

***Escherichia coli*, comensal Multidrogo-resistente en niños de Perú y Bolivia**

Multidrug-resistant Comensal *Escherichia coli* in Children, Peru and Bolivia

Alessandro Bartoloni, * Lucia Pallecchi, † Marta Benedetti, * Connie Fernandez, ‡ Yolanda Vallejos, § Elisa Guzman, ¶ Ana Liz Villagran, § Antonia Mantella,* Chiara Lucchetti, † Filippo Bartalesi, * Marianne Strohmeier, * Angela Bechini,* Herlan Gamboa, § Hugo Rodríguez, ‡ Torkel Falkenberg, # Göran Kronvall, # Eduardo Gotuzzo, ** Franco Paradisi,* and Gian Maria Rossolini †

* Università di Firenze, Florencia, Italia; † Università di Siena, Siena, Italia; ‡ Hospital Apoyo Yurimaguas, Yurimaguas – Loreto, Perú; § Servicio Departamental de Salud Santa Cruz, Camiri, Bolivia; ¶ Hospital Moyobamba, Moyabamba – San Martín, Perú; # Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia; y ** Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

Utilizando un método de escaneo rápido, se investigó la prevalencia en transporte fecal de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* en 3.174 niños sanos de 4 áreas urbanas de Perú y Bolivia. Se observó un alta tasa de resistencia a Ampicilina (95 %), trimetoprim – sulfametoxazol (94 %), tetraciclina (93 %), estreptomina (82 %) y cloranfenicol (70 %). Se observaron bajas tasas de resistencia a ácido nalidixico (35 %), kanamicina (28 %), gentamicina (21 %) y ciprofloxacina (18 %); resistencia a ceftriaxona y amikacina no fue común (<0.5 %). En una muestra aleatoria de 1.080 *E. coli* resistentes aisladas, 90 % exhibieron un fenotipo multidrogo - resistente (MDR). Los 2 fenotipos MDR más comunes (ampicilina/tetraciclina/trimetoprim - sulfamexoxazol y ampicilina/tetraciclina/trimetoprim-sulfamexoxazol/cloranfenicol) podrían ser transferidos en bloque en experimentos de conjugación. Los genes resistentes adquiridos más comunes fueron *bla*_{TEM}, *tet*(A), *tet*(B), *drfA8*, *sul1*, *sul2*, y *catI*. Estos hallazgos subrayaron la magnitud del problema de la resistencia a antibióticos en áreas de bajos recursos y la urgente necesidad de vigilancia y control de este fenómeno.

La dispersión de la resistencia a los antibióticos es un desafío mundial de salud pública, lo cual disminuye la eficacia de los agentes antimicrobianos y los resultados en el incremento sustancial en las tasas de enfermedades y muerte y los costos asociados de atención en salud ^(1 - 3). En países de bajos recursos, la extensión y el impacto del fenómeno tiende a ser incluso mayor que en los países industrializados. De hecho, las altas tasas de resistencia han sido frecuentemente reportadas en estudios de vigilancia que trabajaron con aislados clínicos ^(1, 4, 5) y en estudios de prevalencia de bacterias comensales tomadas como indicadores para estimar la dispersión de resistencia adquirida ^(6 - 15). Más aún, en países de bajos recursos el impacto de la resistencia a medicamentos antimicrobianos en tasas de enfermedades y muerte tiende a ser mayor debido a la alta prevalencia de infecciones bacterianas y el rol mayor de los agentes antimicrobianos en combatir las enfermedades infecciosas ^(1,3,4,16,17).

Las altas tasas de resistencia a antibióticos observadas en países de bajos – recursos son probablemente debidos a una combinación de varios factores, entre los cuales el uso irracional de antimicrobianos y las condiciones de precariedad juegan el rol mayor, incluso si la importancia relativa de factores adicionales permanecen no claros ^(1,4,8,9).

El proyecto ANTRES (Hacia el control del Uso de Antibióticos y Resistencia en países de bajos ingresos: Un estudio de intervención en Latino América), es un proyecto de

investigación que busca investigar este fenómeno a gran escala. El proyecto es ejecutado en dos países de Latino América, Bolivia y Perú, donde se han seleccionado 4 áreas urbanas para el estudio del uso de medicamentos antibióticos y la resistencia bacteriana en niños saludables por un acercamiento prospectivo. A partir de ello se desarrollara una estrategia de información-educación-comunicación basada en la información colectada e involucrando servicios de salud locales. Se evaluarán su impacto en el uso de antibióticos y la resistencia bacteriana (<http://www.unifi.it/infdis/antres/default.htm>).

Se reportan los resultados del estudio de base, ejecutados al principio del proyecto, para evaluar las tasas de resistencia a medicamentos antibióticos en las áreas estudiadas. Se observaron tasas de resistencia muy elevadas a agentes antimicrobianos en bacterias comensales de la población de cada área. Cepas con fenotipos resistentes a múltiples medicamentos mostraron amplia diseminación.

Materiales y Métodos - Diseño del estudio y Población

La población estudiada estuvo representada por niños saludables de 6 – 72 meses de edad de 4 áreas urbanas, 2 en Bolivia (Camirí, Departamento de Santa Cruz; Villamontes, Departamento de Tarija) y 2 en Perú (Yurimaguas, Departamento de Loreto; Moyobamba, Departamento de San Martín). Las áreas urbanas fueron comunidades de 25.000 a 30.000 habitantes que tuvieron características comparables demográficas y socioeconómicas. Ochocientos niños de cada área fueron incluidos en el estudio para cubrir al menos 25 % de todos los domicilios con niños en la meta de edad cohorte. Sólo los niños que no tuvieron diarrea (como esta definido por la Organización Mundial de la Salud ⁽¹⁸⁾ durante las 24 horas previas fueron elegidos para su inclusión en el estudio. En cada domicilio, se seleccionaron los niños reclutables más jóvenes en la edad meta de cohorte. Los domicilios estudiados fueron seleccionados con un cluster modificado de muestreo: se obtuvieron mapas detallados de la distribución de los domicilios de cada área de estudio, y cada ciudad fue dividida en 80 pequeños grupos. En cada grupo, se visitaron un número de domicilios seleccionados aleatoriamente en los cuales se llevo hasta a 10 niños. Se obtuvo una muestra rectal de cada niño tomado en cuenta en el estudio, después de haber obtenido el consentimiento informado de sus padres u otros guardianes legales.

Antes de que se obtuviera la muestra, se entrevistaron a los adultos miembros del domicilio para coleccionar información sobre la situación socioeconómica y cultural de la familia, el uso domiciliario de antimicrobianos, y el estado de salud de los niños seleccionados. En cada país, se obtuvo, completa autorización ética de las autoridades calificadas quienes revisaron y aprobaron el diseño del estudio.

La tasa general de aceptación fue > 95 % en todas las áreas de estudio. Las muestras rectales fueron obtenidas de un total de 3.174 niños (Figura 1): 794 de Camirí y 790 de Villamontes – Bolivia; 797 de Yurimaguas, y 793 de Moyobamba, Perú. Los participantes del estudio estuvieron entre los 6 y 72 meses de edad (media 34.7 ± 18.2 meses; edad media 33.5 meses). La relación mujer: hombre fue 0.95. No se observaron diferencias significativas entre la edad o el sexo entre los niños involucrados de las diferentes áreas. El estudio se ejecutó en 4 meses (Agosto – Noviembre 2002). En cada área, el período de muestreo no fue mayor a 7 semanas.

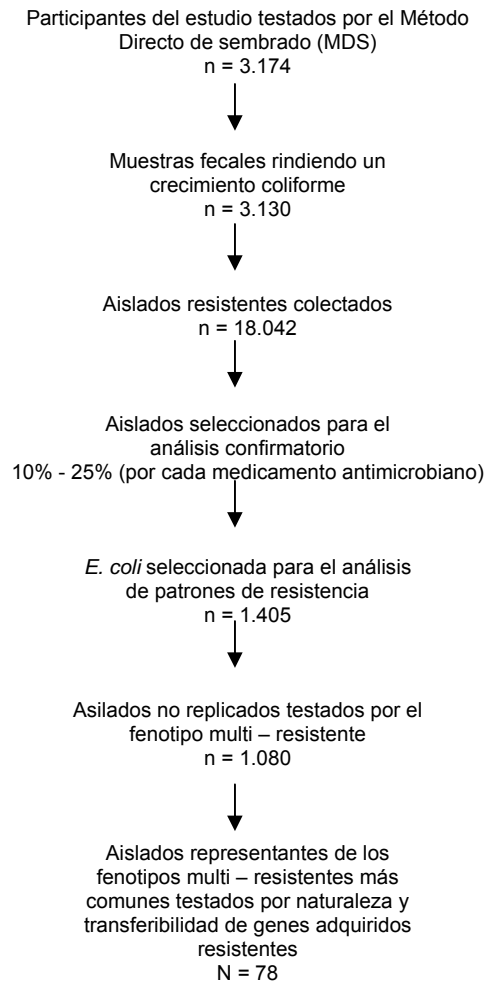


Gráfico 1. Flujo del análisis microbiológico de las muestras fecales. MDS, Método Directo de Sembrado

Escaneo para *Escherichia coli* resistente en Microbiota comensal

Las muestras rectales fueron almacenadas en medio de transporte Amies (Oxiod, Milan – Italia), fueron transferidos en una caja fría al laboratorio del hospital del distrito correspondiente dentro de las 3 horas de recolección. Los 4 laboratorios participan en programas nacionales de control de calidad. Una fase de entrenamiento y estudio piloto precedió la investigación. Tres investigadores europeos (AB, MB, LP) participaron en el análisis de las muestras en los 4 laboratorios. Este acercamiento fue seleccionado para limitar la variabilidad en los procedimientos microbiológicos durante los estudios de campo.

Se ejecutó un escaneo de resistencia antimicrobiana a *E. coli* en la microbiota fecal por un método directo de sembrado (MDS), como se describió previamente ^(7,19). Se prefirió éste método por su buena correlación con métodos basados en exámenes aleatorios de recolección de colonias de cultivos primarios de la cepa, pero es mas sensitivo ^(11, 19). Brevemente, cada muestra fue rociada en agar McConkey Placas No. 3 (Oxiod) para producir crecimiento uniforme en el campo, y se colocaron directamente los discos con el antibiótico en la placa sembrada. Los agentes antimicrobianos testados incluyeron

ampicilina, ceftriaxona, tetraciclina, trimetoprim – sulfametoxazol, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, ácido nalidixico y ciprofloxacina (Oxoid).

Después de la incubación a 37°C por 12 a 14 horas, las placas fueron inspeccionadas, midiéndose el crecimiento y los diámetros de la zona de inhibición. La presencia de una zona de inhibición de crecimiento más grande que el diámetro del punto de quiebre establecido fue considerado para indicar la susceptibilidad al agente antimicrobiano testado. La presencia un zona de inhibición de crecimiento más pequeña que el diámetro del punto de corte, la ausencia de cualquier zona de inhibición, o la presencia de colonias aisladas en crecimiento dentro de una zona de inhibición de cualquier tamaño fue considerada indicativa de resistencia. En el caso posterior, sin embargo, la resistencia no fue considerada para ser representada en la flora dominante. Los puntos de corte fueron, como se describió previamente para ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, amikacina, ácido nalidixico, y ciprofloxacina (19), y 14 mm, 12 mm, 12 mm, y 14 mm para kanamicina, estreptomina, gentamicina y ceftriaxona, respectivamente (A. Bartoloni, datos sin publicar). Se considero valido para el análisis, sólo el crecimiento bacteriano que exhibía una forma típica de *E. coli*. Se utilizaron formularios especialmente preparados para registrar los resultados microbiológicos, incluyendo características de crecimiento y patrones de susceptibilidad. El crecimiento bacteriano confluyente se obtuvo de 3.130 (99 %) de 3.174 muestras rectales colectadas (Cuadro 1). Se observo en pocos casos crecimiento insuficiente (11 muestras) o crecimiento no coliforme (33 muestras). De cada plato y de cada medicamento, el crecimiento coliforme putativo resistente (i.e. una variedad de las colonias crecieron dentro de la zona de inhibición o unas colonias del césped microbiano creció en proximidad al disco) fueron colectadas (n = 18.042) (Cuadro 1), De éstas, una muestra aleatoria (10 % - 25 % de cada medicamento, dependiendo en la prevalencia del fenotipo resistente) fueron sometidos a un análisis confirmatorio para *E. coli* resistente (cuadro 1) utilizando el sistema de identificación API20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y el método estándar de difusión de disco agar^(20, 21). La confirmación se obtuvo en > 96 % de estas muestras, sin diferencias significativas entre los 4 laboratorios.

Análisis de los Patrones de Resistencia de *E. coli* comensal

Se testó la susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos de un representante de varias clases (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, kanamicina, gentamicina, ácido nalidixico, ciprofloxacina) en 1.405 (8 %) aislados de *E. coli* aleatoriamente seleccionados de 18.042 muestras recolectadas. Cada aislado fue dispersado en platos de agar Mueller-Hinton (MH) conteniendo cada agente antimicrobiano a una concentración de 20 % mayor que los puntos de quiebre para resistencia de cada agente antimicrobiano, como establecen las normas del Comité Nacional de Estándares para Laboratorio^(20, 21). El tamaño del inoculum fue 2×10^5 CFU por spot. Un plato de antimicrobiano libre de medicamento medio fue siempre incluido como un control de crecimiento. Se incluyo siempre para control de calidad cepas *E. coli* ATCC 25922, y *E. coli* de la colección resistente a los diversos agentes antimicrobianos. Los resultados fueron registrados después de la incubación a 37°C por 18 horas. Se asignó, un fenotipo resistente cuando se observó el crecimiento en el medio conteniendo el agente antimicrobiano. Un fenotipo multi – resistente fue destinado como resistencia a 2 o más clases de agentes antimicrobianos. Los aislados del mismo participante del estudio que exhibieron el mismo fenotipo resistente (el procedimiento de muestreo aleatorio inicialmente no considero la fuente participante del estudio) se consideraron los aislados

replicados y fueron contados solo una vez para el análisis de datos. De acuerdo a este criterio, el análisis de los datos fue conducido con 1.080 aislados (Cuadro 1).

El ingreso de los datos y análisis fueron calculados con el paquete informático EpiInfo (versión 2002, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Se determinaron diferencias estadísticas en la prevalencia de resistencias a medicamentos antimicrobianos por la prueba del Chi cuadrado.

Análisis molecular de Genes Resistentes y Ensayo de Conjugación

Se investigaron las características de genes con resistencia adquirida y la transferencia conjugativa en 78 aislados seleccionados aleatoriamente de aquellos representantes de los 2 fenotipos multi – resistentes más comunes (Cuadro 1). Se detectaron por hibridización seca de colonia ⁽²²⁾, los genes resistentes *bla*_{TEM}, *catI*, *dfrA8*, *sul1*, y *sul2* y el gen integrasa *int1* con sondas específicas generadas por la reacción en cadena de polimerasa (RCP), como está descrito previamente ^(23 - 25). Como se describió previamente, se detectaron por RCP, los genes resistentes a la tetraciclina *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, y *tet(D)* ⁽²⁶⁾.

Se ensayó la transferencia conjugativa de genes resistentes en caldo MH utilizando *E. coli* J53 (auxotrópico para prolina y metionina y resistente a rifampicina y ácido nalidixico) como recipiente y una proporción inicial entre donante/recipiente de 0.1. Se incubaron tubos de apareamiento a 30°C por 14 horas. Se seleccionaron transconjugantes en agar MH conteniendo rifampin (400 µg/mL) y ácido nalidixico (32 µg/mL) más uno de lo siguientes agentes antimicrobianos: ampicilina (200 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL), cloramfenicol (30 µg/mL), o trimetoprim-sulfametoxazol (40/200 µg/mL). Bajo las condiciones mencionadas, la detección de sensibilidad del ensayo de apareamiento fue $\geq X 10^{-8}$ transconjugantes/recipientes.

Resultados

Tasas de Resistencia Antimicrobiana

En general, se observó un alta tasa de resistencia para ampicilina (95 %), trimetoprim-sulfametoxazol (94%), tetraciclina (93%), estreptomina (82%), y cloramfenicol (70%). Se observaron, bajas tasas de resistencia para ácido nalidixico (35 %), kanamicina (28%), gentamicina (21%), y ciprofloxacina (18%). No fue común la resistencia de ceftriaxona y amikacina (<0.5%) (Cuadro 1). Para los agentes antimicrobianos orales de primera línea tales como ampicilina, tetraciclina, y trimetoprim-sulfametoxazol, se presentaron cepas resistentes como la flora dominante en > 80% de los portadores (Cuadro 1).

Fueron significativamente más altas las tasas de resistencia para ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, kanamicina, y estreptomina en Bolivia que en Perú ($p < 0.001$), por el contrario las tasas de resistencia para ciprofloxacina fueron significativamente altas en Perú que en Bolivia ($p < 0.001$) (Cuadro 1). Se observaron también diferencias en las tasas de resistencia dentro de cada país.

En Bolivia, se encontraron tasas más elevadas de resistencia general en Camirí, que en Villamontes ($p < 0.001$) para cloramfenicol, estreptomina, gentamicina, ácido nalidixico, y ciprofloxacina (Cuadro 1). En Perú, se encontraron tasas más elevadas de resistencia general en Moyobamba que en Yurimaguas. Se notaron, las diferencias más significativas

($p < 0.001$) para estreptomina, ácido nalidixico y ciprofloxacina (Cuadro 1). Se observaron, tasas de resistencia significativamente altas ($p < 0.05$) en niños, con algunos agentes, y en algunos escenarios (ampicilina en ambas ciudades peruanas, trimetoprim-sulfametoxazol en Moyobamba y cloranfenicol, kanamicina y gentamicina en Camiri). El análisis por edad mostró que, con todos los agentes (no fueron consideradas en éste análisis la ceftriaxona y la amikacina debido a los pocos números de aislados resistentes), las tasas de resistencia notablemente altas en el grupo de edad más joven, y se observó una tendencia general decreciente. (Cuadro 2). Con algunos agentes (kanamicina, gentamicina y las quinolonas), la tendencia decreciente estuvo esencialmente limitada a los grupos de edad más joven; con otros agentes (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol), éste fenómeno fue más evidente en los grupos de mayor edad.

Combinaciones de características de resistencia a antimicrobianos en niños saludables

De los 3.174 niños evaluados en el estudio, sólo 84 (2 %) portaron una población de *E. coli* fecal susceptible a todos los agentes antimicrobianos testados, mientras 46 (1.5 %), 73 (2.3%), 187 (5.9 %), 537 (17 %), 808 (26%), 624 (20%), y 816 (26%) tuvieron una población de *E. coli* resistente a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o >6 agentes antimicrobianos. No se observaron diferencias significativas en esa distribución entre los 2 países. De las 156 combinaciones diferentes de resistencia observadas, 2 fueron más prevalentes: 1) el patrón con 4 resistencias, (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, y estreptomina), en 361 (11.5%) niños y 2) el patrón con 5 resistencias, (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, estreptomina, y cloranfenicol) en 567 (18%) niños.

Patrones de Fenotipos Resistentes de aislados de *E.coli*

La frecuencia y el patrón de resistencia de los fenotipos se determinaron en una muestra aleatoria de 1.080 *E. coli* resistentes no replicadas con 8 agentes antimicrobianos representantes de 6 clases diferentes (ampicilina para β -lactámicos, tetraciclina para tetraciclinas, cloranfenicol para fenicoles, trimetoprim-sulfametoxazol para inhibidores del folato, kanamicina y gentamicina para aminoglucosidos, y ácido nalidixico y ciprofloxacina para quinolonas). Solo pocos aislados fueron resistentes a un medicamento simple (9%) (Figura 3). Los aislados que mostraron resistencia a 3 diferentes medicamentos fueron los más prevalentes (30%), seguidos por aquellos que mostraron resistencia a 4 (22%) y 2 (20%) medicamentos, respectivamente. Siete aislados (<1%) mostraron resistencia a todos los medicamentos testados (Figura 3). Fue común un fenotipo multi - resistente (90% de los aislados).

Cuadro 1. Prevalencia, expresada en porcentaje, de niños saludables portadores de *Escherichia coli* drogo – resistente como parte de su flora comensal y de niños en quienes la *E. coli* resistente constituyó la flora predominante *

Medicamento	Camiri	Bolivia Villamontes	Valor p.	Yurimaguas	Perú Moyobamba	Valor p.	Bolivia subtotal	Perú subtotal	Total	Valor p.
Ampicilina	98 (95)	96 (87)	<0.05	92 (76)	93 (83)	NS	97 (91)	92 (80)	95 (85)	<0.001
SXT	98 (94)	95 (86)	<0.05	89 (72)	93 (83)	<0.05	96 (90)	91 (77)	94 (84)	<0.001
Tetraciclina	96 (91)	92 (82)	<0.05	89 (71)	93 (81)	<0.05	94 (86)	91 (76)	93 (81)	<0.05
Estreptomicona	96 (89)	88 (79)	<0.001	71 (50)	86 (66)	<0.001	92 (84)	79 (58)	82 (68)	<0.001
Cloranfenicol	74 (58)	65 (40)	<0.001	69 (42)	72 (48)	NS	70 (49)	71 (45)	70 (47)	NS
Ácido Nalidixico	44 (25)	29 (13)	<0.001	27 (8)	41 (18)	<0.001	36 (19)	38 (13)	35 (16)	NS
Kanamicina	37 (20)	31 (12)	<0.05	22 (8)	23 (9)	NS	34 (16)	22 (9)	28 (12)	<0.001
Gentamicina	28 (16)	18 (10)	<0.001	19 (9)	21 (10)	NS	23 (13)	20 (10)	21 (11)	<0.05
Ciprofloxacina	21 (10)	10 (4)	<0.001	16 (5)	25 (9)	<0.001	16 (7)	21 (7)	18 (7)	<0.001
Amikacina	0	0.1 (0)	NA	1 (0.4)	0.4 (0.3)	NA	0.1 (0.1)	1 (0.3)	0.4 (0.2)	NA
Ceftriaxona	0.1 (0)	0.1 (0.1)	NA	0.3 (0)	0.1 (0.1)	NA	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	NA

* Dentro los paréntesis: proporción de portadores en los cuales la *E. coli* resistente constituyó la flora predominante. NS, No Significante; NA, No Aplicable.

+ Número de niños de los cuales se obtuvieron las muestras: Camiri = 794; Villamontes = 790; Yurimaguas = 797; Moyabamba = 793; Bolivia = 1.584; Perú 1.590; y en total = 3.174

‡ SXT, trimetroprim - sulfametoxazol

Fueron ciertamente variables los patrones de resistencia. De 97 diferentes patrones observados, algunos fueron altamente prevalentes. El patrón que incluyó ampicilina, tetraciclina, y trimetroprim-sulfametoxazol fue el más prevalente, seguido por ese incluyendo ampicilina, tetraciclina, trimetroprim-sulfametoxazol, y cloranfenicol, así como ese incluyendo solo ampicilina y trimetroprim-sulfametoxazol (22%, 15%, y 10% de los aislados testados respectivamente), (Figura 3).

Genes de Resistencia Adquirida y Transferibilidad de Rasgos Resistentes

La prevalencia de muchos genes de resistencia adquirida (*bla*_{TEM} para resistencia a ampicilina; *tet*(A)–(D) para resistencia a tetraciclina; *df*rA8 para resistencia a trimetroprim; *sul*1 and *sul*2 para resistencia a sulfonamidas; *cat*1 para resistencia a cloramfenicol) e integrones de clase 1 fue investigada en 78 aislados seleccionados aleatoriamente de los representantes de los 2 fenotipos multi – resistentes más prevalentes (ampicilina /tetraciclina/trimetroprim-sulfametoxazol, n = 45; ampicilina/tetraciclina/trimetroprim-sulfametoxazol/cloramfenicol, n = 33). En muchos casos el fenotipo resistente apareció ser determinado por una combinación de los genes resistentes anteriores, y algunos de ellos aparecen para ser altamente prevalentes (Cuadro 2). Se detectó en 35 % de los aislados multi - resistentes, la presencia del gen *int*11 integrasa (asociado con integrones de la clase 1).

Estos 78 aislados fueron también testados por rasgos de transferibilidad de resistencia en experimentos de conjugación. En general, se observó la transferencia de al menos 1

rasgo resistente en 37 casos (47%). Las tasas de transferencia para cada rasgo resistente fueron como sigue: ampicilina 46%, tetraciclina 40%, trimetoprim-sulfametoxazol 41%, y cloramfenicol 27%. La co – transferencia de todos los rasgos resistentes se observó en 26 de 37 casos que dieron resultados positivos en los experimentos de conjugación. El análisis molecular de los transconjugantes mostró que, en todos los casos, los fenotipos resistentes fueron determinandos por la adquisición de genes resistentes detectados en los donantes respectivos. La transferencia conjugativa de los integrones de clase 1 se observo en 10 (37%) de los 27 aislados positivos *int1*.

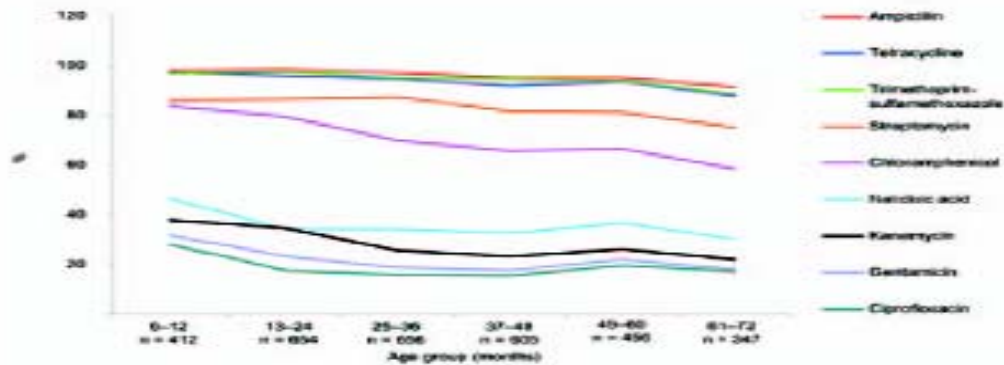


Gráfico 2. Prevalencia total, por grupo de edad, de transporte fecal de *Escherichia coli* resistente a antibióticos entre 3.174 niños en 4 áreas urbanas de Bolivia y Perú. No se consideraron en el análisis la ceftriaxona y la amikacina, debido a que sus tasas de resistencia fueron muy bajas.

Discusión

Similar a las bacterias patogénicas, los comensales son expuestos a la presión selectiva de agentes antimicrobianos, y la *E. coli* comensal ha sido frecuentemente utilizada como un indicador de la diseminación de genes resistentes adquiridos ^(7,8,11-13,15,27). Para nuestro conocimiento, este estudio es el primero dirigido a establecer el estado de la resistencia antimicrobiana en *E. coli* comensal en una gran población de niños en edad pre – escolar de áreas urbanas de países de bajos recursos. Los resultados muestran una alta prevalencia (70% - 95%) de portadores de *E. coli* saludables resistentes a un número de antiguos agentes antimicrobianos (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol, y estreptomina). Para estos medicamentos, las pequeñas diferencias observadas entre localidades, aunque algunas veces estadísticamente significantes, son probablemente de relevancia clínica y epidemiológica limitada y presumiblemente atribuidas a un gran número de portadores de *E. coli* resistentes a los antimicrobianos. Una relativamente alta prevalencia (18%-35%) de portadores de *E. coli* resistentes a otros agentes (kanamicina, gentamicina, ácido nalidixico, y ciprofloxacina) fue también observada, mientras el transporte de *E. coli* resistente al espectro – expandido de cefalosporinas y amikacina no fue común (<0.5%). Patrones de ranking de tasas de resistencia fueron similares en general en cada de las 4 áreas estudiadas, lo cual sugiere un escenario común en áreas urbanas de estos 2 países Latino Americanos. Esta visión es más apoyada por los datos recientemente publicados para adultos en Lima (Perú), donde se reportaron tasas similares de resistencia ⁽¹²⁾.

Nuestros hallazgos estuvieron en acuerdo sustancia con reportes previos de tasas de resistencia altas en comensales de participantes de estudio de áreas de bajos recursos ⁽⁷⁾.

8, 11 – 13, 15, 28). Se investigó 10 años antes un análisis comparativo con datos disponibles previos para un área estudiada (Camirí, Bolivia) ⁽⁷⁾ indicando un incremento significativo en las tasas de resistencia a gentamicina y ácido nalidixico y la nueva aparición de resistencia a la ciprofloxacina.

Un aspecto que no fue previamente reportado entre niños preescolares fue las diferencias relacionadas a la edad en tasas de resistencia; las tasas fueron significativamente altas en grupos de edad más joven. Este fenómeno podría reflejar un gran uso de medicamentos antimicrobianos en niños jóvenes. Sin embargo, esta explicación no puede ser aplicada para las quinolonas, las cuales no son prescritas en éste grupo de edad. Otro factor de influencia podría ser los cambios en la dieta relacionados al destete. De hecho, una dieta alta en leche que contiene abundante lactoferrina, lo cual quelata el hierro dietético, han sido hipotetizados a favorecer la presencia de rasgos expresando sistemas de toma de hierro (tales como aerobactina o enterobactina), los cuales son frecuentemente encodificados por plasmids que también portan genes resistentes ⁽²⁹⁾. Sin embargo, más investigación será necesaria para clarificar el mecanismo responsable de este fenómeno.

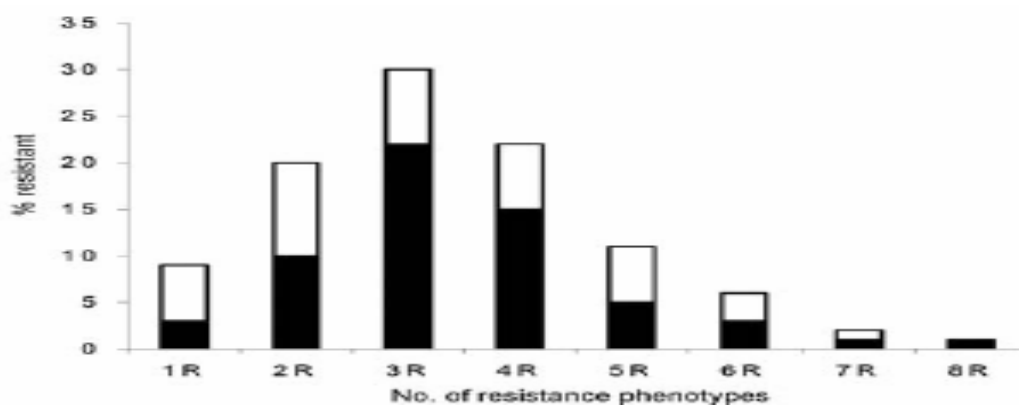


Gráfico 3. Frecuencia de fenotipos resistentes en 1,080 aislados de *E. coli* resistentes aleatoriamente seleccionados de 4 áreas urbanas de Bolivia y Perú. Las barras negras indican la resistencia más frecuente y fenotipo multi – resistente dentro de cada categoría: 1R, TET; 2R, AMP-SXT; 3R, AMP-TET-SXT; 4R, AMP-TET-SXT-CHL; 5R, AMP-TET-SXT-CHL-KAN; 6R, AMP-TET-SXT-CHL-NAL-CIP; 7R, AMP-TET-SXT-CHL-GEN-NAL-CIP; 8R, AMP-TET-SXT-CHL-KAN-GEN-NAL-CIP. AMP, ampicilina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CHL, cloramfenicol; KAN, kanamicina; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina.

Los rasgos de resistencia múltiple en la microbiota comensal *E. coli* fueron aparentemente la regla, como fueron detectados en muchos de los participantes del estudio. La presencia simultánea de rasgos múltiples expresando diferentes fenotipos resistentes y rasgos simples expresando fenotipos múltiples – resistentes podría contribuir a éste fenómeno. Aunque la contribución relativa de éstos 2 mecanismos no fue específicamente investigada, la alta prevalencia de rasgos expresando fenotipos multi – resistentes probablemente ofrece una mayor contribución. Algunos patrones multi – resistentes (por ejemplo ampicilina/tetraciclina/trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina/tetraciclina/trimetoprim-sulfametoxazol/cloramfenicol) fueron comunes y podrían ser contados por un número de genes resistentes adquiridos conocidos. Los rasgos de resistencia podrían ser transferidos por conjugación, frecuentemente en bloc, sugiriendo un nexo de los genes resistentes correspondientes en los plasmids auto – transferibles o mobilizables.

Cuadro 2. Genes resistentes adquiridos en 78 comensales de *Escherichia coli* MDR *

Característica resistente	No. de aislados resistentes	Gen resistente	No. (%) de aislados positivos
Ampicilina	78	<i>bla_{TEM}</i>	77 (99)
Tetraciclina	78	<i>tet(A)</i>	27 (35)
		<i>tet(B)</i>	44 (56)
		<i>tet(D)</i>	4 (5)
		<i>tet(A)</i> y <i>tet(B)</i>	1 (1)
Trimetoprim	78	<i>dfrA8</i>	42 (54)
Sulfametoxazol	78	<i>sul1</i>	7 (9)
		<i>sul2</i>	54 (69)
		<i>sul1</i> y <i>sul2</i>	17 (22)
Cloramfenicol	33	<i>catI</i>	33 (100)

* **Multi – Drogo Resistente**

† **Porcentajes refieren a aislados positivos entre aislados resistentes para cada agente antimicrobiano**

En conclusión, el estudio remarca la magnitud del problema de resistencia a medicamentos antimicrobianos en áreas de bajos recursos y la urgente necesidad de vigilancia y control de éste fenómeno. Métodos económicos, sensitivos y simples para monitorear la resistencia antimicrobiana en bacterias comensales podrían ser valiosas herramientas para estudios de vigilancia a gran escala y para mejorar la eficacia de las intervenciones para el control de la resistencia. El método directo de plato, utilizado en éste estudio, el cual ha mostrado previamente alta sensibilidad y especificidad al detectar *E. coli* resistente ⁽¹⁹⁾, fue confirmado para ser una herramienta valida para conducir tal estudio a gran escala.

Agradecimientos

Agradecemos a los otros miembros del Grupo de Estudio de ANTRES por su apoyo en este estudio: Ruth Arias, Vieri Boddì, Paolo Bonanni, Mirtha Camacho, Blanca Huapaya, Charlotte Kristiansson, Oscar Lanza Van den Berghe, Mattias Larsson, Luis Pacheco, Angela Pieri, Victor Suarez, Esteban Salazar, y Christian Trigoso. También agradecemos a las autoridades locales de salud por la cooperación en la ejecución del estudio, el personal del laboratorio por su asistente técnica, los miembros del equipo de campo por su valioso apoyo recolectando las muestras, y a todos los niños participantes y a sus padres por su buena disposición y voluntad de tomar parte de la investigación.

El estudio fue ejecutado dentro de las actividades de investigación del proyecto ANTRES, apoyado por la Comisión Europea, Programa INCO-DEV, contrato no. ICA4-CT-2001-10014.

El Dr. Bartoloni es profesor asociado de enfermedades infecciosas en la Universidad de Florencia, Italia. Sus intereses de investigación incluyen resistencia a los antimicrobianos y medicina tropical.

Referencias

1. Byarugaba DK. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24:105–10.
2. World Health Organization. WHO report on infectious diseases 2000. Overcoming antimicrobial resistance. Geneva: The Organization; 2000.

3. World Health Organization. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: The Organization; 2001 [cited 2006 Jan 27]. Available from <http://www.who.int/drugresistance/en/>
4. Okeke IN, Lamikanra A, Edelman R. Socio-economic and behavioural factors leading to acquired bacterial resistance to antimicrobial agents in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:18–27.
5. Shears P. Antibiotic resistance in the tropics. *Epidemiology and surveillance of antimicrobial resistance in the tropics.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:127–30.
6. Bartoloni A, Colao MG, Roselli M, Orsi A, Aquilini D, Corti G, et al. Antimicrobial agent susceptibility patterns of staphylococci isolated in urban and rural areas of Bolivia. *J Trop Med Hyg.* 1990;93:360–4.
7. Bartoloni A, Cutts F, Leoni S, Austin CC, Mantella A, Guglielmetti P, et al. Patterns of antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia. *Trop Med Int Health.* 1998;3:116–23.
8. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *J Infect Dis.* 2004;189:1291–4.
9. Walson JL, Marshall B, Pokhrel BM, Kafle KK, Levy SB. Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *J Infect Dis.* 2001;184:1163–9.
10. Calva JJ, Sifuentes-Osornio J, Cerón C. Antimicrobial resistance in faecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1699–702.
11. Lester SC, del Pilar Pla M, Wang F, Pere Schael I, Jiang H, O'Brien TF. The carriage of *Escherichia coli* resistant to antibiotic agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela and in Qin Pu, China. *N Engl J Med.* 1990;323:285–9.
12. Nys S, Okeke IN, Kariuki S, Dinant GJ, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:952–5.
13. Okeke IN, Fayinka ST, Lamikanra A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from Nigerian students, 1986–1998. *Emerg Infect Dis.* 2000;6:393–6.
14. Shanahan PM, Wylie BA, Adrian PV, Koornhof HJ, Thomson CJ, Amyes GB. The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa. *Epidemiol Infect.* 1993;111:221–8.
15. van de Mortel HJ, Jansen EJ, Dinant GJ, London N, Palacios Pru E, Stobberingh EE. The prevalence of antibiotic-resistant faecal *Escherichia coli* in healthy volunteers in Venezuela. *Infection.* 1998;26:292–7.
16. Col NF, O'Connor RW. Estimating worldwide current antibiotic usage: report of Task Force 1. *Rev Infect Dis.* 1987;9 (Suppl 3):323–43.
17. O'Brien TF. Global surveillance of antibiotic resistance. *N Engl J Med.* 1992;326:339–40.
18. World Health Organization. Management and prevention of diarrhoea: practical guidelines. 3rd ed. Geneva: The Organization; 1993.
19. Bartoloni A, Benedetti M, Pallecchi L, Larsson M, Mantella A, Strohmeyer M, et al. Evaluation of a rapid screening method for detection of antimicrobial resistance in the commensal microbiota of the gut. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:119–25.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved standard M07-A6. Wayne (PA): The Committee; 2003.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 13th informational supplement M100-S13. Wayne (PA); The Committee; 2004.

22. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
23. Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, et al. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol. 2004;42:5444–52.
24. Lee JC, Oh JY, Cho JW, Park JC, Kim JM, Seol SY, et al. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. J Antimicrob Chemother. 2001;47:599–604.
25. Infante B, Grape M, Larsson M, Kristiansson C, Pallecchi L, Rossolini GM, et al. Acquired sulfaonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:308–12.
26. Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of tet(A)-1. J Clin Microbiol. 2003;41:1023–32.
27. Alliance for Prudent Use of Antibiotics (APUA). Reservoirs of Antibiotic Resistance Network (ROAR). Commensal bacteria are reservoirs of resistance. 2004 [cited 2006 Jan 27]. Available from <http://www.tufts.edu/med/apua/ROAR/project.htm>
28. Grenet K, Guillemot D, Jarlier V, Moreau B, Dubourdieu S, Ruimy R, et al. Antibacterial resistance, Wayampis amerindians, French Guyana. Emerg Infect Dis. 2004;10:1150–3.
29. Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. Appl Environ Microbiol. 2004;70:752–7.

Dirección para correspondencia: Alessandro Bartoloni, Dipartimento Area Critica Medico Chirurgica, Clinica Malattie Infettive, Università di Firenze, Ospedale di Careggi, Viale Morgagni 85, I-50134, Florencia, Italia; email: bartoloni@unifi.it
Drug-resistant *E. coli*, Perú and Bolivia
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 12, No. 6, Junio 2006 913

Todo el material publicado en Enfermedades Infecciosas Emergentes (Emerging Infectious Diseases) esta en el dominio y puede ser utilizado y reimpresso sin permiso especial; sin embargo, se requiere la cita apropiada del mismo.