

# Factor "R" en enterobacteriáceas aisladas de infecciones del tracto urinario \*

MAURICIO FRAJMAN\*\*

OLDEMAR CHAVARRIA\*\*

MARIA ELENA PEÑARANDA\*\*\*

MARIA ISABEL LACAYO\*\*\*\*

## Introducción

La aparición de bacterias resistentes a múltiples antibióticos y la transferencia de esa resistencia a otras bacterias, tiene importancia capital hoy día en el tratamiento de infecciones bacterianas, ya que las cepas multiresistentes han adquirido proporciones de una verdadera epidemia mundial.

En 1952, se aisló de un paciente con disentería por primera vez, una cepa de *Shigella* resistente a 3 antimicrobianos: Estreptomicina (Sm), Tetraciclina (Te) y sulfá (Sa). Tres años después, de un paciente con un cuadro clínico similar, se aisló una cepa de *Sb. flexneri* resistente a 4 drogas: Sm, Te, Sa y Cloranfenicol (Cm), (14).

En 1957 durante una epidemia de diarrea, causada por una cepa de *Sb. flexneri* resistente a 4 antibióticos, se aisló una cepa de *E. coli* que poseía el mismo patrón de resistencia (19). Desde entonces se ha venido observando que, poco tiempo después de la introducción de un nuevo antibiótico en el mercado, aparecen cepas resistentes a dichas drogas (9).

En investigaciones posteriores se demostró, que la resistencia era transmitida de una bacteria a otra por contacto directo entre las células. Posteriormente se demostró que esta transmisión también se lleva a cabo entre diferentes cepas bacterianas (14).

Hace 20 años, la incidencia de bacterias resistentes a los antibióticos era baja, por lo que no se dio mucha importancia al hecho. Hoy día, se aislan cada vez con más frecuencia, cepas resistentes a 7, 8 y más antibióticos.

Como resultado de numerosas investigaciones, se demostró que la resistencia múltiple, hallada en diferentes partes del mundo, se presenta principalmente en *Staphylococcus aureus* y bacterias de la familia Enterobacteriácea.

En el caso de las enterobacterias, se demostró que la transferencia de la resistencia no era mediada por bacteriófagos, como sucede en *Staphylococcus aureus*, sino por elementos genéticos llamados PLÁSMIDOS (9).

Los plásmidos se definen hoy día como anillos de ácido desoxiribonucleico (ADN) presentes en el citoplasma bacteriano que poseen la capacidad de replicarse en forma autónoma. Aquellos plásmidos que se integran por inserción al cromosoma huésped se denominan episomas.

Los plásmidos reciben diferentes nombres de acuerdo a las propiedades específicas que confieren a las células huésped, por

\* Este trabajo recibió el primer premio en el I Congreso Científico de la A.E.F.M. en 1977.

\*\* Facultad de Medicina - Universidad de Costa Rica.

\*\*\* Instituto de Investigaciones en Salud.

\*\*\*\* Hospital San Juan de Dios, C.C.S.S.

ejemplo, el plásmido clásico de fertilidad es llamado Factor F o Factor sexual, puesto que confiere a la célula bacteriana que lo posee (F+) capacidad de conjugación con una célula receptora (F—). Otros plásmidos pueden dar a la bacteria capacidad de producir toxinas (plásmido Ent.) o de adherencia a la mucosa intestinal (Factor de colonización). (15).

Un grupo de elementos plasmídicos confieren a la células bacteriana, resistencia a agentes antimicrobianos, estos son los factores de resistencia bacteriana o factores R, que pueden tener la capacidad de transmitirse por sí solos de una bacteria a otra.

Actualmente se ha demostrado transferencia de resistencia a los antibióticos en *Haemophilus influenza* (7) y *Neisseria gonorrhoeae* (3) entre otras bacterias de importancia clínica.

El problema de la alteración de la sensibilidad a antibióticos en bacterias aisladas de urocultivos a nivel de hospital, fue revelada por Trejos y colaboradores (18), donde se mostró que el 38% de todas las cepas de *E. coli* aisladas presentaban resistencia múltiple, posiblemente determinada por el factor de resistencia múltiple (FRM) que codifica resistencia simultánea a 4 antibióticos: Te, Cm, Sm y Sa.

Dado el hecho de que la gran mayoría de las infecciones urinarias son causadas por bacterias de la familia *Enterobacteriácea* (8, 17), se pretende en este trabajo, determinar la capacidad de transferencia de resistencia de las bacterias multiresistentes encontradas en orina; así como buscar otras enterobacteriáceas que tuviesen un patrón de resistencia semejante, buscando una mejor comprensión de la historia natural de las infecciones urinarias.

#### Material y métodos

Se estudiaron 30 pacientes con infección de las vías urinarias, del Hospital San Juan de Dios; 16 mujeres y 14 hombres, cuyas edades variaban entre 24 y 69 años. Los urocultivos de los pacientes presentaban más de 10<sup>5</sup> bacterias por ml de orina, resistentes a 4 antibióticos o más.

Se recogieron muestras de orina de los pacientes antes de iniciado el tratamiento, en frascos de vidrio estériles previo lavado

del área periuretral y descartando la primera mitad de la micción. Se cultivaron en medio de Tetracionato, aislándose las bacterias en medio McConkey y Levine.

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos (PSA), se realizaron según el método de Bauer y colaboradores (1) con los siguientes antibióticos de la casa BBL: Ampicilina (Ap): 10 mcg; Carbenicilina (Cb): 100 mcg; Cloranfenicol (Cm): 30 mcg; Gentamicina (Gm): 10 mcg; Kanamicina (Km): 30 mcg; Estreptomina (Sm): 10 mcg; Nitrofurantoina (FM): 300 mcg; Triple-sulfa (Sa): 250 mcg; Neomicina (Nm): 30 mcg; Acido Nalidíxico (NA): 30 mcg.

A los pacientes se tomaron dos hisopados rectales, los cuales se procesaron mediante las mismas técnicas descritas para las muestras de orina.

Las bacterias aisladas de orina, resistentes a 4 o más antibióticos y aquellas cepas predominantes en el cultivo de heces, fueron cultivadas en medio McConkey con 25 ug/ml de Ap y McConkey con 25 ug/ml de Cm, para confirmar su resistencia y ser estudiadas como donadores de plásmidos R. Para la conjugación se utilizó la cepa receptora *E. coli* W1485, timina dependiente y sensible a todos los antibióticos, pero con resistencia al ácido nalidíxico (NA) determinada cromosomalmente (i -e no por un plásmido y así incapaz de transmitir dicha resistencia).

La conjugación se llevó a cabo en caldo de infusión de cerebro y corazón por 18 horas a 37°C. Las bacterias se mezclaron en una proporción de 1 ml de donador por 9 ml de receptor. Luego se hicieron crecer en placas de McConkey conteniendo: unas 25 ug/ml de Ap y NA y otras 25 ug/ml de Cm y NA. De estos cultivos se aislaron las cepas transconjugantes, o sea, aquellas resistentes al NA que habían adquirido la resistencia a Ap y Cm por conjugación. A todas las transconjugantes se les hizo la PSA (como antes descrito) para determinar el patrón de resistencia adquirido.

A tres cepas bacterianas, aisladas de una de las pacientes del estudio (una cepa de urocultivo y dos de coprocultivos), se les hizo un extracto de su ADN según métodos ya descritos (5) y luego se analizaron en gel de agarosa según el método de Meyers y colaboradores (13).

**Resultados:**

En 4 de los 14 hombres estudiados se encontró próstata aumentada de tamaño, 2 de ellos ingresaron con cuadro de retención urinaria aguda, por primera vez. En los demás pacientes, no se observaron cambios anatomopatológicos en el sistema urinario.

Los grados de temperatura al ingreso de los pacientes al hospital se resumen en el cuadro 1.

La orina de los pacientes presentaba pH 6, excepto en una paciente de cuya orina se aisló *Proteus morgani* en que, el pH era 7. En los 15 pacientes en que se aisló *E. coli* el pH de la orina osciló entre 5 y 6.5.

Todos los pacientes eran sintomáticos. En la orina de ninguno de los pacientes se encontró albúmina, glucosa o cilindros. Todos presentaban cierto grado de Piuria y el 80 por ciento eritrocituria. De los pacientes estudiados solamente uno tenía puesta sonda antes de la toma de la muestra de orina. Este paciente ingresó con un cuadro de meningitis post-trauma craneoencefálico, causada por bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas*, las cuales eran resistentes a Ap, Cb, Cm, Te y Sa. Este patrón de resistencia fue muy semejante al encontrado en la *Klebsiella* aislada de orina. Antes del resultado de la PSA, 24 de los casos (80%) fueron tratados con ampicilina, 5 (17%) con gentamicina y 1 (3%) con nitrofurantoina. Las bacterias demostraron ser resistentes "in vitro" a los dos primeros antibióticos.

CUADRO N° 1

TEMPERATURA DE INGRESO DE LOS PACIENTES

Temperatura	Pacientes	%
38.5°C	1	3
38.0°C	2	7
37.5°C	3	10.0
37.3°C	2	7
37.1°C	15	50
36.9°C	6	20
Sin datos	1	3

Coincidiendo con trabajos anteriormente realizados en cuanto a las cepas bacterianas que con mayor frecuencia causan infecciones urinarias (12-17-18), encontramos una prevalencia de *E. coli* del 47 por ciento en los urocultivos, siguiendo en orden decreciente: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Proteus* (cuadro N° 3).

Asi mismo en las bacterias aisladas de los coprocultivos, predominaron las cepas de *E. coli* seguidas de *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Proteus* (cuadro 4).

La mayoría de las cepas aisladas de los urocultivos presentaban resistencia a más de 5 antibióticos. En las bacterias aisladas en los coprocultivos, no se encontró una prevalencia significativa cuanto al número de antibióticos de resistencia. (cuadro 4).

En el 33 por ciento de los casos se encontró el mismo género de bacteria en orina y el tracto intestinal, pero los patrones de resistencia fueron diferentes.

CUADRO N° 2

pH DE LA ORINA DE LOS PACIENTES EN RELACION CON LAS BACTERIAS AISLADAS

pH	E. coli	Klebs.	Pseud.	Citrob.	Proteus	%
5	7					23.
5.5	1					3
6	5	8	9	2		70.0
6.5	2					7.
7					1	3

CUADRO Nº 3

ORDENAMIENTO DE LAS BACTERIAS SEGUN EL NUMERO DE  
ANTIBIOTICOS A LOS CUALES ERAN RESISTENTES

Nº de anti- bióticos	UROCULTIVOS						COPROCULTIVOS					
	E. coli	Klebs.	Pseud.	Proteus	Citrob.		E. coli	Klebs	Pseud.	Proteus	Salm.	
0-1							5	1	1			
2-3							3	2	1	1	1	
4-5	2			1			3	1				
6-7	7	1	5				4		2			
8-9	5	3	3		2		3	2	1		1	
10-11	1	1	1					2	1			
<b>TOTAL</b>	15	5	9	1	2		18	8	6	1	2	
	47%	16%	28%	3%	6%		51%	23%	17%	3%	6%	

De las 32 cepas bacterianas aisladas de los urocultivos, se encontró un 100 por ciento de resistencia a Ap y Cb con porcentajes de resistencia mayores de 90 por ciento para Te, Sm y Sa (cuadro N° 4).

En las PSA de las 35 cepas bacterianas aisladas de los coprocultivos se halló que 64 por ciento eran resistentes a Te, 63 por ciento a Ap y Cb, 48 por ciento a Cm.

Las cepas donadoras transfirieron la resistencia a la cepa receptora en mayor porcentaje para Ap, Cb y Cm (cuadro 4).

El 59 por ciento de las bacterias poseían Factor de resistencia múltiple (FRM i.e. resistencia a Te, Cm, Sm y Sa) y esta fue transmitida a la cepa virgen W1485, en el 63 por ciento de los casos.

El 31 por ciento de las cepas aisladas en los urocultivos, poseían resistencia simul-

tánea a Ap, Km, Nm y Cb (cuadro 5) y fueron capaces de transmitirla en un 90 por ciento.

En los coprocultivos el 32 por ciento poseía el FRM y el 25 por ciento eran resistentes simultáneamente a Ap, Km, Nm y Cb, resistencias que fueron transferidas a la cepa virgen en el 27 por ciento y el 60 por ciento de los casos respectivamente (cuadro 5).

En la electroforesis realizada, al comparar con plásmido control, se encontró un plásmido de alto peso molecular, (aproximadamente  $80 \times 10^6$  dal), en las 3 bacterias estudiadas, el cual probablemente corresponda al plásmido FRM. En la cepa aislada del urocultivo (*Citrobacter sp.*) se observan 2 plásmidos de peso molecular menor que el anterior ( $40$  y  $50 \times 10^6$  dal) también encontrado en una de las cepas aisladas de co-

CUADRO N° 4

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE UROCULTIVOS Y COPROCULTIVOS, CON LAS RESPECTIVAS TRANSCONJUGANTES EN MEDIOS DE CULTIVO CON AMPICILINA (AM) Y CLORANFENICOL (CM).

UROCULTIVO							COPROCULTIVO					
ATB	PSA	%	Transconjugantes				PSA	%	AM	Transconjugantes		
			AM	%	CM	%				%	CM	%
AM	32	100	17	53	10	31	21	64	10	48	7	33
CB	32	100	14	44	10	31	21	64	9	43	7	33
CM	23	72	12	52	12	52	16	48	7	44	7	44
GM	12	38	5	42	5	42	6	18	3	50	2	33
KM	21	66	10	48	9	43	15	45	6	40	5	33
TE	30	94	11	37	9	30	21	64	4	19	4	19
SM	29	91	12	41	10	34	20	61	5	25	4	20
F/M	12	37	2	17	0	0	9	27	1	11	0	0
3S	27	84	16	59	12	44	25	76	9	36	6	24
NM	10	31	8	80	7	70	9	27	5	55	5	55
NA	9	28	17	100	12	100	6	18	10	100	7	100
Total	32		17		12		35		10		7	

CUADRO N° 5

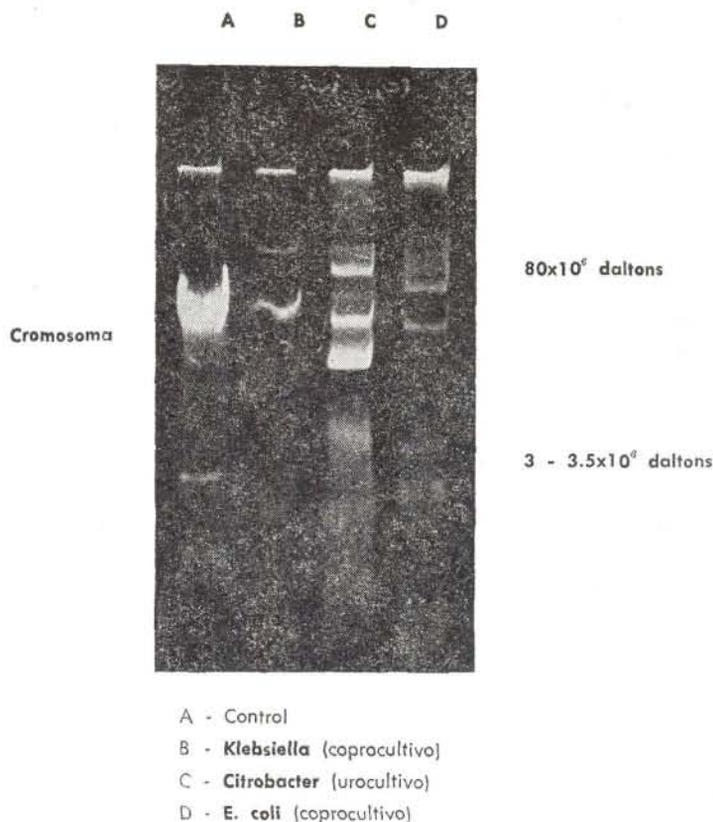
PREVALENCIA DE GRUPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS CONOCIDOS COMO CODIFICADOS POR UN MISMO PLASMIDO EN LAS BACTERIAS AISLADAS EN UROCULTIVOS Y COPROCULTIVOS Y SUS RESPECTIVOS TRANSCONJUGANTES

Grupos de Resistencia	UROCULTIVO					COPROCULTIVOS				
	E. coli	Klebs.	Pseud.	Citrob.	Total	E. coli	Klebs.	Pseud.	Citrob.	Total
FRM	11	4	2	2	19	6	3	1	1	11
(TE-CM-SM-SA)	73%	80%	22%	100%	59%	35%	43%	17%	50%	32%
AM-KM-NM-CB	6	1	1	2	10	5	3	1	1	10
	40%	20%	11%	100%	31%	29%	33%	17%	50%	29%

Grupos de Resistencia	UROCULTIVO					COPROCULTIVOS				
	E. coli	Klebs.	Pseud.	Citrob.	Total	E. coli	Klebs.	Pseud.	Citrob.	Total
FRM	6	4	0	2	12	2	1	0	0	3
(TE-CM-SM-SA)	54%	100%	0	100%	63%	33%	33%	0	0	27%
AM-KM-NM-CB	6	1	0	2	9	3	2	0	1	6
	100%	100%	0	100%	90%	60%	67%	0	100%	27%

FIGURA N° 1



procultivo (*E. coli*). Las 3 cepas presentaban además, un plásmido de bajo peso molecular (aproximadamente  $3 \times 10^6$  dal). Llama la atención en la cepa de *Citrobacter* un plásmido de aproximadamente  $60 \times 10^6$  dal, que no se encuentra en ninguna de las otras cepas bacterianas (Fig. 1).

**Discusión**

Al analizar la evolución clínica de los pacientes, sobresale el hecho de que los pacientes cuyo tratamiento con antibióticos no se modificó, después del resultado de la PSA, el 65 por ciento se tornó asintomático o afebril en un promedio de 6 días después del grupo en que se usaron los antibióticos adecuados.

La prevalencia de resistencia a Ap, Cb, Te y Sm coincide con los resultados del estudio realizado por Trejos y colaboradores en los años de 1973, 1974, con 3857 cepas aisladas de cultivos de orina de pacientes del Hospital San Juan de Dios (18). Sobre-

sale el hecho de que se encontró una resistencia relativamente baja a la nitrofurantoina (FM) y al ácido nalidixico (NA), demostrándose así la eficacia de los antisépticos urinarios, los cuales al igual que la asociación Sulfametaxazol - Trimetoprim, se recomienda como primera indicación en infecciones urinarias agudas (6-12-17-20).

En los últimos años, muchos trabajos se han hecho determinando la resistencia transmitida a múltiples antibióticos en bacterias que causan cuadros diarreicos (15). La magnitud del problema es alarmante y ha llevado a varios investigadores a proponer repetidamente la necesidad de una racionalización en el uso de antibióticos (10), pues se ha demostrado que las bacterias con el tiempo pierden los plásmidos, que codifican la resistencia a los antimicrobianos (15).

Al respecto nosotros encontramos que la conjugación "in vitro" transfirió el factor de la resistencia a los distintos antibióticos en casi el 100% de los casos (cuadro 4).

Consideramos que frente al peligro de infecciones causadas por enterobacterias en otros sitios fuera del tracto digestivo (incluso asintomático) se hace imperioso, a través de constantes estudios epidemiológicos, normalizar el tratamiento de dichas infecciones, desechando por cierto tiempo aquellos antibióticos a los cuales se demuestra una alta prevalencia de resistencia (por ejemplo en nuestro medio, ampicilina, en infecciones urinarias), volviendo a utilizarlos cuando ésta prevalencia haya disminuido. Se hace necesario un control, también en la automedicación, para evitar la aparición y selección de cepas resistentes.

Al revisar la historia natural de las infecciones urinarias, no pudimos confirmar en nuestro trabajo, la teoría del "canal rectouretral", ya que en ningún momento, encontramos cepas idénticas en ambos sistemas.

Sin embargo, en una investigación reciente, Stuart-Levy (12) encuentra cepas del mismo género (sin especificación serológica) aislada de heces y orina.

La necesidad de definir qué características poseen algunas enterobacterias para colonizar en las vías urinarias, en relación con otras que coexisten normalmente en el mismo medio, pero que no tiene capacidad de hacerlo, es también citada por Harvey en el capítulo referente a las infecciones urinarias (8).

Consideramos que es posible aislar las mismas cepas bacterianas en ambos sistemas (urinario y digestivo) pero las enterobacterias que causan infección urinaria deben tener capacidad de adherirse a la mucosa de las vías urinarias para que no sean eliminadas en la micción y pueden colonizar en este medio, algo semejante a lo que describe Evans et al (4) con relación a una cepa de *E. coli* que se adhiere y coloniza al intestino delgado produciendo diarreas coleriforme. Es de subrayarse el hecho que el plásmido que, según Evans, le da a la *E. coli* la capacidad antes citada, posee un peso molecular de  $60 \times 10^6$  dal (4) y que en la electroforesis por nosotros realizada, la bacteria aislada del urocultivo poseía un plásmido de peso molecular  $60 \times 10^6$  daltons, que no estaba presente en las cepas aisladas del coprocultivo del mismo paciente, (fig. 1). Este hecho apoya la hipótesis antes expuesta.

#### Agradecimiento

Nuestro agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación en Salud (INISA), que nos facilitó sus laboratorios para la realización de este trabajo y muy especialmente al Sr. Guillermo Vargas por la labor técnica realizada.

Agradecemos también a los laboratorios del Hospital San Juan de Dios, donde se procesaron las muestras de urocultivos y coprocultivos utilizados en el estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—BAUER A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C., TURCK M.  
Antibiotics Susceptibility testing by a standardized disk method. Am. J. of Clin. Path., 45: 493. 1966.
- 2.—CROSA, J.H., OLARTE, J., MATA, J.J., LUTTROPP L.K. PEÑARANDA M.E.,  
Characterization of an R-Plasmid Asociated with ampicilin resistance in *Shigella dysenteriae* tipe 1 isolated from epidemics. Antimicrobial agents and Chemoterapy. 11: 553-1977.
- 3.—CULLITON B. J.  
Penicillin resistance gonorrhea; new strain spreading world-wide. Science: 194: 1395-1946.
- 4.—EVANS D.G., SILVER R.P., EVANS O.J., CHASE D.G., GORBACH S.L., 1975.  
Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *E. coli* enterotoxigenic for human. Infection and Immunity 12: 656. 1975.
- 5.—FREIFELDER D.,  
Isolation of extrachromosomal DNA from bacteria, p. 153, Methods in Enzimology, Academic Press Inc. 1970.
- 6.—GOWER P.E., TASKER P.R.W.  
Comparative double-blind study of cephalixin and co-trimoxazole in urinary tract infections. B. Med. J. 1:684. 1976.
- 7.—GRAAF J., ELWELL L.P., FALKOW, 1976.  
Nature of two B-lactamasa specifying plasmids isolated from *H. influenzae*. J. of Bact. 126: 439. 1976.
- 8.—HARVEY A.M., JOHNS R.J., OWEN A.H. AND ROSS R.S.  
Tratado de Medicina Interna. Edit. Interamericana, Décimo-octava edición, p. 1007 10.13.

- 9.—HELINSK, D.  
Plasmid determined resistance to antibiotics: Molecular properties of R. factors. *Ann. Rev. Mic.* 27: 437. 1973.
- 10.—JONES S.R.  
The effect of an educational program upon hospital antibiotic. *Am. J. Med.*, 273: 79-1977.
- 11.—LE BLANC D.J., FALKOW S.  
Effects of superinfection immunity on plasmid replication following conjugation. International Symposium on infections antibiotic resistance. Czechoslovak Medical Press Prague, 305-318. 1977.
- 12.—LEVY S.  
Fecal flora in recurrent urinary-tract infections. *N. Egl. J. Med.*, 296: 813. 1977.
- 13.—MEYERS J.A., SANCHEZ D., ELWELL L., FALKOW S., 1976.  
Simple agarose gel electroforesis method for the investigation and characterization of plasmid-DNA. *J. of Bac.* 127: 1529. 1976.
- 14.—MITSUHASHI S.  
Review: The R factor. *The Journal of Infections Disease* 119: 89. 1969.
- 15.—MITSUHASHI S., 1977.  
Transferable drug resistance factor R. Published by Tokio University Press.
- 16.—ORSKOV I., ORSKOV R., 1977.  
Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children. *Med. Mic. Immunol.* 163: 99-1977.
- 17.—STAMEY T.A., CONDY M., MIHARA G., 1977.  
Nitrofurantoin and trimetoprim Sulfamethoxazole profilaxis of urinary tract infections. *N. Engl. J. Me.* 296: 780. 1977.
- 18.—TREJOS A., MATA L., GONZALEZ K., PEÑARANDA M.E.  
Alteraciones de la Sensibilidad a los antibióticos inducidas en el medio hospitalario. Sesión clínica del Hospital San Juan de Dios, del 18 - VIII - 1976.
- 19.—WATANABE T., 1964.  
Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. *J. Bact.* 88: 716. 1964.
- 20.—Trimetoprim - Sulfametoxazol para el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias. *Carta Médica, C.C.S.S.* 1976, vol. III, pág. 21-22.