

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en *Plesiomonas shigelloides*

Lic. Laura Bravo Fariñas,¹ Lic. Olga Susana De Paula Almeida,² Dr. Jorge Maestre Mesa,³ Dra. Margarita Ramírez Álvarez,⁴ y Téc. Belkys García Rodríguez⁵

RESUMEN

Se estudiaron 30 cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda y procedentes de los diferentes centros de salud del país. Se caracterizaron fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas convencionales y se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer, frente a 11 drogas. Se halló que las cepas de *Plesiomonas shigelloides* fueron sensibles a 7 y resistentes a 6 de las drogas investigadas. Se determinó la presencia de plásmidos en 12 de 29 cepas analizadas y se evidenció la diversidad en sus patrones plasmídicos.

Descriptor DeCS: PLASMIDOS/aislamiento & purificación; PLESIOMONAS/aislamiento & purificación; RESISTENCIA MICROBIANA A LAS DROGAS; DIARREA/microbiología.

Los microorganismos pertenecientes al género *Plesiomonas*, son bacilos curvos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positivos, ubicados taxonómicamente en la familia Vibrionaceae.¹

A pesar de que las evidencias epidemiológicas indican que *Plesiomonas shigelloides* es un patógeno entérico y de los enormes esfuerzos por definir los factores de virulencia asociados con la enteropatogenicidad, aún no se ha definido al nivel internacional el carácter enteropatógeno de este agente.²

Este microorganismo ha sido asociado con casos esporádicos y brotes de diarreas en diferentes partes del mundo, así como con la diarrea del viajero. Asimismo se han publicado en la literatura mundial numerosos estudios en los cuales se ha identificado este microorganismo como agente causal de infecciones extraintestinales (colecistitis aguda, septicemia y otras).³

La terapia antimicrobiana parece ser esencial en el tratamiento de las diarreas prolongadas o severas, fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos y está bien definido en las infecciones extraintestinales.⁴

El desconocerse en Cuba la susceptibilidad antimicrobiana de estos agentes y el estar sus porcentajes de aislamiento en niños con enfermedad diarreica aguda, en cifras similares a las reportadas en otras áreas geográficas, nos motivó a la realización de este trabajo.

MÉTODOS

Se estudiaron 30 cepas de *Plesiomonas shigelloides*, aisladas de las heces de personas con enfermedad diarreica aguda. Las cepas fueron remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia de Agentes Enteropatógenos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), entre los meses de enero de 1992 y enero de 1993, procedentes de diferentes centros de salud del país.

Las cepas se inocularon en caldo triptonsoya y se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones de aereación, al cabo de ese tiempo se inocularon por agotamiento en placas de agar cerebro corazón, se seleccionaron al

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

² Licenciada en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

⁴ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁵ Técnica en Procesos Biológicos. IPK.

menos 3 colonias por placas, las cuales fueron inoculadas por punción y estría en los medios de agar hierro y 2 azúcares de kligler, y agar hierro y lisina. Más tarde se incubaron por 24 h a 37 °C en las condiciones antes mencionadas^{5,6} y se escogieron las imágenes compatibles a la de los microorganismos del género *Plesiomonas shigelloides*^{5,6}

Las cepas que resultaron ser bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, oxidasa positivos, fueron ubicadas en la familia Vibrionaceae, y se realizó el estudio fenotípico de 14 pruebas bioquímicas convencionales para ubicarlas taxonómicamente en género y especie.⁷

La susceptibilidad antimicrobiana de las 30 cepas frente a 11 drogas antimicrobianas (tetraciclina, kanamicina, colimicina, penicilina, eritromicina, polimixín B, cloranfenicol, estreptomycin, novobiocina, cefaloridina y amikacina), fue determinada mediante el método de Bauer - Kirby.⁸

El aislamiento de plásmidos fue determinado en 29 cepas, las cuales se sometieron a un proceso de extracción de ADN plasmídico. Primero el ADN plasmídico se extrajo mediante la técnica de minialcalino y las que presentaron plásmidos se sometieron posteriormente a una extracción de plásmido alcalino masivo.⁹

RESULTADOS

Las 30 cepas estudiadas poseían la enzima citocromo oxidasa, lo que permitió ubicar a estos bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos en la familia Vibrionaceae. El estudio bioquímico complementario realizado demostró que el 100 % de las cepas pertenecía al género *Plesiomonas* y a la especie *shigelloides*.¹⁰

La susceptibilidad antimicrobiana de las 30 cepas de *Plesiomonas shigelloides* mostró que todas fueron sensibles a 4 drogas: cloranfenicol, tetraciclina, polimixín B y colimicina. En cuanto a la resistencia tenemos que las cepas fueron resistentes con diferentes porcentajes a 6 agentes: penicilina (100 %), novobiocina (93,3 %), cefaloridina (86,6 %), estreptomycin (83,3 %), eritromicina (43,3 %) y kanamicina (20 %) (tabla).

TABLA. Susceptibilidad de las cepas de *Plesiomonas shigelloides* frente a 11 drogas antimicrobianas

Droga	Susceptibilidad					
	Sensible		Intermedia		Resistente	
	No. de cepas	%	No. de cepas	%	No. de cepas	%
Penicilina	0	0	0	0	30	100
Novobiocina	0	0	2	6,6	28	93,3
Cefaloridina	0	0	4	13,3	26	86,6
Estreptomycin	0	0	5	16,6	25	83,3
Kanamicina	5	16,6	19	63,3	6	20
Eritromicina	8	26,6	10	33,3	13	43,3
Amikacina	26	86,6	4	13,3	0	0
Polimixín B	30	100	0	0	0	0
Colimicina	30	100	0	0	0	0
Tetraciclina	30	100	0	0	0	0
Cloranfenicol	30	100	0	0	0	0

De las 29 cepas sometidas al proceso de purificación de ADN plasmídico, 12 poseían plásmidos, lo que representa 41,3 %, se identificaron 21 bandas distintas entre las 12 cepas y en cada cepa hubo entre 1 y 11 bandas. De las 21 hubo 6 que no fueron compartidas por 2 cepas o más. Se encontraron 2 cepas con patrones plasmídicos idénticos y un gran número de cepas con patrones similares.

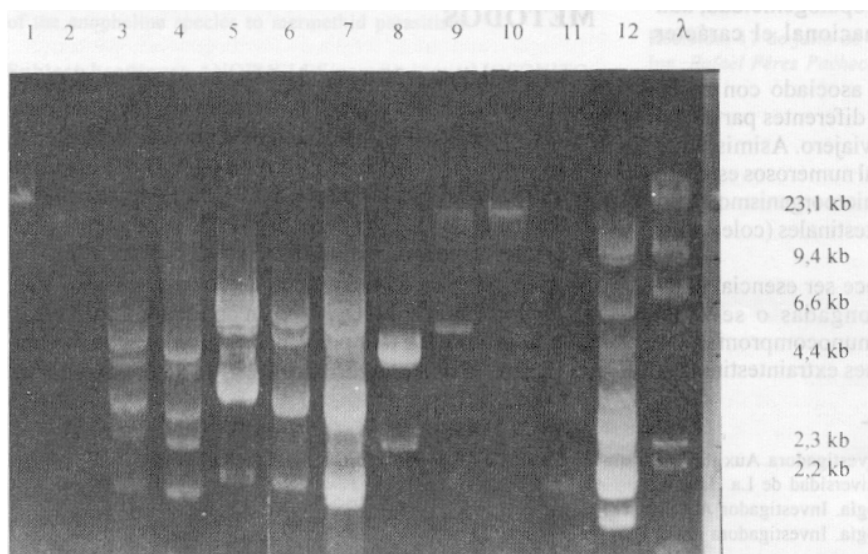


Fig. Resultados del análisis plasmídico. Cepas 1 y 10: provincia de Pinar del Río. Cepas 2 y 5: provincia de Guantánamo. Cepas 4, 6, 7, 8, 9, 11 y 12: provincia de Camagüey. Cepa 3: provincia de Holguín. : λ Marcador de peso molecular fago Lambda digerido con enzima Hind III.

En cuanto a las tallas de las bandas, 2 tuvieron aproximadamente 23,1 kb (una estuvo presente en 2 cepas y la otra en 3). También en la cepa 21 se observó una banda de alrededor de 23,1 kb. Hay otras 3 bandas cercanas a 9,4 kb que estuvieron en 2 cepas (2 en una misma cepa) y la otra en sólo 1 cepa. La mayoría de las bandas estuvieron entre 6,6 y 2,2 kb, sólo 4 bandas estuvieron por debajo de 2,2 kb (fig.).

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la caracterización fenotípica de *Plesiomonas shigelloides* realizada por *Kain y Kelly* en 1991, pudimos comprobar que el perfil bioquímico de nuestras cepas se correspondía con los publicados por los autores antes mencionados, pero diferían en cuanto al crecimiento en diferentes concentraciones de sodio. Se plantea que esta bacteria crece en un rango entre 0 y 5 % de cloruro de sodio, y en nuestro trabajo obtuvimos que 12 cepas crecieron a la concentración de 6 %.¹¹⁻¹³

A pesar de que las infecciones gastrointestinales por *Plesiomonas shigelloides* son moderadas y autolimitadas, creemos necesario determinar la susceptibilidad antimicrobiana de estas cepas a diversos agentes antimicrobianos, por 2 causas fundamentales:

- Por no contar con estudios previos en el país y de hecho no conocer los patrones de susceptibilidad a las drogas de elección.
- Por ser la terapia antimicrobiana esencial en una infección gastrointestinal prolongada o cuando se trate de un paciente inmunocomprometido o con una enfermedad subyacente.¹⁴

En relación con los patrones de sensibilidad de las cepas estudiadas, podemos decir que nuestros resultados están acordes con los publicados por otros investigadores en diferentes áreas geográficas, los cuales han hallado que en la mayoría de los casos el 100 % de las cepas estudiadas es sensible al cloranfenicol, al polimixín B y a la tetraciclina, aunque para este último agente se han reportado cepas resistentes.¹⁵

Comparando nuestros resultados respecto a la kanamicina, eritromicina y amikacina con los obtenidos por otros investigadores, vemos que la susceptibilidad de nuestras cepas se comportó de manera similar a la reportada por *Billiet* y otros, donde se reportó susceptibilidad intermedia a la kanamicina y a la eritromicina.¹⁶

En 1990, *Olsnik* publicó un estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de niños peruanos con enfermedad diarreica aguda, y demostró múltiple resistencia a la ampicilina y a

la estreptomycin. Nuestros resultados coinciden con los antes mencionados en relación con la alta resistencia notada a la penicilina y la estreptomycin.¹⁷

Varios investigadores han informado aislamientos de plásmidos en cepas de *Plesiomonas shigelloides*, éstos han tratado de relacionar la presencia de ellos con características bioquímicas, resistencia antimicrobiana y con un posible factor de virulencia en relación con los plásmidos de 140 MDa.¹⁸

En nuestro estudio encontramos que los patrones plasmídicos de cepas de una misma región del país eran muy parecidos, las cuales presentaron también patrones de resistencia iguales; es de resaltar el hecho de que 2 cepas en una misma localidad presentaron patrones plasmídicos iguales y a su vez bastante diferentes de los patrones de cepas de otras regiones del país.

Nuestros resultados están acordes con los de *Kain y Kelly*, quienes en un estudio de 72 aislamientos fecales hallaron que 29 cepas poseían plásmidos, identificaron en esas cepas 15 bandas distintas, en cada cepa hubo entre 1 y 7 bandas, pero no encontraron 2 cepas con patrones plasmídicos iguales.¹⁸

El análisis de los patrones plasmídicos podría constituir en el futuro un instrumento epidemiológico en las investigaciones de los brotes de infecciones asociadas con esta bacteria, teniendo en cuenta la cantidad de cepas que presentan plásmidos y el hecho de que en aislamientos de personas se han hallado patrones plasmídicos idénticos.¹⁸

SUMMARY

30 strains of *Plesiomonas shigelloides* isolated from patients with acute diarrheal disease at different health centers of the country were studied. They were phenotypically characterized by conventional biochemical tests and the antimicrobial susceptibility to 11 drugs was determined by the Kirby Bauer's method. It was found that the strains of *Plesiomonas shigelloides* were sensitive to 7 and resistant to 6 of the investigated drugs. The presence of plasmids in 12 of the 29 analyzed strains was determined and the diversity in their plasmidic patterns was proved.

Subject headings: PLASMIDS/isolation & purification; PLESIOMONAS/isolation & purification; DRUG RESISTANCE, MICROBIAL; DIARRHEA/microbiology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schubert RHW. Genus IV. *Plesiomonas* Habos and Schubert 1962. En: Kridg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Willkins, 1984; vol 1:548-50.
2. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Kosako Y, Inoue K, Zhengshi Y et al. New O and H antigens of *Plesiomonas shigelloides* and their O antigenic relationships to *Shigella boydii*. *Curr Microbiol* 1994;28:351-54.

3. Abbott SH, Kokka RP, Janda JM. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol* 199;29:148-53.
 4. Brenden RA, Miller AM, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides*. Infections in humans. *Rev Infect Dis* 1988; 10:303-15.
 5. Aldová E. *Plesiomonas shigelloides* in the Czech and Slovak Republics. *Alpe Adria Microbiol J* 1995;2:95-104.
 6. Ewing E. Identification of Enterobacteriaceae. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1971:25-115. (Edición Revolucionaria).
 7. Graevenitz A von. *Aeromonas* and *Plesiomonas* agents of diarrhea. En: Ellner PD, ed. Infections diarrhea disease. New York: Marcel Dekker, 1984:75.
 8. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-6.
 9. Sayeed S, Saek DA, Qadri F. Occurrence of a large plasmid in a strain of *Plesiomonas shigelloides* with cross reactivity against *Shigella sonnei*. *J Med Rev* 1992;95:21-2.
 10. Lee JV. *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: Parker MT, Duerden BI, eds. *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology ad immunity*. 8 ed. London: Edward Arnold, 1990;vol 2:526.
 11. Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* in humans. *Rev Infect Dis* 1998;10:303-16.
 12. Ljungh A, Wadstrom T. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as possible cause of diarrhea. *Infection* 1985;13:169-73.
 13. Holmberg SD. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann Intern Med* 1986;105:690-4.
 14. Clark RB, Westby GR, Spector H, Soricelli RR, Young CL. Fatal *Plesiomonas shigelloides* septicemia in a splenectomised patient. *J Infect* 1991;23:89-92.
 15. Ingram CW, Morrison AJ, Levitz RE. Gastroenteritis, sepsis and ostiomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 1987;25:1791-3.
 16. Billiet J, Kuypers J, Livede S van, Vergaegen J. *Plesiomonas shigelloides* meningitis and septicemia in a neonate: report of a case and review of the literature. *J Infect* 1989;19:267-71.
 17. Osnick O. Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains isolated from children with diarrhea in Perú. *J Clin Microbiol* 1990;28:886-9.
 18. Kelly MT, Kain KC. Biochemical characteristic and environmental *Plesiomonas shigelloides*. *Experientia* 1991;47:439-41.
- Recibido: 28 de diciembre de 1996. Aprobado: 26 de noviembre de 1997.
Lic. *Laura Bravo Fariñas*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Mariano 13, Ciudad de La Habana, Cuba.