



COMPARACION POR RIBOTIPIA DE CEPAS DE SALMONELLA TYPHI AISLADAS EN EL HOSPITAL ROOSEVELT, GUATEMALA (1986 / 2000 - 2003)

Licdas. Fcia. Lillian Martínez¹, Olga Torres², Rafael Pradesaba.²

¹Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

²Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP

Resumen: Previo a 1990, el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Roosevelt, atendía frecuentemente casos de fiebre tifoidea con complicaciones severas. La ausencia de cepas de *S. typhi* resistentes a antibióticos y la falta de factores predisponentes identificables del hospedero, sugirieron la posible existencia en el país, de variantes de *S. typhi* más agresivas. Se estudió un total de 97 cepas de *S. typhi* aisladas en el Hospital Roosevelt durante 1986, 1990 y 2000-2003. Solamente se tuvo acceso a 21 historias clínicas que, aún siendo pocas, presentaron cursos clínicos diferentes, algunos con complicaciones y otros sin ninguna complicación.

Objetivos: Comparar los ribotipos obtenidos de las cepas estudiadas. Determinar diferencias y/o similitudes entre éstos.

Material y métodos: El ADN genómico fue extraído utilizando tiocianato de guanidinio y digerido con la enzima de restricción *Pst*I. Se tipificó por ribotipia con una sonda de ADN ribosomal marcada con Digoxigenina. Para el análisis de clusters se utilizó el programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6 y para el análisis discriminante y dendrograma se utilizó el SPSS 10.0.

Resultados: Se encontró una diversidad muy alta en las cepas de *S. typhi* estudiadas. Las cepas del año 1986 fueron muy parecidas a las del 2001. El año en que las cepas presentaron mayor diversidad fue 2003. Algunas cepas fueron genéticamente distantes al resto estudiado. Otras cepas eran muy parecidas entre sí, conservando sus características a través del tiempo.

Al comparar las cepas según la complicación presentada, se encontraron bandas que les eran comunes, sugiriendo que en el genoma de dichas cepas existan genes que codifican características que hacen a estas cepas capaces de producir complicaciones específicas.

Biodiversidad. Cepas S. Typhi. Patogenio. Complicaciones.

Abstract: Prior to 1990, it was common that the Infectious Diseases Service of Hospital Roosevelt of Guatemala treated cases of Typhoid Fever with severe complications. The absence of antibiotic resistance in the *Salmonella typhi* strains cultured, and the lack of predisposing identifiable factors in the host, suggested the presence of more virulent variants of *S. typhi* during that period. To investigate such possibility, we studied 97 strains of *S. typhi* isolated at Hospital Roosevelt during 1986 (43), 1990 (3), 2000 (8), 2001 (16), 2002 (14) and 2003 (13).

The isolates were ribotyped using the restriction enzyme *Pst*I in order to identify the variants among these *S. typhi* strains and to determine any difference and/or similarity between them.

The results obtained suggest marked diversity among the *S. typhi* strains present in Guatemala City. The strains from 1986 were similar to the strains from 2001; strains from year 2003 had the greatest diversity. When the strains were stratified by the presence and type of clinical complication occurred, there were bands common to the strains isolated from cases with complications.

This suggest the existence, within these strains genome, of genes capable to codify pathogenic characteristics which enable them to produce specific complications.

Biodiversity. S. typhi strains. Pathogenicity complications.

INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es causada por una bacteria Gram-negativo conocida como *Salmonella enterica* serovar *typhi* y tiene como único hospedero al ser humano (1). El cuadro clínico de la enfermedad se inicia con malestar general, debilidad, pérdida de apetito, dolor de cabeza y altas fiebres (1, 2). La fiebre tifoidea puede presentar complicaciones potencialmente mortales que incluyen toxemia, miocarditis, neumonía (3) y las más severas como sangrado intestinal y perforación del intestino delgado (4). En la actualidad, la fiebre tifoidea es endémica en Guatemala y desde el año 2001, es una enfermedad de notificación obligatoria en el país, estando incluida dentro del Sistema de Información Gerencial de Salud (SIGSA). Desde hace muchos años la fiebre tifoidea se ha presentado en Guatemala con variada agresividad. Esta investigación identificó diferencias genéticas entre las cepas aisladas en un mismo año y a través de los años, obteniendo así, clonas que han circulado en nuestro país desde 1986. Para determinar las diferencias genéticas entre las cepas, se utilizó la técnica de ribotipia que consiste en obtener patrones de la región del DNA que codifica la síntesis de proteínas; estos patrones son marcadores genómicos valiosos, ya que se conservan en las bacterias. La ventaja de la ribotipia sobre la huella digital es que reduce en gran manera el número de bandas y facilita así, las comparaciones entre cepas muy similares (5).

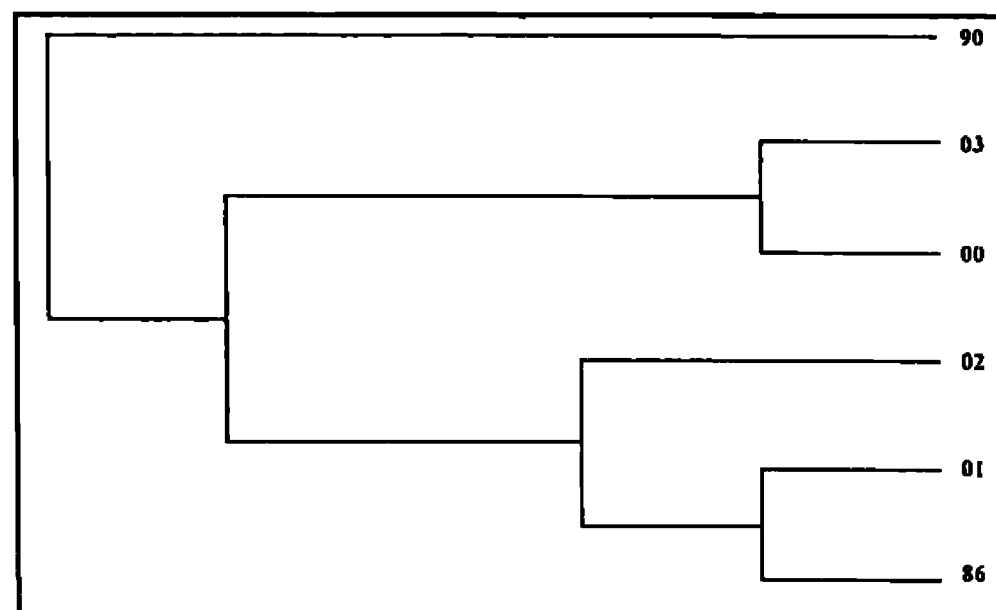
MATERIAL Y METODOS

Esta investigación presenta un muestreo estadístico por conveniencia. Se estudiaron un total de 97 cepas de *S. typhi* aisladas en el hospital Roosevelt durante 1986 (43), 1990 (3), 2000 (8), 2001 (16), 2002 (14) y 2003 (13). La identificación y la susceptibilidad a antibióticos de las cepas fueron realizadas en el laboratorio de infectología del Hospital Roosevelt; no se encontró ninguna cepa resistente a los antibióticos. La ribotipia fue realizada en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). El ADN genómico fue extraído por medio de la técnica de tiocianato de guanidinio (6). El

ADN fue digerido con la enzima de restricción *Pst*I (7); Luego, el ADN digerido fue separado por electroforesis en gel de agarosa (0.7% en buffer TBE) a 20 V por 16 a 18 h. y luego transferido a una membrana de nylon de carga positiva (6). Posteriormente, se hibridizó con una sonda de ADN ribosomal (16S-23S RNA de *Escherichia coli*) marcada previamente con Digoxigenina (6,7). Para el análisis de resultados se utilizó el programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6 y para el análisis discriminante y los clusters el SPSS 10.0.

RESULTADOS

De las 97 muestras de ADN cromosomal de *S. typhi* digeridas con *Pst*I se obtuvieron bandas con pesos moleculares de 5187 a 27069 kb. El análisis del cluster de los ribotipos por año, mostró que existe una gran similitud entre las cepas de 1986 y de 2001 y las cepas de 2000 y 2003 (Gráfica 1). El análisis discriminante de los años confirmó lo anterior mostrando que el año 2003 presenta la mayor diversidad de cepas (Gráfica 2). En el análisis de clusters por año se observó diversas agrupaciones de cepas para 1986; para 1990, tres únicos aislamientos que son completamente diferentes entre sí para 2000, dos grandes grupos de cepas; para 2001, tres grandes grupos de cepas; para 2002, tres grandes grupos y tres cepas completamente distintas del resto y para 2003 tres grupos de cepas muy distintos entre ellos. Según e



Gráfica 1. Análisis del cluster de los ribotipos por año. Tres aislamientos incluidos para el año 1990, 13 aislamientos para el 2003, 8 aislamientos para 2000, 14 aislamientos para el 2002, 16 aislamientos para el 2001 y 43 aislamientos para 1986.

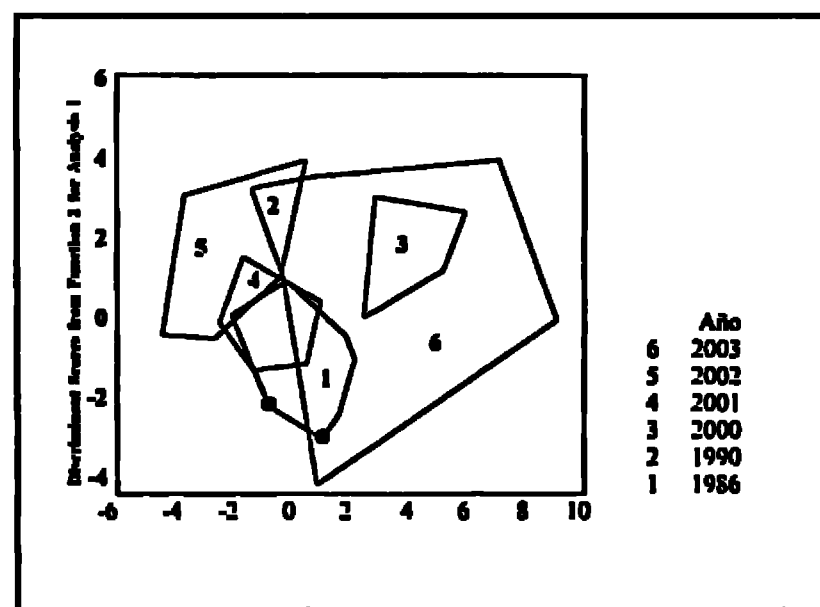


endrograma de todos los ribotipos obtenidos, se observaron agrupaciones que incluyen cepas de 1986, 2001, 2002 y 2003 (Gráfica 2). Al agrupar los ribotipos de las cepas presentes en una determinada complicación, se observaron bandas en común. Las tres cepas involucradas en compromiso hepático poseen dos bandas en común (11224 kb y 7201 kb); las dos cepas involucradas con neumonía poseen dos bandas en común (14035 kb y 11224 kb); las dos cepas involucradas con endocarditis poseen dos bandas en común (13021 kb y 11224 kb); las cepas involucradas con pancreatitis poseen dos bandas en común (11224 kb y 7201 kb); las dos cepas involucradas con perforación intestinal y hemorragia gastrointestinal, respectivamente, poseen una banda en común (7201 kb) y carecen de la banda 11224 kb, que la mayoría de las cepas del estudio presentan. La cepa obtenida de un portador crónico, posee una banda (8063 kb) que no está presente en ninguna otra cepa de las estudiadas con historia clínica. Las tres cepas que no están involucradas en ninguna complicación son muy diferentes entre ellas, puesto que no presentan ninguna banda en común.

DISCUSION DE RESULTADOS

La caracterización molecular de las cepas de *S. typhi* aisladas en el Hospital Roosevelt durante 1986, 1990, 2000, 2001, 2002 y 2003 muestra una alta diversidad. Estos resultados excluyen la diseminación de una variante única de *S. typhi* en Guatemala. Estudios realizados en continentes como Asia y Europa, han sugerido que la endemicidad y los brotes de fiebre tifoidea pueden estar asociados con ribotipos predominantes (8) o con muchos ribotipos de *S. typhi* (9), como lo observado en el presente estudio. La gran variabilidad de ribotipos puede ser debido a múltiples fuentes de infección, lo cual significaría fallas en el saneamiento (10,11).

Los resultados muestran variantes de *S. typhi* de 1986 muy similares a las variantes del 2001; lo que puede sugerir reordenamientos en el ADN de la bacteria. Ha sido reportado que *la S. typhi* puede experimentar cambios en su genoma por transferencia horizontal, incluyendo mecanismos como transducción (bacteriófago mediado), conjugación (plásmido mediado) o transformación (1).



Gráfica 2. Análisis discriminante de los años, utilizando el programa SPSS 10.0. El tamaño de cada polígono refleja la diversidad de los aislamientos para ese año, con un mayor tamaño reflejando mayor diversidad. Además, la sobreposición entre polígonos refleja similitud entre los aislamientos de esos años.

El dendrograma de 1990 indica que se trata de cepas muy diferentes del resto de los años; sin embargo, se contó únicamente con tres aislamientos, por lo que podría no ser significativo. El análisis discriminante muestra que las cepas más homogéneas entre sí son las de 1986 y las de mayor diversidad son las de 2003, lo cual podría reflejarse en presentaciones clínicas muy diferentes.

Se observó que dos cepas de 1986, identificadas como 30 y 10303, son las más distantes genéticamente del grupo y se desconoce la razón de tal diferencia. Tampoco se cuenta con los cuadros clínicos de los pacientes contagiados con estas cepas. Son necesarios otros estudios para profundizar sobre estas diferencias tan marcadas, que pudieran involucrar mecanismos de virulencia no vistos en otras cepas.

Dos cepas de 1986 son idénticas entre sí. Sin embargo, no se cuentan con los archivos para poder identificar si eran cepas aisladas de un mismo paciente, del mismo tipo de muestra o al mismo tiempo en el curso de la enfermedad. Se tienen otras dos cepas idénticas, una de 2001 y la otra de 2002. Esto podría significar que la cepa ha conservado sus características a través del tiempo y posiblemente es transmitida por un foco que continúa latente o un portador crónico.

Se observó que tres cepas aisladas en agosto de 2001, de diferentes pacientes, presentaron la mayoría de bandas en común. Esto sugiere un posible brote; sin embargo, se necesitaría de la procedencia de los pacientes para poder trazar un mapa con posibles fuentes comunes de contaminación y el



archivo médico de dichos pacientes no refería en detalle este dato. Lo anterior recalca la importancia de la ribotipia (5) como una herramienta valiosa en la determinación de brotes epidémicos.

Al comparar los ribotipos de los casos con historias clínicas completas, que sufrieron complicaciones, se observaron bandas en común, lo que da lugar a la posible localización de segmentos (de genes) que codifiquen características que hacen a estas cepas capaces de provocar complicaciones específicas. Estas bandas en común se conservan a través de los años. Sin embargo, el intervalo de tiempo es de 1 ó 2 años, por lo que se deberá estudiar en el futuro si estas bandas se conservan por mayores intervalos de tiempo. Las cepas aisladas de pacientes sin complicaciones, presentan patrones de restricción muy diferentes entre sí y entre los obtenidos de cepas involucradas en complicaciones.

La cepa aislada de un portador crónico, solamente posee una banda que no está presente en ninguna otra cepa de las estudiadas con historia clínica. Esto sugiere, que este tipo de cepas debe poseer diferencias muy sutiles, lo que concuerda con el hecho de que deben evadir muy bien al sistema inmune para poder localizarse en las vías biliares y multiplicarse cuando lo requieran (1, 2).

CONCLUSIONES

1. Existe una alta diversidad de *S. typhi* en Guatemala. No hay variantes que predominen.
2. La ribotipia es una herramienta útil para la epidemiología molecular, ya que permite discriminar entre cepas de la misma bacteria, comparando su ADN ribosomal, el cual es muy conservado.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), por abrir sus puertas para la realización de toda la investigación y a su personal, especialmente a Teresa Vélez por toda su ayuda.

Al Hospital Roosevelt, especialmente, al Dr. Claudio Ramírez y la Dra. Iris Cazali, por toda su colaboración.

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), particularmente a la Dra. Carlota Monroy, Sandoval Pineda y Patricia Landaverde, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Wain J, et al. Unlocking the genome of the human typhoid bacillus. March 2002. Lancet Infectious Disease. Vols. 2, Vol. 2. Pp. 163-169.
2. House, D, et al. Typhoid fever: pathogenesis and disease. Current Opinion in Infectious Diseases 2001. Oct 14:5 573-8.
3. Levine MM. Typhoid fever vaccines. In Plotkin SA, Orenstein WA Vaccines 3rd. Ed. Saunders Company 1999; 781-814
4. Hook, E. *Salmonella* species (including typhoid fever). In Principles and Practice of Infectious Diseases 3rd. Ed. Mandell GL et al. Churchill Livingstone 1990, Pp. 1700-1716.
5. Altwegg, M. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J. Infect. Dis. 1989. Pp. 145-149.
6. Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1st. Ed. USA, 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. Vol. 1 Pp. 97, 150, 157, 161, 162, 163 Chapter 7.
7. Roche Diagnostic GmbH. <http://roche-applied-science.com/> Germany, 2004.
8. Mather, K. Molecular techniques in the study of *Salmonella typhi* in epidemiologic studies. 1986 Am. J. Trop. Med. Hyg. Pp. 831-835.
9. Mourad, A. Multiple-drug resistant *Salmonella typhi*. Clin. Infect. Dis. Pp. 135-136.
10. Medina, E. Fiebre Tifoidea en Chile, consideracion epidemiológicas. Rev. Méd. Chile 1983. Pp. 609-615
11. Morris, J. Typhoid fever in Santiago, Chile 1984: a study of household contacts of pediatric patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. Pp. 1198-1202.
12. Altwegg, M. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J. Infect. Dis. 1989. Pp. 145-149.