

PLASMIDOS DE VIRULENCIA

María Elena Peñaranda¹ y Leonardo Mata^{1,2}

GENERALIDADES

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

Los plásmidos fueron descritos como factores de fertilidad ("factores F") debido a que son capaces de inducir la conjugación bacteriana y transmitirse así 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 proteínico (mediante una fimbria o pilus sexual) con la bacteria receptora (F⁻) (6). El contacto celular 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 plásmidos 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 Hfr (high frequency of recombination) por presentar alta frecuencia de recombinación (6).

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

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

En la última década, se ha demostrado que los plásmidos son elementos responsables de más de doce características adquiribles, algunas de las cuales se

1. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Universidad de Costa Rica.

2. Ministerio de Salud y Caja Costarricense de Seguro Social. San José, Costa Rica.

12 REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR. CARLOS SAENZ HERRERA
 resumen en el Cuadro 1. Entre éstas interesa resaltar aquellas que confieren
 virulencia a las bacteriás, Cuadro 2.

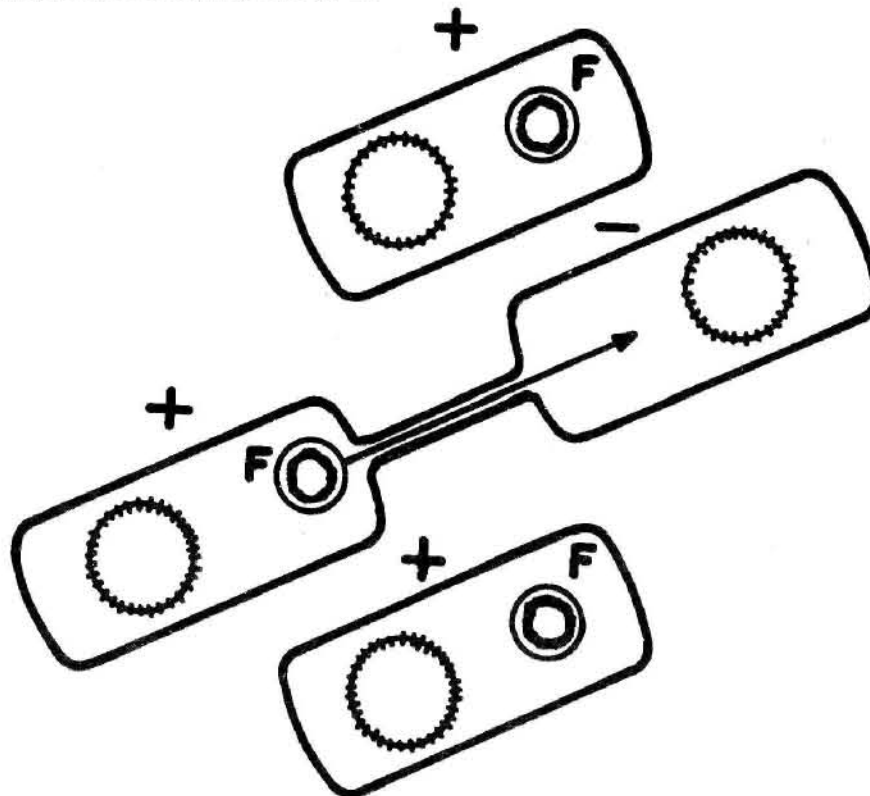


FIGURA 1

Representación diagramática de dos bacterias en conjugación. La donadora (F +) por medio del pilus 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 mediadas por plásmidos

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

CUADRO 2

Cualidades bacterianas de importancia clínica,
mediadas por plásmidos

Característica	Plásmido
Producción de hemolisinas	Hly
Producción de colicinas	Col
Producción de toxina lábil y toxina estable	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, estreptomina y sulfonamidas (13).

El mecanismo genético para explicar la adquisición de múltiple resistencia 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 estable, 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* poseían el FRM, lo que dificultó 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. CARLOS SAENZ HERRERA
 dad de invasión (invasividad) de la mucosa intestinal por cepas de *Shigella* (18) y
E. coli (15) y la producción de enterotoxinas por cepas de *Aeromonas*, *Pseudo-*
monas, *Klebsiella* y *Citrobacter* (22).

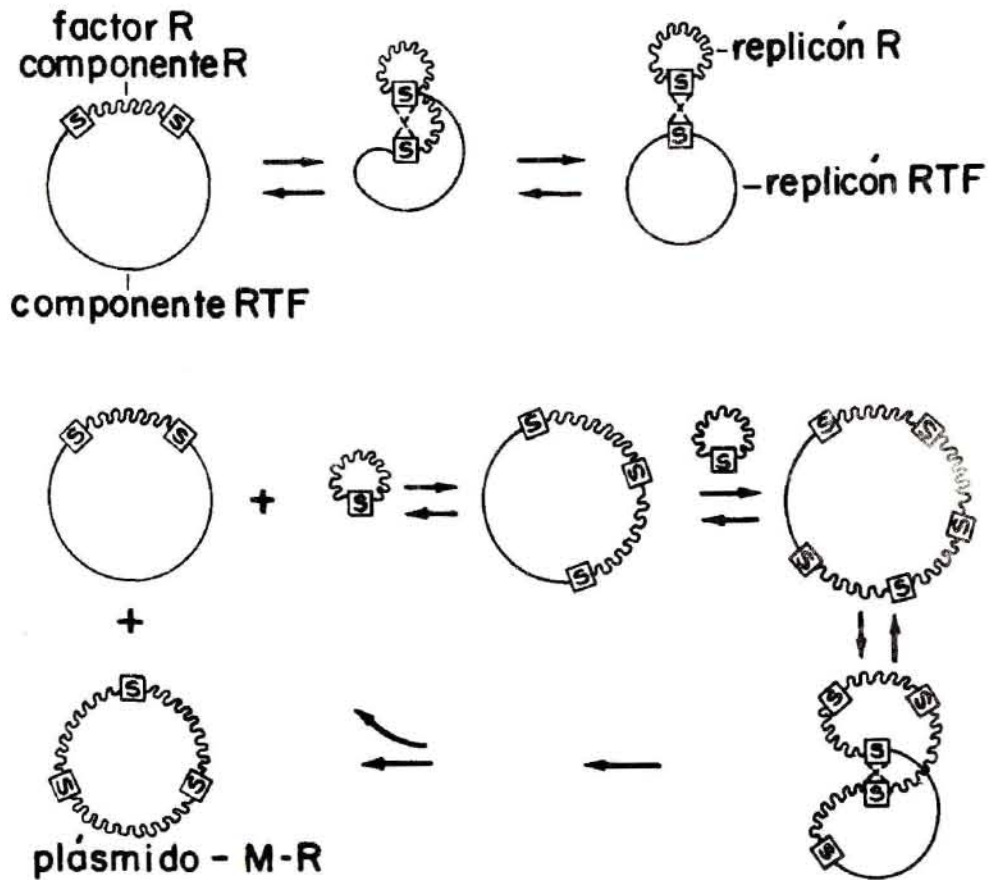


FIGURA 2

Mecanismo propuesto por Stanley Cohen (2) para explicar la asociación reversible de plásmidos de resistencia (Factor R) mediante la 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 varios factores determinantes de resistencia. Finalmente ocurre disociación de la unidad poligénica en un plásmido de múltiple resistencia y el FTR.

METODOLOGIA

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 Mac Conkey (McC) al cual

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

* Ensayo inmunosorbente de enzima conjugada

se le han agregado 20 ug por ml de cada antibiótico cuya resistencia se desea investigar. La cepa receptora que se utiliza con más frecuencia es la *Escherichia coli* W1485, que es libre de plásmidos, resistente al ácido nalidíxico por mutación y dependiente de la timina para su crecimiento. La deficiencia nutricional impide que los transconjugantes puedan replicarse fuera del tubo de ensayo. Como se ilustra en la Figura 3, tanto el donador como el receptor se cultivan en caldo Penassay a 37 ° C durante la noche bajo agitación constante.

Diluciones al 2 % se incuban a 37 ° C durante 2 a 4 horas para lograr la fase de crecimiento logarítmico. Luego se mezclan 9 mililitros del receptor y un mililitro del donador para asegurar así un máximo de transferencia. Después de 18 horas de incubación a 37 ° C, se seleccionan los transconjugantes en medio de McC con 20 µg por ml tanto de ácido nalidíxico como de los antibióticos cuya resistencia se sospecha ha sido transmitida por conjugación. La resistencia del transconjugante se confirma mediante prueba de sensibilidad a los antibióticos (1).

Para estudiar la naturaleza de los plásmidos se utilizan métodos como la electroforesis y la microscopía electrónica. Con estas técnicas se puede determinar el contenido de plásmidos de las bacterias, el peso molecular de los plásmidos y correlaciones sobre el origen, evolución e información codificada por los plásmidos.

Para la electroforesis se extrae el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano por lisis con lauril sulfato de sodio y precipitación en cloruro de sodio y etanol (12). Se colocan de 25 a 50 microlitros del extracto de ADN así obtenido en un gel de agarosa al 0,7 % y se hace migrar por 2 horas a 120 voltios. El gel se sumerge en una solución de 0,4 µg por ml de bromuro de etidio, el

CONJUGACION BACTERIANA

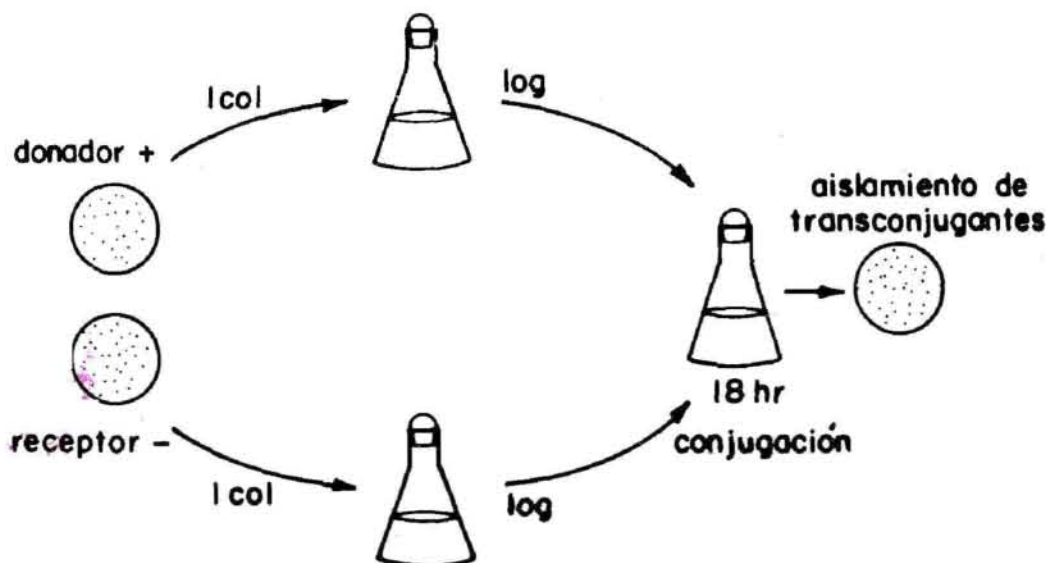


FIGURA 3

Conjugación bacteriana in vitro. El donador y receptor se cultivan en agar Mac Conkey (McC) con antibióticos u otra droga selectiva, y luego se subcultiva en caldo Penassay a 37 ° C. De éstos se obtienen diluciones al 2 por ciento que se cultivan de 2 a 4 horas para lograr el crecimiento logarítmico. Se mezclan 9 mililitros del receptor con un mililitro del donador y se incuban durante 18 horas a 37 ° C. Finalmente se subcultiva en McC para seleccionar transconjugantes.

cual se intercala entre las moléculas de ADN haciéndolas fluorecer ante una fuente de luz ultravioleta de onda larga (12). Bajo tal condición se toma una fotografía del gel empleando un filtro rojo (A-25) para determinar las bandas de ADN que han migrado a diferentes velocidades y que corresponden a los diferentes plásmidos.

El peso molecular de las partículas es inversamente proporcional a la distancia recorrida. Utilizando como testigo bacterias que contienen plásmidos de peso molecular conocido, se dibuja en una gráfica el logaritmo de la distancia recorrida contra el logaritmo del peso molecular. Sobre la curva trazada se calcula el peso molecular de los plásmidos en estudio, según se ilustra en la Figura 4.

Para observar los plásmidos al microscopio electrónico, se coloca una dilución de 1 mg por ml de ADN bacteriano, sobre una rejilla de cobre recubierta con una membrana de colodión (3). La preparación se tiñe con una solución de acetato de uranilo al 2 % y se observa al microscopio electrónico, Figura 5. La circunferencia de cada plásmido es directamente proporcional a su peso molecular.

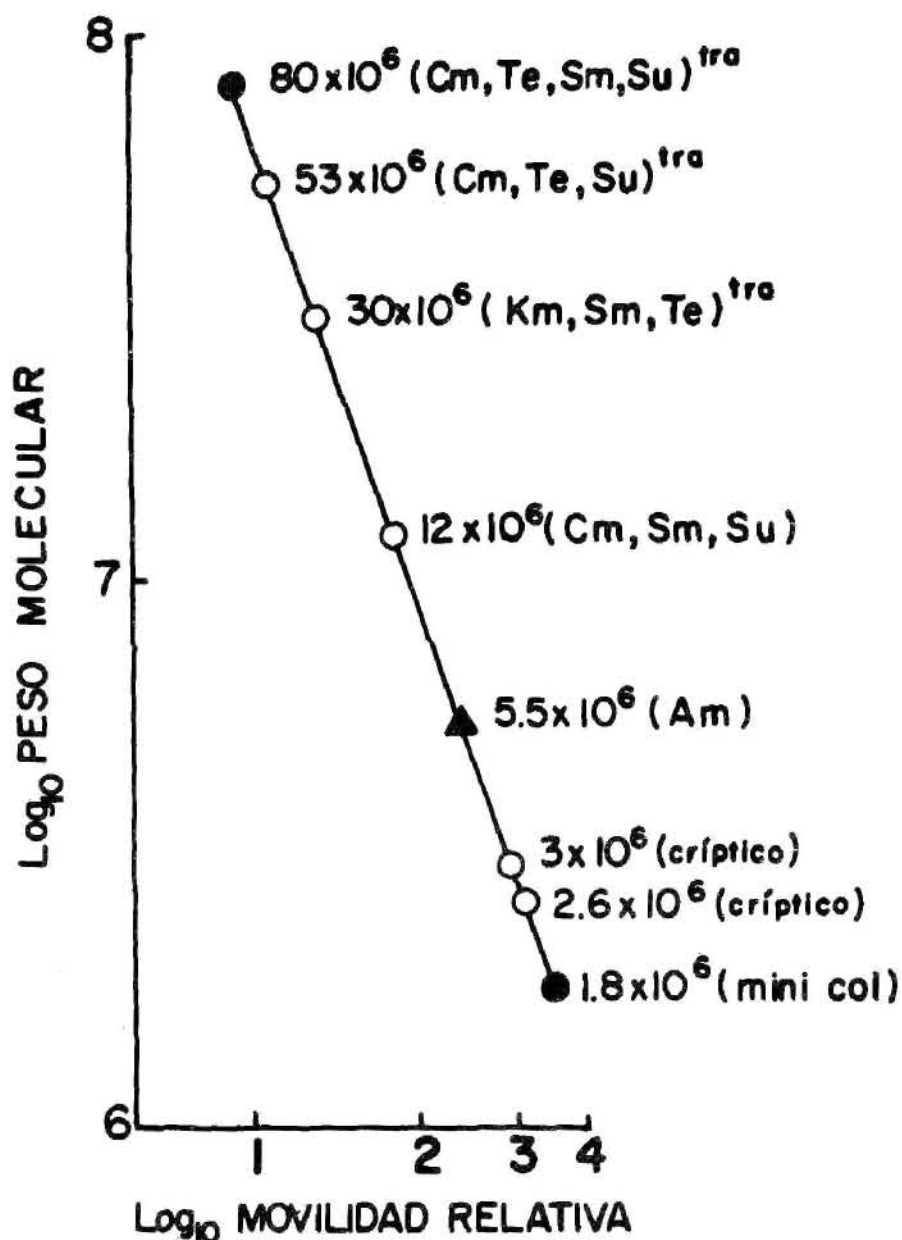


FIGURA 4

Determinación del peso molecular de plásmidos según Meyers et al (12). Plásmidos de peso molecular conocido (●), plásmidos de bacterias aisladas de pacientes del Hospital de Niños (○). Dos plásmidos son crípticos (críptico). El plásmido (▲) codifica la resistencia a la ampicilina en *Shigella dysenteriae* 1.

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

Finalmente, existen técnicas para modificar artificialmente el genoma bacteriano y así aumentar, por ejemplo, acciones metabólicas poco acentuadas o que incluso no existían del todo en la bacteria ancestral.

Los procedimientos y metodología empleados en la producción de tales microorganismos son objeto de un intenso debate actual por sus implicaciones éticas, (8). Ellos conforman lo que ha sido denominado "cirugía o ingeniería genética".

Aspectos positivos son el haberse logrado el desarrollo de nuevas bacterias, una de ellas la *E. coli* sintetizadora de muchas copias de la molécula de enterotoxina (20) lo que tiene interés futuro para el control y prevención de la diarrea.

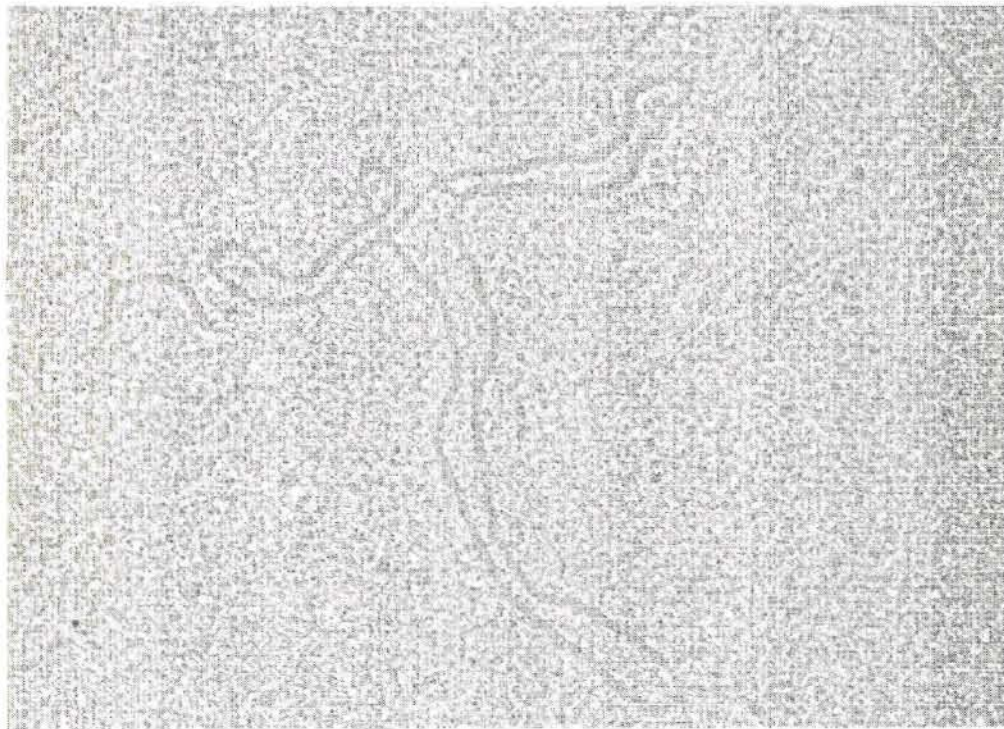


FIGURA 5

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 —ácido 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, número, 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. Sherris & 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 & N. Davison.
En: *Methods in Enzymology*, 20 L. Grossman & K. Moldave, eds.
(New York: Academic Press), Vol. 21, parte D, p. 413, 1971.
4. Dulbecco, R. & H.S. Ginsberg.
Lysogeny, episomes and transducing bacteriophages. En: *Microbiology*.
B. D., Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood & M.
Mc Carty, (editores). Harper y Row Publishers Inc. II edición, P. 1087,
1975.
5. Evans, D.G., R.P. Silver, D.J. Evans, D.G. Chase & S.L. Gorbach.
Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Esche-
richia 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. Lagnado (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., 35: 2016, 1976.
10. Lederberg, J., L.L. Cavalli-Sforza & E.M. Lederberg.
Sex compatibility in *Escherichia coli*.
Genetics, 37: 720, 1952.

11. Mata, L.J., E.J. Gangarosa, A. Cáceres, D.R. Perera & 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. Sánchez, L.P. Elwell & 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 & S. Falkow
Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal.
Bact. Rev., 40: 168, 1976. 76.
15. Ogawa, H., A. Nakamura & R. Sakazaki.
Pathogenic properties of "enteropathogenic" *Escherichia coli* from diarrheal children and adults.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 21: 333, 1968.
16. Ohtsubo, H. & E. Ohtsubo.
Isolation of inverted repeat sequences, including ISI, IS2 and IS3, in *Escherichia coli* plasmids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2316, 1976.
17. Olarte, J. & 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. & 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 & S. Falkow.
Molecular cloning of an *E. coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin.
J. Bact., 128: 463, 1976.

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

22. Wdström, T., A.; Aust-kettis, D.; Habte, J,; Homgren, G.; Meeuwisse,
R. Mølky & O. Söderlind.
Enterotoxin producing bacteria, and parasites in stools of Ethiopian
children with diarrhoeal disease.
Arch. Dis. Childhood., 51: 865, 1976.