

***Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EN NIÑOS CON DIARREA DE UN HOSPITAL DE LIMA**

Isabel Arias B¹, Omar Cáceres R², Myluska Figueroa V¹, José Huguet T¹, Máximo Camiña Q³

RESUMEN

Entre las *Escherichia coli* diarreogénicas la categoría *E. coli* enteroagregativa (ECEA) es una de las más importantes y frecuentemente asociada a diarreas infantiles. El presente estudio se realizó con la finalidad de detectar los factores de virulencia que caracterizan a esta categoría patogénica mediante hibridación por *colony blot* usando sondas de ADN específicas. Se evaluaron 233 cepas aisladas en el laboratorio del Hospital de Emergencias Pediátricas durante los meses de diciembre 1998 y abril de 1999. Del total de muestras analizadas, se encontró que 17,16% de las cepas poseen el factor de virulencia característico de esta categoría. Los resultados obtenidos demuestran que un importante número de aislamientos de niños con diarrea presentan *E. coli* enteroagregativa.

Palabras clave: *Escherichia coli* / Clasificación; Diarrea Infantil; Perú (fuente: BIREME).

ABSTRACT

Amongst *Escherichia coli* causing diarrheal disease, enteroaggregative *E. coli* is one of the most important organisms, and it is frequently associated to diarrhea in infants. The study was performed aiming at detecting virulence factors for the aforementioned organism, using colony blood hybridization with specific deoxyribonucleic acid (DNA) probes. 233 samples isolated in the Pediatric Emergency Hospital Laboratory between december 1998 and april 1999. Of all samples analyzed, it was found that 17,16% of them have the typical virulence factor for their category. The results prove that an important proportion of isolates in children with diarrheal disease have enteroaggregative *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli* / Classification; Infantile Diarrhea; Peru (source: BIREME).

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli diarreogénica, es uno de los agentes bacterianos que produce diarrea con mayor frecuencia en el Perú y el mundo^{1,2}. Se conocen hasta la fecha seis diferentes categorías patógenas, que se manifiestan con diferentes cuadros clínicos³.

Entre las diferentes categorías de *Escherichia coli* se destaca la categoría *E. coli* enteroagregativa (ECEA), la que se encuentra asociada a episodios de diarreas en la población infantil, provocando diversos cuadros desde diarreas agudas a persistentes.

La finalidad del presente estudio es identificar la categoría de *E. coli* enteroagregativa, mediante hibridación por *colony blot* para detectar el factor de adhesión denominado eagg, el cual genera el patrón de adhesión agregativa o de agregación de la bacteria característica de esta categoría.

REPORTE

Se evaluaron cepas de *E. coli*, procedentes del laboratorio del Hospital Emergencias Pediátricas (Lima, Perú), durante los meses de diciembre 1998 y abril de 1999. Las cepas obtenidas para el estudio fueron aisladas a partir de muestras de casos de diarrea acuosa de pacientes que ingresaron a los consultorios y salas de hospitalización de dicha institución. Se obtuvieron en total 233 cepas que fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú) en medio de mantenimiento agar tripticosa soya para su confirmación.

Se procedió a realizar la identificación bioquímica de *E. coli* utilizando medios selectivos y medios diferenciales. Se realizó también la identificación serológica usando antisueros polivalentes y monovalentes. Todas las cepas debidamente confirmadas fueron criopreservadas en caldo glicerol peptona a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

¹ División de Bacteriología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² División de Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

³ Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Emergencias Pediátricas. Lima, Perú

Para la identificación genética se usaron sondas de ADN para detectar el gen *eagg*, las cuales estuvieron clonadas en el plásmido pCVD432⁴. Las bacterias recombinantes fueron cultivadas en caldo LB-ampicilina (100 µg/mL) y los plásmidos fueron aislados por el método de lisis alcalina (kit Wizard Miniprep, PROMEGA). La sonda fue liberada del plásmido por digestión enzimática con las enzimas EcoRI - Pst I cuyo tamaño fue de 700 pb y purificada utilizando el *Kit Wizard DNA Clean-Up* (PROMEGA)⁴.

Las cepas de *E. coli* cultivadas en caldo LB fueron colocadas (20 µL) sobre membranas de nylon (+) y éstas colocadas a su vez en placas de agar tripticosa soya e incubadas a 37 °C toda la noche. Las membranas con las colonias crecidas sobre ella fueron tratadas con SDS al 10% y con soluciones desnaturalizantes y neutralizantes con la finalidad de liberar el ADN, el cual fue fijado a la membrana por calor a 85 °C por 2 horas⁴. El marcaje de las sondas, así como la hibridación de las membranas, fue realizado usando el kit de quimioluminiscencia ECL (*Amersham Pharmacia Biotech*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente el resultado de la hibridación fue visualizado por reacción quimioluminiscente sobre un film autoradiográfico.

Se logró identificar un total de 40 cepas (17,16%) de *E. coli* positivas al gen *eagg* correspondientes a la categoría enteroagregativa. Además de ésta categoría se evaluó la presencia del gen *bfp* propio de la categoría enteropatógena. Se detectaron 3 cepas (1,28%) con el gen *bfp* y 2 cepas (0,86%) que llevaban ambos genes (*eagg* + *bfp*). No se detectaron estos factores en las 190 cepas (81,54%) restantes.

Al realizar la serotipificación se obtuvieron 93 cepas serotipadas, siendo las 140 restantes serológicamente negativas (Tabla 1).

Los serogrupos encontrados fueron O127, O125, O114, O128, O112, O111, O126, O142, O26, O29, los cuales corresponden a las cepas donde se encontraron el gen *eagg* de la categoría enteroagregativa (ECEA).

DISCUSIÓN

El análisis determinó la presencia de *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) en un porcentaje relevante (17,16%) en cuadros de diarrea. Se pudo observar también, que el factor *bfp* (1,28%) presente en las cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP) fue bajo en compa-

Tabla 1. Distribución porcentual de los serogrupos de *E. coli* encontrados.

Serogrupo	Total		Presencia de genes	
	N	(%)	<i>eagg</i>	<i>bfp</i>
O127	17	(7,30)	7	-
O142	14	(6,01)	3	-
O128	10	(4,29)	1	-
O55	9	(3,86)	1	-
O158	7	(3,00)	-	-
O143	7	(3,00)	-	-
O26	5	(2,15)	1	-
O119	4	(1,72)	-	-
O125	4	(1,72)	2	-
O126	4	(1,72)	1	-
O112	4	(1,72)	3	-
O86	3	(1,29)	-	-
O111	3	(1,29)	2	-
O29	1	(0,43)	1	-
O163	1	(0,43)	-	-
Negativo*	140	(60,09)	18	5†
TOTAL	233	(100)	41	5

* Serológicamente negativo a los antisueros probados.

† Incluye las dos cepas que tienen ambos genes.

ración con estudios realizados en otros países, en los cuales ECEP es uno de los principales y más prevalentes agentes bacterianos implicados en diarrea aguda en población infantil³. Es importante mencionar que algunos estudios demuestran además que *E. coli* enterotoxigénica (ECET) también es una categoría prevalente en diarreas⁷. Probablemente este dato podría explicar el alto número de aislamientos de *E. coli* que no fueron ECEA o ECEP, ya que en este estudio no usamos sondas para la detección de los factores de virulencia asociados a ECET.

Un resultado interesante es la relación de los serogrupos y la categoría patógena encontrada. La literatura asocia principalmente a los serogrupos O3, O15, O44, O77, O111, O127 con la categoría enteroagregativa³. En este trabajo se encontró que los serogrupos O127 y O111 coinciden con la categoría enteroagregativa, mientras que el resto de cepas que se identificaron como enteroagregativas correspondían a serotipos que anteriormente no se les asociaba a esta categoría patógena. Estos resultados nos plantean la revisión de la serotipificación como herramienta en la identificación de la categoría patógena en *E. coli*. Por lo observado, es de suponer la posibilidad de encontrar nuevos serogrupos que posean el factor de virulencia característico de ECEA.

Esta idea se sustenta principalmente en que la mayoría de los factores de virulencia en *E. coli* están codificados en elementos móviles como plásmidos y fagos^{5,6}, por lo que es posible que estos elementos genéticos puedan transferirse a serogrupos no relacionados anteriormente a una categoría patogénica en especial.

Finalmente, este informe demuestra la presencia de *E. coli* enteroagregativa implicada en cuadros de diarrea en población infantil. Se hace necesario por consiguiente, establecer un protocolo para la búsqueda activa de esta bacteria y obtener datos en el ámbito nacional, así como también poder describir características clínicas de la diarrea causadas por *E. coli* enteroagregativa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la participación de las siguientes personas: TE Ana Meza, TM Bertha Paredes, Blga. María Zamudio, TM Luisa Torres y TL Adrián Gomez, quienes ayudaron en la realización del presente trabajo. Al Instituto Carlos G. Malbran de Argentina por donar las sondas de ADN para detectar el gen eagg.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pazzaglia G, Podgore J, Mercado W, Martinez A, Urteaga A, Echevarry E.** The etiology of childhood diarrhea in northern coastal Peru: the 1989 Fuerzas Unidas Humanitarian Civic Action—a model for international and interservice cooperation, community service, and scientific opportunity. *Mil Med* 1991; 156(8): 402-5.
2. **Saelzer E, Muñoz P, Peña A, Tellerías L, Fernández A, Giglio M, et al.** Bacterial isolation in infants hospitalized for acute diarrhea. *Rev Chil Pediatr* 1989; 60(6): 328-33.
3. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998 11(1): 142-201.
4. **Chinen I, Viboud G, Pichel M, Rivas M, Binsztein N.** Manual de Procedimientos Parte I: *Escherichia coli* diarregénico. Buenos Aires: Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS «Dr. Carlos Malbran»; 2000.
5. **Blanco J, Blanco M, Garabal JI, González EA.** Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiología* 1991; 7(2): 57-73
6. **Moseley S, Echeverría P, Seriwatana J, Tirapat C, Chaicumpa W, Sakuldaipeara T, et al.** Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J Infect Dis* 1982; 145(6): 863-69.
7. **Nirdnoy W, Serichantalergs O, Cravioto A, LeBron C, Wolf M, Hoge CW, et al.** Distribution of colonization factor antigens among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Nepal, Indonesia, Peru, and Thailand. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2): 527-30.

Correspondencia: Blga. Isabel Arias Bustamante. División de Bacteriología, Laboratorio de Enteropatógenos. Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Dirección: Cápac Yupanqui 1400 Jesús María. Lima 11, Perú. Teléfono: (511)4719920
Correo electrónico: iaras@ins.gob.pe