



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS
ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli**

T E S I S

MANCOMUNADA

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a n

**MONICA ALVAREZ GALVAN
LILIA VARGAS HERNANDEZ**



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
1.- GENERALIDADES	4
1.1.- Importancia de las diarreas	4
1.2.- <u>Escherichia coli</u>	6
1.3.- <u>Escherichia coli</u> como agente causal de diarreas	8
1.4.- <u>Escherichia coli</u> enterotoxigénica (Antecedentes)	10
1.5.- Toxinas producidas por <u>E. coli</u>	13
1.5.1.- Toxina Termolábil (LT)	14
1.5.2.- Toxina Termoestable (ST)	17
1.6.- Identificación de cepas enterotoxigénicas	18
1.7.- Biotipos	20
1.8.- Resistotipos	22
1.9.- Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos.	25
2.- TRABAJO EXPERIMENTAL	26
2.1.- Material	26
2.1.1.- Material de uso común	26
2.1.2.- Equipo	26
2.1.3.- Material Biológico	27
2.1.3.1.- Cepas	27

2.1.3.2.- Cepa de <u>E. coli</u> produc	
tora de enterotoxina	27
2.1.3.3.- Animales	27
2.1.4.- Medios de cultivo	27
2.1.4.1.- Para aislamiento	27
2.1.4.2.- Para identificación	28
2.1.4.3.- Para conservación de cepas	28
2.1.4.4.- Para producción de entero-	
toxina	28
2.1.4.5.- Para caracterización de ce	
pas	28
2.1.5.- Reactivos	29
2.1.5.1.- Para anestesia del conejo	29
2.1.5.2.- Para aislamiento	29
2.1.5.3.- Para Biotipos	29
2.1.5.4.- Para Resistotipos	30
2.1.5.5.- Para sensibilidad frente	
a diferentes antimicrobia	
nos	31
2.2.- Métodos	33
2.2.1.- Aislamiento e identificación	33
2.2.2.- Conservación de cepas	33
2.2.3.- Prueba de asa ligada en fleon de co	
nejo.	33
2.2.4.- Biotipos	38
2.2.5.- Resistotipos	38

2.2.6.- Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos	40
3.- RESULTADOS	42
4.- DISCUSION DE RESULTADOS	62
5.- CONCLUSIONES	70
SUGERENCIAS	73
ANEXO	75
6.- BIBLIOGRAFIA	78

INTRODUCCION

Debido a la alta incidencia de padecimientos gastrointestinales en nuestro país y en otras partes del mundo, ha surgido la necesidad de incrementar el estudio de las diferentes etiologías que los originan.

Las enfermedades diarreicas agudas ocupan los primeros lugares como causa de muerte, principalmente en niños.

Las bacterias responsables de la mayoría de las enfermedades diarreicas agudas, en adultos y en niños menores de dos años de edad, pueden ser agrupadas dentro de dos rubros: las invasivas que penetran y dañan la mucosa del intestino y las no invasivas o productoras de enterotoxinas, que no causan daño detectable en la mucosa intestinal.

En el grupo de las bacterias invasivas encontramos a: Shigella, Salmonella, Vibrio parahemolyticus y Campylobacter fetus.

Dentro de las bacterias productoras de enterotoxinas tenemos a: Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus y Escherichia coli.

Escherichia coli enterotoxigénica ocupa los primeros lugares como causa de morbilidad y mortalidad en México (8,39). Por tal razón, la identificación de este microorganismo adquiere gran importancia; sin embargo, los procedimientos empleados para su caracterización no son accesibles a la mayoría de los laboratorios de diagnóstico rutinario (19).

La serología es el método que más se emplea para tipificar diferentes cepas de E. coli. Los antígenos de superficie O, K y H utilizados para la caracterización serológica, dependen del cromosoma; por el contrario, la capacidad para elaborar enterotoxinas está condicionada por la presencia de un plásmido conjugativo (Ent); sin embargo, se ha visto que la característica de producir enterotoxina no está distribuida al azar y que ciertos serotipos están implicados en la capacidad para aceptar el plásmido Ent. No obstante, debido a que no todos los serotipos se han identificado plenamente, que varían dependiendo del área geográfica y además, que el uso de este procedimiento implica un alto costo, se dificulta la identificación de cepas enterotoxigénicas por los antígenos de superficie; por tal razón, ha surgido la necesidad de introducir métodos adicionales accesibles que faciliten su caracterización (25,26,39).

Desde tiempo atrás, se sugirió el empleo de pruebas bioquímicas para identificar biotipos y, más recientemente, el uso de pruebas de resistencia frente a diferentes productos químicos o resistotipos, para la caracterización de cepas bacterianas (16,41).

El método de biotipificación también se ha sugerido para identificar cepas de E. coli enterotoxigénicas basados en el hecho de que los serotipos implicados en la producción de enterotoxina, tienen un patron fermentativo establecido, además de otras características fisiológicas. Estas observaciones sugieren que sólo ciertos grupos serofermentativos especiales, son capaces de poseer el plásmido que codifica para la producción de enterotoxina.

De ser cierto lo antes mencionado, se consideró en esta investigación que el empleo de los biotipos, junto con otras pruebas como resistotipos y la sensibilidad a antimicrobianos, resultarían de utilidad para la caracterización de cepas de E. coli productoras de enterotoxinas en laboratorios de diagnóstico rutinario.

1.- GENERALIDADES

1.1.- Importancia de las diarreas.

Las enfermedades diarreicas agudas, han encabezado las causas de muerte a través de largos periodos de desarrollo del mundo.

Las diarreas no respetan razas, fronteras, ni edades; son los pueblos pobres e insalubres sus principales víctimas, y los niños los más afectados. El costo de la atención médica, la pérdida de vidas y su influencia negativa en el avance y desarrollo de los pueblos, es evidente. Las enfermedades diarreicas agrupan una serie de padecimientos de diversa índole, siendo la etiología infecciosa la más importante por su carácter contagioso.

La etiología de las enfermedades diarreicas es muy diversa; la multiplicidad de agentes que intervienen complican su estudio, al mismo tiempo que dificultan su prevención. A pesar de los adelantos logrados en el esclarecimiento de la etiología de las gastroenteritis y aún con el empleo de las mejores técnicas de diagnóstico, no se puede determinar el agente etiológico en todos los casos, aproximadamente en un 25% se identifica a una bacteria patógena

conocida, entre el 25 y 50% se puede identificar a un virus y en cerca de un 25 a 50% la causa no se llega a conocer (23,39).

Actualmente se sabe que ciertos microorganismos, hasta hace poco considerados como flora intestinal habitual, pueden causar diversos padecimientos diarreicos, (13) lo cual puede estar condicionado por lo siguiente: se sabe que el estómago normal carece de microorganismos por la acción bactericida del ácido clorhídrico y en el intestino delgado la cifra de microorganismos es muy baja en las primeras porciones, pero aumenta a medida que se alcanza la parte terminal del ileon; en cambio, en el colon, la población puede llegar a una cifra cercana a 10^{10} bacterias/g heces (37). Lo anterior está regulado por diversos factores, como son: movimientos peristálticos, secreción glandular, factores nutricionales (disponibilidad de nutrientes para la multiplicación bacteriana), cantidad de anticuerpos en el lumen intestinal y factores ecológicos microbianos (competencia, antagonismo o simbiosis) (31). Cuando se altera cualquiera de estos mecanismos puede presentarse la colonización del intestino delgado con microorganismos entéricos, lo cual repercute en diversos síndromes diarreicos y de mala absorción.

mente sobre la lactosa; la mayoría fermenta la salicina, no así el adonitol e inositol. Los aminoácidos lisina, arginina y ornitina son descarboxilados por la mayoría de las cepas (18).

En cuanto a sus características antigénicas, se sabe que posee tres tipos de antígenos O, K y H.

El antígeno O se encuentra localizado en la pared celular, constituyendo parte del complejo lipopolisacárido, es termoestable y es el primer antígeno que se determina cuando se quiere tipificar una cepa de Escherichia coli; este antígeno no puede diferenciarse del resto de la fracción antigénica de la endotoxina.

Se conocen 148 antígenos O que van del O1 al O148 (18).

El antígeno K o de envoltura, es termolábil, de naturaleza proteica, dificulta la aglutinación con sueros específicos anti O, por encontrarse rodeando a la célula. Se conocen 3 variedades de este antígeno llamadas L, B, A. Se han identificado hasta la fecha 91 diferentes tipos de este antígeno que van del K1 al K91 (31).

El antígeno H o flagelar es de naturaleza proteíca, termolábil y no está presente en todas las cepas. Se conocen 51 grupos de antígenos H y van del H1 al H51 (31).

1.3.- Escherichia coli como agente causal de diarreas.

Los estudios realizados hasta la fecha, muestran que las cepas de Escherichia coli que causan enfermedad en el hombre pueden dividirse en 3 grupos:

- Escherichia coli enteroinvasiva, que tiene la capacidad de invadir las células del epitelio intestinal y producir un cuadro semejante a la disentería bacilar producida por Shigella. Presenta antígenos somáticos específicos comunes con diferentes especies de Shigella.- Para su determinación se usa la prueba de Serény, utilizada para identificar Shigella; se pueden emplear métodos serológicos, pero éstos presentan limitaciones para el diagnóstico, ya que no hay una relación plena entre el poder invasivo y el serotipo (34,38,39,48).

- Escherichia coli enteropatógena. Estos microorganismos por lo general no poseen toxinas, ni son invasivos; su patogenicidad depende aparentemente, de otros factores de virulencia aún no bien establecidos. Dentro de este

grupo se encuentran serotipos característicos que participan en el síndrome conocido como diarrea epidémica del recién nacido. La identificación en el laboratorio se hace por serología, recomendando efectuarse principalmente en brotes de diarrea epidémica en cuneros, en donde en ocasiones se observa una mortalidad elevada que puede llegar hasta el 50% o más (34,38,39).

- Escherichia coli enterotoxigénica. Son cepas de Escherichia coli que elaboran dos tipos de enterotoxinas: una termolábil (LT) y otra termoestable (ST), las cuales pueden presentarse en forma simultánea o por separado. Estas toxinas son capaces de producir diarrea activando la adenilato ciclasa o la guanilato ciclasa, dependiendo de la toxina involucrada.-- Los métodos de laboratorio de que se dispone, no están al alcance del laboratorio ordinario. En los de investigación o centros especializados, se utilizan tres tipos de pruebas, basados en la acción in vivo de las toxinas LT y ST en diversos modelos animales, en la actividad in vitro de la toxina LT, en cultivos de tejidos, así como en la capacidad antigénica de dicha toxina (6,48).

De los tres grupos mencionados, Escherichia coli enterotoxigénica es la que se presenta con mayor frecuencia en nuestro país, causando grandes problemas

de morbilidad y mortalidad, lo cual hace necesario incrementar los estudios sobre este microorganismo con el fin de encontrar métodos factibles a cualquier laboratorio, que ayuden a solucionar este problema.

1.4.- Escherichia coli enterotoxigénica. (Antecedentes)

Al descubrimiento de este microorganismo (1886) siguió una etapa durante la cual se realizaron minuciosas investigaciones, encaminadas a probar la relación del colibacilo con las diarreas infantiles. Los trabajos de la escuela francesa sobre el tema son notables; cabe destacar los de Lesage (1897) y Nobecourt (1899), quienes sostenían el papel patógeno de Escherichia coli en este tipo de padecimientos. Hacia 1910 dicha suposición quedó olvidada; durante los 30 a 35 años siguientes, sólo en forma esporádica se intentó demostrar su participación en las enteritis (43), como sucedió en 1923 en que hubo fundados indicios de sus relaciones con casos de diarrea infecciosa.

En 1945, Bray demostró la asociación de un tipo serológico específico de Escherichia coli con un brote de diarrea (Bacterium coli napolitanum). En 1946, en el Hospital Infantil de la Ciudad de México, Varela, Aguirre y Carrillo aislaron del cadáver de un lac-

tante de 2 meses de edad, una cepa de Escherichia coli que fue causante de la gastroenteritis y muerte de ese niño; dicha cepa poseía un antígeno somático que cruzaba con el antígeno "O" de Salmonella adelaide, dándole el nombre de E. coli Gomez (9).

De 1945 a 1951, diversos investigadores, particularmente en Inglaterra, aislaron algunas cepas de Escherichia coli de casos de diarreas infantiles. En 1951, Kauffman y Dupont recogieron estos cultivos utilizando el esquema serológico propuesto por el primero en 1947, y demostraron que las cepas correspondían a 2 tipos específicos: E. coli O111:B4 y E. coli O55:B5; sin embargo, los mecanismos de patogenicidad estaban pobremente entendidos en parte, debido a la incapacidad para reproducir la enfermedad humana en animales de experimentación (43).

En 1952, Olarte y Varela observaron que la cepa de E. coli Gómez, y la bacteria aislada por Bray (Bacterium coli napolitanum), así como la cepa Bacterium tipo Giles y Songster y E. coli serotipo O111:B4 de Kauffman y Dupont, estaban relacionadas con brotes epidémicos de diarrea en lactantes (22,39). A partir de este descubrimiento se identificaron serotipos responsables de producir diarrea tanto en recién nacidos como en niños y adultos; Neter y col. designaron a estas cepas de Escherichia coli causantes de diarrea, co

no enteropatógenicas (EEG), para diferenciarlas de las cepas relacionadas con infecciones extraintestinales (14).

Thompson en 1955 fue, al parecer, el primero en reconocer semejanzas entre Vibrio cholerae y Escherichia coli ya que eran capaces de elaborar enterotoxinas; inicialmente éstas se aislaron de animales muy jóvenes con diarrea severa. Un año más tarde, en Calcuta, se hicieron estudios en pacientes adultos con cuadros diarreicos semejantes a los producidos por Vibrio cholerae y en quienes se aisló Escherichia coli principalmente; las observaciones realizadas previamente en animales hicieron pensar que estas bacterias aisladas en Calcuta podrían ser las responsables de esos casos de diarrea (7).

Con el empleo de las técnicas utilizadas para la demostración de enterotoxinas elaboradas por Vibrio cholerae, se pudo probar que las cepas de E. coli aisladas de esos pacientes también eran capaces de sintetizar enterotoxinas (6).

En estudios posteriores se mostró que Escherichia coli requiere, además de su capacidad para producir toxinas, propiedades accesorias de virulencia, como es su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal,

la cual es mediada por antígenos específicos localizados sobre la superficie celular y denominados factores de colonización. Algunos de éstos han sido caracterizados con detalle, como son: el K88 y 987P en cepas porcinas; K99 en bovinos y cepas ovinas y CFA/I y CFA/II identificados en cepas enterotoxigénicas de humanos.

En 1980 Levine demostró, que cepas en las que su papel patógeno se había demostrado por inoculaciones experimentales en voluntarios humanos, carecían de CFA/I y CFA/II; en estas cepas pueden estar implicados otros factores de colonización como promotores de la adherencia y colonización a la mucosa del intestino delgado.-- Esto ha sido apoyado por estudios realizados en Bangladesh, en los que se sugiere la existencia de otro posible factor de colonización al que denominaron fimbria (3,43,51).

1.5.- Toxinas producidas por E. coli.

Diversos estudios realizados en el área veterinaria y en la investigación del cólera, condujeron al descubrimiento de 2 tipos de enterotoxinas que pueden ser diferenciadas por su capacidad de resistencia al calor; estas toxinas han sido denominadas toxina termoestable (ST) y toxina termolábil (LT) (6,32).

La capacidad para elaborar ambos tipos de enterotoxinas radica en la presencia de material genético extracromosómico (plásmido), el cual es relativamente fácil de transferir a cepas con características particulares que actúan como receptoras (6,22,34,50).

1.5.1.- Toxina Termolábil (IT).

Es una exotoxina, aunque gran parte de ella se encuentra en el espacio periplásmico de la bacteria; es de naturaleza proteica con un contenido muy pobre en lípidos y carbohidratos, es termolábil, se destruye generalmente a 60°C durante 30 minutos; tiene un peso molecular aproximado de 95,000d aunque se pueden considerar valores diferentes dependiendo de los métodos utilizados en su obtención (6,49).

Se ha visto que los cultivos con agitación y en un amplio volumen, favorecen su producción (6); además, los medios deben contener diversos aminoácidos y un medio basal de sales y glucosa. Entre estos encontramos el medio de Soya Trypticase, CAA y CAYE 2, siendo este último con el que se obtienen mejores resultados (35).

La toxina termolábil de Escherichia coli es similar en muchos aspectos a la toxina producida por Vibrio cholerae; de entre éstos se pueden señalar su

mecanismo de acción in vivo, las condiciones de cultivo requeridas para la producción in vitro, la labilidad al calor, que no son dializables, que se precipitan con sulfato de amonio y tienen capacidad antigénica (7,28, 34,38,39).

La toxina IT de Escherichia coli se encuentra formada por 2 subunidades: una subunidad A con peso molecular entre 25,000 a 30,000 daltons y una subunidad B con peso aproximado de 11,780 daltons. La subunidad A está constituida a su vez por dos unidades de - nominadas A_1 y A_2 con peso aproximado de 23,000 y 5,000 daltons respectivamente y unidas entre sí mediante un puente disulfuro. La subunidad B, llamada también coligenoide, está formada por 5 unidades monoméricas con tendencia a la polimerización, agregadas en forma de anillo, que es la única forma geométrica estable de agregación. Existen 2 formas de la subunidad B determinadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio: una de corrimiento rápido denominada R y otra de corrimiento lento llamada C. La forma R se convierte en la forma C por incubación en galactosa, entre 30° y 50°C. Se considera que la subunidad A está unida e insertada parcialmente en el anillo B por la porción A_2 (21,43,45).

El mecanismo de acción que se ha sugerido para esta enterotoxina, se relaciona con su capacidad de estimular la adenilato ciclasa en células grasas y en células del epitelio de la mucosa del intestino delgado, ocasionando un incremento en la concentración de adenosin 3'5' mono fosfato cíclico (AMPC), el cual estimula la salida de líquidos y además tien un efecto inmediato sobre el transporte de electrolitos.

Para que la toxina III de E. coli ejerza su acción, se presentan los siguientes eventos:

En primer lugar se requiere de un receptor sobre la superficie de las células intestinales, el cual se sabe es el gangliósido GM₁ (galactosil N-acetil galactosaminil-sialosil-galactosil-glucozil-ceramido), el que pertenece a los gangliósidos formados por complejos glucolipídicos que se encuentran en la membrana plasmática de las células; la subunidad B se une rápida e irreversiblemente a este receptor. El siguiente paso es un período de unión celular de 15 a 30 min dependiendo de la temperatura; en este lapso ocurren cambios conformacionales, que dan como resultado la exposición de regiones hidrofóbicas ocultas de la subunidad, las que son capaces de unirse a proteínas hidrofóbicas o componentes lipídicos de la membrana plasmática; por este mecanismo se logra, ya sea la for -

mación de un canal hidrofóbico a través de la membrana, por el cual puede pasar la subunidad A, o bien una interacción hidrofóbica que facilita la entrada hasta la membrana interna. En cualquiera de los casos A_1 se libera de A_2 por una reducción intracelular con glutatión; una vez que ha ocurrido esto se estimula la adenilato ciclasa por un mecanismo dependiente de nicotinamin-adenin-dinucleótido (NAD). El resultado es el incremento de AMPc, responsable de una prolongada secreción de fluido isotónico, disminución en la absorción de sodio y cambio en el transporte neto de cloro (8,17,34,38).

1.5.2.- Toxina Termoestable (ST).

La toxina termoestable de Escherichia coli no muestra similitud en estructura, especificidad celular o modo de acción con la toxina termolábil (8,24,30).

Se describe como una molécula de bajo peso molecular que se encuentra en un rango de 1,800 a 5,100 daltons, de constitución lipoproteica, termoestable, que soporta temperaturas hasta de 100°C durante 15 min; poco antigénica, la agitación vigorosa y la aereación favorecen su aumento en el medio de cultivo (2,6).

Para su obtención se recomiendan medios que con-

tengan aminoácidos tales como: prolina, serina, ácido aspártico y alanina, así como vitaminas, ácido oleíco y ácido láctico; por otro lado, se observa un efecto represor con glucosa, gluconato y piruvato (2).

Tanto su estructura como su modo de acción no son bien conocidos (1,2,45).

Actúa en forma diferente a la toxina LT, ya que por ser una molécula mucho más pequeña, no se une al gangliósido GM₁. Estimula la guanilato ciclasa, aumentando la concentración de guanosin 3'5' mono fosfato cíclico (GMPc); este incremento produce un efecto inmediato sobre el transporte de electrolitos en el intestino. El contenido de electrolitos del fluido producido por el intestino delgado es, no obstante, idéntico al que se observa en la respuesta a la enterotoxina termolábil o a la enterotoxina del cólera (8,44,46).

1.6.- Identificación de cepas enterotoxigénicas.

En el cuadro de la siguiente hoja se muestran los métodos utilizados para la detección de las enterotoxinas producidas por Escherichia coli.

Prueba	IT	ST
<u>Modelos animales:</u>		
Asas ligadas de conejo (fleón)	+(18 hrs)	+(6 hrs)
Conejo recién nacido (intragástrica)	+	+
Vía intradérmica en conejo	+	-
Ratón recién nacido (intragástrica)	-	+
Perfusión <u>in vivo</u> en rata (yeyuno)	+	+
<u>Cultivo de Tejidos:</u>		
Y-1 (Tumores adrenales en ratón)	+	-
CHO (Ovario de hamster chino)	+	-
VERO (Riñón mono verde africano)	+	-
<u>Serodiagnósticos:</u>		
RIA (Radioinmuno análisis)	+	-
ELISA (Inmunoabsorción enzimática)	+	-

(34,39,40,42)

La mayoría de las pruebas mencionadas requieren de manipulaciones y material muy complejo, además de que la mayoría de los laboratorios no cuentan con las condiciones adecuadas para llevarlas a cabo.

La prueba de asa ligada de conejo es la que menos manipulaciones especiales requiere, de modo que es la más empleada en aquellos laboratorios en los que las otras pruebas no son factibles. Esta prueba

consiste en observar los efectos ocasionados por las enterotoxinas en segmentos ligados del intestino delgado del conejo y otros animales. Estos segmentos se dilatan por el efecto de la toxina al estimular la adenilato ciclasa. Para que la prueba resulte confiable, es necesario incluir un control positivo que consiste en un filtrado bacteriano de una cepa productora de toxina y un control negativo constituido por medio de cultivo o filtrado de un cultivo no productor de toxina. Los resultados óptimos de esta determinación se observan a las 18 horas cuando se trata de toxina IT y a las 6 horas cuando se requiere identificar cepas productoras de toxina TE.

1.7.- Biotipos.

En virtud de los problemas que se tienen en la identificación de cepas de E. coli productoras de enterotoxinas, tanto por el costo, como por la dificultad de las técnicas, se plantea la necesidad de buscar métodos de laboratorio que cubran este propósito.

Los estudios realizados por Davis en 1977 con cepas de Escherichia coli aisladas de tracto urinario, mostraron que con el uso de pruebas bioquímicas es -

tandarizadas (fermentación de carbohidratos y descarboxilación de aminoácidos), es posible dar un perfil bioquímico de cada cepa o, mejor dicho, lo que se conoce como un biotipo (10).

Las investigaciones realizadas por Pamela E. Crichton and D.C. Old en 1979, reafirman lo señalado por Davis, al obtener resultados que fueron reproducibles y altamente discriminativos con cepas de Escherichia coli aisladas por ellos. Estos autores sugieren que las pruebas de descarboxilación de la L-ornitina, L-sorbose, D-rafinosa y sacarosa resultaron altamente discriminativas (10).

En este mismo año, Merson y col., encontraron una relación entre las características fenotípicas de E. coli y los serogrupos productores de enterotoxinas, observando serobiotipos comunes en cepas que producían ambos tipos de enterotoxinas (33).

En el año de 1980, D. C. Old y col. evaluaron la técnica de tipificación utilizada por Crichton y Old (1979); estos autores encontraron 43 diferentes biotipos entre 156 cultivos; el estudio fue altamente reproducible, y mostró que puede ser empleado en laboratorios en los que la serotipificación no es fácil de realizar (41).

En este mismo año, D. Reis y col. realizaron un estudio con cepas obtenidas en Brasil, encontrando al igual que Merson et al (1979), una relación entre los serotipos y los perfiles de fermentación de sus cepas (27).

Este método ha sido realizado en cepas enterotoxigénicas, sólo como parte complementaria de la caracterización por serotipos. Sin embargo, por la relación existente entre biotipos y serotipos, actualmente la biotipificación adquiere gran relevancia, como un método prometedor en la identificación de cepas enterotoxigénicas.

Las pruebas mencionadas consisten en observar los cambios ocurridos en un medio de cultivo debido a la actividad metabólica del microorganismo.

1.8.- Resistotipos.

En general la tipificación plena de especies bacterianas se encuentra restringida al uso de la serología, la fagotipia o, en algunos casos, a la susceptibilidad a la colicina. Hasta el momento, un recurso poco estudiado es el relacionado al efecto diferencial que ejercen algunos compuestos químicos (orgánicos).

cos e inorgánicos) sobre cepas de especies bacterianas y que se conoce con el nombre de resistotipia.

El principio de este procedimiento consiste en la diferenciación de cepas bacterianas, por el grado de resistencia o susceptibilidad a la acción de diferentes sustancias químicas.

Este método lo describieron Elek y Higney en 1970. Aplicado en cepas de E. coli, causantes de enfermedades de tracto urinario, dió resultados que concordaron con los serotipos encontrados. Un procedimiento similar se empleó con Shigella sonnei y los resultados obtenidos correspondieron con la tipificación por colicina y con la epidemiología (15,16).

En 1974, el método de resistotipificación lo emplearon Elek y Moryson para diferenciar cepas de Staphylococcus aureus obtenidas de diferentes hospitales. En este estudio encontraron una alta variabilidad en las características genéticas, dificultándose la tipificación; sin embargo, también observaron algunos resistotipos característicos que daban resultados paralelos con datos obtenidos por la tipificación con fagos. Esta investigación confirmó que la resistotipificación se puede emplear como un método de uso epidemiológico, aplicable a la diferencia

ción de una extensa variedad de especies bacterianas.

En 1980, Old y Chrichton observaron esquemas de resistotipificación altamente selectivos en 156 cepas de E. coli causantes de enfermedades del tracto urinario. Dichos autores demostraron la estabilidad de las características resistotípicas, al realizar repetidamente el estudio a diferentes intervalos y obtener resultados altamente reproducibles (41).

Este procedimiento fue utilizado también por estos autores con cepas de Escherichia coli, de diferentes fluidos del cuerpo y observaron resultados altamente satisfactorios al estudiar resistotipos, encontrando que existe una relación entre éstos y el uso de biotipos. Un hecho importante de esta investigación consistió en que, al presentarse cambios en los biotipos, ocurrían cambios en los resistotipos (9).

Los estudios realizados hasta la fecha, muestran que el principio es válido y puede, probablemente, ser extendido a cualquier microorganismo y usarse con propósitos epidemiológicos. El método es simple y proporciona un sistema útil para la tipificación de bacterias, cuando ésta no puede realizarse satisfactoriamente por los métodos existentes (16).

1.9.- Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos.

Debido a que se sabe que existen grandes variaciones en cuanto a la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos dentro de una misma especie, en muchas ocasiones se ha intentado diferenciar cepas por este método con fines epidemiológicos; sin embargo, tales características no pueden emplearse como una base de tipificación, ya que estos compuestos son ampliamente utilizados con fines terapéuticos, lo cual induce a la selección de mutantes resistentes y los resultados no son reproducibles.

No obstante todo lo antes mencionado, algunos investigadores afirman que cuando este método se utiliza en conjunto, con biotipos y resistotipos, puede ayudar a una completa tipificación de cepas (9,41).

2.- TRABAJO EXPERIMENTAL

2.1.- Material

2.1.1.- Material de uso común:

Asa bacteriológica

Mechero de Bunsen.

Porta objetos

Caja Petri

Tubos de ensaye (12x75, 13x100, 16x150 mm)

Tubos de ensaye con tapón de rosca de 16x150mm

Tubos para centrifuga de 50 ml.

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.

Pipetas graduadas de 1 y 5 ml.

Pipetas Pasteur

Jeringas de 1,3,20 ml.

Tabla de sujeción para conejo.

Hisopos

2.1.2.- Equipo

Microscopio

Placa agitadora

Centrífuga

Balanza analítica

Equipo Millipore

Equipo para cirugía

2.1.3.- Material Biológico

2.1.3.1.- Cepas:

Se estudiaron 175 cepas de E. coli aisladas de coprocultivos.

2.1.3.2.- Cepa de E. coli productora de enterotoxinas: 15M proporcionada por el Departamento de Ecología Humana, Laboratorio de Bacteriología. Facultad de Medicina, UNAM.

2.1.3.3.- Animales:

Se emplearon conejos machos Nueva Zelanda blancos de 2.5 a 3.0 Kg. proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

2.1.4.- Medios de cultivo

2.1.4.1.- Para aislamientos:

Agar eosina-azul de Metileno-Lactosa-Sacarosa (Merck)

2.1.4.2.- Para identificación

Agar citrato Seg. Simmons (Merck)

Agar Hierro Kligler (Merck)

Agar Hierro Tres Azúcares (Merck)

SIM

2.1.4.3.- Para conservación de cepas

Medio para conservación de cepas

2.1.4.4.- Para producción de enterotoxina

**Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (Merck)
(30)**

Medio CAYE 2 (35)

2.1.4.5.- Para caracterización de cepas

Biotipos:

Base de Rojo de Fenol (Bioxon)

Caldo Nutritivo (Merck)

**Bacto Descarboxilasa Base Moeller deshidrata-
da (Difco)**

Resistotipos:**Caldo BHI (Merck)****Medio base para resistotipos****Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos:****Caldo Nutritivo (merck)****Medio Base Agar Mueller Hinton (Merck) (29,41)****2.1.5.- Reactivos****2.1.5.1.- Para antestesia del conejo****Pentotal sódico 3 mg/Kg.****2.1.5.2.- Para aislamiento:****Colorantes de Gram****2.1.5.3.- Para Biotipos:****Maltosa (Merck)****Dulcitol (Merck)****Adonitol (Merck)****Celobiosa (Merck)****~~L~~-Raminosa (Sigma)****Sacarosa (Merck)**

D-Sorbitol	(Difco)
Trealosa	(Merck)
Salicina	(Difco)
D-Xilosa	(Difco)
D (+)-Rafinosa.5H ₂ O	(C.F. National Biochemi cals Corp.)
Lactosa-H ₂ O	(Merck)
L (+)-Arabinosa	(Merck)
Ornitina HCl	(Merck)
Lisina HCl	(Takeda)
L-Arginina HCl	(ICN Pharmaceuticals Inc. Life Science Group Plaiview N. Y.)

2.1.5.4.- Para resistotipos

Solución Salina Isotónica

Tris (hidroximetil aminometano) (Merck)

Fucsina básica (Sigma)	0.0014%	0.00175%	0.0196%
Verde de malaquita (Merck)	0.003 %	0.0375 %	0.0042%
Nitrato de plomo (Hoffmann-Broworth, S.A.)	1.62 %	2.025 %	2.91 %

Arsenato de sodio (Baker)	0.75 ‰	0.9375 ‰	1.01 ‰
Acido bórico (Técnica Química S/P)	3.0 ‰	3.75 ‰	4.05 ‰
Sulfato de cobre (Baker)	0.07 ‰	0.875 ‰	0.07 ‰
m-bisulfito potásico (Baker)	1.0 ‰	1.25 ‰	1.3 ‰
Acetato de cadmio (Baker)	0.4 ‰	0.5 ‰	0.4 ‰
m-Amino fenol (Eastman Organic Chemicals)	3.6 ‰	4.5 ‰	3.81 ‰
p-amino fenol (Eastman Organic Chemicals)	3.6 ‰	4.5 ‰	4.86 ‰
Cloruro de cetilpiridinio (Cepacol, Merrel)	-	0.0125 ‰	0.015 ‰

2.1.5.5.- Para sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos:

Ampicilina (Bristol)	25 µg/ml
Cloramfenicol (Parke Davis)	25 µg/ml
Kanamicina (Bristol)	25 µg/ml
Acido Nalidixico (Sidney Rous)	50 µg/ml
Estreptomicina (Lakeside)	100 µg/ml
Tetraciclina (Sigma)	25 µg/ml

Gentamicina (Scheramex, S.A. de C.V.) 12.5 $\mu\text{g/ml}$

Nitrofurazona (Kruja) 50 $\mu\text{g/ml}$

2.2.- Métodos

2.2.1.- Aislamiento e Identificación:

Se estudiaron 70 coprocultivos, obtenidos de la Clínica 32 del IMSS y de un laboratorio privado, de los cuales se tomaron sólo colonias características de E. coli, resemebrándolas por estría de aislamiento en medio de EMB, se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Una vez obtenido el desarrollo, se realizó tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas (Kligler, SIM, Citrato de Simmons) a colonias aisladas, con el objeto de identificar E. coli.

2.2.2.- Conservación de cepas.

Las cepas identificadas como E. coli se sembraron en medio de conservación (Ver ANEXO) por estría de superficie, a partir del tubo de Kligler. Se incubaron a 37°C 24 horas y se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante el tiempo del estudio.

2.2.3.- Prueba de asa ligada en fleón de conejo.

Para la producción de toxina por cepas de E. coli se preparan matraces de 250 o 500 ml conteniendo 25 y

50 ml del medio de CAYE 2 o Trypticase Soya respectivamente; al mismo tiempo se preparan tubos de 16x150 mm con 5 ml del medio que se haya elegido anteriormente. Se esteriliza a 120°C, 15 min.

Las cepas a probar se resiembran a partir del medio de conservación en EMB, se incuban a 37°C 24 hrs.; se toma una agada del desarrollo obtenido y se siembra en los tubos con 5 ml del medio CAYE 2 o Trypticase Soya, se incuban a 37°C, 24 horas ó durante 3 horas con agitación, de estos tubos se toman 0.5 o 1 ml con pipeta estéril y se transfieren a los matraces que contienen 25 y 50 ml del medio.

Los matraces se colocan en una placa agitadora o en un baño con agitación a 37°C y 400 rpm durante 18 horas.

El contenido de los matraces se vierte a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugan a 4,500 rpm a 4°C durante 45 minutos, el sobrenadante se filtra utilizando equipo Millipore en condiciones de esterilidad, recibéndolo en tubos estériles. A partir del filtrado libre de bacterias se lleva a jeringas un volumen de 2 ml.

Se prepara un control positivo y uno negativo. El

positivo se trabaja igual que las cepas a probar; el control negativo lo constituye medio de cultivo estéril.

Una vez hecho lo anterior, se procede a realizar la cirugía, para lo cual se siguen los siguientes pasos.

Se coloca al conejo de la cepa Nueva Zelanda, (el cual se mantuvo sin alimento por lo menos 24 horas antes de realizar la prueba) sobre la tabla de sujeción en posición dorso ventral, sujetando primero la extremidad posterior izquierda, continuar con la anterior de recha, seguir con la extremidad posterior derecha y finalmente la extremidad anterior izquierda. Se le hace inhalar éter durante 30 a 45 seg. Se realiza la tricotomía en la región ventral, se anestesia al animal con pentotal sódico (3 mg/Kg) de la siguiente manera: Se baja una de sus orejas y se desinfecta el área de la vena marginal en dirección al crecimiento del pelo, se mantiene presionada la vena con el dedo medio e índice y se tensa la oreja con el pulgar y el anular, levantando ligeramente el anular, se introduce la aguja en un ángulo de 45° con respecto a la vena, se fija la aguja con los dedos y se introduce lentamente el inóculo. Se coloca la torunda sobre la aguja antes de re -

tirlarla (tener cuidado de no llegar al cuarto plano de la anestesia, ya que el animal puede morir) (47)

Una vez anestesiado el animal se desinfecta la región ventral con Alkil dimetil bencil amonio (zol-vacsol), se precede a realizar la cirugía utilizando el material quirúrgico necesario, el cual ha sido previamente esterilizado.

Se hace una insición en la línea media de la región ventral de aproximadamente 7 cm con bisturí provisto de hoja No. 22, incidiendo primero piel, enseguida tejido conjuntivo y una vez expuesta la capa muscular se corta ésta con tijeras para dejar expuesta la cavidad peritoneal.

Al llegar al peritoneo se identifica y expone el intestino delgado en el cual se va a trabajar. Se localiza la válvula ileocecal y 7 cm por arriba de ésta se practica una ligadura, a partir de ahí se ligan segmentos alternados de 10 y 3 cm aproximadamente con hilo de seda 00.

En cada conejo se hacen de 10 a 12 segmentos de 10 cm y cada una de estas porciones largas se incula con el filtrado contenido en las jeringas previamente preparadas.

Una vez terminado el trabajo se procede a introducir el intestino delgado, se sutura con hilo catgut 00 cerrando el plano muscular con surjete continuo, después se procede a suturar piel con hilo de seda 00, uniendo piel y tejido conjuntivo simultáneamente con puntos separados.

Se desata al animal y se mantiene sin alimento de 18 a 24 horas al cabo de las cuales se sacrifica con aspiración de cloroformo.

Se coloca nuevamente en la tabla de sujeción, se abre y se examina el intestino delgado tomando como asas positivas aquéllas en las que el acúmulo de líquido tiene un volumen de entre 0.5 y 1 cc tomando en cuenta también, que el control positivo y negativo dieron el resultado esperado.

Las cepas que resulten positivas se marcan y guardan en el tubo de conservación a 4°C, se les realiza nuevamente la prueba y si ésta es positiva se guardan para estudios posteriores y las que resultan negativas en ésta segunda prueba pero que en la primera ocasión fueron positivas se separan y se siguen conservando.

Las cepas que resulten negativas desde la primera prueba se desechan, conservando sólo algunas de

ellas para los estudios comparativos posteriores.

2.2.4.- Biotipos

Se prepara caldo con base de rojo de fenol adicionada con el 0.5% del carbohidrato correspondiente y Base de Moeller adicionada con 1.0% del aminoácido respectivo.

Se colocan 3 ml de cada uno de ellos en tubos de 12 x 75 mm y se esterilizan a 10 lb durante 15 minutos.

Preparación del inóculo. Se siembran a partir del medio de conservación tubos que contienen 3 ml de caldo nutritivo estéril y se incuban 24 horas a 37°C; con este cultivo se inoculan los 13 carbohidratos y 3 aminoácidos empleados con pipeta Pasteur (2 a 3 gotas), se incuban a 37°C y se leen a las 3, 6, 24, 48, 72 horas para carbohidratos y para el caso de aminoácidos hasta las 120 horas.

2.2.5.- Resistotipos

Se prepara el siguiente material:

Tubos con 27 ml del medio base para resisto-

tipos (Medio para antibióticos # 2 10% más concentrado).

Equipo Millipore

Tubos con 1 ml de BHI

Tubos con 9 ml de SSI

Hisopos estériles

Esterilizar a 15 lb 15 min.

Tubos con las diferentes sustancias a la concentración deseada. Se esterilizan las soluciones por filtración en Millipore.

Una vez que se tiene lo anterior se colocan 3 ml de cada sustancia en cajas de Petri y se adicionan los tubos que contienen los 27 ml del medio base, se agita con movimientos rotatorios y suaves y se deja solidificar en una superficie plana. Cada una de las cajas tiene capacidad para 8 cepas.

En los tubos que contienen 1 ml de BHI se inocula una asada de las cepas a probar tomada del medio de conservación y se incuban 18 horas exactamente, se les agrega 9 ml de SSI estéril y se mantienen en refrigeración mientras que no se inoculen. Con esta dilución se obtiene un buen desarrollo confluyente.

Se procede a sembrar las cajas introduciendo un hisopo a los tubos que contienen el microorganismo a prueba y con éste sembrar una estría recta en cada una de las cajas con las diferentes sustancias.

Se incuban 24 horas a 37°C y se observan resultados (Inhibición del desarrollo o crecimiento normal de la bacteria).

2.2.6.- Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos.

Se preparan matraces con Base de Mueller Hinton y tubos con 1 ml de caldo nutritiva, hisopos y equipo Millipore. Se esteriliza a 15 lb 15 min.

Se preparan diluciones de los diferentes antimicrobianos y se filtran en Equipo Millipore, se adiciona la cantidad necesaria de cada uno de ellos a la base de Mueller Hinton (la cual debe estar a 45° aprox.) según la concentración deseada, se homogeniza perfectamente, se vierte a cajas de Petri y se deja que solidifique en una superficie plana.

Para esta prueba se preparó un cultivo bacteriológico de 18 horas utilizando el mililitro de caldo nutritivo y haciendo diluciones hasta una densidad e-

equivalente a la del tubo de 0.5% en la escala de Mc. Farland.

El procedimiento de sembrar y leer resultados es el mismo que para resistotipos.

3.- RESULTADOS:

Se estudiaron 175 cepas de *E. coli*, las cuales se probaron por el método de asa ligada en conejo, lográndose la identificación de 24 cepas enterotoxigénicas; de ellas sólo 13 dieron más de una vez positiva la prueba (2 de éstas se obtuvieron al final del estudio, por lo que no fue posible trabajarlas en conjunto con las primeras cepas). Se laboró, por lo tanto, sólo con 11 cepas.

Las cepas enterotoxigénicas se trabajaron en conjunto con las no enterotoxigénicas aisladas en este trabajo, para poder efectuar un estudio comparativo y ver si existen diferencias entre ellas.

Para las pruebas metabólicas se usaron 13 carbohidratos y 3 aminoácidos. Se observaron resultados repetitivos cuando el experimento se realizó a diferentes intervalos. Esto se muestra en las Tablas I y II.

Analizando los resultados se pudo ver que ciertas cepas presentan patrones de fermentación similares, lo cual nos permitió agruparlas en 6 y 7 biotipos para las cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas respectivamente. Estos resultados se muestran en las Tablas III y IV.

En las pruebas de resistencia se trabajó con 4 productos químicos inorgánicos y 7 orgánicos a tres diferentes concentraciones (con el fin de observar la máxima diferencia entre cepas toxigénicas y no toxigénicas). Los resultados se muestran en las tablas V, VI, IX, X, XIII y XIV y al igual que para biotipos se pudieron agrupar en 5, 4 y 6 diferentes patrones para las cepas productoras de enterotoxina y 4, 4 y 5 resistotipos para las cepas no enterotoxigénicas, para las 3 concentraciones estudiadas. Esto se observa en las Tablas VII, VIII, XI, XII, XV y XVI.

En el caso de las pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos se trabajó con 8 productos diferentes. En este estudio se observaron 5 marcadores de resistencia para las cepas enterotoxigénicas y 4 para las no enterotoxigénicas.

TABLA I

PRUEBAS PARA CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS
DE Escherichia coli

CEPA	FERMENTACION DE:												DESCARBOXILACION DE:			
	ADO	ARA	DUL	LAC	MAL	RAF	RAM	SAC	SAL	SOR	TRE	XIL	GEL	ARG	LIS	ORN
15M		*+	(+)	**+	**+	(+)		+		+	**+	**+			+	+
POLI H	(+)	*+		*+	*+				+	**+	*+				+	(+)
33P		*+	(+)	*+	*+	+		**+		**+	*+	*+			+	+
CERDO		**+	V	*+	**+	*+	**+	**+	(+)	+	**+	**+			+	+
1980	+	*+		**+	**+		(+)		(+)	**+	**+				+	
46A		*+	+	**+	**+	+		**+	+	**+	**+	*+			+	+
279	+	*+		*+	**+		+	(+)	(+)	**+	*+	*+			+	
46P		*+	(+)	*+	**+	+		**+	(+)	**+	*+	**+			+	+
344		*+		*+	**+	+	**+	+	(+)	**+	*+	**+			+	+
276	+	*+		*+	**+		+		+	**+	*+	+			+	
281	+	**+		*+	**+		+		(+)	*+	*+	+			+	

- *+ Positivo desde las 3 horas
- **+ Positivo desde las 6 horas
- + Positivo a las 24 horas
- (+) Positivo retardado 48 o 72 horas
- V Reacción variable

TABLA II
 PRUEBAS PARA CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS
 DE Escherichia coli

CEPA	PERMENTACION DE:												DESCARBOXILACION DE:			
	ADO	ARA	DUL	LAC	MAL	RAP	RAM	SAC	SAL	SOR	TRE	XIL	GEL	ARG	LIS	ORN
17		*+	+	+	**+		**+			**+	*+	**+		+	+	
525		*+	V	**+	**+		+			**+	**+	+			+	
201	+	**+		**+	**+		+		(+)	**+	**+	**+		+	+	
476	+	*+		**+	**+		**+		(+)	+	*+	**+			+	
110		**+	+	**+	**+	+	**+	+	(+)	**+	**+	**+			+	+
183		**+	+	**+	**+		**+			**+	**+	**+		+	+	
466	V	**+		**+	**+		**+		(+)	**+	**+	*+		+	+	
429		**+		**+	**+	(+)	**+	+	V	**+	**+	+			+	+
274		**+	+	+	**+		**+			**+	**+	+			+	
278	+	**+		**+	**+		+		(+)	**+	**+	**+			+	
95		**+		**+	**+		**+			**+	**+	(+)			+	+

*+ Positivo desde las 3 horas
 **+ Positivo desde las 6 horas
 + Positivo a las 24 horas
 (+) Positivo retardado 48 o 72 horas
 V Reacción variable

TABLA III
BIOTIPOS DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS
DE Escherichia coli

BIOTIPO	FERMENTACION DE:												DESCARBOXILACION DE:	
	ADO	ARA	DUL	LAC	MAL	RAF	RAM	SAC	SAL	SOR	TRE	XIL	LIS	ORN
A n=4		*+	V	*+	**+	+	V	**+	(+)	**+	**+	**+	+	+
B n=2		*+	(+)	*+	**+	(+)		**+		**+	**+	**+	+	+
C n=2	+	*+		*+	**+		+		(+)	**+	*+	+	+	
D n=1	(+)	*+		*+	*+				+	**+	*+		+	(+)
E n=1	+	**+		**+	**+		(+)		(+)	**+	**+		+	
F n=1	+	*+		*+	+		+	(+)	(+)	**+	*+	**+	+	

*+ Positivo desde las 3 horas
 **+ Positivo desde las 6 horas
 + Positivo a las 24 horas
 (+) Positivo retardado 48 o 72 horas
 V Reacción variable

TABLA IV
BIOTIPOS DE CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS
DE Escherichia coli

BIOTIPO	FERMENTACION DE:											DESCARBOXILACION DE:			
	ADO	ARA	DUL	LAC	MAL	RAF	RAM	SAC	SAL	SOR	TRE	XIL	ARG	LIS	ORN
A n=2		**+	+	+	**+		**+			**+	**+	+	+	+	
B n=1		**+		**+	**+	(+)	+	+	V	**+	**+	+		+	+
C n=2		**+	V	+	**+		+			**+	**+	(+)		+	
D n=2	V	**+		**+	**+		+		(+)	**+	**+	**+	+	+	
E n=2	+	**+		**+	**+		+		(+)	+	**+	**+		+	
F n=1		**+	+	**+	**+	+	**+	+	(+)	**+	**+	**+	V	+	+
G n=1		**+		**+	**+		**+			**+	**+	(+)	+	+	+

- * Positivo desde las 3 horas
- ** Positivo desde las 6 horas
- + Positivo a las 24 horas
- (+) Positivo retardado 24 o 48 horas
- V Reacción variable

TABLA V

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
15M	A	B	C	D	E		G	H	I	J
POLI H	A	B	C	D			G			J
33P	A	B	C	D	E		G	H		J
CERDO	A	B	C	D			G	H	I	J
1980	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
46A	A	B	C	D	E		G	H		J
279	A	B	C	D	E		G	H	I	J
46P	A	B	C	D	E		G	H	I	J
344	A	B	C	D	E		G	H		J
276	A	B	C	D	E		G	H	I	J
281	A	B		D	E		G	H	I	J

A = Fucsina básica 0.0014%
 B = Verde de malaquita 0.003%
 C = Nitrato de plomo 1.62%
 D = Arsenato de sodio 0.75%
 E = Acido bórico 3.0%

F = Sulfato de cobre 0.07%
 G = m-bisulfito potásico 1.0%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.6%
 J = p-amino fenol 3.6%

NOTA:

Donde aparecen letras indica que hubo resistencia
 Los espacios en blanco indican susceptibilidad.
 Esto es válido para las 11 tablas siguientes.

TABLA VI

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
17	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
525	A	B	C		E		G	H	I	J
201	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
476	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
110	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
183	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
466	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
429	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
274	A	B	C	D	E		G	H	I	J
278	A	B	C	D	E		G	H	I	J
95	A	B	C		E			H		J

A = Fucsina básica 0.0014%
 B = Verde de malaquita 0.003%
 C = Nitrato de plomo 1.62%
 D = Arsenato de sodio 0.75%
 E = Acido bórico 3.0%

F = Sulfato de cobre 0.07%
 G = m-bisulfito potásico 1.0%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.6%
 J = p-amino fenol 3.6%

TABLA VII

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO		PRODUCTOS QUIMICOS									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	n = 5	A	B	C	D	E		G	H		J
2	n = 3	A	B	C	D	E		G	H		J
3	n = 1	A	B	C	D			G			J
4	n = 1	A		C	D			G	H	I	J
5	n = 1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

A = Fucsina básica 0.0014%
 B = Verde de malaquita 0.003%
 C = Nitrato de plomo 1.62%
 D = Arsenato de sodio 0.75%
 E = Acido bórico 3.0%

F = Sulfato de cobre 0.07%
 G = m-bisulfito potásico 1.0%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.6%
 J = p-amino fenol 3.6%

TABLA VIII

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO		PRODUCTOS QUIMICOS									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	n = 3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
2	n = 4	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
3	n = 2	A	B	C	D	E		G	H	I	J
4	n = 2	A	B	C		E		G	H	I	J

52

A = Fucsina básica 0.0014%
 B = Verde de malaquita 0.003%
 C = Nitrato de plomo 1.62%
 D = Arsenato de sodio 0.75%
 E = Acido bórico 3.0%

F = Sulfato de cobre 0.7%
 G = m-bisulfito potásico 1.0%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.6%
 J = p-amino fenol 3.6%

TABLA IX

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
15M	A		C	D	E					J	K
POLI H	A		C	D	E					J	
33P	A		C	D	E					J	K
CERDO	A		C	D	E					J	K
1980	A		C	D	E						
46A	A		C	D	E					J	K
279	A			D	E		G			J	K
46P	A			D	E		G			J	K
344	A			D	E		G			J	K
276	A			D	E		G			J	K
281	A			D	E		G			J	K

52

- | | | | |
|------------------------|----------|-------------------------------|---------|
| A = Fucsina básica | 0.00175% | G = m-bisulfito potásico | 1.25% |
| B = Verde de malaquita | 0.0375% | H = Acetato de cadmio | 0.5% |
| C = Nitrato de plomo | 2.025% | I = m-amino fenol | 4.5% |
| D = Arsenato de sodio | 0.9375% | J = p-amino fenol | 4.5% |
| E = Acido bórico | 3.75% | K = Cloruro de cetilpiridinio | 0.0125% |
| F = Sulfato de cobre | 0.875% | | |

TABLA X

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
17	A			D	E		G			J	K
525	A			D	E		G			J	K
201	A			D	E		G			J	K
476	A			D	E		G			J	K
110	A		C	D	E		G			J	K
183	A		C	D	E		G			J	K
466	A		C	D	E		G			J	K
429	A		C	D	E		G			J	K
274	A		C	D	E		G			J	K
278	A			D	E		G				K
95	A		C		E		G			J	K

53

A = Fucsina básica 0.00175%
 B = Verde de malaquita 0.0375%
 C = Nitrato de plomo 2.025%
 D = Arsenato de sodio 0.9375%
 E = Acido bórico 3.75%
 F = Sulfato de cobre 0.875%

G = m-bisulfito potásico 1.25%
 H = Acetato de cadmio 0.5%
 I = m-amino fenol 4.5%
 J = p-amino fenol 4.5%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.0125%

TABLA XI

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1 n = 4	A		C	D	E					J	K
2 n = 2	A		C	D	E					J	
3 n = 3	A			D	E		G			J	K
4 n = 2	A			D	E		G				K

A = Fucsina básica 0.00175%
 B = Verde de malaquita 0.0375%
 C = Nitrato de plomo 2.025%
 D = Arsenato de sodio 0.9375
 E = Acido bórico 3.75%
 F = Sulfato de cobre 0.875%

G = m-bisulfito potásico 1.25%
 H = Acetato de cadmio 0.5%
 I = m-amino fenol 4.5%
 J = p-amino fenol 4.5%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.0125%

TABLA XII

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1 n = 4	A			D	E		G			J	K
2 n = 5	A		C	D	E		G			J	K
3 n = 1	A			D	E		G				K
4 n = 1	A		C		E		G			J	K

A = Fucsina básica 0.00175%
 B = Verde de malaquita 0.0375%
 C = Nitrato de plomo 2.025%
 D = Arsenato de sodio 0.9375%
 E = Acido bórico 3.75%
 F = Sulfato de cobre 0.875%

G = m-bisulfito potásico 1.25%
 H = Acetato de cadmio 0.5%
 I = m-amino fenol 4.5%
 J = p-amino fenol 4.5%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.0125%

TABLA XIII

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
15M	A	B		D	E		G	H	I	J	K
POLI H	A			D	E		G			J	K
33P	A			D	E		G	H			K
CERDO	A	B		D	E		G	H	I	J	K
1980	A	B		D	E	F	G	H			
46A	A	B		D	E		G	H	I	J	K
279	A	B		D	E		G	H	I	J	K
46P	A	B		D	E		G	H	I	J	K
344	A	B		D	E		G	H	I	J	K
276	A	B		D	E		G	H	I		K
281	A	B		D	E			H	I		K

56

A = Fucsina básica 0.0196%
 B = Verde de malaquita 0.0042%
 C = Nitrato de plomo 2.91%
 D = Arsenato de sodio 1.01%
 E = Acido bórico 4.05%
 F = Sulfato de cobre 0.07%

G = m-bisulfito potásico 1.3%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.81%
 J = p-amino fenol 4.86
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.015

TABLA XIV

PRUEBAS OBTENIDAS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
17	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
525	A	B		D	E		G	H	I	J	K
201	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
476	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
110	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
183	A	B		D	E	F	G	H		J	K
466	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
429	A	B		D	E	F	G	H		J	K
274	A	B		D	E		G	H		J	K
278	A	B		D	E		G	H	I	J	K
95	A	B		D	E		G	H	I		K

57

A = Fucsina básica 0.0196%
 B = Verde de malaquita 0.0042%
 C = Nitrato de plomo 2.91%
 D = Arsenato de sodio 1.01%
 E = Acido bórico 4.05%
 F = Sulfato de cobre 0.07%

G = m-bisulfito potásico 1.3%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.81%
 J = p-amino fenol 4.86%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.015%

TABLA XV

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO	PRODUCTOS QUIMICOS										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1 n = 5	A	B		D	E		G	H	I	J	K
2 n = 1	A	B			E		G			J	K
3 n = 1	A			D	E		G	H			K
4 n = 1	A	B		D	E	F	G	H			
5 n = 1	A			D	E		G	H	I	J	K
6 n = 2	A	B		D	E		G	H	I		K

58

A = Fucsina básica 0.0196%
 B = Verde de malaquita 0.0042%
 C = Nitrato de plomo 2.91%
 D = Arsenato de sodio 1.01%
 E = Acido bórico 4.05%
 F = Sulfato de cobre 0.07%

G = m-bisulfito potásico 1.3%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.81%
 J = p-amino fenol 4.86%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.015%

TABLA XVI

RESISTOTIPOS OBTENIDOS CON EL USO DE DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS
(ORGANICOS E INORGANICOS) EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

RESISTOTIPO		PRODUCTOS QUIMICOS										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	n = 5	A	B		D	E	F	G	H	I	J	K
2	n = 2	A	B		D	E		G	H	I	J	K
3	n = 2	A	B		D	E	F	G	H		J	K
4	n = 1	A	B		D	E		G	H		J	K
5	n = 1	A	B		D	E		G	H	I		K

A = Fucsina básica 0.0196%
 B = Verde de malaquita 0.0042%
 C = Nitrato de plomo 2.91%
 D = Arsenato de sodio 1.01%
 E = Acido bórico 4.05%
 F = Sulfato de cobre 0.07%

G = m-bisulfito potásico 1.3%
 H = Acetato de cadmio 0.04%
 I = m-amino fenol 3.81%
 J = p-amino fenol 4.86%
 K = Cloruro de cetilpiridinio 0.015%

TABLA XVII

PATRON DE RESISTENCIA A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS
EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	ANTIMICROBIANOS							
	Gm	Km	Nf	A. nal.	Tc	St	Gm	Ap
15M					Tc			
POLI H			Nf		Tc			
33P					Tc			Ap
CERDO					Tc	St		
1980			Nf		Tc			Ap
46A		Km			Tc			Ap
279								8
46P					Tc			Ap
344					Tc			Ap
276					Tc			
281								

Gm = Gentamicina	12.5 μ g/ml	Tc = Tetraciclina	25.0 μ g/ml
Km = Kanamicina	25.0 μ g/ml	St = Estreptomicina	100.0 μ g/ml
Nf = Nitrofurazona	50.0 μ g/ml	Gm = Cloramfenicol	25.0 μ g/ml
A. nal. = Acido nalidixico	50.0 μ g/ml	Ap = Ampicilina	25.0 μ g/ml

NOTA:

Las abreviaturas del antimicrobiano correspondiente presentes en el cuadro indican resistencia.
La ausencia de abreviaturas indica sensibilidad.
Esto es válido para la tabla siguiente.

TABLA XVIII

PATRON DE RESISTENCIA A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS
 EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli

CEPA	ANTIMICROBIANOS							
	Gm	Km	Nf	A. nal.	Tc	St	Cm	Ap
17		Km			Tc	St		Ap
525		Km			Tc	St		Ap
201					Tc			
476					Tc	St		Ap
110					Tc			
183					Tc			Ap
466								
429								Ap
274					Tc			Ap
278								Ap
95					Tc	St		

Gm = Gentamicina 12.5 μ g/ml
 Km = Kanamicina 25.0 μ g/ml
 Nf = Nitrofurazona 50.0 μ g/ml
 A. nal. = Acido nalidixico 50.0 μ g/ml

Tc = Tetraciclina 25.0 μ g/ml
 St = Estreptomicina 100.0 μ g/ml
 Cm = Cloramfenicol 25.0 μ g/ml
 Ap = Ampicilina 25.0 μ g/ml

4.- DISCUSION DE RESULTADOS

Este estudio se realizó con el objeto de establecer una diferenciación entre cepas de E. coli productoras y no productoras de enterotoxina.

Como se mencionó en los resultados, a pesar de que en este trabajo se logró aislar 24 cepas enterotoxigénicas, sólo se trabajó con aquéllas que mostraron la capacidad de retención del plásmido que codifica para la producción de enterotoxina, ya que para nuestro fin era importante trabajar con cepas que nos dieran seguridad en cuanto a su capacidad enterotoxigénica, para poder dar características definidas de éstas, pues si se eligen aquellas cepas que sólo una vez den positiva la prueba, se corre el riesgo de que al perder el plásmido, perdieran algunas características que fueran de importancia para esta investigación.

El análisis de los resultados obtenidos para la parte de la utilización de carbohidratos y aminoácidos, mostró que algunas cepas tenían el mismo patrón fermentativo, por lo cual pudieron reunirse dentro de un mismo grupo, el cual se conoce como biotipo (16), encontrándose que aunque un biotipo es compartido por cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas, exis

ten biotipos característicos de cada una de ellas.

Un análisis más profundo del biotipo compartido, nos permitió observar que tanto la cepa 276 (enterotoxigénica) y la 274 (no enterotoxigénica), fueron colonias aisladas de la misma caja, lo cual nos lleva a suponer que sí existen características sero-fermentativas particulares especiales que hacen que una cepa pueda ser receptora o no del plásmido (27, 34, 50), siendo factible que la cepa 274 sea quizá receptora del plásmido, por lo que muestra las mismas características fenotípicas que las cepas 276 y 281 enterotoxigénicas; y con respecto a la cepa 476 (no enterotoxigénica) también se puede pensar que sea una cepa receptora del plásmido.

En el análisis de biotipos se pudo encontrar que algunos patrones fermentativos son similares entre cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas, variando únicamente en un carbohidrato o un aminoácido; esto podría llevar a confusión en el momento de la identificación de algunas cepas; sin embargo, ya que el porcentaje de utilización de algunos carbohidratos y aminoácidos es variable para cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas, al ser en algunos casos muy marcado esto nos ayudaría a lograr u-

na mejor diferenciación de la cepa en estudio. Con respecto a lo anterior, se tienen diferencias marcadas en la utilización de rafinosa, ramposa, saca rosa, adonitol, arginina y ornitina observándose para el caso de las enterotoxigénicas un 54.5%, 54.5%, 63.6%, 45.4%, 0% y 63.6% en tanto que para las no enterotoxigénicas un 18.1%, 100%, 18.1%, 36.2%, 45.4% y 27.2% para cada uno de los carbohidratos y aminoácidos mencionados.

Pueden notarse diferencias menos marcadas en la utilización de xilosa y salicina con un porcentaje de 81.8% y 81.8% para las cepas enterotoxigénicas y de 100% y 54.5% para las no enterotoxigénicas.

Otro dato importante es el hecho de que las cepas enterotoxigénicas nunca utilizaron la arginina y para el caso de las no enterotoxigénicas se vió que siempre emplearon la ramposa lo cual es una ayuda más en su identificación.

Comparando los resultados obtenidos en nuestro experimento para las cepas toxigénicas, con los obtenidos por otros investigadores (27), se encuentra que no se tienen los mismos patrones fermentativos, a excepción del biotipo A que se comparte con el bio

tipo del Serogrupo O128 Ac:H27, obtenido por M. Henriqueta y cols. Esto viene a apoyar lo que se había sugerido acerca de que los grupos serofermentativos varían dependiendo del área geográfica y del tipo de alimentación (39), por lo que se tienen diferencias en los resultados obtenidos.

Por último, se encontraron diferencias generales en cuanto a lo reportado por Edwards para la identificación de E. coli, (18) ya que en su estudio la mayoría de las cepas de E. coli no utilizan el adonitol y descarboxilan la arginina, lo que no ocurrió en nuestro caso porque muchas de nuestras cepas si utilizan el adonitol y no descarboxilan la arginina, siendo esto más notable en las cepas no enterotoxigénicas.

En las pruebas de resistencia a diferentes productos químicos orgánicos e inorgánicos, también se obtuvieron resultados de interés, ya que, como en el caso de biotipos, aquí también pudieron agruparse en patrones característicos denominados resistotipos, basándonos sólo en la capacidad de la cepa para desarrollar o no, en presencia de las diferentes sustancias, tomando como tiempo máximo para su desarrollo 72 horas.

Es importante hacer notar que se utilizaron 3 diferentes concentraciones y se notó variación en los resistotipos obtenidos en cada una de ellas.

Al analizar por separado cada una de las concentraciones estudiadas se obtuvo lo siguiente: para la primera concentración (Tablas VII y VIII) se vió que sólo uno de los resistotipos de las cepas enterotoxigénicas (resistotipo 5) se comparte con el resistotipo 2 de las cepas no enterotoxigénicas. Sin embargo, el resistotipo 2 agrupa 4 cepas, por lo que lo consideramos más representativo de las cepas no enterotoxigénicas.

Otro dato importante es que algunos compuestos nos ayudan a lograr una mejor diferenciación entre las cepas, como ocurre en el caso de sulfato de cobre y m-amino fenol, ya que para éstos las cepas enterotoxigénicas muestran un 9% y 63.6% de resistencia, en tanto que las no enterotoxigénicas acusan un 63.6% y 100%, respectivamente.

Menor diferencia se observa para el caso de ácido bórico, p-amino fenol con un porcentaje para las cepas enterotoxigénicas de 81.8% y 100% y para las no enterotoxigénicas de 100% y 72.7%, respectivamente. Es decir, a estas concentraciones se logra una

buena diferenciación con sulfato de cobre y m-amino fenol, en caso de haber confusión para el resistotipo completo.

Para el caso de la segunda concentración empleada (Tablas XI y XII), se ve que se comparten 2 resistotipos; el resistotipo 3 y 4 de las enterotoxigénicas se corresponde con el 1 y 3 de las no enterotoxigénicas respectivamente y tanto en enterotoxigénicas como en no enterotoxigénicas se agrupa casi igual número de cepas, por lo que se consideró que esta concentración no es de utilidad para diferenciar por resistotipos estas cepas; sin embargo, el análisis individual de cada compuesto muestra que un mayor porcentaje de cepas toxigénicas son resistentes al m-bisulfito potásico y al p-amino fenol; pero esta diferencia no es muy grande con respecto a las no enterotoxigénicas, por tanto se sugiere que estas concentraciones no sean utilizadas como un medio de diferenciación.

Por último, para la tercera concentración, (Tablas XV y XVI) se puede observar que se comparten 2 resistotipos: el resistotipo 1 y 6 de las enterotoxigénicas con el 2 y 5 de las no enterotoxigénicas respectivamente; sin embargo, el resistotipo 1 y 6

de las enterotoxigénicas agrupa 5 y 2 cepas, en tanto que el resistotipo 2 y 5 agrupa 2 y 1 cepas, respectivamente.

Además, es de importancia señalar que la cepa agrupada en el resistotipo 5 es la única de las no enterotoxigénicas que presenta la particularidad de no ser resistente al p-amino feno, en comparación con las enterotoxigénicas, en que varios resistotipos incluyen esta característica, lo que nos hace pensar que tal vez el resistotipo 5 no sea muy característico de las no enterotoxigénicas. Por tanto, tomando en cuenta lo antes señalado, consideramos que estas concentraciones sí son de utilidad para diferenciar las cepas por resistotipos.

El análisis separado de cada uno de los productos utilizados, nos llevó a encontrar diferencias en cuanto a la resistencia al verde de malaquita, al sulfato de cobre y al p-amino fenol, con porcentajes de 63.6%, 9.09% y 63.6% para las cepas enterotoxigénicas y de un 100%, 63.6% y 93.3% para las cepas no enterotoxigénicas, por lo que a estas concentraciones sí se logra una buena diferenciación entre las cepas estudiadas.

Para las Tablas XVII y XVIII, que se refieren

a la resistencia a diferentes antimicrobianos, se puede observar que no hay patrones característicos; pero sí puede verse que existe mayor resistencia a la Ampicilina y Estreptomicina por parte de las cepas no enterotoxigénicas. Otra particularidad es que 2 de las cepas enterotoxigénicas mostraron resistencia a la Nitrofurazona. Sin embargo, estas características no son muy notables, por lo que consideramos que el estudio de resistencia a los antimicrobianos no es de utilidad para diferenciar cepas de E. coli.

5.- CONCLUSIONES

- Por la evaluación general de los estudios realizados, consideramos que el uso de biotipos no da un 100% de seguridad en cuanto a la identificación de cepas toxigénicas; sin embargo, es un método más accesible que la utilización de suero en los que la certeza tampoco es de un 100%, además de que en México esta incertidumbre se ve incrementada por la utilización de suero obtenidos con cepas no nacionales.

- La caracterización de las cepas por medio de biotipos se puede simplificar, utilizando sólo aquellos carbohidratos y aminoácidos con los que se tiene un alto porcentaje de diferenciación entre cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas.

- El uso de biotipos presenta la ventaja de ser relativamente rápido, pues se pueden tener resultados desde las 3 horas.

- Es factible establecer patrones de utilización de carbohidratos y aminoácidos con cepas nacionales, sin que esto implique técnicas más complejas.

- El empleo de resistotipos lo consideramos de utilidad sólo cuando se profundiza lo suficiente, con el fin de encontrar las concentraciones óptimas para

cada uno de los reactivos que nos ayuden a diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas.

- Este método (resistotipos) lo consideramos económico y no se utiliza en el demasiado tiempo; sin embargo requiere de más material y mucha manipulación.

- En el método de resistotipos se pueden incluir una gran variedad de sustancias, con el único requisito de encontrar la concentración óptima para el fin que se quiere alcanzar.

- El estudio de resistencia a diferentes antimicrobianos nos señala que no es de utilidad para diferenciar estas cepas y la importancia que podría tener es sólo desde el punto de vista médico, ya que encontramos que las cepas enterotoxigénicas son más sensibles a la ampicilina y estreptomina que las no enterotoxigénicas.

- Por último, consideramos que la utilización de biotipos aunado al empleo de resistotipos, puede aumentar la probabilidad de identificar en forma lo más correcta posible una cepa enterotoxigénica, ya que si ésta pertenece a un biotipo enterotoxigénico y además se encuentra dentro de un resistotipo ca -

racterístico de estas cepas, el porcentaje de incertidumbre se ve disminuído y todo esto facilita su caracterización en un laboratorio rutinario de diagnóstico.

SUGERENCIAS

- Es importante tratar de establecer patrones característicos con cepas nacionales, utilizando para este fin un mayor número de cepas, con el objeto de que estos patrones sean representativos.

- Debido a los problemas que se tienen al realizar las lecturas de la utilización de carbohidratos y aminoácidos, se piensa en la posibilidad de establecer un patrón de referencia con el fin de unificar criterios.

- De acuerdo con las 3 concentraciones estudiadas en este trabajo, sugerimos que en resistotipos se empleen las siguientes concentraciones para las diferentes sustancias

	Concentración
Fucsina básica	Mayor a 0.00196 g/dl
Verde de malaquita	0.042 g/dl
Nitrato de plomo	2.025 g/dl
Arsenato de sodio	0.75 g/dl
Acido bórico	4.05 g/dl
Sulfato de cobre	0.70 g/dl
m-bisulfito potásico	1.25 g/dl
Acetato de cadmio	0.04 g/dl
m-amino fenol	3.6 g/dl
p-amino fenol	4.86 g/dl
Cloruro de cetilpiridinio	Mayor a 0.015 g/dl

- Es necesario poner de manifiesto que las características serofermentativas se encuentran codificadas por cromosomas, mientras que la capacidad de resistencia a diferentes productos y la producción de enterotoxinas se encuentra mediada por plásmidos. En el desarrollo de este trabajo se encontró que la capacidad de resistencia de las cepas con las que se trabajó se conservó durante todo el tiempo en el que se realizó el experimento; sin embargo, se piensa que un estudio complementario a este trabajo sería realizar la conjugación bacteriana con el objeto de observar qué variaciones tienen estas características una vez realizada dicha conjugación.

ANEXO

Preparación de Medios:

1.- Para conservación de cepas:

Agar-Agar purificado y exento de inhibidores al 2%

Cloruro de Sodio 0.5%

Bacto peptona 2.0%

2.- Para la caracterización:

CAYE 2

Casamino Ácidos 2.0%

Extracto de Levadura 0.6%

Cloruro de Sodio 0.25%

K_2HPO_4 0.875%

Bacto Dextrosa 0.25%

0.1% de una solución de (0.5% $MgSO_4$, 0.5% de $MnCl_2$ y 0.5% de $FeCl_3$)

Ajustar a pH 8.5 con NaOH o HCl 1N.

La dextrosa se esteriliza por filtración y se adiciona en condiciones de esterilidad.

Medio Base para Resistotipos

Medio para Antibióticos #2 10% más concentrado

Bacto peptona o peptona de gelatina 6.6 g

Extracto de Levadura 3.3 g

Extracto de Carne	1.65 g
Agar-Agar	16.5 g

Se disuelve en Tris 0.1M pH 7.6

Preparación de Reactivos

1.- Resistotipos:

	Disolvente	Diluyente
Fucsina Básica	Alcohol	Agua
m-amino fenol	Alcohol	Agua
p-amino fenol	Alcohol	Agua

Para preparar éstos reactivos primero se disuelven en una pequeña cantidad de alcohol y se completa con agua hasta alcanzar la concentración deseada.

2.- Sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos:

	Disolvente	Diluyente
Ampicilina	Buffer de Fos fatos pH 8	Buffer de Fos fatos pH 6
Cloramfenicol	Etanol	Agua
Kanamicina	Buffer de Fos fatos pH 8	Agua
Nitrofurazona	N-N dimetil formamida	
Ac. Nalidíxico	NaOH 1M	Agua

En este caso se utiliza como disolvente para cada uno de los reactivos señalados los mencionados en la

segunda columna y se completa con las soluciones señaladas en la tercera columna hasta alcanzar la concentración deseada.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alderete, J. F.; and Robertson, D. C.: Purification and Chemical Characterization of the Heat-Stable Enterotoxin Produced by Porcine Strains of Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun. 1978. 19(3): 1021-1030.
- 2.- Alderete, J. F.; and Robertson, D. C. : Nutrition and Enterotoxin Synthesis by Enterotoxigenic Strains of Escherichia coli: Defined Medium for Production of Heat-Stable Enterotoxin. Infect. Immun. 1977. 15(3): 781-788.
- 3.- Berdeley, R.C.W. and cols.: Microbial Adhesion to Surfaces. Society of Chemical, Industry, London, p. 530-532.
- 4.- Bioxon. Medios de Cultivo 1 y Reactivos de Diagnóstico. p. 5.
- 5.- Bourque, R.; Lallier, R.; and Lariviere, S.: Influence of Oral Antibiotics on Resistance and Enterotoxigenicity of Escherichia coli. Can. J. Comp. Med. 1980. 44:101-108-

- 6.- Bradley, S. R.: Human Diarrheal Disease caused by Enterotoxigenic Escherichia coli. Human Diarrheal Disease. 3a. Edición, Ed. Copyright, 1975. p. 333-352.
- 7.- Bradley, S. R.; and cols.: Enterotoxigenic Escherichia coli Isolated from Patients with Severe Cholera-like Disease. J. Infect. Dis. 1971. 123(4):378-385.
- 8.- Carpenter, Ch. C. J.: Mechanisms of Bacterial Diarrheas Am. J. Med. 1980. 68:313-316.
- 9.- Chrichton, F. B. and Old, D.C.: Differentiation of Strains of Escherichia coli: Multiple Typing. Approach J. Clin. Microbiol. 1980. p. 635-640.
- 10.- Chrichton, F.B.; and Old, D. C.: Biotyping of Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 1979. 12:473-486.
- 11.- De, S.N.; and Chatterje, D.N.: An Experimental Study of the Mechanism of Action of Vibrio cholerae on the Intestinal Mucous Membrane. J. Path. Bact. 1953. 56:559-562.
- 12.- Donta, S. T.; and cols.: In Vivo Production and Inactivation of Escherichia coli Enterotoxin. Gastroenterology. 1974. 67:983-990.

- 13.- Dupont, H. L.: Estudios Necesarios para Enriquecer el Conocimiento de las Infecciones Entéricas y Reducir sus Consecuencias en Términos de Morbilidad y Mortalidad. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 1979. p. 346-349.
- 14.- Dupont, H. L.; Formal, S. B.; Hornich, R. B.: Pathogenesis of Escherichia coli Diarrhoeae. New Eng Med. 1971. 285:1-9.
- 15.- Elek, S. D.; and Higney Leoner: Resistogram Typing- A New Epidemiological Tool; Aplicacion to Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 1969. 5:108-110.
- 16.- Elek, S. D.; and Moryson, C.: Resistotyping of Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol. 1974. 7:237-249.
- 17.- Evans, D. J.; and cols.: Stimulation of Adenyl Cyclase by Escherichia coli Enterotoxin. Nature New Biology. 1972. 236:137-138.
- 18.- Ewing, W. H.; and Edwards, P. R.: Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company. 3a. Ed. 1972.

19.- Ewing, W. H.; and Edwards, P. R.: Isolation and Preliminary Identification of Escherichia coli serotypes Associated with Diarrheal Disease. CDC Laboratory Manual. 1957. p.p. 1-8.

20.- Gianella, R. A.; and Drake, K.W.: Effect of Purified Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin on Intestinal Cyclic Nuclotide Metabolism and Fluid Secretion. Infect. Immun. 1979. 24(1):19-23.

21.- Gill, D. M.; and cols.: Subunit Number and Arrangement in Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin. Infect. Immun. 1981. 33(3):677-683.

22.- Gilligan, P. H.; and Robertson, D. C.: Nutritional Requirements for Enterotoxin-Labil Synthesis by Escherichia coli. Infect. Immun. 1979. 17(3):99-107.

23.- Gorbach, S.L.; Banwell, J. G.; Chatterjie, B. D.; Jacobs, B.; and Sack, R.B.: Acute Undifferentiated Human Diarrhea in the Tropics I. Alterations in Intestinal Microflora. J. Clin. Inv. 1971. 50:881-889.

24.- Guzman-Verduzco, L. M.; Fonseca, R.; and Kuperstoch-Fortnoy, Y.M.: Thermoactivation of a Periplasmic Heat-Stable Enterotoxin of Escherichia coli. J. Bacteriol. 1983. 154(1):146-151.

25.- Gyles, L. C.; Palchaudhuri, S.; Maas, W. D.: Naturally Occurring Plasmid Carrying Genes for Enterotoxin Production and Drug Resistance. *Vet. Microbiol. Microbiol.* 1977. p.p. 198-199.

26.- Gyles, C.; So, M.; Falkow, S.: The Enterotoxin Plasmids of Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 1974. 30(1):40-48.

27.- Henriqueta, M.; and cols.: Relationship Among Enterotoxigenic Phenotypes, Serotypes, and Sources of Strains in Enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1980. 28(1):24-27.

28.- Klipstein, F. A.; and Engert, R. F.: Immunological Interrelationships Between Cholera Toxin and the Heat-Stable Enterotoxins of Coliform Bacteria. *Infect. Immun.* 1977. 18(1):110-117.

29.- Klipstein, F. A.; Entert, R. F.: Relative Enterotoxigenicity of Coliform Bacteria. *J. Infect. Dis.* 1977. 136(2):205-215.

30.- Levine, M. M.; Caplan, E. S.; Waterman, D.; Cash, R.A.; Harnich, R. B.; and Snyder, M. J.: Diarrhea caused by Escherichia coli that produce only Heat-Stable Enterotoxin, *Infect. Immun.* 1977. 17(1):78-82.

31.- Lopez-Alvarez, J.: Escherichia coli: Mecanismos de Patogenicidad. Ciencia Veterinaria. 1a. Edición, Ed. UNAM. p.p. 1-39.

32.- Merson, M. H.; Yolken, R. H.; Sack, R. B.; Froehlich, J. L.; Grunberg, H. B.; Huq, I.; and Black, R. W.; Detection of Escherichia coli Enterotoxins in Stools. Infect. Immun. 1980. 29(1):108-113.

33.- Merson, M. R.; Orskov, F.; Orskov, D.; Sack, R. B.; Huq, I.; Hoster, F. T.: Relationship Between Enterotoxin Production and Serotype in Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 1979. 23(2):325-329.

34.- Mocu, H.; and cols.: Escherichia coli Diarrhoea. World Health Organization. 1979. p.p. 1-18.

35.- Mundell, D. H.; Anselmo, C. R.; and Weshnow, R. M.: Factors Influencing Heat-Labile Escherichia coli Enterotoxin Activity. Infect. Immun. 1976. 14(2):383-388.

36.- Myrvik, Q. N.; Pearsall, N. N.; Weiser, R. S.: Bacteriología y Micología Médicas. 1a. Edición. Ed. Interamericana. 1977. p.p. 228-239.

37.- Nester, W. E.; Roberts, C. E.; Mc. Carthy, B. J.; Pearsall, N. N.: Microbial Genetics Alimentary Tract Infection and Food, Poisoning Microbiology, Molecules, Microbes and Man. 2a. Edición. Ed. Holt. Hinehart and Winston, Inc., 1973. p.p. 199-203, 469,486.

38.- Nelson, J.D.; and Mc. Crachen, Jr., G.H.: Diarrhea in day care centers and New agents in diarrhea, Pediatric Infectious Disease. 1982. 1(1):1-66.

39.- Olarte, J.: Avances en el Conocimiento de la Etiopatogenia de las Diarreas en: Analectas de Medicina Mexicana II. 1a. Edición. Academia Nacional de Medicina México, 1981. p.p. 7-34.

40.- Olsson, E.; and col.: Comparison of Different Assays for Definition of Heat-Stable Enterotoxigenicity of Escherichia coli Porcine Strains. J. Clin. Microbiol. 1980. 11:7-15.

41.- Old, D. C.; Crichton, P.B.; Maunder, A. J.; and Wilson, M. I.: Discrimination of Urinary Strains of Escherichia coli by five Typing Methods. J. Med. Microbiol. 1980. 13:437-444.

- 42.- Pai, C. H.; and Mors, V.: Production of Enterotoxin by Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 1978. 19(3):908-911.
- 43.- Perez, P. G. I.: Toxina Termolábil (TL) de Escherichia coli. Infectología, Organo de la Asociación Mexicana de Infectología, A. C. 1983. No. 5:223-232.
- 44.- Rao, M. C.; and cols.: Comparison of the Biological Actions of Three Purified Heat-Stable Enterotoxins: Effects on Ion Transport and Guanylate Cyclase Activity in Rabbit Ileum In Vitro. Infect. Immun. 1981. 33(1):165-170.
- 45.- Richards, K. L.; and Douglas, S. D.: Pathophysiological Effects of Vibrio cholerae and Enterotoxigenic Escherichia coli and Their Exotoxins on Eucaryotic Cells. Microbiol Rev. 1978. 42(3):592-613.
- 46.- Ryder, R. W.; and cols.: Infantile Diarrhea Produced by Heat-Stable Enterotoxigenic Escherichia coli. The New England Journal of Medicine. 1976. 295(16):849-853.
- 47.- Romero, L.A.: Guía para manejar adecuadamente los animales de laboratorio. Facultad de Química. Bioterio. 1980. p.p. 6-7, 16.

- 48.- Rudoy, R. C.; Nelson, J. D.: Enteroinvasive and Enterotoxigenic Escherichia coli. Am. J. Dis. Child. 1975. 129:668-672.
- 49.- Schendein, I.; Green, R. P.; Santos, D. S.; and Maas, W. D.: Partial Purification and Characterization of a Heat-Labile Enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 1976. 13(6):1710-1720.
- 50.- Smith, H. R.; Cravioto, A.; Willshaw, G. A.; McConnell, M. M.; Scotland, S. M.; Gross, R. J.; and Bove, B.: A plasmid Coding for the Production of Colonization Factor Antigen I and Heat-Stable Enterotoxin in Strains of Escherichia coli of sero-group O78. FEMS Microbiology Letters 6. 1979. p.p. 255-260.
- 51.- Thomas, S. V.; Cravioto, A.; Scotland, S. M.; and Rowe, B.: New Fimbrial Antigenic Type (E 8775) That May Represent a Colonization Factor in Enterotoxigenic Escherichia coli in Humans. Infect. Immun. 1982. 35(3): 1119-1124.