

Identificación de tres factores de virulencia en cepas de *Escherichia Coli* aisladas de humanos

Edith Chávez Bravo¹, María Del Rayo García Varillas², Fabiola Avelino Flores¹, Constantino Gil Juárez¹, Elsa I. Castañeda Roldán¹

Identification of three virulence factors in *E coli* strains isolated from humans.

Fecha de aceptación: septiembre 2007

Resumen

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es el patotipo diarrogénico causante de los niveles más altos de morbilidad, tanto para niños como para adultos; posee atributos de virulencia como el pili formador de bucles (Bfp), mediante el cual, la bacteria se une a las células epiteliales y desencadena una serie de mecanismos intracelulares que dan lugar a la enfermedad. Este patotipo puede contar con otros factores de virulencia, lo cuales, aunque no sean en sí mismos un mecanismo de patogenicidad, sí son de importancia puesto que constituyen elementos de sobrevivencia de la bacteria, como es el caso de los sideróforos y de la resistencia a metales pesados.

En este trabajo, se identificó el gen de *bfpA*, la presencia de sideróforos y la resistencia a metales pesados en 48 cepas *E. coli* de pacientes adultos de la ciudad de Puebla. Del total de cepas el 30% amplificó el gen *bfpA*, el 89.6% fue positivo a sideróforos y todas presentaron resistencia a metales pesados (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V). El 25% del total de las cepas presentó los tres factores de virulencia, el 63% sólo sideróforos y resistencia a metales pesados. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Kuhnert (1999), quien propone que los genes de virulencia ayudan a EPEC para adaptarse a su hospedero, expresándose durante el proceso de infección, facilitando la adherencia, la invasión o ambas. También nuestros resultados indican que EPEC expresa al menos dos factores de virulencia en las cepas de *E. coli* aisladas de adultos de la ciudad de Puebla.

Palabras clave: EPEC, sideróforos, metales pesados

Abstract

Escherichia coli enteropathogenic (EPEC) is the diarrheagenic pathotype cause of the highest morbidity in children and adults, it counts with Bundle-Forming Pilus (BFP) as a virulence attribute. This pili attaches the bacterium to the epithelial cells and trigger a set of transduction signals causing the colonization and disease. EPEC have other virulence factors, no pathologic by their selves, but essential to the bacteria surviving, like siderophores production and heavy-metal resistance. In this work the *bfpA* gene, the siderophores production and the heavy-metal resistance, were reviewed in 48 *E. coli* strains from adult patients from Puebla – México; 30% of the strains amplified *bfpA* gene, 89,6% were positive to siderophores production and all of them offered resistance to heavy metals (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg and V); 25% presented three virulence factors, 63% single siderophores production and resistance to heavy metals. Our results agree with that reported by Kuhnert *et al.* (1999), who propose that virulence genes help EPEC to adapt to host and express itself during infection process, being facilitated adhesion, invasion or both. We demonstrated in this study too, that EPEC expressed at least two virulence factors in *E. coli* strains isolated from adult patients form Puebla – Mexico.

Key words: EPEC, siderophores, heavy metals.

1 Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP Edificio 76 Complejo de ciencias 3er piso CU,

2 Universidad Politécnica de Puebla 3er carril del Ejido Serrano S/N San Mateo Cuanala, Juan C. Bonilla

Introducción

Una de las enfermedades que causan importantes niveles de morbilidad y mortalidad infantil son las diarreas, constituyendo un problema de salud pública. *Escherichia coli* es uno de los agentes bacterianos responsables de esta situación. Esta bacteria Gram negativa, predomina en forma aerobia y anaerobia facultativa en el tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente.¹

Las *E. coli* patógenas pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas); o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas).^{2,3}

Existen diferentes categorías de *E. coli* diarrogénicas, pero la infección por EPEC ocasiona síntomas tales como: fiebre moderada, malestar, vómito y diarrea, se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas sin sangre ni moco. El cuadro clínico aparece después de un período de incubación de 4 a 12 horas; durante la infección existe una gran variedad de mediadores intracelulares del transporte electrolítico. Los padecimientos debidos a EPEC afectan de manera primaria a los infantes menores de 2 años y su relevancia es aún mayor en los menores de 6 meses.^{4,5} Los factores de virulencia que presenta esta bacteria están codificados en plásmidos o islas de patogenicidad, genes que pueden conjugarse o tienden a adaptarse en su hospedero para expresarse durante el proceso de infección, convirtiéndose en cepas cada vez más virulentas.

Uno de los factores primordiales para la adherencia de EPEC es el pilus formador de bucles (Bfp).⁶ La presencia de otros factores puede ayudarle a sobrevivir fuera de hospederos: la presencia de sideróforos y su resistencia a los metales pesados.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de las bacterias, la competencia por el metal, es un factor importante en la lucha entre el hospedero y el parásito, lo cual tiene como consecuencia el desarrollo de la infección o bien su inhibición, por lo que el microorganismo sintetiza sideróforos para la captación de hierro.⁷

La acumulación de metales en bacterias se da en altas concentraciones, lo cual puede incidir en la toxicidad del metal contra el organismo que los acumula y contra la comunidad microbiana, pero el almacenamiento intracelular de estos compuestos

confiere resistencia a metales pesados en el caso de algunas bacterias.^{8,9} En el microorganismo, hay un límite para la cantidad de metal que se puede acumular sin perder la viabilidad y, por lo general, antes de llegar a concentraciones letales, se activan los mecanismos de resistencia y se induce la síntesis de enzimas transformadoras o de proteínas enlazadoras de metales.^{10,11} Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es identificar cepas de *E. coli* patógenas, a partir de una colección de 48 cepas del laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la ciudad de Puebla, mediante la búsqueda de tres factores de virulencia que son: la amplificación del gen *bfpA*, la producción de sideróforos y la resistencia a metales pesados.

Material y método

Se analizaron un total de 48 cepas, aisladas en trabajos previos, de pacientes adultos con cuadros diarreicos. Se utilizó la cepa E2348/69 como control positivo de la expresión de Bfp por contener el gen *bfpA*; como cepa control negativo se usó a JPN 15. Todas las cepas fueron sometidas a los mismos procedimientos para la búsqueda de los tres factores de virulencia.

Identificación del gen *bfpA*.

Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los fragmentos de DNA amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio para observar una banda de 326pb en un transiluminador de luz UV.

Determinación de la producción de sideróforos.

Se utilizó el medio CAS (*Chrome azurol sulfate assay*). Las cepas de *E. coli* se sembraron e incubaron durante 96 horas a 37°C. Se consideraron cepas productoras de sideróforos aquellas que al crecer viraron la coloración del medio CAS a un color anaranjado.

Determinación de la resistencia a metales pesados

La resistencia a los metales pesados se realizó en agar Mueller-Hinton con dos concentraciones de metales pesados que fueron de 1,000 y 2,000 ppm de Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V. Las cepas se hicieron crecer en estrías por 24 horas a 37°C, el crecimiento de ellas fue interpretado como resistencia.

Resultados

De las 48 cepas de *E. coli* estudiadas, el 30% amplificó el gen *bfpA*, mostrando una banda de 326 pb en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio como se muestra en la figura 1. La presencia de este factor de virulencia sugiere fuertemente que esas cepas de *E. coli* pertenecen a la categoría de EPEC.

Figura 1

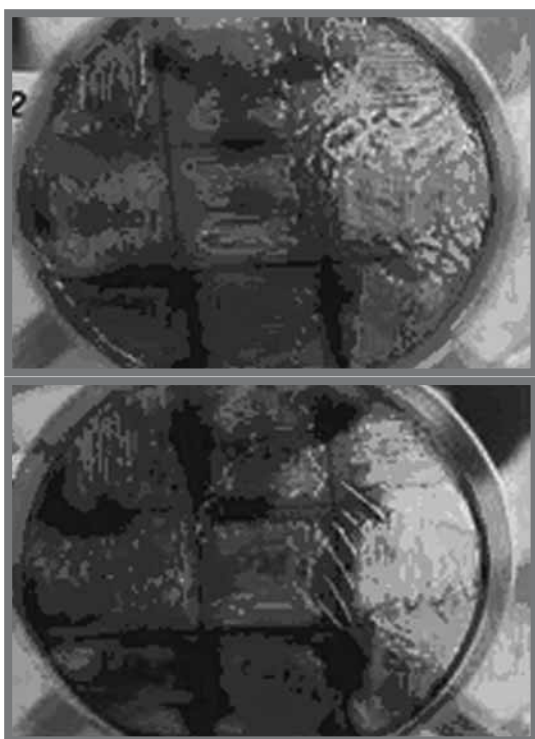
Amplificación del gen *bfpA* en cepas *E. coli*. Carriles:
1. Marcador molecular, 2 Control E2348/69 (+), 3 Control JPN15 (-), 3- 10 Cepas *E. coli* aisladas de muestras clínicas.



La presencia de halos anaranjados en el medio CAS significó que las cepas de *E. coli* produjeron sideróforos, estos resultados se muestran en la Figura 2. Este factor de virulencia estuvo presente en más del 80% de las cepas de *E. coli*.

Figura 2

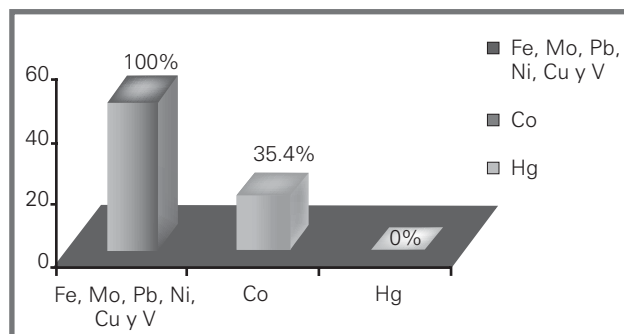
Cepas *E. coli* productoras de sideróforos



En cuanto a la determinación de la resistencia de las cepas de *E. coli* a dos concentraciones de metales pesados, encontramos que todas las cepas fueron resistentes a Fe, Mo, V, Cu, Ni y Pb, sólo el 35.4% fue resistente a Co y ninguna fue resistente a Hg. Estos resultados se muestran en la Figura 3.

Figura 3

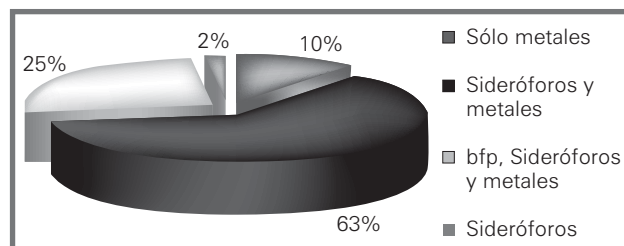
Comparación de la resistencia a metales pesados de las cepas *E. coli*



Al realizar una comparación de la presencia de los tres factores de virulencia en las cepas de *E. coli*, encontramos que 30:48 cepas expresaron dos de los factores de virulencia que fueron la producción de sideróforos y la resistencia a metales; 12:48 cepas expresaron los tres factores de virulencia; 5:48 cepas únicamente fueron resistentes a metales pesados; y finalmente, 1:48 sólo produjo sideróforos. Estos datos se muestran en la Figura 4.

Figura 4

Comparación de los factores de virulencia de las cepas *E. coli*



Discusión

En este trabajo se realizó la identificación de tres factores de virulencia en 48 cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos, de las cuales 14 cepas de adultos (30%) expresaron el gen *bfpA*. Los resultados de este estudio concuerdan con lo hallado por Sepúlve-

da y col. (1994) quienes aislaron de pacientes adultos un 28% de cepas de EPEC. En otro estudio realizado por Nataro y Kaper (1998), los autores demostraron mayor frecuencia de cepas que expresaron *bfpA* aisladas de niños menores de 5 años. El porcentaje de EPEC en ese estudio fue del 30%, sin descartar otros patotipos diarreicos.

Por otro lado, demostramos que el 89.58% de las cepas de *E. coli* produjo sideróforos, sugiriendo que estas cepas pueden ser capaces de utilizar el hierro del hospedero. Los factores de virulencia pueden tener un gran número de funciones, incluyendo la capacidad de promover el crecimiento de un microorganismo dentro del hospedero, evadiendo los mecanismos bactericidas y regulando la capacidad de sobrevivencia.¹⁴

La elevada resistencia a los metales pesados que presentaron las cepas de EPEC en este trabajo, indicó la posibilidad de que esas cepas hayan estado en contacto continuo con estos metales en el medio ambiente o que las cepas interactuaron con otros microorganismos resistentes intercambiando información genética, lo que significa una gran interacción microbiana en el ambiente contaminado con estos metales.

Conclusiones

Las 48 cepas de *E. coli* aisladas de adultos con diarrea expresaron de uno a tres factores de virulencia en distintos porcentajes, correspondiendo al 30% las que amplificaron el gen *bfpA*, el 89.5% las que produjeron sideróforos, el 100% las que fueron resistentes a 1,000 ppm y 2,000 ppm de Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V. En general las cepas de *E. coli* que expresaron los tres factores de virulencia fueron el 25%, mientras que el 63% sólo expresó producción de sideróforos y resistencia a metales.

Bibliografía

1. Gyles C.L. "*Escherichia coli* in domestic animals and humans." *CAB International*, 1994; Wallingford, UK.
2. Johnson J.R. "Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection." *Clinical Microbiology Reviews*, 1991; 4:80-128.
3. Donnenberg MS and Kaper JP: "Enteropathogenic *Escherichia coli*." *Infect. Immun.*, 1992; 60(10): 3953-3961.
4. Guerrant RL, Hugues JM, Lima NL, and Crane J. "Diarrhea in developed and developing countries: Magnitude, special settings, and etiologies." *Rev Infect Dis.*, 1990; 12(1): S41-S50.
5. Kaper J.B. and O'Brien A.D. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. 1998; ASM Press, Washington, USA.
6. Puente J. L., D. Bieker, S. W. Ramer, W. Murray and G. K. Schoolnik. "The bundle forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals." *Molec. Microb.* 1996; 20: 87-100
7. Faraldo Gómez J.D. and Sansom Mark S.P. "Adquisition of siderophores in gram-negative bacteria." *Rev. Nature, Molecular cell Biology*. 2003; 4: 105-116.
8. Kasan H. "The role of wastw activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution." *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, 1993; 23:79-117.
9. Jackson T, West M, Leppard G. "Accumulation of heavy metals by individually analyzed bacterial cells and associated non-living material in polluted lake sediments." *Environ. Sci. Technol*, 2000; 33: 3795-3801.
10. Silver S. "Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation." *Res. Microbiol.* 1994; 195: 61-66.
11. Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. "Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics." *Cur Microbiol* 2000; 41: 151-156.
12. Valdespino Gómez J. I. García García M. de I; Del Río Zolezzi A; Giono Cerezo S; Salcedo Alvarez R. A; Sepúlveda Amor J; "Epidemiología y etiología de las diarreas Infecciosas. El caso de México." *Rev Latinoam Microbial*, 1994; 36:307-324.
13. Nataro J.P. and Kaper J.B. "Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical." *Microbiology Reviews*, 1998; 11:142-201.
14. Casadevall A. and Pirofski L. "Host pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection and disease." *Infect immune*, 2000; 68:6511-6518.