

PLASMIDOS DE VIRULENCIA

Marta Elana Peñaranda¹ y Leonardo Mata^{1,2}

GENERALIDADES

Las bacterias a menudo poseen en su citoplasma pequeños anillos de ácido desoxirribonucleico (ADN) denominados plasmidos, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica (14).

Los plasmidos fueron descritos como factores de fertilidad ("factores F") debido a que son capaces de inducir la conjugación bacteriana y transmitirse de célula a célula (10).

La conjugación es un proceso por el cual dos bacterias se aproximan y forman un "par específico". Si una de ellas posee el factor F (bacteria donadora o F⁺), se establece un puente protoplásmico (mediante una fimbria o pili sexual) con la bacteria receptora (F⁻) (6). El contacto celular es esencial para la transferencia de material genético (6). El ADN transferido se replica en forma autónoma en la bacteria receptora que es denominada transconjugante (14), Figura 1.

Algunos plasmidos tienen la capacidad de integrarse al cromosoma bacteriano y de replicarse en dos estados alternativos: en su forma autónoma o como parte del cromosoma huésped. Tales elementos se denominan episomas (14).

En el estado de integración cromosómica, el factor F es capaz de inducir la transferencia del genoma total de la célula. Estas cepas se denominan Kfr (high frequency of recombination) por presentar alta frecuencia de recombinación (16).

Una bacteria puede contener hasta treinta plasmidos, aunque no todos son capaces de transconjugarse (plasmidos no conjugativos) (14).

Cada plasmido contiene de 2 a 250 genes dependiendo del tamaño del anillo de ADN, cuyo peso molecular varía entre 10^6 y 140×10^6 (4).

En la última década, se ha demostrado que los plasmidos son elementos responsables de muchas de las características adquiribles, algunas de las cuales se

1. Instituto de Investigaciones Científicas (IINISA). Universidad de Costa Rica.

2. Ministerio de Salud y Calificación Social. San José, Costa Rica.

12 REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR.CARLOS SAENZ HERRERA resumen en el Cuadro 1. Entre estas interesa nutter squall's qua confieren virulencia a lac batteries, Cuadra 2.

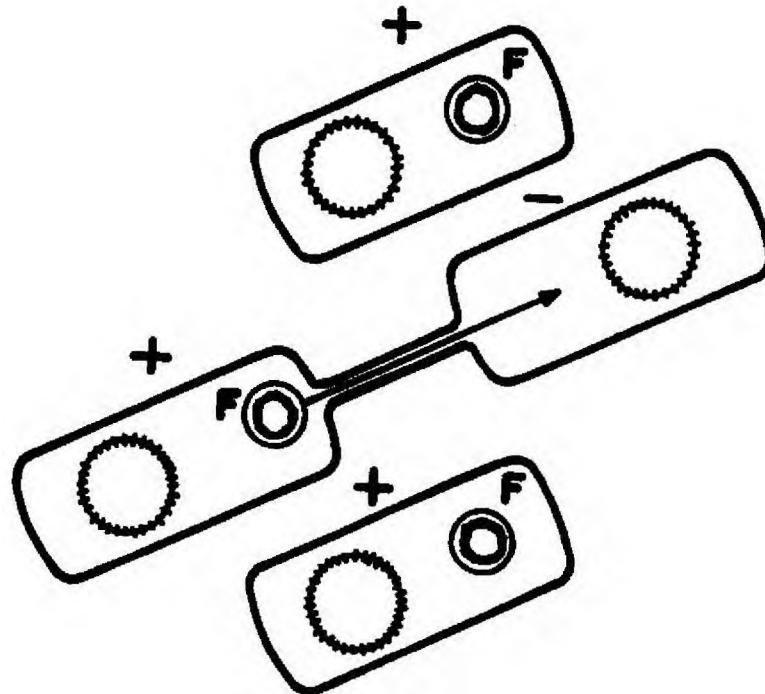


FIGURA 1

Representación diagramática de dos bacterias en conjugación. La donadora (F+) por medio del pili sexual forma un puente proteínico con la receptora (F-). El contacto es esencial para la transferencia del factor F del donador al receptor.

CUADRO 1

características= de las bacterias moduladas por plásmidos

-
- Fermentación
 - Antígeno K-88 (factor de colonización)
 - Producción de enterotoxinas
 - Resistencia a antibióticos
 - Producción de bacteriocinas
 - Producción de cápsulas
 - Producción de hemolisinas
 - Resistencia a metales pesados
 - Fermentación de lactosa y sacarosa
 - Producción de ureasa
 - Metabolismo del oxígeno y carbono
 - Pérdida de movilidad
 - Producción de tumores; vegetales
 - Resistencia a la luz ultravioleta

CU ADRO 2

Cualidades bacterianas de importancia clínica, mediadas por plásmidos

Características	Plásmido
Producción de hemolisinas	Hly
Producción de colicinas	Col
Producción de toxinas lábil y estables	Ent
Adhesividad a la mucosa (factor de colonización)	F.C.
Resistencia múltiple a los antibióticos	FRM

Entre los plásmidos de resistencia o factores R. el de resistencia múltiple (FRM) codifica resistencia simultánea al cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin y sulfonamidas (13).

El mecanismo genético para explicar la adquisición de múltiples subtipos fue propuesto por Cohen, basado en la demostración de secuencias de inserción en los plásmidos (2). Estas son secuencias de bases del ácido nucleico que se repiten en un mismo anillo y en varios plásmidos a la vez. Mediante estas estructuras se presentan sitios de homología en diferentes plásmidos, lo que permite su integración en un solo anillo o unirse a un factor de transferencia, Figura 2.

Ha sido observado por varios investigadores, que la presencia de dos o más plásmidos de virulencia en una bacteria contribuyen a agravar el proceso infeccioso (7,21).

El plásmido Ent, que le confiere capacidad a la bacteria de producir enterotoxinas lábil y estables, se ha encontrado frecuentemente asociado al plásmido de adhesividad K-88 y al plásmido de hemolisina o Hly (19).

En forma análoga, el factor de colonización descrito por Evans *et al.* (5), determinado por un plásmido de peso molecular 60×10^6 , fue hallado en una *Escherichia coli* productora de toxina lábil.

En la epidemia de disentería Shiga en Centroamérica (11) y en la epidemia de tifoidea en México (17) las cepas de *Shigella dysenteriae* 1 y de *Salmonella typhi* poseen el FRM, lo que dificulta el tratamiento y recuperación de los pacientes.

Existen plásmidos denominados crípticos a los que no se les ha adscrito ninguna función (14); por otro lado, hay factores de virulencia cuya codificación genética no ha sido vinculada a ningún plásmido. Tal es el caso de la capaci-

14 REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR. CARLOSSAENZ HERRERA
 dad de invasion (invasividad) de la mucosa intestinal por cepos. de *Shigella* 1
 -)Y *E. roll 05*) y la produccion de enterotoxinas por copes de *Aeromonas*,
Pseudo-monas, *Klebsiella* y *Citrobacter* (22).

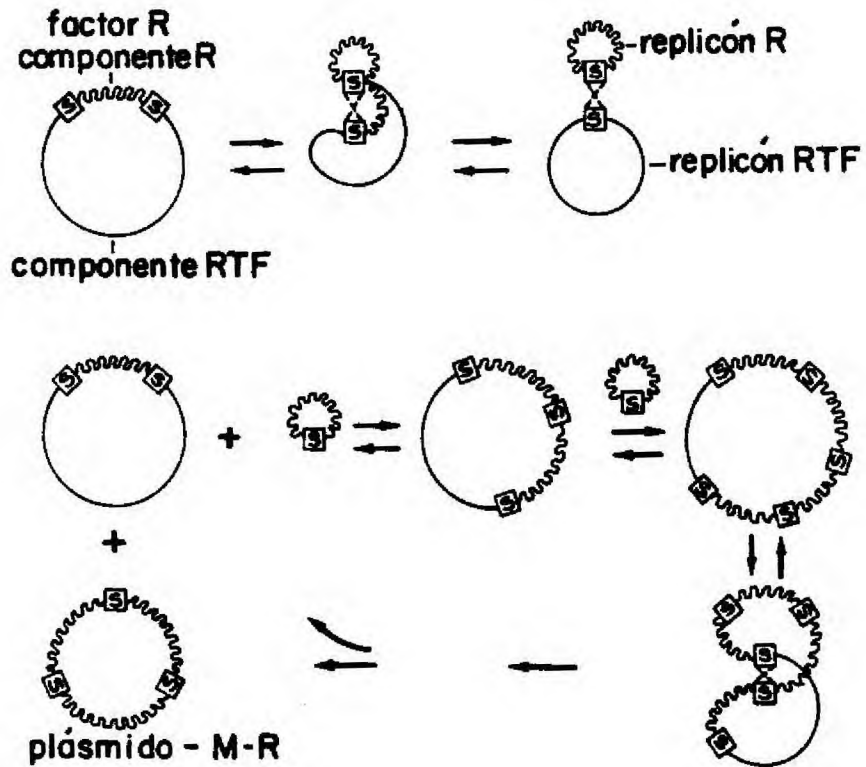


FIGURA 2

Mecanismo propuesto por Stanley Cohen (2) para explicar la asociación reversible de plásmidos de resistencia (Factor R) mediante secuencia de inserción ISL. Primero hay formación de replicones para el factor R y el Factor de transferencia de resistencia (FTR). Luego, ocurre integración de una unidad poligénica por las secuencias de inserción con inversos factores determinantes de resistencia. Finalmente ocurre disociación de la unidad poligénica en un plásmido de múltiple resistencia y el FTR.

MÉTODOS

Los métodos de laboratorio utilizados para determinar algunas características mediadas por plásmidos se indican en el Cuadro 3.

Para determinar la transferencia de resistencia, primero se seleccionan las bacterias resistentes posibles donadoras, en medio de MacConkey (McC) al cual

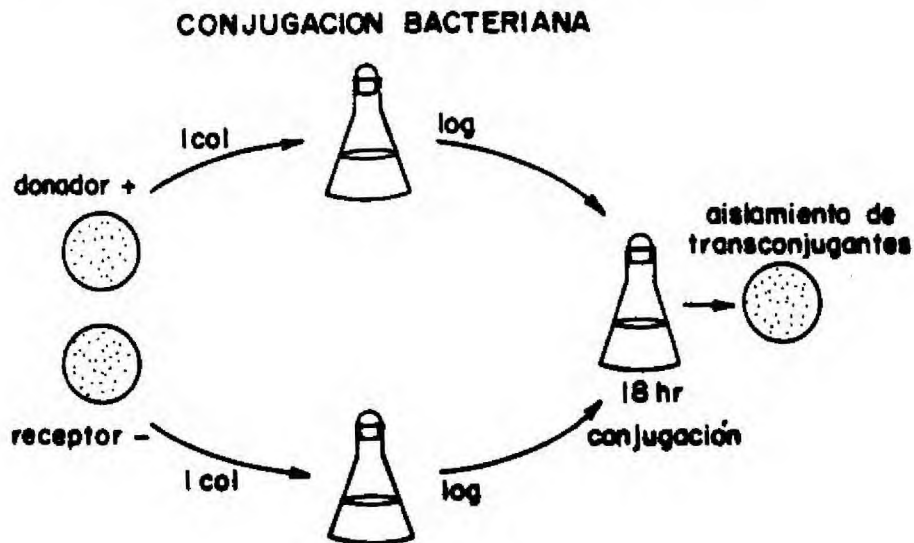


FIGURA 3

Conjugación bacteriana in vitro. EL donador y receptor se cultivan in agar Mac Conkey (McC) con antibioticos u otra droga selectiva, y luego se subcultiva en Geld° Pinauy a 37o C. Di atm se obtlanan dilucones al 2 por ciento qua se cultivan de 2 a 4 hors peva lowar el crecimiento logerftmico. Se mizolan 9 mililitros dil receptor con un rtililitro del donador y se incuben durante 18 horse a 37a C. Fineimente se subcultiva en McC pars sieccionar transconju• antes.

cual se Interests entre as molecules de ADN haciandolas fluorecer ants una fuente de Luz ultraviolet' de onda large (12). Baja tel condlcibn se toms una fotograf fa del gil empleando un filtro rob (A-25) pars detirminar las bandas de ADN qua hen migrado a difarentes velocidades y quo corresponden a los diferentes plasmidos.

El peso molecular di las particulas es inversamente proporclonal a la distends recorride. Utilizando como test*, bacteria que contemn Otani. dos de peso molecular conocido, si dibuja en una grafica el logaritmo de le distends recorrida contra el logaritmo del peso molecular. Sabre is curve treads se calculi el peso molecular di los plasmidos en Gaudio, sigan se ilustra en le Figura 4.

Para observar los plasmidos al mIcroscoplo electronic*, se coloca una Mu-den di 1 mg par ml de ADN bacteriano, sobre una rails do cobre recubierta con una membrane de colodion (3). La preparaciOn se tittle con una soluoitm de motat° de•uranilo al 2 %y se observe a microscopic electronico, Figura 5. La air-cunferencia de cads plasmido as directamante proporclonal a su peso molecular.

CUADRO 3

Virulencia bacteriana

Característica	Método de laboratorio
Resistencia a los antibióticos	Antibiograma (discos)
Toxina lábil	Inmunolisis pasiva y ELISA*
Toxina estable	Ensayo en ratones lactantes
Factor de colonización	Hemaglutinación y aglutinación con suero específico

- Enemy* inmunosorbióna do enámo conjugodo

a ls *hart* agrigado 20 ug par ml de cads antibiotica cuya resistencia se dewa invastigar. La cepa receptors qua se utilize con mis frecuencia es la *Escherichia coil* WI485, que es libri de plasmidos, resistantes al kid^o nalidixico por mutaclim y dependiente de ia timina par. su crecimiento. La deficiencia nutritional 'molds qua los transconjugentss puedan mallowse fuera del tubo de ensayo. Como is ihnta in la Figure 3, Unto el donador como el receptor m cultivan en caldo Penassay a 37^o C durance la nacho bajo agitacion constantes.

Dilutions al 2 %ea incuben a 37o C duranta 2 a 4 harm pare lograr la fase de crecimiento logaritmlco. Luigo se mezdán 9 mililitros del receptor y un mi-litro del donador pant asegurar asi un maximo de transferencia. Despuin de 18 bores de incubaclon a 37o C, se silaccionan los transconjugantes en media de MaC 00r1 20 pp par mi canto de &lido nalidixice coma de los antibioticos cuya resistencia se sospeche ha lido transmitida par conjugaciOn. La resistencia del transoonjugante so confims mediante prueba de sensibilidad a los antiblo-deo' (1).

Para estudiar is naturaleza de los plaamidos se utilizan mitodos coma la electroforesis y la microscopia electrica. Con was *micas si puede determinar el contenido de plismidos di la bacterlis, el peso molecular de los y corrilaciones sabre el origen, evolution a information codificada par los plismidos.

Pare ls electroforesis se extras el Mido desoxirribonucklico (ADN) bacti-riano par llis con lauril sulfato di sodio y precipitation en cloruro de sodlo y steno) (12). Se colocan de 25 a 50 microiltros del extract^o de ADN ail obte-nido en un gil di agerosa al 0,7 is y se hoes migrar par 2 haras a 120 voltios. El gel se sumergi en una solution de 0,4 ,ug par ml de bromuro de etidio, al

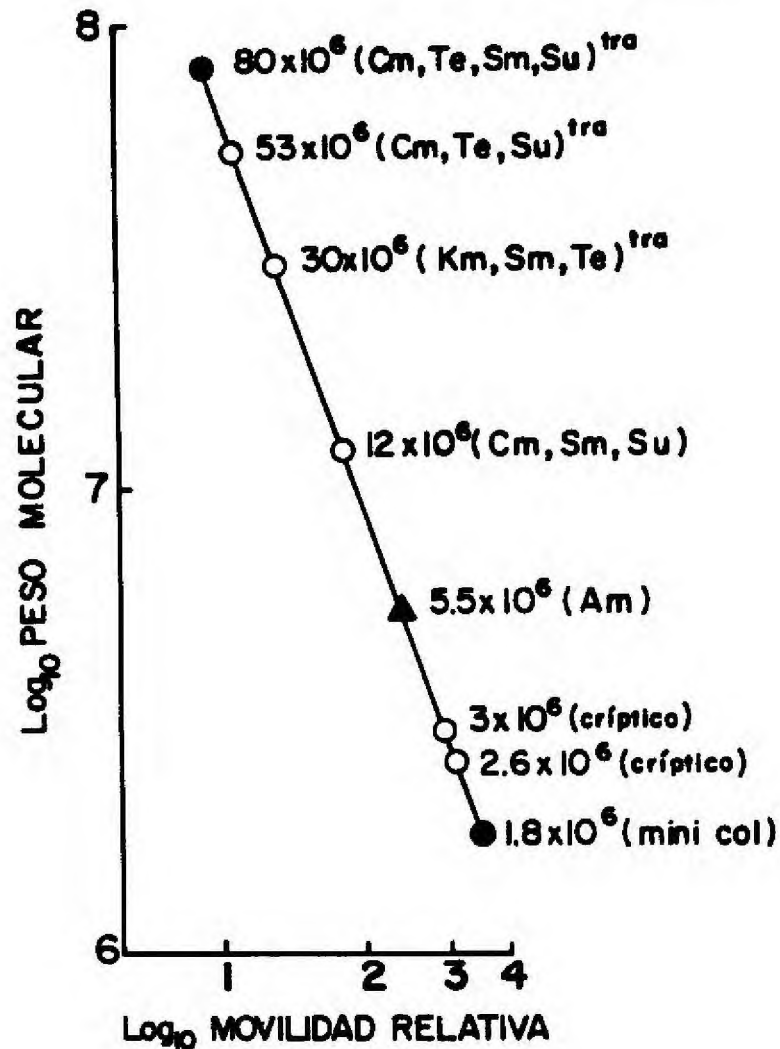


FIGURA 4

Determinación del peso molecular de plásmidos según Meyers et al (12). Plásmidos de peso molecular conocido (●), plásmidos de Manias aisladas de cadent., del Hospital de Niños (○) Dos plásmidos son cripticos (criptico). El plásmido I) codifica la resistencia a la ampicilina en *Shigella dysenteriae* 1.

Utilizando variaciones en la estructura se pueden estudiar además las características de replicación (9) y las secuencias repetidas de nucleótidos (16). Estos y otras técnicas de biología molecular permiten caracterizar claramente propiedades de patogenicidad y virulencia de las bacterias, que permitan comprender mejor la etiopatogénesis de la enfermedad.

Fin(manta, smitten bionics: pars modllicar artificialmente el ginoma bac tartan° y asf aumentar, por ejemplo, melanin metaballcas poco acentuadas o qw Inlcluse no (mistiest dil todo en la bacteria ancestral.

Los procedlmisntos y metodologla empleados en la produccien de tales mi. croorganismos son objeto de un intenso debate actual por sus implicaciones ideas, OIL Ellos conforman lo cue ha lido denominado "cirugfa o ingenieria genetics",

Aspectos positivos son il Noborue logrado el desarrollo de nuevas bacterial, una de alias la *E. coil* sintatizadora de muchas copias de le moleculc de entero• toxlna (20) lo qua thine inter& futuro pars el control y prevenciOn de la diarrea.

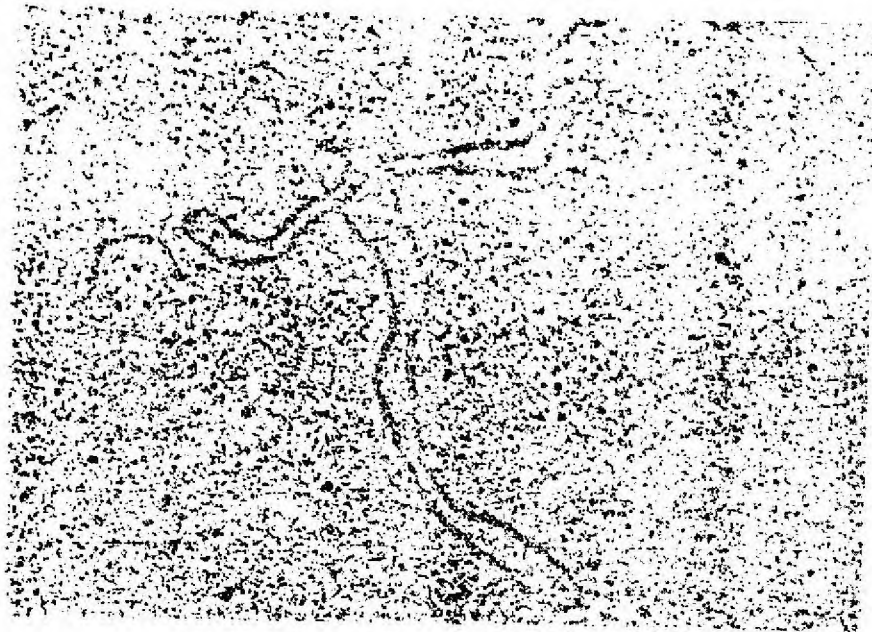


FIGURA 5

Fotografía al microscopio electrónico del ADN del plásmido de resistencia a la ampicilina en *Shigella dysenteriae* 1, 140.000 X.
La longitud del hilo es de 2,7 micras, lo que denota un peso molecular de $5,1 \times 10^6$ daltons, según la relación: 1 micra = $1,9 \times 10^6$ daltons (3).

RESUMEN

Se revisan conceptos básicos sobre los plásmidos **desoxirribonucleico extracromosómico con replicación autónoma— presentes en el citoplasma bacteriano. Se hace énfasis en plásmidos que codifican factores de virulencia como la resistencia a las drogas y la producción de enterotoxinas. Se describen técnicas de laboratorio para el estudio de plásmidos, tales como la conjugación bacteriana in vitro, electroforesis en gel de agarosa y la microscopía electrónica.**

Las técnicas permiten determinar la transmisibilidad, tamaño, forma y peso molecular de los plásmidos.

SUMMARY

Basic concepts on plasmids —rings of extrachromosomal deoxyribonucleic acid with autonomous replication— present in the cytoplasm are reviewed. Emphasis is made on plasmids coding for virulence factors such as drug resistance and enterotoxin production. Laboratory techniques for the study of plasmids are described. These are: bacterial conjugation in vitro, agarose gel electrophoresis and electron microscopy. Techniques permit determination of transmissibility, size, form and molecular weight of plasmids.

BIBLIOGRAFIA

1. **Bauer, A.W., W.M.M., Kirby, J.C. Shams K. M. Turck.**
Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method.
Amer.J. Clin. Path., 45: 493, 1966.
2. **Cohen, S.**
Transposable genetic elements and plasmid evolution.
Nature, 263: 731, 1976.
3. **Davis, R.W., M.N. Simon K. N. Davison.**
En; Methods in Enzymology, 20 L. Grossman K. K. Moldave, eds.
(New York: Academic Press), Vol. 21, parte 0, p. 413, 1971.
4. **Dulbecco, R. K. H.S. Ginsberg.**
Lysogeny, epitomes and transducing bacteriophages. En:
Microbiology. B. D., Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B.
Wood K. M. Mc Carty, (editores). Harper y Row Publishers Inc. II
edicion, P. 1087, 1975.
5. **Evans, D.G., R.P. Silver, D.J. Evans, D.G. Chase K. S.L. Gorbach,**
Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in
ESche. *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans.
Infect. Immun., 12; 656, 1975.
6. **Falkow, S.**
The sex factor, F, and temperate phages. En: Infectious multiple drug
resistance, J.R. Lagnado (editor). Pion Limited, Londres, p. 8, 1975.
7. **Falkow, S.**
Plasmids which contribute to the pathogenicity of enteric organisms.
En: Infectious multiple drug resistance. J.R. Le3nado (editor). Pion
Limited, Londres, p. 253, 1975.175.
8. **Grobstein, C.**
The recombinant-DNA debate. Sci.Am., 237: 22, 1977.
9. **Helinski, D.R.**
Plasmid DNA replication.
Fed. Proc., 36: 2016, 1976.
10. **Lederberg, J., L.L. Cavalli-Sforza K. E.M. Lederberg.**
Sax compatibility in *Escherichia coli*.
Genetics, 37: 720, 1952.

11. Mata, L.J., E.J. Gangarosa, A. Caceres, D.R. Perera K. M.L. Mejicanos
Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. I Etiologic investigations in Guatemala, 1969. *J. Infect. Dis.*, 122: 170, 1970.
12. Meyers, J.A., D. Sanchez, LP. Elwell K. S. Falkow.
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid.
J. Bact., 127: 1529, 1976.
13. Mitsuhashi, S.
Transferable drug resistance factor R.
S. Mitsuhashi, (editor) University of Tokyo, Press. pp. 203, 1971.
14. Novick, R.P., R.C. Clowes, S.N. Cohen, R. Curtis III, N. Datta K. S. Faikow
Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal.
Bact. Rev., 40: 168, 1976. 76.
15. Ogawa, H., A. Nakamura K. R. Sakazaki.
Pathogenic properties of "enteropathogenic" *Escherichia coli* from diarrhea' children and adults.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 21: 333, 1968.
16. Ohtsubo, H. K. E. Ohtsubo.
Isolation of inverted repeat sequences, including 151, 152 and 153, in *Escherichia coli* plasmids.
Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 73: 2316, 1976.
17. Diane, J. K. E. Galindo
Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4: 597, 1973
18. Sereny, B.
Experimental *Shigella* Kerato-conjunctivitis: a preliminary report.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 2: 293, 1955.
19. Smith, H.W. K. M. A. Linggood.
Observations on the pathogenic properties of the K-88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microb.*, 4: 467, 1971.
20. So, M., H.W. Boyer, M. Betlack K. S. Falkow.
Molecular cloning of an *E. coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin.

22 REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIAOSDR.CARLOS SAENZ HERRERA

21. **Wachsrnuth, I.K., S. Falkow K. R. W. Ryder.**
Plasmid mediated properties of heat stable-enterotoxin-producing
Escherichie coli associated with infantile diarrhea.
Infect. Immun., 14: 403, 1976.

22. **Wdstrom, T., A.; Aust-kettis, D.; Habte, J,; Homgren, G.; Meeuwisse,**
R. Molky K. O. Vaderlind.
Enterotoxin producing bacteria, and parasites in stools of Ethiopian
childrin with diarrhoeal disease.
Arch. DIs. Childhood., 51: 865, 1976.