

# Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012

## *Molecular characterization of virulence factors of Escherichia coli isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in 2012*

María Gabriela Canata<sup>(1)</sup>, Rodrigo Navarro<sup>(1)</sup>, Gladys Velázquez<sup>(1,2)</sup>, Sofía Rivelli<sup>(3)</sup>, Fátima Rodríguez<sup>(3)</sup>, Ana Céspedes<sup>(2)</sup>, Carmen Espínola<sup>(2)</sup>, Jorge Canese<sup>(1)</sup>, Rosa Guillén<sup>(3,4)</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** Las bacterias, como *Escherichia coli*, causan diarrea mediante la producción de diversos factores de virulencia codificados por genes como *elt* y *est* en cepas enterotoxigénicas (ETEC), *eae* en enteropatógenas (EPEC), *stx* en enterohemorrágicas (EHEC) y *aggR* en enteroagregativas (EAEC). **Objetivo:** Detectar por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) los genes codificantes de factores de virulencia en aislados de *E. coli* provenientes de heces diarreicas de niños que concurren al Hospital Central del Instituto de Previsión Social (IPS), de agosto a diciembre del 2012. **Materiales y Métodos:** Fueron analizados 94 aislados de *E. coli*. El ADN fue extraído por el método de ebullición. Se emplearon cebadores descritos por Merino y colaboradores en el 2010 y como control positivo de amplificación cepas portadoras de los factores de virulencia. **Resultados:** El 46,80 % (n:44) de los aislados era portador de factores de virulencia, el más frecuente fue el factor de agregación (*aggR*) en el 40,42% de las muestras. El gen *eae* se detectó en 3 aislados (2,13%). Se detectó la presencia de *elt* e *ipah* en un aislado (1,06%) respectivamente y 4 (4,26%) dieron resultado positivo para la toxina shiga (*sxt*). **Discusión:** Este trabajo

### ABSTRACT

**Introduction:** Bacteria, such as *Escherichia coli*, cause diarrhea by producing various virulence factors encoded by genes, such as *elt* and *est* in enterotoxigenic strains (ETEC), *eae* in enteropathogenic strains (EPEC), *Stx* in enterohemorrhagic strains (EHEC) and *AggR* in enteroaggregative strains (EAEC). **Objective:** To detect by polymerase chain reaction (PCR) genes encoding virulence factors in *E. coli* isolates from diarrheal stools of children who were admitted the Institute for Social Welfare (IPS) Central Hospital, from August to December 2012. **Materials and Methods:** We analyzed 94 isolates of *E. coli*. The DNA was extracted by the boiling method. Primers described by Merino et al in 2010 were used and strains carrying the virulence factors as positive amplification controls. **Results:** 46.80% (n = 44) of isolates carried virulence factors, the most frequent was clumping factor (*AggR*) in 40.42% of the samples. The *eae* gene was detected in 3 isolates (2.13%). *Elt* and *ipaH* were present in one isolate (1.06%), respectively and 4 (4.26%) were positive for Shiga toxin (*Stx*). **Discussion:** This study shows a high rate of production of virulence factors in *E. coli* isolated from diarrhea of children, and the feasibility

1. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

2. Laboratorio de Microbiología, Hospital Central del Instituto de Previsión Social. Asunción, Paraguay.

3. Departamento de Biología Molecular y Genética, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. San Lorenzo, Paraguay.

4. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

**Correspondencia:** Dra. Gladys Velázquez. E-mail: g-velazquez@hotmail.com

Recibido: 01/09/2015; Aceptado: 20/11/2015.

Los autores declaran que no existen conflictos de interés en el presente estudio.

<http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>

muestra una elevada frecuencia de producción de factores de virulencia en *E. coli* aislados de diarreas de niños, así como la factibilidad de la detección de forma rápida y precisa por métodos moleculares.

**Palabras clave:** *E.coli*, PCR múltiple, factores de virulencia, *eae*, *aggR*, *elt*, *est*, *stx*, *ipaH*.

## INTRODUCCIÓN

*E.coli* es un bacilo gran negativo, anaerobio predominante en la flora intestinal humana, usualmente se mantiene de forma inocua y confinado al lumen intestinal, sin embargo, en huéspedes inmunosuprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son sobrepasadas las cepas de *E. coli* pueden producir infecciones. Las infecciones debidas a clones de *E. coli* patogénicos pueden limitarse a superficies mucosas o pueden diseminarse en todo el cuerpo. Dentro de las infecciones más frecuentes originadas por *E. coli* se encuentran las enfermedades entéricas y diarreas<sup>(1)</sup>.

Las cepas de *E. coli* que causan diarreas incluyen varios patógenos emergentes de importancia en salud pública en todo el mundo. Estas cepas de *E. coli* producen diversos factores de virulencia codificados por genes como *elt* y *est* que caracterizan a cepas enterotoxigénicas (ETEC), *eae* presente en cepas enteropatógenicas (EPEC) y a veces también en enterohemorrágicas (EHEC), *stx*, codificante de la toxina shiga y propia de aislados enterohemorrágicos (EHEC), *aggR* en aislados enteroagregativos (EAEC) e *ipaH* en cepas enteroinvasivas (EIEC). La presencia de estos genes y a su vez la expresión de las proteínas codificadas por los mismos forma parte esencial del mecanismo de patogénesis único de cada uno de estos tipos de *E. coli* diarreogénicas<sup>(2)</sup>.

En este sentido, los patotipos ETEC y EAEC de *E. coli*, no solo están asociados a diarrea en niños, sino que también son los principales agentes etiológicos de la diarrea del viajero<sup>(3)</sup>. Por otra parte las cepas ETEC de *E. coli* colonizan el intestino delgado y secretan enterotoxinas termolábil y termoestable, que producen una diarrea secretoria. La diarrea se caracteriza por ser acuosa, sin sangre, con dolor abdominal, náuseas, vómitos y escasa fiebre. La enfermedad usualmente se auto limita<sup>(4)</sup>. La adherencia bacteriana a la mucosa intestinal es

of detecting said factors quickly and accurately by molecular methods.

**Keywords:** *E.coli*, multiplex PCR, virulence factors, *eae*, *AggR*, *elt*, *est*, *Stx*, *ipaH*.

característica de las cepas EAEC de *E.coli* que causan diarrea en niños<sup>(5)</sup>. Existen 3 tipos de patrones de adherencia descritos: adherencia localizada, difusa y agregativa<sup>(6,7)</sup>. Las cepas correspondientes al patotipo EIEC son causa importante de diarrea en áreas de poca higiene y transmitidas por alimentos<sup>(8)</sup>. Las cepas EPEC de *E. coli* se adhieren a la mucosa intestinal produciendo aplanamiento de las vellosidades con lesiones tipo “adhesión y borrado” y cambios inflamatorios. La relevancia clínica de la diarrea crónica es mayor en niños de países en vías de desarrollo porque agrava su estado nutricional y ensombrece su pronóstico<sup>(4)</sup>. Los aislados EHEC se adhieren al epitelio intestinal, produciendo una o más toxinas Shiga (*Stx1* y *Stx2*), que son su principal factor de virulencia y son responsables de las complicaciones intestinales y sistémicas. En diferentes partes del mundo muchos otros serotipos han sido asociados a Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)<sup>(9)</sup>. Por ejemplo las cepas de *E. coli* del serotipo 0157:H7 fueron primeramente reconocidas como causa de Gastroenteritis Aguda (GEA) humana en 2 brotes separados de colitis hemorrágica en Michigan y Oregón en 1982<sup>(10,11)</sup>.

*E. coli*, como patógeno causante de diarreas, representa uno de los problemas de salud pública más importantes en los países en vías de desarrollo, sobretodo en menores de edad, por lo que se hace necesario hacer un diagnóstico adecuado. El reconocimiento apropiado de los patotipos causantes de los cuadros diarreicos es importante para el para diferenciarlas de la flora normal del tracto gastrointestinal<sup>(12)</sup>.

La identificación de los factores de virulencia de *E. coli* diarreogénicas (DEC) constituye un reto para los laboratorios de microbiología y una información epidemiológica importante para los médicos tratantes. En la actualidad existen métodos

convencionales para la identificación de sólo algunos factores basados principalmente en la detección de proteínas por técnicas inmunológicas, siendo la mayor limitación de éstos la posibilidad de dar falsos negativos frente a nuevas variantes antigénicas presentes en las proteínas. El uso de métodos moleculares de gran especificidad y sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa ha permitido la detección de múltiples genes codificantes de factores de virulencia, por tanto facilitando la tipificación molecular de las DEC<sup>(13)</sup>.

## OBJETIVO

El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización molecular de factores de virulencia aislados de *E. coli* obtenidos de heces diarreicas de niños que concurren al Hospital Central del Instituto de Previsión Social de agosto a diciembre del 2012.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio descriptivo de corte trasverso permitió el análisis de 94 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de heces diarreicas de niños que concurren al Hospital Central de IPS en el periodo comprendido de agosto a diciembre del 2012. Se registraron datos clínicos de los niños como edad y síntomas a partir de las fichas de los pacientes. Los datos personales de los pacientes fueron mantenidos en estricta confidencialidad, siendo manejados bajo códigos de forma exclusiva por los investigadores participantes del presente protocolo.

Como parte del análisis microbiológico de rutina, las muestras de heces fueron inoculadas en tres medios de cultivos: Agar Eosina Azul de metileno, Agar Sangre y Agar Mc Conkey-Sorbitol y fueron incubadas a 35-37 grados centígrados, de 24 a 48 hs. Aquellas colonias con sospecha de presencia de *E. coli*, fueron sometidas a pruebas bioquímicas estándar para su tipificación. Los análisis microbiológicos fueron realizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Central del Instituto de Previsión Social.

Los aislados fueron remitidos al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud para el análisis molecular. Dicho proceso incluyó la extracción de ADN por el

método de ebullición. Las muestras de ADN fueron sometidas a una PCR múltiple para la detección de los genes de las toxinas *est*, *elt*, *est*, *eae*, *ipaH*, *stx* y *aggR*, empleando las condiciones de ciclado y los cebadores descritos por Merino y colaboradores en el 2010<sup>(13)</sup>. En cada reacción de PCR se incluyeron controles positivos y negativos de amplificación. Se emplearon como control positivo de amplificación cepas portadoras de los factores de virulencia gentilmente cedidas por el Dr. Luis Merino de la Universidad del Nordeste, Resistencia, Argentina. Los productos obtenidos por PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz UV. El marcador de peso molecular empleado en las electroforesis fue el marcador de 100 pb (Bioron, Alemania).

## RESULTADOS

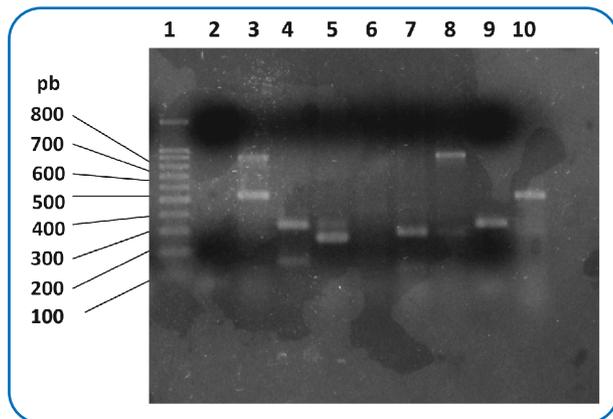
Del total de 94 muestras analizadas, 42 provenían de niñas (44.7%) y 52 de niños (55,3%). El promedio de edad fue de 4 años, la mediana de la edad de los niños fue de 3 años. Con relación a los síntomas clínicos más frecuentes, en la población general se destacan las náuseas en 45 niños (43,6 %), vómitos en 52 niños (55.3 %), y fiebre en 65 niños (69.2 %).

La amplificación por PCR permitió obtener productos del tamaño esperado para los genes *eae*, *elt*, *est*, *stx* y *aggR* en las cepas de *E. coli* portadoras de estos genes y empleadas como control positivo de amplificación. En cada tanda de muestras amplificadas se incluyó un control negativo que no generó producto alguno tras la amplificación, validando los resultados de esta técnica molecular obtenidos en los aislados de *E. coli* en estudio (*Figura 1*).

El 46,8% (n=44/94) de los aislados era portador de factores de virulencia, el más frecuente fue el factor de agregación (*aggR*) en el 40.4 % (38/94) de las muestras. El gen *eae* se detectó en 2.13% (2/94), ambos presentaban simultáneamente *aggR*. Un aislado respectivamente 1.06 % (1/94) presentaba la toxina termolábil (*elt*) y la toxina *ipah*, mientras que 4.26 % (4/94) eran portadores de la toxina shiga (*sxt*). En ningún caso se detectó la toxina *est*.

Con relación a los factores clínicos, los síntomas más frecuentes en los 44 niños cuyos aislados de *E. coli* eran portadores de factores de virulencia

incluyeron: de fiebre en 27 (61.4%), vómito en 24 de los 44 niños (54.5%), y náuseas en 14 (31.8 %).



**Figura 1.** Amplificación por PCR múltiple de genes *eae*, *elt*, *est*, *stx* y *aggR*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1. Marcador de peso molecular de 100 pb, 2. Control negativo, 3. Control positivo portador de genes *stx* (518 pb) y *eae* (881 pb), 4. Control positivo portador de genes *elt* (147 pb) y *est* (322 pb), 5. Control positivo portador del gen *aggR* (254 pb), 6. Aislado ECN 30: Negativo para toxinas 7. Aislado ECN18: Positivo para *aggR* (*E. coli* enteroagregativa, EAEC) 8. Aislado ECN16: Positivo para *eae* y *aggR* (*E. coli* enteropatógena, EPEC) 9. Aislado ECN17: Positivo para *est* (*E. coli* enterotoxigénica, ETEC) 10. Aislado ECN22: Positivo para *stx* (*E. coli* productora de toxina shiga, STEC).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo el factor de virulencia más frecuente fue el de agregación *aggR* característico de las cepas EAEC con un 40.4 %. Los factores de virulencia de los demás patotipos fueron detectados en menores porcentajes, por ejemplo: el gen *sxt* de las EHEC se detectó en 4 aislados (4,3%), mientras que el gen *eae* de las cepas EPEC y/o EHEC se detectó en el 2.1%, seguidos de los factores *elt* del patotipo ETEC e *ipah* de las cepas EIEC, fueron hallados en 1.1 % respectivamente. Varios trabajos realizados en Brasil, Tanzania y Perú presentan valores de portación de factores de virulencia que varían desde 78, 14.6 a 9.9% para el patotipo EAEC; 10.2, 4.6 a 8.5% para las cepas EPEC; 1.7, 3.6 a 6,9% para aislados del patotipo ETEC, mientras que detectan cepas EHEC en 3.4, 0 y 0,8%, respectivamente<sup>(14-16)</sup>. Estos datos demuestran una concordancia con nuestros datos, revelando que los mayores porcentajes en orden decreciente son cepas de EAEC, EPEC, ETEC y por último EHEC. Trabajos realizados en Venezuela presentan un porcentaje bajo de *E. coli* diarrogénicas en 18,9 %, siendo la EPEC la más frecuentemente aislada, seguida de ETEC y EIEC, mientras que en último lugar se encuentran las cepas EAEC, en contraposición de nuestros datos<sup>(17)</sup>.

El patotipo EAEC es responsable del 10 al 40% de la diarrea aguda y del 40 al 80% de la diarrea persistente

en pacientes con VIH<sup>(9)</sup>. Los genes *aggR* sirven como marcadores de la virulencia verdadera en cepas de EAEC, que causan expresión de un paquete genes. Nataro y col. han sugerido recientemente, que las cepas EAEC consideradas como “típicas” son aquellas que expresan el regulón de *aggR*<sup>(8,18)</sup>.

Trabajos realizados por *Hannaoui y col.* muestran un 9,47% de *E. coli* enteropatógenas “atípicas”, caracterizados por presentar tan sólo la amplificación del gen *eae*<sup>(17)</sup>, coincidentes con nuestros resultados, así como los realizados en Reino Unido, que demostraron una frecuencia mayor de aislamientos de cepas EPEC “atípicas” que de cepas “típicas” procedentes de niños con gastroenteritis<sup>(19)</sup>; y los reportados por Afset y col. quienes obtuvieron mayores aislamientos de EPEC “atípicas” en niños con diarrea en Noruega<sup>(20)</sup>.

*E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las categorías diarrogénicas reconocidas actualmente, causa la diarrea del viajero, tanto en niños como en adultos. En nuestra muestra en estudio este patotipo fue detectado en un mínimo porcentaje<sup>(21)</sup>. La patogenicidad de ETEC involucra factores de colonización, expresión de adhesinas intestinales y la producción de enterotoxinas, como la termolábil (LT) cuyo mecanismo es semejante a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*, también produce la enterotoxina termoestable (ST) que contiene múltiples residuos de cisteína que le confiere estabilidad; ambas toxinas pueden manifestarse juntas o sólo una de ellas, para causar daño en las células epiteliales<sup>(22)</sup>.

La identificación de las cepas y serotipos más comunes es de importancia para el desarrollo futuro de vacunas. Adicionalmente, los patrones de aislamiento de bacterias y virus varían con el tiempo, conforme se va reduciendo la mortalidad infantil. En una revisión reciente para la Organización Mundial de la Salud, se encontró que EPEC y ETEC son la siguiente prioridad luego de rotavirus, por las tasas de mortalidad<sup>(23)</sup>.

Las técnicas de biología molecular también deberían ser usadas para estudios epidemiológicos de agua y alimentos para determinar el riesgo de infección proporcionando información adecuada que facilite un rápido diagnóstico, un manejo médico apropiado y la implementación a tiempo de medidas de prevención de las diarreas en niños.

## REFERENCIAS

1. Nataro J, Kaper J. Diarrhea genic E. coli. *Clin Microbiol Reviews*. 1998;11:142-20.
2. Esquivel P, Lifschitz V, Losch L, Medina MG, Pato AM, Cacciamani A, Merino Luis A. Caracterización molecular de asilamientos de *Escherichia coli* productores de diarrea en niños y adultos de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Rev Panam Infectol*. 2010;12(12:3):17-21.
3. Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:383-89.
4. Ochoa TJ, Cleary TG. Epidemiology and spectrum of disease E. coli O157. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:259-63.
5. Ulshen MH, Rollo JL. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. *N Engl J Med*. 1980;302(2):99-101.
6. Mathewson JJ, Cravioto A. HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1989;159:1057-1060.
7. Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*. 1984;45:534-36.
8. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6:829-31.
9. Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Evaluation of children with persistent infectious diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15(4):229-36.
10. Su Ch, Brandt L. *Escherichia coli* O157:H7 infection in human. *Ann Intern Med*. 1995;126:698-714.
11. Rowe PM. Eradicating *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. 1995;345:1-3.
12. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasane N, Chimen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2669-71.
13. Merino L, Giusiano G. Manual de Técnicas moleculares para estudios microbiológicos. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2011.
14. Moyo S, Maselle S, Matee M, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMF Infectious Disease*. 2007;7:92.
15. Liebchen A, Benz I, Mellmann A, Karch H, Gomes TA, Yamamoto D, Hernandez RT, Sampaio J, Sampaio SC, Fruth A, Schmidt MA. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Sao Paulo, Brazil: identification of intermediate virulence factor profiles by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2274-78.
16. Ochoa T, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F, Prada A, Ruiz J. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011;28(1):13-20.
17. Hannaoui E, Villalobo L, Martine R, Maldonado A, Hage I, Bastard J. *Escherichia coli* diarrogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. *Invest Clin*. 2010;51(4):489-500.
18. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(1):12-18.
19. Sotland S, Smith H, Cheasty T, Said B, Willshaw G, Stokes N. Use of gene probes and adhesion tests to characterize E. coli belonging to enteropathogenic serogroups isolated in United Kingdom. *J Med Microbiol*. 1996;44:438-43.
20. Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. *J Clin Microb*. 2006;44(10):3703-3711.
21. Shaheen HI, Khalil SB, Rao MR, Abu Elyazeed R, Wierzbza TF, Peruski LF Jr, Putnam S, Navarro A, Morsy BZ, Cravioto A, Clemens JD, Svennerholm AM, S. Savarino SJ. Phenotypic profiles of Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood diarrhea in rural Egypt. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5588-95.
22. Tauschek M, Gorrell R, Strugnell RA, Robins-Browne R. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxina by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *PNAS*. 2002;99:7066-71.
23. Lanata CF. Comunicación personal. Lima, Octubre; 2005.