

## Identificación de los genotipos patógenos de *Escherichia coli* por PCR en tiempo real y análisis de su resistencia a los antibióticos en el estado de Michoacán, México.

Francisco Javier Ávila Cortés\*  
Irvin Eduardo Jácome Galarza\*\*  
Aldo Rafael Silva Gamiño\*\*\*  
Octavio Silva García\*\*\*

\*Jefe del servicio de Infectología del Hospital Infantil de Morelia.

\*\*Jefe del laboratorio de Biología molecular del Laboratorio estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán.

\*\*\*Químico Farmacobiólogo, egresado de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Mexicana San Nicolás de Hidalgo.

Este artículo debe citarse como: Ávila-Cortés FJ, Jácome-Galarza IE, Silva-Gamiño AR, Silva-García O. Identificación de los genotipos patógenos de *Escherichia coli* por PCR en tiempo real y análisis de su resistencia a los antibióticos en el estado de Michoacán, México. Rev Enf Infecc Pediatr Mex 2011;25(1):13-16.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

### RESUMEN

**Antecedentes:** el síndrome diarreico tiene un origen muy diverso pero *Escherichia coli* es la primera causa de diarrea bacteriana y un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana.

**Objetivo:** identificar los genotipos patógenos de *E. coli* por los genes que codifican los factores de patogenicidad. Se utilizó la técnica de la PCR en tiempo real y se evaluó la susceptibilidad de los patógenos aislados a los antibióticos.

**Material y método:** estudio longitudinal, experimental y ambispectivo que incluyó 100 aislamientos de muestras clínicas provenientes del Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos y el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, México, obtenidas entre septiembre de 2009 y marzo de 2010. Se utilizó la técnica de la PCR en tiempo real y se evaluó la susceptibilidad de los patógenos aislados a los antibióticos.

**Resultados:** de las muestras tipificables, 44% (44 cepas) contenía por lo menos un gen de patogenicidad, y la mayor parte fue de *E. coli* enterotoxigénica (50%, 22 cepas), seguida por *E. coli* enteroagregativa (41%, 18 cepas) y en menor porcentaje *E. coli* enteropatógena (9%, 4 cepas).

**Conclusiones:** los resultados encontrados muestran una mayor incidencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, al igual que lo reportan la mayoría de los autores. El patotipo identificado con menos prevalencia fue *E. coli* enteropatógena. El resto de los genotipos patógenos no fue identificado.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, patotipos, reacción en cadena de la polimerasa

### ABSTRACT

**Background:** diarrhea syndrome has a very diverse origin, but *Escherichia coli* is the leading cause of bacterial diarrhea and a reservoir of antimicrobial resistance genes.

**Objective:** To identify genotypes pathogenic *E. coli* genes that encode pathogenicity factors. We used the technique of real-time PCR and evaluated the susceptibility of isolated pathogens to antibiotics.

**Material and methods:** longitudinal, experimental and ambispective involving 100 isolates of clinical samples from the Hospital Infantil de Morelia Eva Samano de Lopez Mateos and the State Public Health Laboratory of Michoacan, Mexico, obtained between September 2009 and March 2010. We used the technique of real-time PCR and evaluated the susceptibility of isolated pathogens to antibiotics.

**Results:** Of the typeable samples, 44% (44 strains) contained at least one gene of pathogenicity, and most were from *E. enterotoxigenic coli* (50%, 22 strains), followed by *E. coli* enteroaggregative (41%, 18 strains) and to a lesser extent *E. coli* enteropathogenic (9%, 4 strains).

**Conclusions:** The results show a higher incidence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, as has been reported in most of the authors. The less prevalent pathotype was identified with *E. coli*. The rest of the pathogens was identified genotypes.

**Key words:** *Escherichia coli*, pathotypes, chain reaction of polymerase

La diarrea es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta cada año 4,000 millones de casos de diarrea, de los cuales 4,116,000 fallecen. Del total de las muertes causadas por diarrea, 2,200,000 ocurren en niños menores de 5 años.<sup>1</sup> El Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) reportó que en México la diarrea es la primera causa de muerte en preescolares y la tercera causa de muerte en niños menores de un año.<sup>2</sup> En Michoacán, el Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones (SEED) reportó una mortalidad de 13.5/100,000 niños menores de 5 años por diarrea aguda durante 2007.<sup>3</sup>

El síndrome diarreico tiene un origen muy diverso pero *Escherichia coli* es la primera causa de diarrea bacteriana y un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana. A esta bacteria se le considera parte de la microbiota normal del intestino, aunque existen seis genotipos capaces de producir enfermedad diarreica, también llamados patotipos. Estos patotipos son: *Escherichia coli* enterotoxigénica, que causa la diarrea del viajero y la diarrea del destete; *Escherichia coli* enteropatógena, causa diarrea aguda principalmente en niños; *Escherichia coli* enterohemorrágica, capaz de causar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico; *Escherichia coli* enteroinvasiva, puede ocasionar brotes de diarrea con sangre parecida a la que produce *Shigella spp*; *Escherichia coli* enteroagregativa, causa diarrea persistente en niños y *Escherichia coli* de adherencia difusa, que causa diarrea acuosa en niños.<sup>4,5</sup>

En los laboratorios se usan pruebas de rutina con las que se puede identificar a *Escherichia coli* en coprocultivos, pero con estos análisis no es posible diferenciar entre los genotipos patógenos y los de biota normal, por esto es necesario usar técnicas que permitan dicha diferenciación. Destacan los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, que consisten en la síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos a partir de una molécula de material genético que sirve de molde. Esta técnica permite identificar genes expresados por los genotipos patógenos y visualizarlos en tiempo real, ciclo a ciclo.<sup>6,7</sup>

En este estudio se identificaron los genotipos patógenos de *E. coli* por los genes que codifican los factores de patogenicidad. Se utilizó la técnica de la PCR en tiempo real y se evaluó la susceptibilidad de los patógenos aislados a los antibióticos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio longitudinal, experimental y ambispectivo que incluyó 100 aislamientos de muestras clínicas provenientes del Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos y el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, México, obtenidas entre septiembre de 2009 y marzo de 2010. Las muestras de hisopados rectales fueron obtenidas de las diferentes jurisdicciones sanitarias de Michoacán y las muestras de recolección diarreica directa se obtuvieron de la unidad de rehidratación oral y consulta externa del Hospital infantil de Morelia.

Las cepas se identificaron por las características de las colonias en el cultivo en medios selectivos y por pruebas bioquímicas.

## PRIMERS UTILIZADOS

Se utilizaron ocho *primers* de ida y ocho de vuelta, con los que se identificaron ocho genes que codifican para factores de patogenicidad en los distintos genotipos patógenos por medio de la RT-PCR y el SYBR Green I como agente fluorescente intercalante. El gen *eae* corresponde a *E. coli* enteropatógena, los genes *eae* y *stx* a *E. coli* enterohemorrágica, los genes *est* y *elt* a *E. coli* enterotoxigénica, el *ipaH* a *E. coli* enteroinvasiva, y *aggR*, *CVDR432* y *aspU* a *E. coli* enteroagregativa.<sup>8</sup> (Cuadro 1)

## RESULTADOS

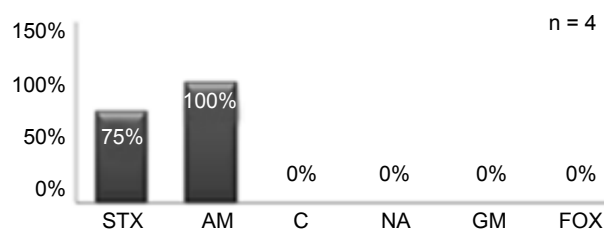
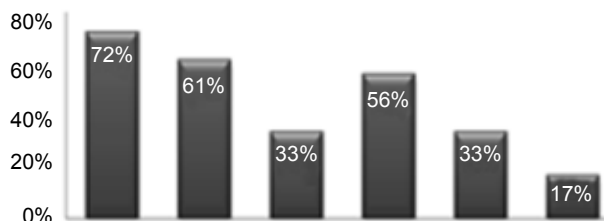
Se realizó el análisis de la resistencia a los antibióticos de los patotipos con los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute y sensibilizados en placa.

De las muestras tipificables, 44% (44 cepas) contenía por lo menos un gen de patogenicidad, y la mayor parte fue de *E. coli* enterotoxigénica (50%, 22 cepas), seguida por *E. coli* enteroagregativa (41%, 18 cepas) y en menor porcentaje enteropatógena (9%, 4 cepas). (Figura 1)

En las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se encontró que la resistencia más alta es a los de primera elección como trimetoprim/sulfametoxazol y ampicilina. El antibiótico con menor resistencia es la fosfomicina; esto se observó en todos los patotipos. (Figuras 2, 3 y 4)

**Cuadro 1.** Datos de los primers usados en el estudio<sup>8</sup>

Designación	Secuencias 5' a 3'	Gen	Tamaño del amplicón (pb)
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	eae	881
SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTGG		
VTcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	stx	518
VTcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT		
AL65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	est	147
AL125	CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC		
LT1	TCTCTATGTGCATACGGAGC	elt	322
LT2	CCATACTGATTGCCGCAAT		
IpaIII	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	ipaH	619
IpaV	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
aggRsk1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	aggR	254
aggRsk2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		
Eaggfp	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	CVDR432	194
Eaggbp	ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC		
aspU-3	GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG	aspU	282
aspU-2	AACCCATTCGGTTAGAGCAC		

**Figura 1.** Genotipos patógenos identificados**Figura 3.** Resistencia a los antibióticos de las cepas enteropatógenas**Figura 2.** Resistencia a los antibióticos de las cepas enterotoxigénicas**Figura 4.** Resistencia a los antibióticos de las cepas enteroagregativas

## DISCUSIÓN

Se logró identificar un número importante de cepas de *Escherichia coli* patógenas con la técnica de PCR en tiempo real por su elevada especificidad y sensibilidad, además de su rapidez. Esta técnica es un método de caracterización más sensible que el colony blot o con antisueros, ya que estas pruebas necesitan la expresión de los genes de patogenicidad o una gran cantidad de antisueros que pueden tener reacción cruzada con otras bacterias.

Los resultados encontrados muestran una mayor incidencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, al igual que lo reportan la mayoría de los autores.<sup>9</sup> En estudios anteriores realizados en nuestro medio, no se reportó la distribución de *E. coli* enteroagregativa, debido a la complicación de su identificación. Este estudio demuestra que esta cepa induce evacuaciones diarreicas al igual que *E. coli* enterotoxigénica. El patotipo identificado con menos prevalencia fue *E. coli* enteropatógena.<sup>10,11</sup> El resto de los genotipos patógenos no fue identificado.

También se encontró una elevada resistencia a los antibióticos de primera elección en diarrea, según lo establecido por la Secretaría de Salud, en los tres genotipos patógenos encontrados. La mayor resistencia es a la ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol, esto es debido al abuso de los antibióticos en nuestro país. Esto disminuye la posibilidad de atacar una infección bacteriana, aumenta los índices de mortalidad y representa un problema económico y de salud pública.<sup>12</sup> Si se considera que las infecciones virales son las más frecuentes, el uso de antibióticos no produce ningún beneficio.<sup>3</sup> El antibiótico con menor resistencia fue la fosfomicina, por lo que este antibiótico puede considerarse como una alternativa

para el tratamiento de la diarrea causada por genotipos patógenos de *Escherichia coli*, sin olvidar la terapia de rehidratación oral como primera acción de tratamiento.<sup>3</sup>

## REFERENCIAS

1. WHO 2004. Global Burden of disease.
2. Sistema Nacional de Información en Salud.
3. Manual de enfermedades diarreicas agudas, prevención, control y tratamiento. Secretaría de Salud, 2009.
4. Guadalupe A. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México 2002;44(5):464-475.
5. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11(1):142-201.
6. Espinoza L. Herramientas molecular. Manual práctico de PCR. 17:517-537.
7. Rodríguez S, Barrera S. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL 2004;7(3)
8. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR Assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. American society of Microbiology 2003;(6)41:2669-2671.
9. Cortés Ortiz IA, Rodríguez Angeles G, Moreno Escobar EA, Tenorio Lara JM, Torres Mazadiego BP y col. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. Salud Publica Mex 2002;44:297-302.
10. Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. Infect. Immun. 60:2541-2543.
11. Gutiérrez-Jiménez J, Vidal JE, Mejía-Albarrán ME, Rescendiz-Sánchez J, Pérez-Miravete A y col. Prevalencia de patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en niños del Hospital Infantil de México. Memorias del 34º Congreso Nacional de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología. 2004.
12. Anahí Dreser, Veronika J Wirtz, Kitty K Corbett, Gabriela Echániz. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. Salud pública Méx 2008;50(supl. 4)