

## APLICACIÓN DE PCR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIGÉNICOS

Bioq. Daniela Carrizo

Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular.

Hospital Interzonal de Niños “Eva Perón”. Av. Virgen del Valle 1050.

Fac. de Cs. de la Salud. Maestro Quiroga 1° cuadra s/n.

Capital-Catamarca

e-mail: [bioqdcarrizo@hotmail.com](mailto:bioqdcarrizo@hotmail.com)

Resumen:

Con el nombre de *E. coli* diarreigénico (ECD) se conoce a un grupo de diversos agentes capaces de producir diarrea en humanos. Dentro de estos ECD existe un grupo de microorganismos responsables de cuadros más severos, las cepas productoras de toxina Shiga (STEC), con la particularidad de poseer factores de virulencia capaces de producir patologías severas como el síndrome urémico hemolítico (SUH). Se analizaron por PCR Multiplex ocho cepas de pacientes asistidos en el Hospital de Niños: dos aisladas de SUH y seis de diarrea, encontrándose para todas los marcadores de virulencia que portaban. La reacción de PCR Multiplex resulta una excelente herramienta diagnóstica para la detección de los factores de virulencia, *stx1*, *stx2*, *E-hlyA* y *rfbO157*, puesta en evidencia en este estudio<sup>1</sup>.

1. Introducción:

La diarrea constituye la principal causa de mortalidad y es un factor importante de morbilidad en niños de países en desarrollo. La tasa de ataque de la enfermedad es de uno a ocho episodios anuales por persona, dependiendo de la edad y condiciones de vida.

En la provincia de Catamarca, la incidencia de diarrea es superior al 60% de los casos en los niños menores de cinco años (según datos proporcionados por el SINAVE). *Escherichia coli* es el patógeno aislado en aproximadamente un 65% de los cultivos de materia fecal de niños que presentan diarrea y/o gastroenteritis aguda, por esto es necesario colocar a las diarreas dentro de la categoría de vigilancia intensificada. Motiva este esfuerzo la emergencia de brotes y patologías relacionadas, como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), ya que se registraron en la provincia desde el año 2002 hasta el presente cinco casos de SUH asociados a *E. coli* O157.

En el Hospital Interzonal de Niños “Eva Perón”, el Servicio de Estadística proporcionó la siguiente información: en el año 2002 se atendieron 6987 consultas por diarrea, remitiéndose al Laboratorio de Microbiología 1060 muestras de materia fecal, en el año 2003, 5957 consultas con 915 muestras analizadas, y en año 2004 sobre 4577 consultas se analizaron 919 muestras.

*E. coli* es un habitante universal del tracto intestinal de humanos y animales homeotermos, y es a partir de la década del '70 uno de los agentes bacterianos mejor caracterizados. Los estudios realizados durante los últimos años han permitido establecer con el nombre *E. coli* diarreigénico (ECD) a un grupo heterogéneo de agentes etiológicos, reconociéndose hasta el presente cinco categorías bien definidas. Recientemente se propuso una sexta categoría cuyo rol como agente diarreigénico aún no está bien dilucidado.

Las categorías de *E. coli* asociados a diarrea son:

---

<sup>1</sup> Palabras clave: *E. coli* diarreigénico, STEC, factores de virulencia, diarrea, PCR Multiplex, toxina Shiga

1. *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENO (EPEC)
2. *Escherichia coli* ENTEROTOXÍGENO (ETEC)
3. *Escherichia coli* ENTEROINVASIVO (EIEC)
4. *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICO (EHEC)
5. *Escherichia coli* ENTEROADHERENTE AGREGATIVO (EaggEC)
6. *Escherichia coli* DE ADHERENCIA DIFUSA (DAEC)

Las diferencias entre las cepas de distintas categorías de *E. coli* diarreigénicos son: poseer distintos factores de virulencia; establecer distintas interacciones con la mucosa intestinal; causar un síndrome diarreico diferente; presentar distinta epidemiología; pertenecer a distintos serotipos O:H.

Las cepas productoras de toxina Siga o Verotoxina son agrupadas como cepas STEC, y se consideran patógenos emergentes relacionados a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). *E. coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de STEC, que junto a O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM, entre otros, comparten el mismo potencial patogénico. Los serotipos de STEC asociados a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la misma categoría de EHEC (Levine, 1987).

La infección por cepas STEC puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), siendo los niños y ancianos los grupos más vulnerables, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y alto riesgo de evolución a SUH o PTT.

El cuadro clínico de infección por STEC incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea sin sangre y evidencia de edema de la mucosa colónica como síntomas iniciales, seguidos de diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días, que en la mayoría de los casos es autolimitada, sin embargo aproximadamente 5 a 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico sino de sostén.

La transmisión de cepas patógenas puede efectuarse a través de carne cruda o mal cocida, verduras crudas o mal lavadas, alimentos contaminados y por el agua, también puede efectuarse de persona a persona por la vía fecal-oral. La asociación entre SUH e infección con cepas del serogrupo O157 fue demostrada primero en Canadá en la década del '80 y posteriormente confirmada por numerosos estudios realizados en distintos países, incluida la Argentina (López, 1989; Rivas, 1996).

Todas las categorías de ECD tienen en común la capacidad de colonizar la mucosa intestinal a través de adhesinas específicas que facilitan la adherencia a las células epiteliales del intestino delgado. Una vez establecida la adherencia-colonización, hay distintos mecanismos de patogenicidad asociados a factores de virulencia específicos. Ellos son: producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), invasión del epitelio (EIEC), adherencia íntima con destrucción de las microvellosidades (EPEC Y EHEC) y producción de citotoxinas (EHEC). Estos factores son proteínas que pueden ser codificadas en plásmidos, en cromosomas, en transposones o fagos.

Son varias las técnicas que se han desarrollado para la detección de las categorías de ECD:

1. Propiedades bioquímicas o de serotipo (EIEC; EHEC O157:H7).
2. Reacciones inmunoenzimáticas (ELISA) (ETEC-ST Y LT-, EIEC).
3. Cultivos celulares (EPEC, EAEC, DAEC, EHEC).

#### 4. PCR.

#### 5. Sondas genéticas.

En particular, la PCR y las sondas genéticas que identifican los factores de virulencia constituyen una excelente herramienta para la caracterización y clasificación de las diferentes categorías de *E. coli* diarreigénicos (Pollard, 1990; Paton, 1998)

Los serotipos de EHEC poseen los siguientes marcadores de virulencia:

1. Potentes citotoxinas, llamadas toxina Siga (Stx), codificadas por bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano, consideradas el principal responsable de la patogénesis de las enfermedades asociadas a cepas STEC en humanos. También las cepas de origen animal o de alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de ellas, solas o en combinación de dos o más toxinas, y Stx2 tiene una actividad citotóxica 100 veces superior a Stx1.
2. Plásmido de 60 Mda (pO157) que porta el operón que codifica una toxina RTX, llamada enterohemolisina de EHEC (EHEC-Hly), y el sistema de secreción tipo II.
3. Factores de adherencia intestinal codificados en la región cromosomal LEE (siglas en inglés de locus of enterocyte effacement), entre ellos el gen *eae* que codifica la proteína intimina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (attaching and effacing). La región LEE codifica además un receptor traslocado (Tir) para la intimina y el sistema de secreción tipo III.

#### 2. Objetivo

Detectar y caracterizar los factores de virulencia de las cepas de ECD aisladas de coprocultivos de pacientes con diarrea o colitis hemorrágica asistidos en el Hospital Interzonal de Niños “Eva Perón”.

#### 3. Materiales y Métodos

Se procesaron 2894 muestras de materia fecal de deposiciones espontáneas recolectadas en recipiente estéril, correspondiente a niños desde sesenta días hasta catorce años de edad, internados y ambulatorios, remitidas al Laboratorio de Microbiología del Hospital Interzonal de Niños “Eva Perón”, en el período comprendido entre los años 2002 y 2004.

Todas las muestras se procesaron de la siguiente manera:

- Examen de MF directo en fresco con tinción de Lugol para la visualización de parásitos, leucocitos PMN, hematíes y levaduras.
- Examen de MF con coloración de Azul de Metileno para recuento de PMN.
- Cultivo primario en Agar EMB de Levine y Agar Salmonella-Shigella, en caldos Telurito, Selenito y Tripteína-Soya, durante 18 a 24 horas a 35-37°C y aislamiento a partir de los caldos en Agar S-S y en Agar Mac Conkey Sorbitol con agregado de cefixima y telurito de potasio 18 a 24 horas a 35-37°C.
- Pruebas bioquímicas de identificación: indol, TSI, RM/VP, Citrato de Simmons, malonato, sorbitol, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, rafinosa, glucosa, sacarosa, lactosa, celobiosa, dulcitol, maltosa, salicina, ramnosa, motilidad, hidrólisis de esculina, actividad de beta glucuronidasa y urea.
- Tipificación serológica: para la detección del serogrupo O157 se realizó aglutinación en placa con antisuero monoclonal anti O157 provisto por el INPB-

ANLIS Malbrán. La reacción se basa en que los anticuerpos anti O157 aglutinan con la bacteria cuando el antígeno O157 está presente en el lipopolisacárido bacteriano. La serotipificación con el antisuero anti H7 se efectuó en el Servicio de Fisiopatogenia del INEI-ANLIS Malbrán. De la misma manera se realizó la caracterización serológica de las demás cepas de *E. coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAaggEC y DAEC).

- Caracterización de las cepas hemolíticas: mediante placas de Agar Sangre base tripteína-soya suplementado con cloruro de calcio y 5% de sangre ovina desfibrinada, ph final 7,0-7,2 cultivadas a 35-37°C por 18 horas. La primera lectura se realizó a las 3 horas de incubación para detectar alfa hemólisis, y la segunda lectura a las 18 horas para ver la beta hemólisis característica de las cepas EHEC-Hly.
- Determinación del patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos según el método de Kirby-Bauer: se usó el método de difusión en agar por discos (antibiograma), con agar Mueller-Hinton a ph 7,2-7,4. El inóculo de trabajo correspondió al testigo 0,5 de la escala de Mac Farland, siguiendo las reglamentaciones vigentes del NCCLS para todo el procedimiento. Se probaron las siguientes drogas: ampicilina, cefalotina, cefotaxima, TMS, ciprofloxacina, furazolidona, fosfomicina y gentamicina.

### 3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR Multiplex.

Se utilizó este método analítico especialmente para la detección de factores de virulencia de EHEC, serogrupo O157:H7, producción de toxina Stx, producción de enterohemolisina *E-Hly*, presencia del gen *eae* y presencia del lipopolisacárido capsular LPS O157.

Se utilizaron los cebadores o “primers” que amplifican un fragmento de 130-pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B para Stx1 y un fragmento de 346-pb de la región correspondiente a la subunidad A para Stx2, y los primers que amplifican un segmento de 259-pb del gen *rfb* correspondiente al LPS O157.

Se utilizó como control positivo de la reacción DNA de la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 y la mezcla sin templado como control de reactivos. El templado se preparó seleccionando 5 colonias de las cepas a ensayar, suspendidas en tritón X100 al 1% en buffer TE 1X, sometidas a hervor durante 15 minutos y centrifugando a 10.000 rpm, del sobrenadante se tomó el volumen del templado. La mezcla para la PCR consistió en buffer PCR 10X, cloruro de magnesio 1,5mM, dNTP 0,1mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), primers Stx1, Stx2, *rfb*O157, Taq polimerasa y templado para un volumen final de reacción de 50ul. La mezcla se sometió a una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos y luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 58°C (hibridación) y 30 segundos a 72°C (extensión), finalmente la reacción concluyó con 2 minutos a 72°C, para un tiempo total de reacción de 1 hora con 11 minutos. Los productos de amplificación se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, con el agregado de bromuro de etidio hasta concentración final de 0,5 ug/ml, las muestras se sembraron diluidas en buffer A 6X, y en paralelo se sembró un marcador de tamaño molecular diluido en buffer B, la fuente se conectó a 80 voltios durante 30 minutos.

## 4. Resultados

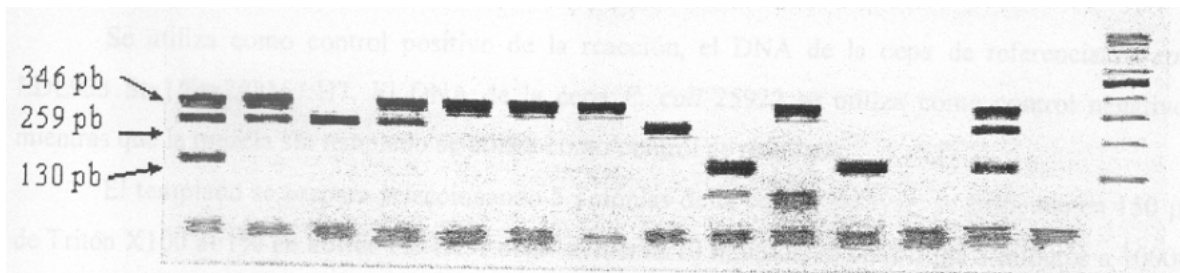


Figura 1: Productos de amplificación de PCR multiplex

Del total de muestras analizadas en el período de estudio, se aislaron 353 cepas de *E. coli*, de las cuales 36 cepas reunieron las características culturales, bioquímicas y serológicas de cepas STEC.

En esta primera experiencia se realizó la caracterización genómica de 8 cepas de las 36 cepas de *E. coli* STEC aisladas de materia fecal de pacientes con diarrea, colitis hemorrágica y SUH.

La procedencia de las cepas analizadas por PCR multiplex fue la siguiente: 2 cepas aisladas de pacientes con SUH (internados en el servicio de la UCIP) y 6 cepas aisladas de diarrea y/o CH.

Los resultados de la PCR pueden observarse en la figura 1, mostrando los productos de amplificación para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157* en cepas STEC de referencia, en las 8 cepas de aislamientos clínicos y en 2 cepas aisladas de alimentos (carne bovina). Las líneas 1 y 13 son los controles positivos de reacción (*E. coli* EDL933 *stx1/stx2+/rfbO157+*). Las líneas 3 y 8 pertenecen a las cepas de origen alimentario: *E. coli* O157 *rfbO157+*. Las líneas 5, 6, 7 y 10 corresponden a casos de CH: *E. coli stx2+*. Las líneas 9 y 11 pertenecen a cepas aisladas de diarrea: *E. coli stx1+*, la línea 12 es el control negativo de la reacción (*E. coli* 25922), sin factores de virulencia, la línea 14 es el control de reactivos (mezcla sin templado) y la línea 15 el marcador de tamaño molecular Cien Marker.

##### 5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en esta primera etapa, se afirma que es fundamental realizar el estudio microbiológico diferencial de los agentes bacterianos productores de diarrea en nuestra población infantil. Dentro de este análisis es imprescindible realizar la búsqueda de cepas de ECD, y dentro de éstas de cepas STEC, por la alta virulencia de las mismas. Para la detección de estas cepas se debe realizar una identificación bioquímica completa, ya que hay muy buena correlación entre el comportamiento químico y la virulencia, y en la medida de las posibilidades, efectuar siempre el seroagrupamiento. El antibiograma debe realizarse siempre, porque brinda información epidemiológica, pero no debe informarse, ya que la diarrea o CH se consideran autolimitantes y en caso de mala evolución del paciente el uso de un antibiótico puede favorecer la aparición de SUH, como ya está ampliamente documentado. Por otra parte, según los hallazgos en nuestro medio, no existe diferencia significativa entre la sensibilidad de cepas STEC con otras cepas de *E. coli*.

Por la relevancia de los resultados de esta primera experiencia se considera que la implementación de métodos moleculares, especialmente la PCR, constituyen un gran avance para el diagnóstico oportuno y certero de la diarrea, ya que según las características

del cuadro clínico y/o del paciente se puede analizar de manera exhaustiva al agente etiológico responsable, especialmente las cepas STEC dentro de los ECD, posibilitando así actuar a tiempo para evitar llegar a patologías más severas como SUH o PTT, que pueden resultar de un cuadro diarreico o una CH de mala evolución.

Al tratarse de cepas ampliamente distribuidas en animales, particularmente en ganado bovino, cerdos y pollos, vegetales y productos lácteos mal conservados o no pasteurizados, las cepas STEC deben ser buscadas en estos alimentos de forma rutinaria por ser agentes causales de ETA. Como agentes de salud es imperante concienciar a los organismos encargados sobre la necesidad de su detección, fomentando las buenas prácticas de manipulación de alimentos y aplicando controles rígidos en los puntos críticos en la elaboración de los mismos.

#### Referencias:

1. Levine MM. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal Infect. Dis.* 1987; 155: 377-89
2. López EL, Díaz M, Grinstein S et al. Hemolytic Uremic Síndrome and diarrhea in Argentine children; the role of the Shiga-like toxins. *Journal Infect. Dis.* 1989; 160: 469-75.
3. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxicogenic *E. Coli* by using Multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. Coli hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. *Journal Clin. Microb.* 1998; 36: 598-602.
4. Pollard DR, Johnson WM et al. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *E. Coli* by the polymerase chain reaction. *Journal Clin. Microb.* 1990; 25: 540-45.
5. Rivas M, Voyer LE et al. Hemolytic Uremic Síndrome: co-infection with two different serotypes of Shiga-like toxin producing *E. Coli*. *Medicina (Argentina)* 1993; 53: 487-90.