



Identificación por hibridización molecular de virotipos de *E. coli* aislados de pacientes VIH positivos

Carlos A. Agudelo C., MD, M. Sc. Salud Pública, M. Sc. Microbiología, Facultad de Medicina, Instituto de Salud en el Trópico. Emilia María de Silva Valenzuela, Q.F., M. Sc. Microbiología; José Ramón Mantilla, Q.F., M. Sc. Química, Instituto de Biotecnología. Martha Murcia, Bacterióloga., M. Sc. Microbiología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

Se estudiaron 50 muestras de *Escherichia coli* obtenidos de heces de pacientes VIH positivos, algunos de los cuales presentaban SIDA, con el propósito de identificar los tipos virulentos de esta bacteria. Como método de identificación genotípica se utilizó la hibridización en colonias con sondas de ADN. Se encontraron 16 muestras (32 %) con capacidad toxigénica, de los cuales la mitad correspondieron a toxina termolábil y la mitad a toxina termoestable. Así mismo, 8 muestras (16 %) correspondieron a la *E. coli* enteropatógena, de los cuales la mitad tenía capacidad de adhesión localizada y la otra mitad capacidad de adhesión difusa. Se detectó *E. coli* spp. en 31 muestras (62 %). No se encontró relación entre los virotipos detectados y los antecedentes de diarrea y/o enteritis. Los tipos virulentos presentaron una mayor frecuencia en las etapas II y IV de la infección (clasificación del año 1992), en las cuales se acumularon el 70.8 % de los mismos.

SUMMARY

In order to identify virulent types of *Escherichia coli* 50 samples were obtained from the faeces of HIV-positive patients some of which showed signs of AIDS. Genotypic identification was performed by colony hybridization using DNA probes. We observed: 16 (32%) toxigenic samples, 8 had thermolabile toxin and 8 with thermostable toxin; 8 samples were enteropathogenic, 4 of which had localized adhesiveness and 4 diffuse adhesiveness; 31 (62%) samples had unidentified *E. coli*. We found no direct correlation between the virulent type established by us and the antecedent of diarrhea or enteritis. Virulent types were more frequent (70.8%) in stages II and IV of the HIV infection.

INTRODUCCIÓN

La *Escherichia coli* es la principal bacteria aeróbica de la flora intestinal humana normal. Esta bacteria también cuenta con varios tipos patógenos y se le ha encontrado con frecuencia implicada en casos de diarrea en niños y adolescentes, en muchos países (1-3). De otra parte, la diarrea es un problema común en las personas VIH positivas y con SIDA (4,5). En Colombia no se han establecido las de los tipos virulentos de la *E. coli*, desde el punto de vista genotípico (6), en pacientes VIH positivos. Además de las estructuras antigénicas, como los lipopolisacáridos O, los H y K., la *E. coli* posee un amplio conjunto de factores de virulencia (7-11) del tipo de las adhesinas y toxinas.

Los métodos fenotípicos para identificar las diferentes cepas (12-25)

constituyen un amplio conjunto que incluye los de tipo serológico, biológico, inmunológico y cultivos celulares. Más recientemente se han utilizado de manera creciente los métodos genotípicos que permiten identificar una determinada estructura o secuencia propia de un tipo de bacteria para establecer su origen clonal, su potencial epidémico y su tipo virulento. Uno de estos métodos es la hibridización con sondas de ADN, por medio de la cual, la presente investigación se propuso identificar las frecuencias de los tipos virulentos de *E. coli* en 50 aislamientos obtenidos de pacientes VIH positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los 50 aislamientos de *E. coli* se obtuvieron de muestras de heces de 43 pacientes VIH positivos en diferentes grados de evolución. No se obtuvo

información sobre edad y sexo de dos pacientes. Un total de 40 pacientes fueron del sexo masculino y uno femenino. Las frecuencias por edades fueron las siguientes: de 20 a 24 años, 5 pacientes; de 25 a 29, 14 pacientes; de 30 a 34, 13 pacientes; de 35 a 39, 7 pacientes y de 50 a 54 años, 2 pacientes.

Los 50 aislamientos identificados como *E. coli* por métodos bioquímicos se sembraron en medio de MacConkey y se transfirieron individualmente a membranas de nitrocelulosa. Las células, junto con los controles negativos y positivos, se dejaron crecer en las membranas hasta que las colonias alcanzaron un diámetro de 1mm, luego se trataron con solución desnaturalizante (SDS-NaOH) para lisarlas y se neutralizó el proceso con tampón pH 7.2 (TrisHCL 0.5 M, NaCl 1.5 M). El

ADN desnaturalizado se fijó exponiendo las membranas a 80 ° C en horno al vacío durante dos horas (26).

El ADN plasmídico recombinado de aisló de un conjunto de cepas de las cuales se obtuvieron las respectivas sondas, por medio del procedimiento de Birnboim y Doly (27) e Ish-Horowics y Burke (28), modificado por R. Treisman (26). El ADN plasmídico se obtuvo por precipitación diferencial y fue purificado por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de Cesio - bromuro de Etidio, para eliminar los fragmentos de ADN cromosomal. El ADN plasmídico, evaluado por espectrofotometría, fue digerido con las endonucleasas de restricción apropiadas para aislar el fragmento de ADN diseñado como sonda. Los fragmentos obtenidos por las enzimas fueron separados por electroforesis en geles de agarosa, eluidos de la agarosa por absorción en matriz de sílica (Gene Clean®) o por el método del fenol (29), y purificados por precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN fueron marcados radioactivamente con [α ³² P] dCTP de 3.000 ci/mmol (Amersham Life Science) mediante el procedimiento RTS Rad Prime DNA Labelling System (Gibco BRL).

Las membranas se prehibridizaron durante 6 horas a 67° C. Luego se hibridizaron con las respectivas sondas de ADN a una concentración de 20 ng/ml, durante 18 horas a 67 ° C. Después de eliminar la solución de hibridización, las membranas se sometieron a lavados de mediana rigurosidad. Enseguida las membranas se pusieron en contacto con una película de Rayos X a - 70 ° C durante 4 horas. Las cepas que hibridizaron fueron reconocidas por una señal más intensa.

RESULTADOS

El tipo de bacteria más frecuente correspondió entre las que hibridizaron a la *E. coli* toxigénica (Tabla 1). En segundo lugar de frecuencia se encontró el tipo enteropatógeno, con 8.6 y 16 % . No se identificaron tipos invasivos ni enterohemorrágicos.

Las bacterias toxigénicas se repartieron por igual entre los tipos termolábil y termoestable, pero cuando se consideraron bacterias de un sólo tipo fueron más frecuentes las toxigénicas termolábiles. Las bacterias enteropatógenas presentaron igual proporción de factor de adhesión localizado y difuso.

Tabla 1. Frecuencias de los tipos de *E. coli*.

Tipos de <i>E. coli</i>	Muestras con uno o más tipos de <i>E. coli</i>		Muestras con un tipo de <i>E. coli</i>	
	No.	%	No.	%
Toxigénica	16	32	11	23.9
<i>Termolábil</i>	8	16	6	13
<i>Termoestable</i>	8	16	5	10.9
Enteropatógena	8	16	4	8.6
<i>Adhesión localizada</i>	4	8	2	4.3
<i>Adhesión difusa</i>	4	8	2	4.3
Enterohemorrágica	0	-	0	-
Invasiva	0	-	-	-
No hibridizaron	31	62	31	67.4
Total aislamientos	50*		46	

* De las muestras examinadas 4 presentaron dos o más tipos de *E. coli* por lo cual la suma de la columna no coincide con el total de aislamientos.

El intervalo de edades en el que se encontró una mayor frecuencia de los tipos toxigénico y enteropatógeno se situó entre los 25 y los 34 años. Cuando se consideraron los resultados obtenidos con todas las muestras, en el grupo que presentó antecedentes de diarrea y/o colitis se encontró una mayor proporción de tipos virulentos

y una menor proporción de bacterias saprofitas, que no hibridizaron. Sin embargo, ninguna de las diferencias entre las proporciones de los dos grupos resultó significativa ($gI=53;p >0.05$) cuando se utilizó la prueba de t de Student. Las etapas de la infección en las cuales se encontró una mayor frecuencia de tipos virulentos fueron la II y la IV, las cuales acumularon 17 de los 24 tipos virulentos (70.8%) identificados.

DISCUSIÓN

Las frecuencias de los tipos virulentos, toxigénicos y enteropatógenos, encontradas en el estudio, son superiores a las que usualmente se detectan en población adulta sin enfermedad diarreica, pero inferiores a las frecuencias de los virotipos que presenta la población infantil con diarrea, en Colombia y en otros países (30-38).

La presencia de estos virotipos en pacientes VIH positivos, algunos de los cuales presentan SIDA, no concomitante con cuadros de diarrea de carácter epidémico, sugiere que los procesos de inmunosupresión acrecientan el potencial virulento de la bacteria. Sin embargo, como el potencial genético se expresa sólo en algunas condiciones, las frecuencias de funciones virulentas activas deben ser inferiores a las ya indicadas. De otra parte, no se identificaron tipos invasivos ni enterohemorrágicos, lo que sugeriría que la expansión de los clones virulentos es limitada.

Aunque se desconocen las causas de esta expansión limitada, algunas hipótesis pueden ser sugeridas: aunque la capacidad de respuesta se encuentra disminuída, el sistema inmunológico es capaz de controlar parcialmente a este tipo de bacterias;

la marcada competencia que genera la inmunosupresión entre los agentes infecciosos y oportunistas y; los microambientes intestinales no son óptimos, por ejemplo en la disponibilidad de hierro.

La elevada frecuencia de la *E. coli* spp., 62 %, indica que una importante proporción de la respectiva población bacteriana sigue desempeñando las funciones propias y normales de su habitat, aún en condiciones de inmunosupresión.

En pacientes inmunosuprimidos la diarrea puede ser ocasionada por una variedad de agentes patógenos de tipo bacteriano, viral, micótico y parasitario, algunos de los cuales

pueden operar de manera simultánea. Por esta razón, la patología intestinal difícilmente puede ser atribuida a un sólo tipo de agente patógeno y con frecuencia no es posible encontrar asociación entre los antecedentes o los cuadros clínicos y un determinado agente (5,39). Esto quizás explique la falta de asociación entre los antecedentes de diarrea y/o enteritis y los virotipos detectados.

Por último, los resultados sugieren que puede existir una relación directa entre el grado de depleción del sistema inmunológico y la frecuencia de los tipos virulentos de la *E. coli*, posibilidad que es coherente con el modelo teórico de la infección con VIH pero que no ha sido demostrada hasta el

momento en otros estudios, con respecto a la *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

A Henry Ardila y Alicia Weldefoort (Liga Colombiana de Lucha contra el SIDA) y a Sofía Duque, Consuelo Lopez, María Mercedes Santacruz y Santiago Nicholls (Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Parasitología), por facilitarnos la información con respecto a las características de los pacientes con SIDA.

A Felipe Cabello, del New York Medical College por las cepas con los plásmidos recombinados de los cuales se obtuvieron las sondas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; 155 (3): 377-389.
2. Whittam TS, Ochman H, Selander RK. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1751-1755.
3. Farmer JJ, Kelli MT. Enterobacteriaceae. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 360-383.
4. Smith PD, Lane HC, Gill VJ, Manischewitz JF, Quinnan GV, Fauci AS, Masur H. Intestinal infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1988; 108: 328-333.
5. Bessesen MT, Wang E, Echeverria P, Blaser MJ. Enteroinvasive *Escherichia coli*: a cause of bacteremia in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (11): 2675-2677.
6. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA., Tenover FC, Yoken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Ed. Washington D.C.: ASM Press, 1995; 190-208.
7. Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R, Anderson RM. *Microbiología Médica*. Madrid: Mosby/Doyma Libros. 1995.
8. Salyers A A, Whitt DD. *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach*. Washington D.C.: ASM Press, 1994.
9. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yoken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Ed. Washington D.C. ASM Press, 1995.
10. Beachy EH. Bacterial adherence - receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143: 325-345.
11. Schlager TA, Guerrant RL. Seven possible mechanisms for *Escherichia coli* diarrhea. *Infect Dis Clin of North Am* 1988; 2: 607-624.
12. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Manual de investigaciones de laboratorio de infecciones entéricas agudas. Washington D.C., 1983.
13. Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. *N Engl J M* 1975; 292 (20): 1041-1045.
14. Shore EG, Dean AG, Holik KJ. Enterotoxin-producing *Escherichia coli* and diarrheal disease in adult travelers. *J Infect Dis* 1974; 129: 577.
15. Sack DA, Huda S, Neogi PKB, Daniel RR, Spira WM. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 35-40.
16. Cryan B. Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 792-794.
17. Knutton S, Phillips AD, Smith RG, Gross HR, Shaw R, Watson P, Price E. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect Immun* 1991; 59: 365-371.
18. Shariff M, Bhan MK, Knutton S, Das BK, Saini S, Kumar R. Evaluation of the fluorescence actin staining test for detection of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (2): 386-389.
19. Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (12): 3013-3017.

20. **Faruque SM, Haider K, Rahman MM, Alim ARM, Baqui AH, Ahmad QS, Hossain KMB, Albert MJ.** Evaluation of a DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* from children with diarrhoea in Bangladesh. *J Diarrhoeal Dis Res* 1992; 10: 31-34.
21. **Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB.** Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* 1985; 152: 560-565.
22. **Echeverría P, Taylor DN, Seriwatana J, Brown JE, Lexomboon E.** Examination of colonies and stool blots for detection of enteropathogens by DNA hybridization with eight DNA probes. *J Clin Microbiol* 1989; 227: 331-334.
23. **Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Selander RK, Goldstein R.** Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 1990; 161: 230-235.
24. **Echeverría P, Seriwatana J, Sethabutr O, Chatkhaeo-morakot. A.** Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* using nucleotide probes. In: *Gene probes for bacteria*. New York: Academic Press Inc.; 1990: 95-141.
25. **Carson CA, Keller JM, Mcadoo KK, Wang D, Higgins B, Bailey CG, Thorne JG, Payne BJ, Skala M, Hahn AW.** *Escherichia coli* O157:H7 restriction pattern recognition by artificial neural network. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (11): 2894-2898.
26. **Grunstein M, Hognes DS.** Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 3961-3965.
27. **Birboim HC, Dolly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979; 7: 1513-1516.
28. **Ish-Horowicz D, Burke JF.** Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 2989.
29. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
30. **Trujillo H, Jaramillo C, Restrepo M.** Rotavirus y otros enteropatógenos en la etiología de la diarrea aguda en Medellín. Colombia, 1982. *Bol Of Sanit Panam* 1985; 98 (3): 251-259.
31. **Hernández AZ, Jaramillo TC, Ramírez SR.** Tratamiento de diarrea aguda en niños. *Bol Of Sanit Panam* 1987; 102 (6): 606-615.
32. **Leal F, Franco G, Sandoval CI.** Agentes etiológicos de la diarrea aguda en Bogotá. FECODEL, 1984.
33. **Mora JO, Suescún J, Julia O.** Estudio longitudinal sobre la etiología y epidemiología de la enfermedad diarreica aguda en los niños de una comunidad urbana pobre de Bogotá, Colombia. Serie Publicaciones Científicas No. 15. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, 1988.
34. **Gómez CL, Robledo J, Mejía GI.** *E. coli* enterotoxigénico productor de la toxina termolábil como causante de enfermedad diarreica aguda en Medellín. *Laboratorio Actual* 1989; 17: 15-17.
35. **Agudelo C, Viveros H, Castañeda E.** Enterobacterias como agentes etiológicos de la diarrea en la comunidad. *Biomédica* 1992; 12 (2): 37-43.
36. **Agudelo C, Mantilla R, Valenzuela EM, Cabello F. C.** Tipificación de la *E. coli* productora de de diarrea por medio de sondas de ADN. Fundación AMES, 1992.
37. **Faundez G, Figueroa G, Troncoso G, Cabello FC.** Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 928-932.
38. **Taylor DN, Echeverría P, Sethabutr O, Pitarangsi C, Leksomboon U, Blacklow NR, Rowe B, Gross R., Cross R.** Clinical and Microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1362-1366.
39. **Gilks CF, Brindle RJ, Leber LS.** Life threatening bacteraemia in HIV-1 seropositive adults admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1990; 336: 545-549.