Adherencia in Vitro de Escherichia Coli 0111 a Células HEp-2

T.M. Guillermo Figueroa C.¹; T.A. M. del Pilar Alcayde L.¹; T.A. Vivian Soto G.¹;
T.M. Orietta Ross K.²

In Vitro Adherence to HEp-2 Cells and Plasmid DNA Content of Escherichia Coli

The ability to adhere to cultured HEp-2 cells and their plasmid DNA content was evaluated in 33 enteropathogenic *Escherichia coli* 0111 strains, 25 isolates came from infants with diarrhea and 8 from asymptomatic infants. Fourteen non pathogenic *E. coli* strains, considered to be part of the normal flora, were used as controls. No differences in the adhesive capacity of *E. coli* 0111 strains isolated from diarrhoeal cases (60%) or from asymptomatic subjects (50%) were detected. In contrast both groups of strains showed significantly higher ($p < 0.001$ Fisher exact test), adherence rates when compared with strains from the control group (7%). Plasmids with molecular weights 50 to 70 Md were detected in all strains investigated, irrespectively of their ability to adhere to HEp-2 cells. HEp-2 assay constitutes a valuable diagnostic tool, that will probably improve our knowledge in the ethiology of diarrheal diseases.

(Key words: *Escherichia coli*. Adherence to HEp2 cells. In vitro adherence. DNA plasmid content).

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación de infecciones con ciertas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli* o *E.C.*) y diarrea infantil^{1,2}. Más recientemente se han podido vislumbrar algunos mecanismos patogénicos implicados en la aparición de estos casos^{3,4}.

Hoy se reconocen al menos 4 clases de *E. coli* asociadas a afecciones entéricas en el hombre⁵; algunas cepas colonizan y liberan enterotoxinas (EC enterotóxica o ECET) en el intestino delgado^{6,7}; otras (EC enteroinvasora o ECEI) invaden el colon originando síndromes disintéricos⁸; una tercera clase corresponde a los llamados serotipos enteropatogénicos (EC enteropatogénico o ECEP), los primeros en ser descritos, cuya patogenia aún no se conoce bien, y un cuarto tipo que produce una citotoxina semejante a la de las *Shigellae*⁹, como ha sido demostrado en el serotipo 0157:H7, en relación con colitis hemorrágica^{10,11}.

De los grupos antes mencionados el que ha producido más controversias, por las dificultades para caracterizar las bases de su virulencia, es sin duda el de los denominados serotipos "clásicos" o ECEP: durante la mayor parte de la década del 70 estos microorganismos fueron considerados

no patógenos, incluso en muchos lugares se discontinuó su investigación. Sólo en 1978 a través de estudios en voluntarios se logró demostrar su indudable rol patogénico¹²; contemporáneamente se comprobó que la virulencia radicaba en la capacidad de adherencia¹³, aparentemente no mediada por fimbrias¹⁴, que inducía alteraciones histológicas características ("pedestal") en el epitelio intestinal colonizado, humano¹⁵ y animal^{16,17}.

Los primeros ensayos in vitro para caracterizar este mecanismo patogénico, propio de algunos serotipos de ECEP, fueron desarrollados por Cravioto¹³, quien demostró que alrededor de 80% de las cepas enteropatogénicas (ECEP) adherían a células HEp-2. Este autor describió además que la adherencia "in vitro" era resistente a la manosa, más tarde McNeish¹⁸ comprobó que el mecanismo de adherencia ocurría también con células del intestino fetal humano. Posteriormente Scaletsky¹⁹, asoció la virulencia con el fenómeno que llamó "adherencia localizada", propio de algunas cepas de ECEP, hallazgos que fueron confirmados "in vitro" usando células HEp-2 y Hela²⁰.

Se ha demostrado también que la capacidad de adherencia de las ECEP parece estar genéticamente controlada por plasmidios cuyos pesos moleculares (PM) varían entre 50 y 70 megadalton (Md)²¹, tal conocimiento se ha aplicado en la creación de moléculas que sirven de tientos o instrumentos de exploración ("probes") para el

1. Unidad de Microbiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile.

2. Laboratorio de Cultivos Celulares, Instituto de Salud Pública de Chile.

diagnóstico de estos serotipos enteropatógenicos²².

La información epidemiológica sobre el fenómeno de adherencia de ECEP, es aún limitada, sin embargo ha permitido postular que los denominados serotipos "clásicos" pueden ser divididos en dos clases: los que desarrollan adherencia localizada, entre los que se incluyen los serotipos 055, 0111, 0119, 0127, 0128 y 0142, y, por otra parte, los que no expresan dicha capacidad, serogrupos 044, 086 y 0114, de los que se desconoce el mecanismo de virulencia²².

Puesto que en Chile ECEP es el grupo bacteriano más frecuentemente relacionado con casos de diarrea infantil^{23,24} nos propusimos buscar "in vitro" la capacidad de adherencia de cepas de *E. coli* 0111, obtenidas de niños con diarrea y asintomáticos y comparándolas con la de cepas de *E. coli* pertenecientes a la flora normal. Además estudiamos la presencia de DNA plasmidial en dichas cepas, para ver si existen relaciones entre ésta y el fenómeno de adherencia.

MATERIAL y METODO

Se estudiaron 47 cepas de *E. coli* aisladas de deposiciones de niños, 33 correspondían al serogrupo 0111 (25 cepas provenían de niños con diarrea y 8 de niños asintomáticos). La identidad serológica de las cepas fue confirmada con antisueros comerciales Difco. Sólo las cepas que en el estudio de aglutinación en tubo, dieron título $\geq 1:320$ fueron consideradas en el estudio.

Catorce cepas de *E. coli* de la flora normal fueron utilizadas como controles, comprobándose previamente

que no producían toxinas, no eran invasoras (Séreny), ni pertenecían a algún serotipo enteropatógeno clásico.

Ensayos de adherencia a células HEp-2:

Para este ensayo "in vitro" se usó, con algunas modificaciones, el método propuesto por Cravioto¹³. Se consideró que había adherencia localizada sólo cuando, mediante observación microscópica (100 x), más de 40% de las células HEp-2 tenían microcolonias localizadas. Las modificaciones de la técnica consistieron en: uso de tampón fosfato salino (pH=7,2) en el lavado de las células; disminución del tiempo de incubación a 3 horas; fijación de las células durante 15 minutos en metanol y aumento de la concentración del colorante Giemsa, para la tinción, al doble (20%).

Determinación de plásmidos:

El DNA plasmidial fue investigado produciendo lisis de las cepas con dodecil sulfato de sodio y separándolo por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% según la técnica descrita por Kado y Liu²⁵, las corridas se realizaron a 50 V y durante 4 horas, y los geles se fotografiaron bajo luz UV con cámara Polaroid tipo 55. El tamaño de los plásmidos se calculó extrapolando en la recta obtenida con los controles de peso molecular, según lo propuesto por Meyers²⁶. Los controles incluyeron los plásmidos Plac (101 Md); R1 (61 Md); RP4 (36 Md) y SA (26 Md).

RESULTADOS

La cantidad de cepas de *E. coli* 0111 que mostraban capacidad de adherencia localizada (Fig. 1) o difusa (Fig. 2) no fueron diferentes en las cepas que provenían de casos de diarrea (60%)

Fig. 1: Adherencia localizada en células HEp-2, de una cepa de *Escherichia coli* 0111.

o en aquellas de niños asintomáticos (50%) (Tabla 1). Al comparar los resultados obtenidos en cualquiera de estos grupos con los provenientes de las cepas de *E. coli* pertenecientes a la flora normal, se hacen aparentes diferencias que son estadísticamente significativas ($p < 0,001$ prueba exacta de Fisher).

La identificación de plasmidios de 50 y 70 Md, compatibles con los asociados a la capa-

cidad de adherencia, no guardó relación con la presencia o ausencia de adherencia localizada ni con el hecho de provenir las cepas de casos de diarrea o de sujetos asintomáticos. Asimismo, la frecuencia con que fueron detectados plasmidios de estos rangos de PM no mostró diferencias entre cepas enteropatógenas y de flora normal (Tabla 2).

La Fig. 3 muestra los resultados de la electro-

Fig. 2: Adherencia difusa en células HEp-2, de una cepa de *Escherichia coli* 0111.

Tabla 1.

Distribución de Cepas de *E. coli* 0111 y de Flora Normal según su capacidad de Adherencia Localizada a Células HEp-2

	ADHERENCIA LOCALIZADA			
	Positiva		Negativa	
	Diarreas	Asintomáticos	Diarreas	Asintomáticos
<i>E. coli</i> 0111	15/25	4/8	10/25	4/8
<i>E. coli</i> no	---	1/14	---	13/14
Enteropatógeno				

Tabla 2.

Presencia de Plasmidios de entre 50-70 Md en las Cepas de *E. coli* 0111 y de Flora Normal Distribuidas según su Capacidad de Adherencia a Células HEp-2

	ADHERENCIA LOCALIZADA			
	Positiva		Negativa	
	Diarreas	Asintomáticos	Diarreas	Asintomáticos
<i>E. coli</i> 0111	11/13	2/2	5/7	3/4
<i>E. coli</i> no enteropatógeno.	---	1/1	---	8/13

Fig. 3: Electroforesis en gel de agarosa. Fila 1 y 2 *E. coli* 0111 no adherente (68 Md), (68-50 Md); Fila 3 0111 adherencia localizada (105-47-28, 1 < 26 Md); Fila 4 y 5 plásmidos de referencia: Plac (101 Md) y RP4 (36 Md), R1 (61 Md) y SA (26 Md); Fila 6 *E. coli* 0111 adherencia localizada (105-47-28-1 < 26 Md); Fila 7 y 8 *E. coli* flora normal no adherente (86-1 < 26 Md), (82-65-2 < 26 Md).
Nota: Las flechas indican los plásmidos cuyos pesos moleculares varían entre 50 y 70 Md.

foresis de DNA plasmidial en cepas de *E. coli* 0111 con adherencia localizada y no adherentes y de *E. coli* de la flora normal no adherentes.

DISCUSION

Los patrones de adherencia obtenidos en este estudio, en cepas de *E. coli* 0111, muestran menor frecuencia de aparición de adherencia localizada que en otras publicaciones^{22,27}.

Las diferencias, podrían provenir de la selección de las muestras: 28 de las 33 cepas estudiadas por nosotros, correspondían al serogrupo 0111, lo que implica incluir algunos serotipos que otros autores han excluido a priori. Probablemente ésta no sea la única explicación, ya que al analizar el comportamiento de las cepas consideradas como serotipos patógenos en otros estudios, las diferencias persisten, es así como entre 5 cepas de algunos de los serotipos 0111:H2, 0111:H10, 0111:H12 y 0111:H⁻, sólo en una se comprobó capacidad para desarrollar adherencia localizada (datos no mostrados). Aunque el número de cepas estudiadas fue pequeño, esta no

pareciera ser la razón fundamental de las diferencias descritas. Posiblemente variaciones en el biotipo²⁷ o de naturaleza ecológica, o bien la no improbable pérdida del plásmido asociado a la capacidad de adherencia, pudiesen ser también explicaciones plausibles.

En cualquier caso es de gran interés estudiar mayor cantidad de cepas en nuestro medio, porque si estos datos se confirmaran, podría ponerse en duda la utilidad práctica de la serotipificación como único método de detección de ECEP.

En los resultados contenidos con las cepas de *E. coli* 0111 provenientes de niños asintomáticos, llama la atención que 50% de ellas desarrollan adherencia localizada, esto reforzaría estudios anteriores de nuestro laboratorio, que demuestran altas tasas de portación de este agente en niños menores de dos años^{28,29}. Para determinar la real perspectiva de estos hallazgos, sería necesario compararlos con estudios semejantes en otras áreas geográficas, desafortunadamente la revisión bibliográfica en esta materia hace pensar que tales informes no se encuentran disponibles.

El hallazgo de una entre catorce cepas de *E. coli* de la flora "normal" con capacidad de adherencia localizada, es algo más frecuente que lo informado por Nataro²²: la trascendencia de este fenómeno, considerando el pequeño número de cepas estudiadas, requiere mayor investigación y puede obedecer al azar.

Nuestro intento de correlacionar la presencia de plásmidos con el fenómeno de adherencia resultó infructuoso, la razón principal fue la gran abundancia de plásmidos en el rango de PM 50 a 70 Md y de plásmidos de otros pesos moleculares en las cepas provenientes de niños sanos como enfermos. Estos resultados estimulan el interés por la posibilidad de utilizar en el futuro sondas genéticas, como método rápido y confiable para detectar la capacidad de adherencia de cepas ECEP.

RESUMEN

Mediante el ensayo in vitro con células HEp-2, se evaluó la capacidad de adherencia de 33 cepas enteropatógenas de *E. coli* 0111. Asimismo, se caracterizó en ellas la presencia de DNA plasmidial: 25 cepas provenían de lactantes con diarrea y 8 de pacientes asintomáticos. Se incluyeron como controles 14 cepas de *E. coli* de la flora normal. No se encontraron diferencias en la capacidad adhesiva in vitro de las cepas de *E. coli* 0111 aisladas de casos de diarrea (60%) o de asintomáticos (50%). En contraste, en ambos grupos de cepas la frecuencia en que ocurrió la capacidad de adherencia fue significativamente mayor que la del grupo control (7%). ($p < 0,001$, prueba exacta de Fisher). La presencia de plásmidos con PM entre 50 y 70 Md fue demostrada tanto en las cepas que adherían como en las que no lo hacían. El ensayo de adherencia a células HEp-2 constituye una valiosa herramienta que permitirá mejorar el diagnóstico etiológico de la diarrea aguda.

REFERENCIAS

1. Ewing, W.H., Davis, B.R., Montagne, T.S.: Studies on the occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease. Center for Disease Control, Atlanta, G.A. 1963.
2. Kauffmann, F., Orskow, F.: Die bakteriologie der *Escherichia coli* - Enteritis, p. 1-41. In A.A. am. (Ed.), Sauglingsenteritis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1956.
3. Edelman, R., Levine, M.M.: Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 147: 1108, 1983.
4. Dupont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., Synder, M.J., Libonati, J.P.: Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 285: 1, 1971.
5. Myron, M., Levine, Robert Edelman: Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. Epidemiologic Reviews. 6: 31, 1984.
6. Sack, R.B.: Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol. 29: 333, 1975.
7. John, M., Deboy, Grace M., Thomas, Carl, F., Deneke: 1. Kaye Wachsmuth. Colonization factors and *Escherichia coli* belonging to enterotoxin - Associated serotypes. Curr. Microbiol. 6: 49, 1981.
8. Toledo, F.R.M., Reis, L.M.H., Almeida, G.R., Trabulsi, L.: Invasive strains of *Escherichia coli* belonging to O group 29. J. Clin. Microbiol. 9: 288, 1979.
9. O'Brien, A.D., Leveck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B.: Production of *Shigella dysenteriae* 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 146: 763, 1982.
10. Johnson, W.M., Lior, H., Bezanson, G.S.: Cytotoxic *Escherichia coli* 0157: 147 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet 14: 76, 1983.
11. O'Brien, A.D., Levey, T.A., Chen, M.E., Rotman, S.W., Formal, S.B.: *Escherichia coli* 0157:H7 strains associates with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet, March. 26: 702, 1983.
12. Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, L.R., Stoman, S.: *Escherichia coli* strains that cause diarrhoeae but do not produce Heat-Labile or Heat-stable enterotoxins and are non invasive. Lancet 1: 1119, 1978.
13. Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B.: An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3: 95, 1979.
14. Scotland, S.M., Richmond, J.E., Rowe, B.: Adhesion of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* (EPEC) to HEp-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. FEMS Microbiol. Lett. 20: 191, 1983.
15. Ulshen, M.H., Rollo, J.L.: Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man—another mechanism. N. Engl. J. Med. 302: 99, 1980.
16. Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., Gianella, R.A.: Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect. Immun. 41: 1340, 1983.
17. Cantey Roberts, William, B., Lushbaugh, Lindsay, R., Inman: Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by *Escherichia coli* strains RDEC-1 in the rabbit: Stage and role of capsule. J. Infect. Dis. 143, 219, 1981.
18. McNeish, A.S., Turner, D., Fleming, J. and Evans, N.: Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet 2: 946, 1975.
19. Scaletsky, I.C., Silvia, M.L., Trabulsi, L.: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. Inf. Imm. 48: 534, 1984.
20. Nataro, J.P., Scaletsky, I.C., Kaper, J.B., Levine, M.M., Trabulsi, L.R.: Plasmid mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Inf. Imm. 48: 378, 1985.
21. Baldini, M.M., Kaper, J.B., Levine, M.M., Candy, D.C.A., Moon, H.W.: Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 3: 534, 1983.

22. Nataro, J.P., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Bravo, N., Levine, M.M.: Detection of an adherence factor of Enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J. Infect. Dis.* 152: 560, 1985.
23. Figueroa, G., Araya, M., Ibáñez, S., Cler, N., Brunser, O.: Enteropathogens associated acute diarrhea in hospitalized infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 5, (en prensa), 1986.
24. Prado, V., Braun, S., Bosch, P., Bercovich, M., Reyes, C., Sawada, T.: Análisis de *Escherichia coli* enteropatógena clásica (ECEP) como una causa endémica de diarrea aguda en niños chilenos. *Rev. Chil. Ped.* 55: 171, 1984.
25. Kado, C., Liu, S.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365, 1981.
26. Meyers, I.A., Sánchez, D., Etwell, L.P., Falkow, S.: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529, 1976.
27. Scaltsky, I.C., Silva, M.L., Toledo, M.R., Davis, B.R., Blake, P.A. and Trabulsi, L.R.: Correlation between adherence to Hela cells and serogroups. Serotypes, and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infect. Imm.* 49: 528, 1985.
28. Figueroa, G.: Estudio de prevalencia de serotipos enteropatógenos de *Escherichia coli* de deposiciones de niños que habitan una población suburbana de Santiago. *Rev. Chil. Pediatr.* 51: 225, 1980.
29. Figueroa, G., Troncoso, M., Araya, M., Espinoza, J. and Brunser, O.: Enteropathogen carriage by healthy individuals living in an area with poor sanitation. *J. Hyg. Camb.* 91: 499, 1983.