

Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes

Edith Chávez Bravo*, Laura E. Martínez Gómez**, María Lilia Cedillo Ramírez*, Constantino Gil Juárez*, Fabiola Avelino Flores*, Elsa I. Castañeda Roldán*

Fecha de aceptación: marzo 2007

Resumen

La *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es la causante de la diarrea del viajero, o diarrea acuosa, tanto en niños como en adultos. Su transmisión se relaciona con el consumo de alimentos contaminados y mal cocinados, lo que provoca brotes epidemiológicos en México con este patotipo hasta en 70% de los casos. El mecanismo de patogenicidad de ETEC implica factores de colonización, producción de adhesinas y enterotoxinas, como LT y/o ST, y la fimbria longus. El Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la BUAP cuenta con 156 cepas de *E. coli* aisladas —de diferentes ambientes— y muestras clínicas de la ciudad de Puebla. En este trabajo se tipificaron estas cepas tomando como base la identificación de los genes LT y/o ST y la proteína longus, para lo cual empleamos la técnica de PCR y Western Blot, respectivamente. Los resultados mostraron que ETEC se encontró en 75% de las cepas de aire y agua, en 73.52% de las cepas aisladas de niños, en 61.11% en cepas obtenidas de alimentos y en 42.85% en cepas aisladas de adultos. Del total de éstas, sólo 51.58% expresó dos factores de virulencia (gen ST y longus) y 10.95% mostró el gen IT y/o longus. Se clasificaron como ETEC 63% del total de las cepas. Esta investigación sugiere fuertemente que esta bacteria fue el principal biocontaminante, quizá por la poca higiene de las personas, la falta de inocuidad de los alimentos y la contaminación de los ecosistemas en general.

Palabras clave: *Escherichia coli*, ETEC, factores de virulencia, gen LT, gen ST, longus.

Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) generate the travel diarrhea or watery diarrhea both children and adults, its transmission is related by uncooked and contaminated food. This bacterium has caused epidemiologist outbreak in Mexico until 70% of the cases. The pathogenicity mechanism of ETEC involves the expression of colonization factors, production of adhesina and enterotoxins like LT or ST and longus pili. In the Pathogenesis Laboratory of Puebla University there are collections of 156 strains of *E. coli* isolated from diverse environmental and clinical samples. In this investigation we typified the enterotoxigenic *E. coli* from the collection based upon the identification of LT and/or ST genes and longus protein, using for that the PCR and Western blot techniques respectively. Our results showed that ETEC was found in 75% of air and water strains, in 73.52% from children strains, in 61.11% from food strains and in 42.85% from adult clinical samples. Of the total collection strains only the 51.58% expressed two virulence factors (ST gene and longus protein) and the 10.95% expressed IT gene and/or longus protein. We classified like ETEC to 63.0% of the total of the collection strains. This investigation suggests hardest that ETEC were the major biocontaminant perhaps for the lacks hygiene of the individuals, foods and ecosystems pollution in general.

Keywords: *Escherichia coli*, ETEC, virulence factors, LT, gene, ST gene, longus.

* Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, BUAP Edificio 76, complejo de Ciencias, 3er. Piso, C. U., C. P. 72570, tel. y fax 2332010 ext. 12. ** Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Introducción

Las enfermedades diarreicas representan un problema de salud pública y causan importantes niveles de morbilidad y mortalidad infantil en muchos países en desarrollo. Su transmisión y frecuencia se relaciona con la falta de higiene y la pobreza, así como con la desnutrición y las malas condiciones sanitarias.^{1,2,3} En México, las enfermedades diarreicas ocupan uno de los primeros lugares en la morbilidad de niños menores de cinco años, generan 7.4% en la demanda de consulta en los servicios de salud y 10% de las hospitalizaciones pediátricas. De acuerdo con estudios epidemiológicos de enteropatógenos, en el cuadro 1 se observa la frecuencia de los agentes etiológicos más aislados y su mecanismo de transmisión.

Cuadro 1

Frecuencia y principales mecanismos de transmisión en pacientes que presentaron diarrea.

| Frecuencia | % | Agente | Mecanismo de transmisión |
|------------|---------|--------------------------------|--|
| ALTA | 12 - 20 | <i>Rotavirus</i> | Contacto directo y, posiblemente, vía aérea. |
| | 10 - 22 | <i>Escherichia coli</i> | Agua y alimentos contaminados. |
| | 12 - 15 | <i>Campylobacter jejuni</i> | Leche y otros alimentos, agua. |
| MEDIA | 8 - 12 | <i>Shigella sp.</i> | Contacto directo y alimentos contaminados. |
| | 2 - 6 | <i>Salmonella sp.</i> | Agua y alimentos contaminados. |
| | 2 - 6 | <i>Giardia lamblia</i> | Agua y alimentos contaminados. |
| BAJA | 1 - 3 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | Agua y alimentos contaminados. |
| | 1 | <i>Entamoeba histolytica</i> | Contacto directo y alimentos contaminados por quistes. |

La *Escherichia coli* es uno de los agentes causantes de diarreas desde 1920.⁴ Esta enterobacteria puede presentarse por periodos cortos en el medio ambiente, sin embargo, para su transmisión requiere de nuevos individuos hospederos para que pueda persistir a largo plazo.⁵ Al igual que otras bacterias, ésta genera cierto tipo de mecanismos biológicos que conducen a un fenotipo de resistencia que les permite sobrevivir.⁶ Estos mecanismos pueden ser: producción de enzimas, cambios de permeabilidad, modificación de las proteínas de unión, mutaciones ribosómicas y cromosómicas, eliminación de requerimientos de timina, entre otros.^{7,8} Estas bacterias también han desarrollado ciertos factores de virulencia para causar daño al hospedero, ya que promueven la colonización y facilitan la sobrevivencia de las bacterias infectantes, en la que destaca su adherencia mediada por pilis o fimbrias, la presencia de enterotoxinas, las adhesinas no fimbriales y las cápsulas.⁹

La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las categorías diarrogénicas reconocidas actualmente, causa la diarrea del viajero —la diarrea acuosa— tanto en niños como en adultos.¹⁰ En México, esta bacteria se ha aislado hasta en 70% de los casos y su desarrollo se relaciona con zonas donde la higiene es precaria; asimismo, en el ámbito mundial es la categoría de mayor aislamiento. 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.¹¹ También contiene una fimbria denominada longus de 22kDa que presenta homología con la región N-terminal de la estructura de los pili tipo IV clase b que incluye TCO (pilus corregulado con la toxina colérica) de *Vibrio cholerae*.^{12,13}

En este estudio se realizó la identificación de los genes LT y ST, así como de la proteína longus en cepas *E. coli* aisladas previamente del aire, agua, alimentos y de pacientes (niños y adultos) de la ciudad de Puebla, para determinar la presencia de ETEC en el ambiente.

Material y métodos

Cepas y condiciones de cultivo. En el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la BUAP se cuenta con 157 cepas de *E. coli* que se recolectaron —en el estado de Puebla— de agua (28 cepas), alimentos (18), aire (28), muestras clínicas de niños (34) y de adultos (49). Estas muestras de *E. coli* se utilizaron para identificar el patotipo ETEC, caracterizado por la producción del pili longus y dos toxinas. La cepa E9034/A se usó como control (+) y la E9034/P como control (-).

Identificación de los genes LT y ST. Para identificar estos genes se utilizó la técnica de PCR. Se usaron primers específicos realizando una mezcla total de 25 μ l (Buffer 10x, Mg2Cl, Taq Polimerasa, dntp's, 1 μ l de cada oligonucleótido y 5 μ l de ADN problema), posteriormente dicha mezcla se sometió a 37 ciclos de amplificación, las muestras se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y por último se tiñeron con bromuro de etidio.

Identificación de longus. Se realizaron extractos proteicos de las cepas y también se corrieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12%, se adicionaron 15 μ l del extracto y se dejó correr a 120 V/2 hrs, después los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante campos semihúmedos y finalmente estas membranas interactuaron con un antisuero específico durante 24 hrs y con una anti-IgG para ser reveladas con una solución diaminobencidina (DAB).

Resultados

Se demostró que del total de las cepas de *E. coli* 4.45% presentó una amplificación de 696pb que corresponde al gen LT (figura 1), siendo las muestras clínicas de adultos las de mayor frecuencia con 10.20% (5/49); seguidas de las muestras de alimentos con 5.55% (1/18); las de aire con 3.57% (1/28); mientras que las de agua y las muestras clínicas de niños, no presentaron amplificación de este gen.

Con respecto a la amplificación del gen que expresa ST, se encontró que el 24.20% mostró una banda de 186pb (figura 2), el grupo que registró mayor porcentaje de amplificación fue el de muestras clínicas de niños con 38.23% (13/34), seguidas por el grupo de agua 35.71% (10/28), el de alimentos que presentó 33.33% (6/18), el grupo de aire con 17.85% (5/28) y las cepas de muestras clínicas de adultos con 8.16% (4/49).

Figura 1
Amplificación del gen LT en cepas de *E. coli*.
Carriles: 1 Marcador Molecular, 2 Control E9034A (+), 3 Control E934P(-), 4-8 Cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes.

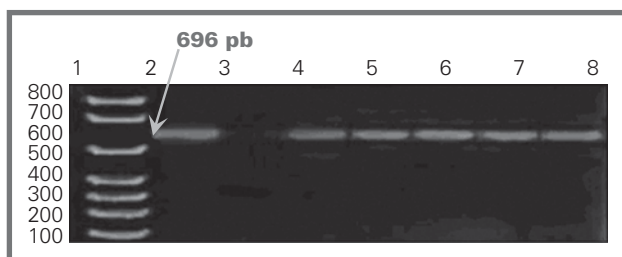
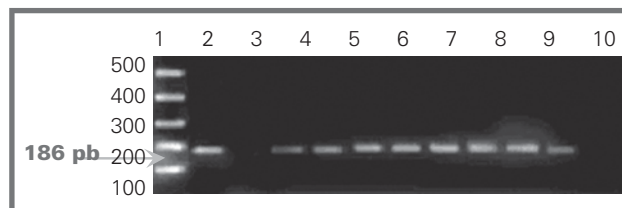
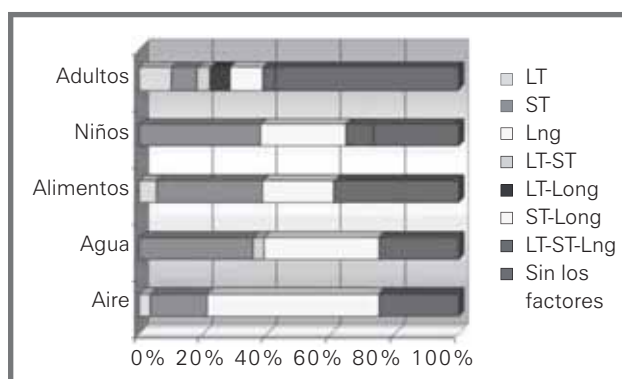


Figura 2
Amplificación del gen ST en cepas de *E. coli*.
Carriles: 1 Marcador Molecular, 2 Control E9034A (+), 3 Control E9034P (-), 4-10 Cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes.



Comparando la presencia de ambas toxinas encontramos que 1.91% del total de cepas presentó tanto el gen de LT como el ST, de las cuales sólo las de los grupos clínicos de adultos y la del agua contuvieron ambas toxinas en 4.08% y 3.57%, respectivamente (gráfica 1).

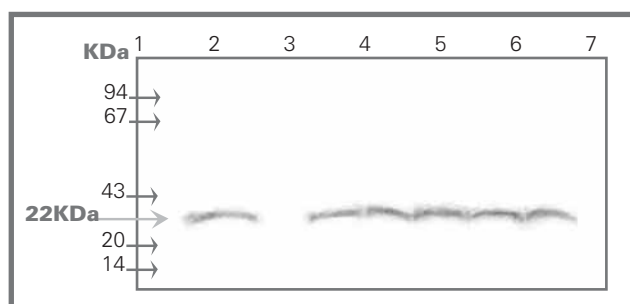
Gráfica 1
Presencia de los factores de virulencia en las cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes.



La proteína longus se demostró con una banda de 22 KDa mediante inmunotransferencia (figura 3), la asociación del gen LT-longus sólo se presentó en el grupo clínico de adultos con 6.12%, la presencia de ST-longus se registró en todos los grupos, pero fueron las cepas del aire las que mayor porcentaje registraron (15/28), seguidas por las del agua (10/28), las cepas clínicas de niños (9/34), las de alimentos (4/18) y, finalmente, las de muestras clínicas de adultos (5/49). El 8.82% de las cepas de niños y 4.08% de las de adultos presentaron los tres factores de virulencia de ETEC.

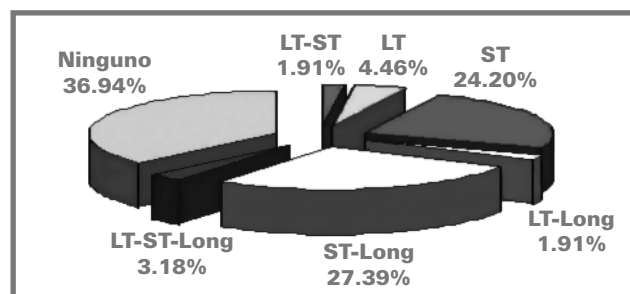
Figura 3

Membrana de nitrocelulosa con la proteína Longus de las cepas *E. coli*. Carril: 1 Control E9034A (+), 2 Control E9034P (-), 3-7 Cepas de los diferentes ambientes.



Gráfica 2

Comparación de la presencia de factores de virulencia en las cepas *E. coli*.



Del total de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes, 63.03% tuvo por lo menos uno de los tres factores de virulencia, de los cuales 24.20% pertenece a la amplificación del gen ST, 4.45% presentó la amplificación para el gen LT y 1.91% pertenece a cepas de *E. coli* que tienen ambos genes (ST y LT), el resto de las cepas (36.94%) no mostraron ninguno

de estos genes; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que tengan otros factores de virulencia que no se buscaron aquí o que pertenezcan a otro patotipo (gráfica 2).

Discusión

La elevada incidencia de la presencia del gen ST en las cepas aisladas de niños concuerda con lo hallado por T. Vu Nguyen *et al.* (2005), quienes proponen que las enfermedades diarreicas provocadas por ETEC están más relacionadas con infantes. Sin embargo, Schultsz¹⁴ (1994) obtuvo mayor detección de LT en niños debido a que son más vulnerables a ETEC. En este trabajo se encontró que esta bacteria estuvo presente en todas las muestras como patotipo en diferentes porcentajes, hecho que sugiere la biocontaminación con ETEC de diferentes ambientes y la falta de higiene de las personas. Los resultados resaltan la importancia de vigilar a los niños y viajeros de países en desarrollo, como el nuestro. Con base en lo anterior, se hace necesario buscar otros patotipos de *E. coli* en el ambiente para esclarecer las vías de infección hacia el humano.

A pesar de que existen investigaciones dirigidas a la tipificación serológica de las *E. coli* diarrogénicas, los resultados que se informan en esta investigación sugieren la búsqueda de factores de virulencia específicos que expresan estos microorganismos en el medio ambiente, ya que su presencia es resultado de las interacciones celulares y las estrategias de los microorganismos para adaptarse al ambiente e infectar a nuevos hospederos.

Conclusión

Identificamos el patotipo ETEC en toda la colección bacteriana pero con diferentes porcentajes, lo cual dependió del ambiente de donde se aisló. Fueron las cepas del agua y las del aire las que expresaron en mayor medida los factores de virulencia buscados en este estudio. Del total, 63.03% de cepas presentó por lo menos un factor de virulencia y la amplificación del gen ST con la expresión de longus fue de 27.39%.

Bibliografía

1. Carneiro, M. S., M. da Silva, H. S. Carbonare, P. Palmeira, T. M. Deleneri, C. A. Honorio y R. L. Trabulsi, "Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*", *Rev Microbiol*, 1996; 27: 120-125.
2. Faugundes, N. U., Enteropathogenic *Escherichia coli* infection infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations", *Microbiological Reviews*, 1996; 27: 117-119.
3. Franzolin M. R., Barbosa A. R., R. Keller, G. T. Tardelli, L. Beutin, B. M. Lima, C. Milroy, A. Strina, H. Ribeiro y T. L. Rachid, "Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005; 100: 359-63.
4. Vu Nguyen, T., P. Le Van, C. Le Huy, K. Nguyen y A. Weintraub, "Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam", *JCM*, 2005; 43: 755-760.
5. Savageau, M. A., "The genetic and ecological characteristics of *Escherichia coli* in its primary and secondary habitats", *Amer Nat*, 1983; 122: 732-744.
6. Dever, L. A. y T. S. Dermody, "Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics", *Arch Inter Med*, 1991; 151: 886-895.
7. Bush, K., "The evolution of beta-lactamases", en D. Chadwick (ed.), Ciba Foundation Symposium 207. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread, Nueva York, *John Wiley and Sons*, pp. 152-166.
8. Miller, R. V. "Intercambio de genes bacterianos en la naturaleza" *Investigación y ciencia*, 1988; 20-24.
9. Mims, C. N., A. Dimmock, A., "General principles", en C. N. Mims, A. Dimmock, Nash y Stephen (eds.), Mims Pathogenesis of infectious disease, 4ª ed., Nueva York, *Academic Press*, 1995, pp. 1-7.
10. Shaheen, H. I., S. B. Khalil, M. R. Rao, R. Elyazeed, T. Wierzba, L. Peruski, S. Putnam, A. Navarro, B. Morsy, A. Cravioto, J. Clemens, A. M. Svennerholm y S. Savarino, "Phenotypic profiles of Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood diarrhea in rural Egypt", *JCM*, 2004; 42: 5588-5595.
11. Tauschek, M., R. Gorrell, R. A. Strugnell y R. Robins-Browne, "Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxina by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*", *PNAS*, 2002; 99: 7066-7071.
12. Girón, J. A., M. M. Levine y J. B. Koper, "Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*", *Molec. Microbiol*, 12, 1994, pp. 71-82.
13. Gómez-Duarte, O. G., A. Ruiz-Tagle, D. C. Gómez, G. I. Vibound, K. G. Jarvis, J. B. Koper y J. A. Girón, "Identification of lngA, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*", *Microbiology*, 1999; 145: 1809-1816.
14. Schultsz, C., G. J. Pool, R. Ketel, B. Wever, P. Speelman y J. Dankert, "Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Stool Samples by Using Nonradioactively Labeled Oligonucleotide DNA Probes and PCR", *JMC*, 1994; 32: 2393-2397.