
- Merino L, Hreňuk G. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp en el nordeste argentino. *Rev Panam Salud Pública* 2004; 15 (4): 219 - 122
- Millar M, Walsh T. Carriage of antibiotic resistant bacteria by healthy children. *J. Antimicrob Chemother* 2001; 47: 605 - 610
- Barreta J. Evaluación de la resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* de muestras fecales provenientes de niños sanos en edad escolar de la ciudad de La Paz. Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia; 2002
- De la Cruz I, Davies I. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* 2000; 2: 128 - 133

20. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy P. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 199; 39 (1): 185-191.
21. Carattoli A. Importance of integrones in the diffusion of resistance. *INRA Sciences* 2001; 32: 243 - 259
22. Collis C, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol* 2002; 184: 3017 - 3026.
23. White P, Rawlinson D. Current status of the *aadA* and *dfr* gene cassette families. *J. Antimicrob Chemother* 2001; 47: 495 - 496
24. Collis C, Hall R.M. Site specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol* 1992; 174: 1574 - 1585.
25. Melver C, White P, Jones L. Integrons and gene cassettes in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658 - 2661
26. Roy P. Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in Enterobacteria and *Pseudomonas*. *APUA Newsletter* 1995; 13(3): 1, 4-6
27. Gallardo F, Ruiz J, Soto SM. Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16(4): 398 - 402
28. Correia M. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (9): 2838 - 2843
29. Flores A, Suarez J. Four biochemical tests for identification of probable enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Rev Latinoam Microbiol* 1999; 41: 259 - 261
30. Reitan M, Betting K. Identification of virulent genes in different isolates of *Escherichia coli* from healthy children. *J. Bacteriol* 1999; 13: 13 - 21
31. Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect* 2002; 19 (2): 77 - 81
32. Muñoz J, Dominguez M, Zambrana R. Integrones y cassettes genéticos de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella flexneri*. *Rev Med Chil* 2003; 34: 1 - 10
33. Efrón B. Large - Scale simultaneous Hypothesis testing: The choice of a null hipótesis. *J. Am Stat Assoc* 2004; 99 (465): 96 - 110
34. Infante B, Grape M, Larsson M, Kristiansson C, Pallecchi L, Rossolini GM, Kronvall G. Acquired sulphonamide resistance genes in fecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *J. Antimicrob Agents* 2005; 25 (4): 308 - 312.
35. Prats G, Mirelis B, Llovet C, Muñoz E and Navarro F. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985- 1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1140 - 1145.
36. Vila J, Vargas T, Ruiz J, Corachan M, De Anta M, and Gascon J. Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in comparison with other geographical areas. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44: 1731 - 1733.
37. Hoge C, Gambel W, Srijan A, Pitarangsi C. Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. *Clin. Infect. Dis* 1998; 26: 341 - 345.
38. Navia M, Capitano L, Ruiz J, Vargas M. Typing and characterization of mechanism of resistance of *Shigella* spp. Isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J. Clin Microbiol* 1999; 37 (10): 3113 - 3117.
39. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (3): 463 - 469.
40. Murray A, Coia JE, Mather H, Brown DJ. Ciprofloxacin resistance in non-typhoidal *Salmonella* serotypes in Scotland, 1993-2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (1): 110 -114.
41. Fernandez-Cuenca F, Amblar G, Pascual A, Martinez-Martinez L. Relationships between resistance to cefoxitin, ciprofloxacin and amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23 (8): 510 - 511
42. Kang SG, Lee DY, Shin SJ, Ahn JM, Yoo HS. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *J Vet Sci.* 2005; 6 (3): 201 - 205.
43. Nogrady N, Gado I, Toth A, Paszti J. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26 (2): 126 - 132.
44. Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44 (3): 303 - 309

45. Kang HY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55 (5): 639 - 644.
46. Zhang H, Zhang X, Yamasaki S, Miyoshi S, Shinoda S. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol Immunol* 2004; 48 (9): 639 - 645.
47. Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A: Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 3: 3053 - 3058.
48. Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. *Antimicrob Chemother*. 2005; 55 (3): 301 -305.
49. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J: Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1568 - 1574.
50. Skurnik D, Le Menac'h A, Zurakowski D, Mazel D, Courvalin P, Denamur E, Andreumont A, Ruimy R. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (7): 3062 - 3065.