

Artículo Original

Identificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

[Molecular identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with diarrhea, by Polymerase Chain Reaction]

Marx Peña-Hidalgo^{1*}, Carlos Dávila-Flores², Alvaro Tresierra-Ayala², Juan Castro-Gómez^{1,3}

¹Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), Pevás 5ta cdra. Iquitos, Perú.

²Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Pevás 5ta cdra. Iquitos, Perú.

³Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, AA.HH. Nuevo San Lorenzo, Iquitos, Perú.

*e-mail: marx_ph@hotmail.com

Resumen

Las infecciones diarreicas agudas (IDAs) son problemas comunes en niños menores de 5 años en nuestro país y la Región Loreto. Sin embargo, se desconocen los agentes microbiológicos causales de estas infecciones. Para cubrir estos vacíos en el conocimiento, el objetivo de esta investigación fue realizar la identificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se colectaron 188 muestras diarreicas de niños menores de cinco años de siete Centros de Salud de Iquitos. A partir de estas se aislaron cepas de *E. coli*, se extrajo el ADN y amplificó regiones de los genes que codifican las enterotoxinas lábil al calor (LT) y estable al calor (ST). De los 188 casos con IDAs se ha encontrado que ~83% son atribuibles a infecciones por cepas de *E. coli* y de estas ~18% fueron identificadas molecularmente como ECET por presentar el gen *LT*(19) o el gen *ST*(9). En conclusión, la mayoría de las IDAs en niños < 5 años de Iquitos están asociadas con cepas de *E. coli*. Una fracción importante de estas cepas han sido identificadas molecularmente (mediante PCR) y demostrado que pertenecen al patotipo ECET. Asimismo, se ha evidenciado que las cepas ECET portadoras del gen *LT* predominan con respecto a las que tienen el gen *ST* y no se ha encontrado cepas ECET que porten de forma simultánea ambos genes.

Palabras clave: *Escherichia coli* patogénica, identificación molecular, infecciones diarreicas agudas, patotipos.

Abstract

Acute diarrheal infections (ADIs) are common problems in children under 5 years of age in our country and the Loreto Region. However, microbiological agents causing these infections are unknown. To fill these gaps in knowledge, the objective of this research was to perform molecular identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in children with acute diarrheal infections by Polymerase chain reaction (PCR). Were collected 188 diarrheal samples of children under five years of age from Health Centers of Iquitos. From these samples *E. coli* strains were isolated, DNA extracted and amplified regions of the genes encoding the heat labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxins. Of the 188 cases of ADIs were found that ~ 83% are attributable to infection by strains of *E. coli* and ~18% of these were identified molecularly as ETEC by having *LT* gene (19) or the *ST* gene (9). In conclusion, most ADIs in children under 5 years of age from Iquitos are associated with strains of *E. coli*. A considerable portion of these strains have been molecularly identified (by PCR) and shown that belong to the pathotype ETEC. Also, it has been demonstrated that ETEC strains carrying *LT* gene predominate over those with the *ST* gene and was not found ETEC strains that carrying both genes simultaneously.

Keywords: Pathogenic *Escherichia coli*, molecular identification, acute diarrheal infections, pathotypes.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 40% de la población mundial carece de condiciones básicas de saneamiento y por ende está expuesta a una serie de patógenos que causan infecciones gastrointestinales. Por esta razón, se reporta hasta 210 millones de casos con infecciones gastrointestinales en el mundo y se estima que en América Latina ha provocado la muerte de 4 a 6 millones de niños menores de cinco años (Prats 2008). El Perú no está ajeno a este problema, en consecuencia los pobladores de zonas urbanas y rurales están expuestos a diversos microorganismos enteropatógenos (SUNASS 2007). Estos microorganismos se contraen por ingestión de agua y alimentos contaminados y son una importante causa de morbilidad (originando desnutrición y retardo del crecimiento) y mortalidad en la población infantil (Vidal *et al.*, 2007).

Se estima que unas 200 especies de bacterias patógenas causan enfermedades diarreicas. Entre estas destacan las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. Estas cepas son clasificadas por su patogenicidad en seis patotipos (Kaper *et al.*, 2004): enteropatógena, enterohemorrágica, enteroagregativa, enteroinvasiva, difusamente adherente y enterotoxigénica (ECET). ECET es la causa más común de diarrea bacteriana en

niños de África, Asia y América Latina (Svennerholm y Lundgren, 2012; Walker, 2014). Asimismo, se estima que es responsable de unas 42 000 muertes y junto con los rotavirus, calicivirus y *E. coli* enteropatógena provocan más de la mitad de todas las muertes por diarrea a nivel mundial en niños menores de cinco años (Lanata *et al.* 2013). Además, ECET es la principal causa de enfermedades diarreicas en personas que viajan a las regiones endémicas (Fleckenstein *et al.*, 2014).

Después de ser ingerida la ECET coloniza la mucosa intestinal, se multiplica y causa múltiples daños a los enterocitos o interfiere con la homeostasis del tracto gastrointestinal (Dubreuil 2012). Para colonizar el intestino delgado ECET se ancla en los enterocitos mediante factores de colonización (CFs) y una adhesina (EtpA) que se encuentra en el extremo del flagelo (Figura 1). Una adherencia fuerte es mediada a través de Tia y TibA (Croxen y Finlay 2010). Dos toxinas, enterotoxina lábil al calor (LT) y la enterotoxina estable al calor (ST) son secretadas. Ambas enterotoxinas son reguladas a nivel transcripcional por una proteína dependiente de AMP cíclico (AMPc), el cual reprime la expresión de LT mientras activa la expresión de ST (Munson 2013).

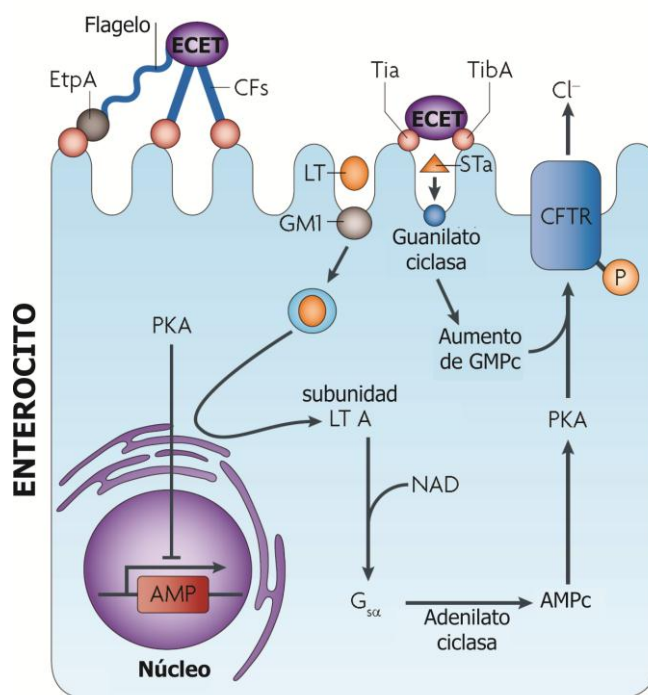


Figura 1. Mecanismo molecular de la patogénesis de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). Fuente: modificado de Croxen y Finlay (2010).

Cuando ST es secretado se une a Guanilato ciclasa C. Esta proteína es un receptor transmembrana expresado principalmente en las células del epitelio intestinal (Steinbrecher 2014). Este receptor bajo condiciones fisiológicas normales es activado por sus péptidos ligandos endógenos que inician el movimiento de agua y sal en el intestino dependiente de GMP cíclico (GMPc). Pero cuando ST se une a este receptor desregula esta vía y causa una diarrea secretoria. Esto se debe a la activación del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis cística (CFTR) mediante incremento de la producción de los segundos mensajeros GMP cíclico (GMPc) y AMP cíclico (Fig. 1).

Aunque se conoce en detalle los mecanismos moleculares de la patogénesis de ECET aún no hay reportes de estas infecciones en niños de la Región Loreto. En nuestra Región se registran varios casos de infecciones diarreicas agudas (IDAs) en los Centros de Salud. Así, en el 2010 se ha reportado 6 605 casos de IDAs en niños < 5 años, de los cuales ~36% de los casos fueron de Iquitos (DIRESA 2010). Por tanto, esta investigación tuvo como objetivo realizar la identificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para cumplir con este objetivo, a partir de muestras diarreicas se aislaron e identificaron cepas de *E. coli*, se extrajo el ADN bacteriano y los genes que codifican las enterotoxinas LT y ST fueron amplificados mediante PCR con cebadores específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de heces diarreicas (~2 g) de 188 niños (73 varones y 115 mujeres) < 5 años fueron obtenidas del Laboratorio de Análisis Clínico de siete Centros de Salud (San Juan, 9 de Octubre, 6 de Octubre, Morona Cocha, Belén, Maynas y San Antonio, pertenecientes a la Provincia de Maynas, Región Loreto, Perú.) en el 2011. Estas muestras fueron puestas en frascos de polietileno estériles, debidamente codificadas (también se incluyó datos de: sexo, edad y lugar de procedencia del paciente) y transportadas en termo de tecknopor al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de

Ciencias Biológicas-UNAP para su procesamiento.

Aislamiento e identificación microbiológica

Las muestras fueron sembradas en placas con Agar MacConkey, se incubaron por 24 h a 37°C y se seleccionaron cinco colonias lactosa (+), que en principio corresponden a *E. coli*. Estas colonias se repicaron en Agar Tripticasa de Soya (TSA) para corroborar su identificación con pruebas bioquímicas tales como oxidasa, comportamiento en agar TSI, indol y citrato. Las cepas de *E. coli* fueron criopreservadas en caldo simple con 50% de glicerol a -20°C.

Extracción del ADN bacteriano

Se procedió según Eslava *et al.* (2006) y brevemente consistió de los siguientes pasos: una alícuota de 50 µL de cada cepa de *E. coli* criopreservada fue sembrada en tubos con 5 mL de caldo simple y cultivada por 24 horas a 37°C. Después las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El precipitado bacteriano fue resuspendido en 1 mL de agua ultrapura estéril, homogenizó en un vortex por 30 segundos y centrifugó bajo las condiciones indicadas previamente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió con 50 µL de agua ultrapura. La muestra se incubó en baño maría a 100°C por 10 min agitando el microtubo cada 3 minutos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 14 000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante, el cual contiene el ADN bacteriano, fue transferido a un microtubo de 1,5 mL y almacenado a -20°C.

Identificación Molecular

Se realizó de acuerdo a Vidal *et al.* (2007) bajo las siguientes condiciones: la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL que contenía Buffer 1X pH 8,0, MgCl₂ 2,5 mM, desoxirribonucleótidos 200 µM de cada uno, cebadores LTf (5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3') y LTr (5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3') ó STf (5'-TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA-3') y STr (5'-GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG-3') 500 nM de cada uno, Taq polimerasa 2 U, ADN 20 ng y agua ultrapura-estéril c.s.p. 20 µL. Las

amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 98°C por 5 min; 35 ciclos de 98°C por 50 segundos, 52°C por 20 segundos y 72°C por 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos amplificados fueron resueltos en gel de agarosa al 2%, tratados con bromuro de etidio, visualizados con un transiluminador UV y fotografiados con un

sistema BioDocAnalyze Live (Biometra, Alemania). El tamaño esperado de los amplicones fueron 322 pb y 159 pb para los genes *LT* y *ST* respectivamente.

Análisis de datos

Los datos generados fueron analizados mediante estadística descriptiva con el programa SPSS v16.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ECET es uno de los agentes comunes asociados con IDAs en niños menores de 5 años de Iquitos. De los 188 casos con IDAs se ha encontrado que ~83% (156) son atribuibles a infecciones por cepas de *E. coli* (determinadas con pruebas microbiológicas y bioquímicas). De las 156 cepas de *E. coli* asociadas a las IDAs 28 (~18%) fueron identificadas molecularmente como ECET por presentar el gen *LT* (19) o el gen *ST* (9). Esto se evidenció por los amplicones obtenidos de los tamaños esperados de 322 pb para el gen *LT* y 159 pb para el gen *ST* (Figura. 2).

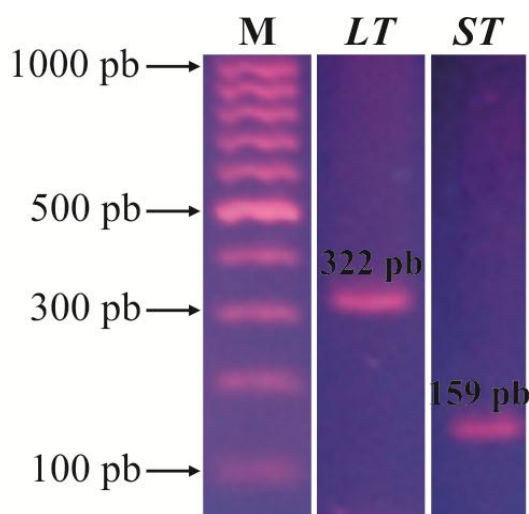


Figura 2. Productos de amplificación obtenidos de los genes *LT* y *ST* de ECET derivados de cepas de *E. coli* aisladas de muestras diarreicas de niños con IDAs.

Tal como se muestra en los resultados en aproximadamente el 17% de las muestras diarreicas no se ha detectado cepas de *E. coli*. Esto se puede explicar en parte porque la diarrea infantil tiene diferentes causas, tales como de etiología microbiana (virus, parásitos y bacterias), la sensibilidad a ciertos alimentos, antibióticos y el consumo excesivo

de frutas o jugos de frutas. De acuerdo con Eslava *et al.* (2010) y Coria *et al.* (2008) los cuadros diarreicos de etiología bacteriana son causados por unas 200 especies, pero el 85% se atribuyen a enterobacteriáceas entre las que destaca *E. coli*. En contraste a nuestro hallazgo, Salas y Sancho (2005) reportan que *E. coli* fue el agente causal en sólo ~23% de las IDAs.

Nuestros resultados también muestran que un porcentaje significativo (18%) de las cepas de *E. coli* asociadas con IDAs son atribuibles a ECET. Por tanto, el 82% restante de cepas pueden corresponder a diferentes patotipos que estén causando los cuadros diarreicos registrados. Según (Kaper *et al.* 2004) los otros patotipos son enteropatogénica, enterohemorrágica, enteroagregativa, enteroinvasiva y difusamente adherente, pero los signos y síntomas de las infecciones causadas por estos patotipos muestran particularidades.

Es preciso señalar que la prevalencia de IDAs asociadas a ECET de nuestro estudio es superior a otros reportes. Por ejemplo en Lima, Ochoa *et al.* (2011) reporta la presencia de ECET en 6,9% de sus muestras analizadas. Asimismo en Brasil, Regua *et al.* (2006) encuentra en el 5% de sus muestras. También en Argentina, Gabriel *et al.* (2010) detecta ECET en el 8,2% de sus muestras. Según Vila *et al.* (2009), las diferencias en las prevalencias de ECET por regiones se atribuye a la diversificación de las condiciones climáticas, la geografía y estrategias políticas relacionadas a la vigilancia epidemiológica, sumada a las condiciones sanitarias precarias y hábitos de higiene y alimenticios variables.

Una peculiaridad de las cepas de *E. coli* del patotipo ECET encontradas en las muestras

analizadas, es la predominancia de las cepas que portan el gen *LT*. Los resultados muestran que el doble de las cepas ECET eran portadoras del gen *LT* y las demás del gen *ST* (67,8% vs 32,2% respectivamente) pero ninguna cepa contenía ambos genes. Resultados similares fueron encontrados en Argentina por Gabriel *et al.* (2010), quienes detectan 70% de cepas ECET portadores del gen *LT* y 30% con el gen *ST*, pero ninguna cepa con los dos genes. Asimismo, en Brasil, Regua *et al.* (2006) encontró proporciones parecidas a los reportados en nuestro estudio, pero se diferencia en el sentido que en un bajo porcentaje de cepas encontró ambos genes. La predominancia de cepas ECET portadoras del gen *LT* con respecto a las cepas con el gen *ST*, es que el primero es más estable y se mantiene a pesar de la división celular y los constantes repiques de las cepas en las condiciones de cultivo *in vitro*, mientras que el gen *ST* se pierde con mayor facilidad bajo estas condiciones.

Existen varias técnicas para identificar el patotipo ECET. Desde la más antiguas a las más modernas tenemos: la prueba del asa intestinal ligada de conejo, efecto citotóxico en células CHO, VERO y Y1, ratón lactante, RIA, ELISA, hibridación en fase sólida con sondas específicas y el PCR (Rodríguez-Angeles, 2002). La creciente incorporación de las nuevas tecnologías moleculares como la hibridación y la PCR, han permitido establecer la relación causal entre los microorganismos y las IDA, mediante la identificación y caracterización de genes de patogenicidad. Sin embargo, la técnica de la PCR, que copia segmentos específicos del ADN en comparación con la hibridación suele ser más económica y rápida. Asimismo, a diferencia de la hibridación, que es una técnica que tiene un costo superior, requiere de complicadas etapas de procesamiento de la muestra, es complejo interpretar los resultados, es difícil estandarizarla y por ende es necesario contar con personal especializado (Soto *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2011).

La implementación de técnicas moleculares como las descritas en este estudio acelerará la identificación molecular de diversos agentes etiológicos de enfermedades que afectan a los niños. Esta información permitirá poner en

alerta a las autoridades de salud, a fin de implementar estrategias para la vigilancia epidemiológica de la ECET y otros agentes etiológicos. Asimismo, los resultados de esta investigación aportarán elementos de juicio para investigaciones posteriores relacionadas con la prevalencia de bacterias causantes de IDA. Además, el empleo de la técnica de PCR brindaría una gran oportunidad para su aplicación como herramienta analítica en los laboratorios de microbiología, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos (Fernández 2006). De ese modo, se contribuiría notablemente a la prevención de IDAs y de enfermedades de transmisión alimentaria (Prado *et al.* 2005).

CONCLUSIONES

La mayoría de las IDAs en niños menores de 5 años de Iquitos están asociadas con cepas de *E. coli*. Una fracción importante de estas cepas han sido identificadas molecularmente (mediante PCR) y demostrado que pertenecen al patotipo ECET. Asimismo, se ha evidenciado que las cepas ECET portadoras del gen *LT* predominan con respecto a las que tienen el gen *ST* y no se ha encontrado cepas ECET que porten de forma simultánea ambos genes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge L. Marapara, Coordinador de la Unidad Especializada de Biotecnología-CIRNA por brindarnos facilidades para el acceso a las Instalaciones y uso de los equipos del Laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coria J, Villalpando S, Gómez D, Treviño A. 2008. Aspectos Microbiológicos y Epidemiológicos para el uso Racional de Antibióticos en niños con Gastroenteritis Bacteriana Aguda. Rev Pdta 5: 200-215.
- Croxen MA, Finlay BB 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology 8(1): 26-38.
- DIRESA - LORETO, 2010. Datos estadísticos de epidemiología, Hospital Regional de Loreto.

- Eslava C, Mateo J, Cravioto A. 2006. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales: Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. Secretaría de Salud Pública México. 251 pp.
- Dubreuil JD. 2012. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Current Issues in Molecular Biology* 14(2): 71-82.
- Fleckenstein J, Sheikh A, Qadri F. 2014. Novel antigens for enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. *Expert Review of Vaccines* 13(5): 631-639.
- Gabriel M, Esquivel P, Lifschitz V, Medina L, Silvina L, Merino L. 2010. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes. *Rev Med Trop* 1: 56-65.
- Gil E, Ramírez M, Pérez A, Lisbona A. 2011. Nuevas Tendencias en imagenología híbrida: PET/RNM. *Rev Alasb* Pag 13: 53.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 123-140.
- Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. 2013. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS One* 8(9): e72788.
- Munson GP. 2013. Virulence regulons of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunologic Research*, 57(1-3): 229-236.
- Ochoa TJ, Mercado E H, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Ruiz J. 2011. Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in peruvian children with and without diarrhea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 28(1): 13-20.
- Prats, G. 2008. Guía para la prevención y el control de la infección por *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* verotoxigenes"; Dirección General de Salud Pública, Barcelona
- Prado V, Solari V, Álvarez I, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O'Ryan M y Muñoz V. 2005. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. *Rev Med* 130: 495-501.
- Regua A, Gomes T, Vieira M, Andrade J, Irino K, Teixeira L. 2006. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infec* 2: 161-167.
- Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44(5): 464-475.
- Salas R, Sancho J. 2005. Resistencia bacteriana a los antibióticos en infecciones del tracto urinario bajo, en pacientes de consulta externa en el área de salud Palmares. *Rev Med* 17: 10-16.
- Soto M, Álvarez F, Rojas A, Urdaneta K, Cásales J, González R. 2011. Detección del complejo BCR-ABL mediante hibridación in situ fluorescente en pacientes leucémicos venezolanos. *Rev Cinc* 19: 5-16.
- Steinbrecher KA. 2014. The multiple roles of guanylate cyclase C, a heat stable enterotoxin receptor. *Current Opinion in Gastroenterology* 30(1): 1-6.
- SUNASS. 2007. Control de Calidad de Agua. Recopilación de los dos primeros cursos de capacitación", organizados por SUNASS; 1^{ra} Edición. Edit. por GRI. Lima-Perú.
- Svennerholm AM, Lundgren A. 2012. Recent progress toward an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Expert Review of Vaccines* 11(4): 495-507.
- Vidal J, Canizález R, Gutiérrez J, Navarro G. 2007. Patogénesis Molecular, Epidemiología y Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Salud Publ* 49: 376-386.
- Vila J, Alvarez M, Buesa J, Castillo J. 2009. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Gastrointestinales. *Rev Microbiol* 7: 406-411.
- Walker RI. 2014. An assessment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Shigella vaccine candidates for infants and children. *Vaccine*. S0264-410X(14)01606-5