

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Determinación de verotoxinas en cepas de *Escherichia coli* 0157:H7

Dra. Margarita Ramírez,<sup>1</sup> Lic. Luis Morier,<sup>2</sup> Dra. Janette Alonso,<sup>3</sup> Lic. Laura Bravo,<sup>4</sup> Lic. Roberto Cabrera<sup>5</sup> y Téc. Anabel Fernández<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la presencia del factor principal de virulencia de *Escherichia coli* verotoxigénica: la producción de verotoxinas en 50 cepas de *Escherichia coli* no fermentadoras del sorbitol (posible enterohemorrágica) aislada de niños con enfermedad diarreica aguda en Ciudad de La Habana y remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia de enfermedades diarreicas agudas del Instituto "Pedro Kourí". Se determinó mediante la técnica de aglutinación con partículas de látex de *Escherichia coli* 0157:H7 si pertenecían a este serotipo, se investigó la producción de verotoxinas en cultivo de células Vero. Del total de las cepas 96 % resultaron positivas a la determinación cualitativa de este factor que se evidenció con mayor frecuencia a las 24 h.

**Descriptores DeCS:** ESCHERICHIA COLI 0157/patogenicidad; ESCHERICHIA COLI 0157/aislamiento & purificación; DIARREA INFANTIL/microbiología.

*Escherichia coli* constituye entre los patógenos bacterianos productores de enfermedad diarreica aguda (EDA) el más común aislado, provoca alrededor de 40 a 50 % de estas enfermedades.<sup>1</sup>

Las cepas de *Escherichia coli* asociadas con procesos diarreicos se clasifican en 5 categorías: enteropatógenos (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enteroadherente (ECEA) y enterohemorrágica (ECEH).<sup>2</sup>

Este microorganismo ha adquirido gran importancia como causa de enteritis hemorrágica y dentro de esta categoría el serotipo 0157: H7 es el enteropatógeno más

aislado a escala mundial, sobre todo como causa de brote y epidemias; se declaró recientemente como patógeno emergente.<sup>3</sup> Este microorganismo elabora potentes citotoxinas que destruyen las células Vero, por lo que reciben el nombre de verotoxinas (VT). Han sido caracterizados 3 tipos de VT<sub>s</sub>, antigénicamente distintos VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub> y VT<sub>2v</sub>. Las verotoxinas son producidas por cepas humanas y bovinas asociadas con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, mientras que VT<sub>2v</sub> es responsable de la enfermedad edematosa en cerdos.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Médico Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>3</sup> Médico Especialista de I Grado en Microbiología.

<sup>4</sup> Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

<sup>5</sup> Licenciado en Microbiología. Reserva Científica.

<sup>6</sup> Técnica en Farmacia.

Los genes que codifican la producción de VT<sub>1</sub> y VT<sub>2</sub> son portados por fagos temperados independientes.<sup>5</sup> Existen cepas ECEH que no albergan los genes codificadores de verotoxinas, otras producen sólo VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub> o ambas.<sup>6</sup>

Algunas cepas de ECEH producen un tipo de toxina citolítica, la  $\beta$ -hemolisina o enterohemolisina, ésta se ha demostrado que está estrechamente ligada al serotipo 0157:H7 y codificada por un plásmido de 90 Kb (pO157), y está regulada por fagos temperados. Se ha encontrado una fuerte asociación entre la producción de enterohemolisina y la síntesis de verotoxinas.<sup>7</sup>

Por esta causa se exploró la producción de verotoxinas en las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 que fueron remitidas al laboratorio.

## MÉTODOS

Se analizaron 50 cepas de *Escherichia coli* no fermentadoras del sorbitol, aisladas de niños con diarreas agudas durante los meses de junio de 1997 y junio de 1998 y remitidas como posibles ECEH, al Laboratorio Nacional de Referencia desde el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHE) de Ciudad de La Habana.

Se realizó la comprobación fisiológica y antigénica mediante el Sistema API 20E (Biomerieux) para la identificación de enterobacterias, y la prueba de aglutinación con partículas de látex (*E. coli* 0157 látex test, Oxoid). Se verificó si correspondían o no con el serotipo 0157:H7.<sup>8</sup>

### Estudio en cultivo de células Vero

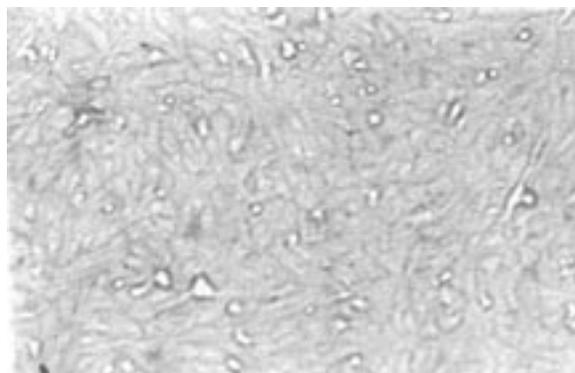
Las cepas identificadas como *Escherichia coli* 0157:H7 se subcultivaron en *agar sangre* y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después se realizó la suspensión de una asada de cultivo en 100  $\mu$ L de medio 199 (SIGMA), se incubó a 37 °C por 30 min; se añadieron 10  $\mu$ L de Tritón X-100 (1 %), se incubó por 10 min y se centrifugó a 3 000 gravedades por 30 min. Se tomaron 50  $\mu$ L de sobrenadante, se inocularon en placas de 96 pocillos que contenían células Vero de 24 h de sembradas, a las cuales se les había eliminado el medio de crecimiento. Se completó cada pocillo con 50  $\mu$ L más de medio 199 con 2 % de suero bovino fetal y se incubaron a 37 °C por 24 h en atmósfera de 10-12 % de CO<sub>2</sub>; la observación se realizó en microscopio invertido a las 24, 48, 72 y 96 h. Cada experimento se realizó por triplicado. Se utilizaron como

controles positivo y negativo, cepas de *Shigella dysenteriae* 1 ATCC 4000 y *Escherichia coli* 0149:K88, respectivamente. Como control celular se utilizaron células Vero sin sobrenadante bacteriano.<sup>9</sup>

## RESULTADOS

De las 50 cepas de *Escherichia coli* que se estudiaron todas correspondieron al serotipo 0157:H7.

Al realizar la lectura de las placas de microtitulación utilizadas para la determinación de verotoxinas, se observó en los pocillos donde no se le añadió sobrenadante de cultivo bacteriano (control celular), así como donde se le añadió el sobrenadante de la cepa control negativo, que no hubo ningún cambio en la morfología de la monocapa (fig. 1); por el contrario, en los pocillos que contenían el sobrenadante de la cepa utilizada como control positivo se observó que cerca de 100 % de las células de la monocapa, originalmente alargadas, se tornaron redondeadas en una primera etapa y sufrieron destrucción con posterioridad.

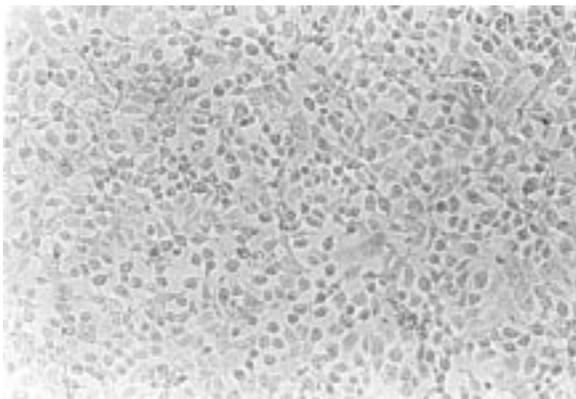


**Fig. 1.** Células Vero inoculadas con sobrenadante de *Escherichia coli* 0149:K88 (control negativo), no se observa cambio en la morfología de la monocapa celular.

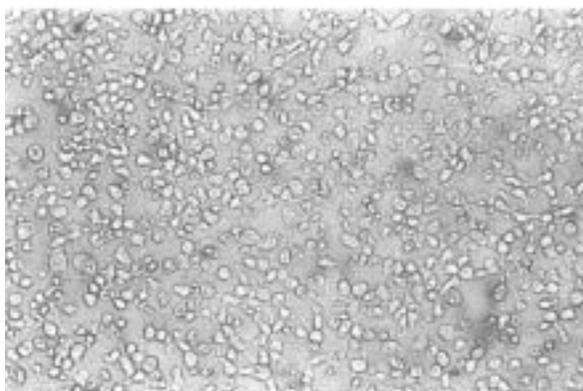
De las 50 cepas investigadas 96 % fueron productoras de VT. En las cepas que no produjeron verotoxinas, se observó que como en el caso del control negativo, las células de la monocapa no sufrieron cambios durante los 4 d en que se realizó la lectura.

En las cepas productoras de verotoxinas, el efecto citotóxico se tradujo por cambios similares a los observados en el control positivo (figs. 2 y 3).

En las células que mostraron efecto citotóxico, éste fue observado por primera vez en los tiempos siguientes: a las 24 h en 78,4 % de las cepas, a las 48 h en 17,5 % de las cepas (positividad acumulada 95,9 %), a las 72 h en 4,1 % (positividad acumulada 100 %).



**Fig. 2.** Células Vero inoculadas con sobrenadante de *Escherichia coli* 0157:H7 (cepa productora de verotoxina), se observa redondeamiento celular.



**Fig. 3.** Células Vero inoculadas con sobrenadante de cultivo *Escherichia coli* 0157:H7 (cepa productora de verotoxinas), se observa destrucción completa de la monocapa celular.

## DISCUSIÓN

*Escherichia coli* productoras de verotoxinas han sido asociadas con colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica.<sup>6,8</sup> El serotipo 0157:H7 se ha diagnosticado como el agente etiológico más frecuente de estas enfermedades en el humano, pero hay otros serotipos que también están relacionados con las EDA.<sup>10</sup> La identificación de las cepas verotoxigénicas a partir de muestras clínicas es necesaria para dilucidar su asociación con estas patologías en los niños y en los adultos.<sup>7</sup>

El diagnóstico microbiológico de las infecciones provocadas por *Escherichia coli* productora de verotoxinas es bastante complicado, pues la eliminación de las bacterias en las heces cesa a los pocos días del

inicio de la diarrea y los genes que codifican para las verotoxinas pueden perderse al realizar subcultivos o durante la conservación de las cepas.<sup>10</sup>

No todas las investigaciones microbiológicas para llegar al diagnóstico de este microorganismo son factibles de llevar a cabo en los laboratorios de los hospitales, esto trae como consecuencia que la verdadera magnitud del problema se desconozca en la mayoría de los países del mundo, incluidos los países desarrollados.<sup>11</sup> Es por esta razón que se utiliza el medio *agar* Mac Conkey sorbitol en la pesquisa de este microorganismo, lo que permite identificar de forma presuntiva cepas de *Escherichia coli* 0157:H7; sin embargo, para llegar al diagnóstico etiológico deben realizarse técnicas confirmativas.<sup>12</sup>

Uno de los métodos más ampliamente utilizados en el diagnóstico de ECEH es la determinación de factores de virulencia como la producción de verotoxinas, pues estas cepas son consideradas como altas productoras de este factor.<sup>13</sup> El cultivo de tejidos en células Vero o Hela es reconocido como la técnica *gold standard*<sup>14</sup> donde se observa la destrucción de estas células.<sup>15</sup> Se consideran como positivas a VT aquéllas donde se observe actividad citotóxica manifestada por retracción del citoplasma, redondeamiento celular, condensación y lateralización del núcleo; ésta puede ser cualitativa o cuantitativa y se realiza a partir de filtrados de heces o de cepas aisladas.<sup>6,14</sup>

En este trabajo se encontró 94 % de cepas productoras de VT, en estudios realizados en otros países como EE.UU.,<sup>13</sup> Canadá,<sup>16</sup> España<sup>17</sup> e Italia,<sup>18</sup> se muestran resultados similares en los cuales se obtuvieron entre 95,8 y 100 % de cepas productoras de VT.

En 78,4 % de las cepas incluidas en este estudio se observó el efecto citotóxico a las 24 h de incubación y las restantes fueron positivas entre las 48 h y 72 h. Esto corresponde con lo hallado por otros autores como *Karmali* y otros al plantear que el efecto citotóxico puede no detectarse hasta períodos largos de incubación.<sup>11,19</sup>

La demostración de la producción de verotoxinas es necesaria en todos los aislamientos de *Escherichia coli* 0157:H7, porque no todas las cepas producen esta toxina y en ausencia de este serotipo habría que investigar otros que ocasionalmente están implicados en colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.<sup>20</sup>

## SUMMARY

We performed an study to find out the main virulence factor in verotoxigenic *Escherichia coli*: the production of verotoxins in 50 non sorbitol-fermenting *Escherichia coli* strains (possible enterohemorrhage) which were isolated from children with acute diarrheas in the City of Havana and referred to the National Reference Laboratory for acute diarrheal diseases in "Pedro Kouri" Institute. By using the agglutination technique with latex particles

of *E. coli* 0157:H7, we determined whether the verotoxins belonged to this serotype, we also researched the production of verotoxins in Vero cell culture. Ninety-six percent of the total number of strains were positive in the qualitative determination of this factor which was more frequently observed after 24 hours.

**Subject headings:** ESCHERICHIA COLI 0157/pathogenicity; ESCHERICHIA COLI 0157/isolation and purification; DIARRHEA, INFANTILE/microbiology.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Riverón CR. Etiología de las EDA (1). Agentes virales. Rev Cubana Pediatr 1990;62(3):449-60.
- González R, Díaz C, Mariño M. Age specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. J Clin Microbiol 1997;35(5):1103-7.
- Armellagos GJ. The viral superhighway. Sciences 1998;38(1):24-9.
- Lingdren SW, Samuel JE, Schmitt CK, O'Brien AD. The specific activities of Shiga -like toxin type II (SLT-II) and SLT-II related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. Infect Immun 1994;62(2):623-31.
- Karch H, Meyer T, Rusmann H. Frequent locus of Shiga like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Invest Immun 1992;60(8):3464-7.
- Blanco J, Blanco M. *Escherichia coli* enterotoxigénica, necrotoxigénica y verotoxigénica de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Enferm Infecc Microbiol Clin 1993;11:324-9.
- Beatin L, Montenegro M, Orshov F, Prada J. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989;27(1):2559-64.
- Sonnenwirth AC. Bacilos entéricos y bacteroides. En: Davis BD, Dulbeco R, Eisen HN, Ginisberg HS. Tratado de Microbiología. 3ra. ed. México, DF: Salvat, 1990:259-51.
- Andrade C, Suassuna I. Actividades citotóxicas y hemolíticas en *Escherichia coli* uropatogénicas Mem Inst Oswaldo Cruz 1988;83(2):193-9.
- Ojedsa A, Bravo V, Martínez J, Arellano C. Sorbitol negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. J Clin Microbiol 1995;33(8):2199-21.
- Karmali MA. Infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989;2(1):15-38.
- Germani Y, Sero B, Vahito M, Morel O. Enterohaemorrhagic coli in Central African Republic. Lancet 1997; 349(9066):1670.
- Witthan TS, Kaye WJ, Wilson RA. Genetic evidence of clone descendent of *Escherichia coli* 0157:H7 associated with haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. J Infect Dis 1988;157(6):1124-33.
- Agudelo C, Viveros H, Castañeda E. Enterobacterias como agentes etiológicos de la diarrea en la comunidad. Biomédica 1992;12(2):37-43.
- Blanco M, Blanco JE, González T, Ramos J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. Am J Vet Res 1993;54:1446-51.
- Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Roser KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990;28(3):540-5.
- Prats G, Frias C, Margall N, Llovet T, Gaztelurrutia L, Elcualtz R. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Presentación de 9 casos. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996;14(1):7-15.
- Chapman PA, Wright DJ, Siddons CA. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0 157 from bovine feces. J Med Microbiol 1994;40:424-7.
- Cantey J, Blake RK. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. J Infect Dis 1997;135:454-62.
- Scotland SM, Willshow GA, Smith HR, Rowe B. Prophets of strains of *Escherichia coli* 026:H11 in relation to their enteropathogenic on enterohemorrhagic classification. J Infect Dis 160(5):1069.

Recibido: 23 de junio de 1999. Aprobado: 10 de agosto de 1999.  
Dra. Margarita Ramírez Álvarez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.