

210  
2es.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL GENETICO DE LA  
PRODUCCION DE ANTIGENO COMUN DE  
ENTEROBACTERIAS EN CEPAS DE Escherichia coli

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

GREGORIA MARIA DEL CARMEN ZARATE AQUINO

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

# I N D I C E

	Página
Resumen	1
Introducción	2
a) Características bioquímicas.	4
b) Características serológicas.	5
c) Características patogénicas.	6
Objetivo.	17
Material y Método	19
I. Procesamiento de las cepas de <u>Escherichia coli</u> .	19
II. Obtención del lipopolisacárido de <u>Salmonella typhimurim</u> .	19
III. Obtención de ECA.	19
IV. Obtención del Título del Suero Anti- <u>E. coli</u> 014.	20
V. Titulación del contenido de ECA por inhibición de la hemaglutinación.	21
VI. Conjugación entre cepas de <u>E. coli</u> .	21
VII. Obtención de la proteína A de <u>Staphylococcus aureus</u> Cowan I.	22
VIII. Pruebas de Cohemaglutinación.	23
IX. Pruebas de Asas ligadas de intestino de conejo.	23
Resultados	25
Discusión	29
Referencias	33
Cuadros	38

## RESUMEN.

Se realizaron experimentos de conjugación bacteriana entre cepas donadoras con alto contenido y cepas receptoras con bajo contenido de antígeno con el fin de conocer si el control genético de la producción de antígeno común de enterobacterias (ECA) estaba controlado genéticamente por un plásmido transmisible en cepas de Escherichia coli. El análisis de las transconjugantes de estas cruas mostró que no existió aumento en el contenido de ECA después de las conjugaciones; por el contrario en la mayoría de las transconjugantes estudiadas se encontró un descenso en la producción de ECA. Dos transconjugantes derivadas de progenitores incapaces de producir secreción a nivel intestinal fueron capaces de dilatar asas ligadas de intestino de conejo. Estas cepas secretoras tenían un contenido de ECA bajo (< 1:4). Se discute la posible implicación de estos resultados en la producción de diarrea en humanos.

## INTRODUCCION.

Las infecciones enterales y la desnutrición continúan - siendo los enemigos públicos número uno en cuanto a mortalidad en - niños menores de 5 años de condición socioeconómica baja (1).

Desde fines del Siglo pasado se sabe que la diarrea infecciosa puede asociarse con el aislamiento de diferentes bacterias, virus y parásitos. A partir de la década de los 50 se comenzó a - conocer cómo estos microorganismos eran capaces de asociarse con - células del epitelio intestinal para causar secreción de agua y - electrolitos. La enfermedad, cuando es de causa infecciosa, generalmente se autolimita en un período de 3 a 5 días, encontrándose sólo en raras ocasiones el patógeno causante.

Existen varios estudios sobre etiología de diarrea tanto en medio urbano como en medio rural de países en desarrollo (2, 3, 4). Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que - la diarrea prevalece donde el saneamiento ambiental e higiene personal son deficientes (2, 3, 4). La enfermedad afecta fundamentalmente a lactantes y a niños, lo que indica un cierto grado de inmunidad que se adquiere con la edad. A nivel de comunidad, la epidemiología es similar a la de otras enfermedades infecciosas. Todo esto lleva a la conclusión de que si la higiene personal y del medio - ambiente mejoraran, la diarrea infecciosa tendería a hacerse esporádica.

En estudios realizados en Guatemala y Bangladesh (1) se demuestra que la alta incidencia de diarrea está asociada a variables socioeconómicas como son poca educación, mala higiene personal y ambiental y bajo poder adquisitivo.

La alta mortalidad asociada con diarrea podría reducirse drásticamente si todo paciente afectado recibiera tratamiento adecuado y oportuno, ya que el proceso letal se debe a la deshidratación y al desequilibrio electrolítico causado por el exceso de secreción y la falta de absorción a nivel intestinal. Recientemente la Organización Panamericana de la Salud (OPS) abrió un Centro de Estudios Ecológicos para la América Latina donde una de sus funciones será la de organizar programas multidisciplinarios para la prevención y control de enfermedades enterales.

Uno de los campos importantes a estudiarse a fin de poder controlar estas infecciones es la habilidad patógena de los microorganismos asociados como posible causa del proceso infeccioso. El desarrollo de vacunas hechas a partir de proteínas bacterianas o virales es una opción a corto plazo en la prevención de estas enfermedades.

Dentro de los microorganismos asociados comúnmente a procesos diarreicos se encuentra Escherichia coli (E. coli), la cual será parte del objeto del presente trabajo.

A mediados de los años 40 algunos investigadores comenzaron a asociar el aislamiento de cierto tipo de cepas de E. coli con la presencia de gastroenteritis severas en lactantes. Los resultados de estas investigaciones iniciales fueron inconclusas porque únicamente se utilizaron métodos bioquímicos para diferenciar las cepas aisladas de lactantes con diarrea, comparándolas con las encontradas en cultivos de individuos sanos.

Bray y Beaven (5) entre 1945 y 1948 en la Gran Bretaña fueron los primeros en reportar una asociación entre el aislamiento de ciertos tipos de E. coli con brotes de diarrea infantil.

Estudiando casos de "diarrea del Verano" estos autores aislaron cepas de E. coli que posteriormente fueron catalogadas como pertenecientes al serotipo 0111:B4 del esquema de Kauffmann (6). Al mismo tiempo, y en forma independiente, Varela, Aguirre y Carrillo (7) en la Ciudad de México aislaron una cepa de E. coli, a la cual llamaron Escherichia coli-gomez de un niño muerto por diarrea. Este mismo tipo de bacteria se aisló posteriormente de otros pacientes. - Varela y colaboradores (7) comprobaron que los antígenos somáticos de la E. coli-gomez cruzaba antigénicamente con los de Salmonella - adelaide (antígeno 035). Esta E. coli fue posteriormente tipificada también como 0111:B4 con el esquema de Kauffmann (6).

El segundo serotipo de E. coli que tuvo importancia por asociarse con epidemias de diarrea fue descrito por Giles y colaboradores (8). Kauffmann y Dupont (9) lo tipificaron como perteneciente al grupo E. coli 055 conteniendo un nuevo antígeno capsular B5. Estos antígenos "capsulares" denominados B, cayeron en desuso posteriormente, aceptándose en la actualidad que los antígenos somáticos 55 y 111 están asociados con antígenos flagelares de tipo 2.

Desde 1945, se han aislado cepas de E. coli - - 055:H2 y 0111:H2 de epidemias y casos esporádicos de diarrea infantil en casi todas las partes del mundo.

a) Características bioquímicas.

La E. coli debido a su pequeñez y facilidad de cultivo bajo condiciones de laboratorio es el organismo más estudiado en la actualidad. La célula promedio tiene forma cilíndrica, - mide 2  $\mu$  de longitud y 1  $\mu$  de diámetro; su peso es de  $2 \times 10^{-12}$  g.

(10). Se trata de un cocobacilo gram-negativo aerobio o anaerobio facultativo, esporógeno, que crece a temperaturas entre 20 y 40°C - (10). La mayor parte de estas bacterias son móviles aunque las hay no móviles; las formas móviles tienen flagelos (10). Algunas poseen también cápsula y por lo tanto tienen antígeno K. Desde el punto de vista de identificación bioquímica las cepas son catalasa positiva, oxidasa negativa; la mayoría son capaces de fermentar glucosa y lactosa con o sin producción de gas; la reacción de rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y no hay producción de ácido sulfhídrico (10). No utilizan urea, fenilalanina, malonato ni citrato de sodio. Usualmente fermentan la lactosa rápidamente, aunque algunas cepas la utilizan lentamente. Las bacterias descarboxilan lisina, arginina y ornitina (10).

b) Características serológicas.

Como se mencionó anteriormente Kauffmann y colaboradores (6) establecieron un método para tipificar cepas de E. coli a través del esquema que utiliza los antígenos que poseen estos microorganismos en su superficie. El interés en los miembros de este género aumentó al encontrarse una asociación entre el aislamiento del germen, los procesos diarreicos, las infecciones adquiridas en centros hospitalarios y las enfermedades en animales. Como resultado de este interés, el cuadro antigénico de E. coli actualmente se compone de 170 antígenos somáticos, 102 antígenos capsulares y 56 - antígenos flagelares (11).

El antígeno somático "O", compuesto de complejos fosfolípidos, polisacáridos y hexosaminas, es resistente a inactivación por temperaturas entre 100 y 121°C. Estos antígenos son resistentes también al alcohol y al ácido diluido (11).



El antígeno capsular "K", que enmascara la aglutinación del antígeno "O", es de origen polisacárido y por lo tanto puede ser inactivado a temperaturas de 100°C. El antígeno flagelar "H", de origen proteico se inactiva rápidamente a temperaturas de -100°C. La tipificación de un serotipo de E. coli no conocido depende de la determinación de sus antígenos O, K y H (11).

c) Características patogénicas.

De acuerdo con la revisión sobre el tema hecha por Rowe en 1979 (11) la identificación inicial de E. coli se hizo a partir de heces de niños con diarrea en 1885, posteriormente se demostró que se podían aislar organismos similares de niños y adultos sanos. El descubrimiento progresivo de características patogénicas diferentes en algunos tipos de E. coli permitió su clasificación en cuatro grandes grupos en la actualidad.

Posterior a los estudios ya mencionados en los años 40 y 50, en 1961 Taylor reportó 17 grupos somáticos de E. coli relacionados con epidemias de enteritis infantil. A estos serogrupos se les denominó enteropatógenos. Anterior a conocerse la etiología de estos cuadros se pudo comprobar que las epidemias de diarrea en cuneros podían controlarse mediante el uso de medidas higiénicas estrictas del personal y de los alimentos que ingerían los niños. Los estudios con voluntarios humanos demostraron que las cepas denominadas enteropatógenas (EPEC) eran capaces de producir diarrea en individuos de diferentes edades (11). Sin embargo el mecanismo por el cual producen secreción a nivel intestinal permanece aún sin esclarecerse en su totalidad.

Las cepas EPEC tienen gran habilidad para colonizar la mucosa del intestino delgado provocando inflamación y acumulación de líquido en asas ligadas de intestino de conejo (11). Recientemente se ha visto que algunas EPEC producen una citotoxina de carácter proteico con capacidad para destruir células de cultivo en el laboratorio muy semejante a la que produce Shigella dysenteriae 1 (11). La relación entre la presencia de diarrea y la producción de esta citotoxina se encuentra en estudio en la actualidad.

De acuerdo con Rowe (11) en 1953 De y Chatterjee en la India demostraron que algunas cepas de E. coli aisladas de pacientes con diarrea tipo cólera eran capaces de producir exotoxinas similares a las producidas por Vibrio cholerae 01. Estudios posteriores confirmaron que existía un grupo nuevo de E. coli al cual se le denominó enterotoxigénico (ETEC). Este descubrimiento causó gran controversia al demostrarse que cepas EPEC eran incapaces de producir este tipo de enterotoxinas poniéndose en duda la capacidad patógena de este último tipo de microorganismos. La controversia fue resuelta en 1978 cuando Levine y colaboradores, demostraron nuevamente que cepas EPEC aisladas varios años antes en epidemias de cuneros en la Gran Bretaña eran capaces de producir diarrea en adultos sanos inoculados oralmente con estas bacterias.

A partir de su descubrimiento se confirmó que las cepas ETEC constituyen la causa más frecuente de diarrea en niños pequeños y en turistas que viajan de países desarrollados a países con deficiente higiene ambiental (11). Estudios recientes en varios países en desarrollo han mostrado la alta incidencia de aislamiento de cepas ETEC en niños con diarrea de diferentes edades (11).

Las cepas ETEC son capaces de producir dos tipos de enterotoxinas: una lábil al calentamiento (LT), que es una proteína de alto peso molecular ( $\approx 86,000$ ) compuesta por dos subunidades, una A y una B (12). La subunidad A, con un peso molecular de alrededor de 25,000 es la fracción activa de la proteína. La subunidad B compuesta por cinco monómeros, cada uno con peso molecular aproximado de 11,500; es la fracción que permite a la toxina adherirse al gangliósido GM<sub>1</sub> (12), que es su receptor específico en la célula epitelial. La detección de LT puede hacerse por diferentes pruebas de laboratorio, las más usadas son de dos tipos: las que utilizan líneas celulares de cultivo de tejidos y las que se realizan por ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA) (12).

La otra enterotoxina, que es estable al calentamiento (ST), es una proteína de bajo peso molecular ( $\approx 1,800$ ), resistente al calentamiento a 60°C por 15 minutos (12). Existe más de un tipo de ST: una a que es soluble en metanol y activa en el intestino de ratones lactantes, una b insoluble en metanol, inactiva en el intestino de ratones lactantes pero con actividad en asas ligadas de intestino de lechones (12). El único método accesible para investigar la presencia de ST es la inyección intragástrica de cultivos filtrados de cepas de E. coli a ratones de tres días de edad (13).

La producción de enterotoxinas no es suficiente para que una cepa ETEC produzca diarrea en animales experimentales; el microorganismo debe ser capaz de adherirse y colonizar áreas de flujo rápido en el intestino y competir con gran cantidad de gérmenes de la microbiota local. Para colonizar estas áreas del intestino las cepas ETEC han desarrollado apéndices proteicos de tipo fimbriado que les permite adherirse a receptores específicos en la - -

célula intestinal (14). A estos fimbriae se les ha denominado factores de colonización (14).

En 1947 se describieron por primera vez cuadros de diarrea asociados con el aislamiento de cepas de E. coli con capacidad para invadir el epitelio intestinal en soldados de los Estados Unidos en servicio en la zona del Mediterráneo (11). Estas cepas tenían habilidad para causar diarrea de tipo disentérico con características bioquímicas y serológicas similares a cepas de Shigella. En estudios posteriores se ha demostrado la habilidad invasora de estas bacterias a células epiteliales y su multiplicación intracelular a lo largo del intestino de conejos y cuyos, produciendo inflamación y ulceración hemorrágica en el colon (11). Estudios genéticos han demostrado que la penetración de Shigella y de cepas enteroinvasoras de E. coli (EIEC) a células epiteliales depende de genes cromosómicos y plasmídicos (15). La interacción entre el microorganismo y receptores específicos en la célula epitelial del intestino grueso es un proceso complicado, cuyo mecanismo está en estudio en la actualidad.

Las pruebas de laboratorio para detectar cepas EIEC son muy caras, la más empleada consiste en inocular el ojo de un cuyo con un cultivo bacteriano y observar durante 72 horas si el animal desarrolla una keratoconjuntivitis ulcerativa (11). Otras pruebas utilizadas son sondas moleculares y pruebas de invasividad que utilizan células de cultivo de tejido (11).

En 1983 se publicó el estudio de una epidemia de colitis hemorrágica en humanos causada por la ingestión de carne de hamburguesa contaminada con cepas de E. coli no toxigénicas o invasoras pertenecientes al serotipo 0157:H7 (16).

Estas cepas de E. coli y otras del serotipo - - 0145:H eran capaces de producir una citotoxina VT que destrufa células de cultivo Vero y HeLa, idéntica a la producida por Shigella dysenteriae 1 (17). Cepas 0145 y 0157 productoras de VT se han aislado posteriormente de algunos niños con síndrome urémico-hemolítico (18).

El método más directo de detectar si una cepa es capaz de causar colitis hemorrágica es investigando si produce VT - por medio de su acción citotóxica sobre células de cultivo de tejido Vero o HeLa. En ambos casos la presencia de la citotoxina debe confirmarse mediante neutralización de este efecto con una antitoxina específica (17).

Además de los antígenos antes mencionados, todas las cepas de E. coli producen un antígeno común a la familia Enterobacteriaceae. Este antígeno común (ECA) fue descubierto en 1962 - por Kunin (19). Todas las especies de enterobacterias producen ECA además de su antígeno somático correspondiente.

Kunin definió al ECA (19), como un antígeno presente en diversas especies de bacterias entéricas con reacción cruzada detectable por hemaglutinación indirecta usando suero anti E. coli 014.

La prueba de hemaglutinación utiliza como suero - el producido en conejos con E. coli 014. Kunin (19) encontró además, que sólo algunos serogrupos de E. coli tales como 14, 56, 124, 144 eran capaces de producir una respuesta inmune contra ECA al ser utilizados como vacunas en conejos.

El ECA está presente en forma de hapteno (sustancias pequeñas, químicamente definidas que puede reaccionar con anticuerpos de especificidad apropiada). La forma hapténica del ECA - está probablemente en todas las bacterias con ECA positivo.

El ECA se puede separar parcialmente del antígeno somático por extracción con alcohol etílico al 85% (19). El ECA - soluble en alcohol tiene una alta inmunogenicidad cuando se inyecta a conejos por vía endovenosa (19). La fracción soluble en alcohol contiene relativamente gran cantidad de antígeno común y pequeña - proporción de antígeno somático (19).

Aunque el antígeno común está presente en todas - las enterobacterias, sólo E. coli 014 y algunos otros serogrupos - son inmunogénicos en conejos inyectados intravenosamente.

El ECA se localiza en la superficie de la célula bacteriana, específicamente en la membrana externa. Männel y Mayer (20) han descrito que el ECA es un heteropolímero compuesto predominantemente por lípidos y aminoazúcares N-acetilados. Los análisis químicos han mostrado que los aminoazúcares y ácidos grasos representan alrededor del 65-70% de los compuestos del ECA, el 30% faltante son componentes lípidos no bien identificados. El peso molecular de la parte soluble del ECA determinado por estudios de sedimentación, usando metanol como solvente, es de aproximadamente - - 2700 (20).

El determinante inmunogénico del ECA está ligado por unión covalente al lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana (21). En cepas no inmunogénicas la porción terminal del LPS es una acetilglucosamina, en tanto que en cepas capaces de producir -

una respuesta inmune, el LPS terminal es una molécula de glucosa - (21). Männel y Mayer (20) han encontrado que en cepas de Salmonella el ácido manosaminurónico y la glucosamina se encuentran en todas - las cepas de ECA<sup>+</sup> y están ausentes en las cepas ECA<sup>-</sup>.

Las investigaciones sobre ECA se han llevado a - cabo en mutantes de Salmonella ECA<sup>-</sup> (21). Gracias a estos estudios ha sido posible deducir parcialmente la composición y síntesis de - ECA (21).

Las diferencias en el contenido de antígeno común no sólo se refiere a su toxicidad y a la reacción inflamatoria que produce tanto en humanos como en animales de experimentación, sino también a su relación con diarrea.

En un estudio efectuado por Carrillo y col. (22) con cepas de E. coli aisladas de recién nacidos con diarrea se pudo observar que durante el período agudo los títulos obtenidos de cepas de E. coli eran más bajos comparados con los de cepas de E. coli aisladas de recién nacidos sanos, utilizados simultáneamente como - controles.

En 1969 Hojyo y col. (23) analizaron los resultados obtenidos en asas ileales de conejo inoculadas con un par de - colibacilos del mismo serogrupo que presentaban diferencias en su - contenido de ECA. Los resultados encontrados señalaron que el mismo serotipo de E. coli exhibía diferente enteropatogenicidad, según el contenido de ECA. El contenido bajo de antígeno estaba asociado con una mayor patogenicidad, observándose una reacción inflamatoria más severa comparativamente con el segmento intestinal en donde se había inoculado el mismo colibacilo con mayor cantidad del antígeno. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los encontrados en - -

estudios de letalidad en embriones de pollo, en donde la dosis letal 50 de cepas con bajo contenido de ECA fueron menores (mayor virulencia) que las encontradas para los mismos serogrupos con títulos más elevados del mismo antígeno (23).

Otro estudio que confirmó los resultados anteriores fue el efectuado en 1971 por Kumate y col. (24) en un área rural del Estado de Morelos. En 34 niños recién nacidos estudiados - hasta la edad de 10 meses, se detectó que el contenido de ECA en cepas de E. coli aisladas de individuos menores de 6 meses con diarrea eran más bajos que el contenido de ECA en cepas de E. coli del mismo serotipo aisladas del mismo niño cuando éste ya no estaba enfermo.

Vázquez y col. (25) en 1970 trataron de explicar estos cambios en contenido de ECA como un fenómeno genético de conjugación bacteriana. Esto es, que la síntesis de mayor cantidad de ECA estuviera controlada genéticamente por un plásmido en una bacteria donadora que pudiera ser transmitida a otra receptora. En su trabajo estos autores lograron demostrar los efectos de una transmisión de información genética de una bacteria donadora a otra receptora.

El progreso experimental en el campo de la genética ha permitido la selección de mutantes y recombinantes genéticas a partir de enormes poblaciones de bacterias "silvestres" con la confección de mapas genéticos de gran resolución (26). Estos mapas han revelado secuencias de genes en los cromosomas y han mostrado el gran número de loci en los cuales se puede experimentar mutación en un microorganismo (26).



La confección del mapa cromosómico de las posiciones relativas de distintos genes bacterianos ha sido factible por el hecho de que en circunstancias especiales un segmento del cromosoma de una célula puede separarse, transferirse e incorporarse por unión covalente al cromosoma de un segundo tipo de célula. Utilizando condiciones experimentales que favorecen tales recombinaciones en bacterias, se han desarrollado métodos adecuados para trazar mapas de las posiciones relativas de los genes en la estructura cromosómica. Para obtener el mapa genético de cromosomas bacterianos y virales se han empleado tres tipos de procesos de recombinación: a) conjugación sexual, b) transformación y c) transducción viral.

El primer proceso, la conjugación sexual, consiste en la transferencia de parte o todo el cromosoma de una célula donadora (+) a una célula receptora (-). La diferencia de sexo entre células está determinado por la presencia de un factor genético específico llamado F (fertilidad) que codifica la formación de un fimbriae que sirve como tubo hueco que conecta ambas células a través del cual se transfiere el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano de un microorganismo a otro (26).

En E. coli el acto de conjugación es relativamente lento, pues requiere aproximadamente 90 minutos para que el cromosoma pueda transferirse por completo. Este proceso puede interrumpirse en cualquier momento simplemente con agitar la suspensión celular o con un desintegrador. Este proceso rompe la unión entre las células, siendo posible recuperar células (-) portadoras de cantidades variables de material cromosómico del donador macho. Esta cantidad de ADN dependerá del momento de interrupción (26).

Observando el tipo y número de caracteres fenotípicos especificados por los segmentos incorporados del cromosoma - donado en la descendencia de células receptoras (-), en función del tiempo de penetración, se puede deducir la posición relativa de genes relacionados con dichos caracteres en el cromosoma insertado. - Estos métodos directos de trazado de mapas han confirmado las secuencias entre genes (26).

Una de las conclusiones más significativas a la - que se ha llegado como consecuencia de experimentos de conjugación sexual es que el cromosoma de E. coli consiste en un anillo cerrado sin fin (26). Por tal motivo, el mapa genético de los cromosomas - bacterianos se representa generalmente en forma circular.

Es importante mencionar que sólo bacterias que - poseen plásmidos (moléculas de ADN bicatenario capaces de multiplicarse independientemente en las células que los alojan y de ser heredados con regularidad al dividirse éstas) poseen información para la conjugación entre bacterias en la forma del factor F de fertilidad que codifica para la producción del puente que forma la bacteria donadora al unirse con la receptora (26).

Los plásmidos son responsables de una sorprendente riqueza de actividades biológicas en las bacterias. Es importante mencionar entre ellas a los factores llamados de resistencia (R). Estos plásmidos tienen en ocasiones la capacidad de promover su - - transferencia intercelular por conjugación y codificar la producción de proteínas que destruyen antimicrobianos (26).

Otro camino para el trazado de un mapa genético - es a través del fenómeno de transformación bacteriana (26). Una - célula bacteriana receptora puede ser genéticamente transformada - por adición de ADN exógeno procedente de otra estirpe bacteriana. - Este efecto se debe a la incorporación de uno o más genes del ADN - donador al cromosoma de la célula receptora. Determinando la fre- cuencia con que dos o más fenotipos de células donadoras aparecen - juntos en la prole de las células receptoras es posible deducir la posición relativa de los dos genes correspondientes en el cromosoma donador.

Los pares de genes incorporados a células recepto- ras con gran frecuencia se encuentran más cercanos en el mapa gené- tico que aquellos pares que penetran con menor frecuencia. La trans- formación de la mayoría de los tipos bacterianos es poco eficiente y su aplicabilidad se ha restringido por este motivo.

La forma más útil para el trazado de mapas genéti- cos es la transducción (27). En este caso un virus que infecta bac- terias participa en la transferencia de material genético de una - bacteria donadora hacia otra receptora. A medida que se duplica - dentro del huésped permite en ocasiones la adquisición de un peque- ño segmento del cromosoma bacteriano. Cuando este bacteriófago se libera y se fija a una nueva bacteria transfiere el segmento de cro- mosoma bacteriano procedente del primer huésped. Este segmento pue- de experimentar entrecruzamiento homólogo con el cromosoma del nuevo huésped e incorporar genes del huésped previo.

La transducción es de gran importancia para el - trazado de la estructura fina de mapas genéticos, sin embargo las - relaciones genéticas observadas sólo sirven para construir mapas -

cromosómicos pequeños (27).

#### OBJETIVO.

Como se mencionó anteriormente la mayor parte de los estudios sobre control genético de la producción de ECA se han realizado con mutantes de cepas de Salmonella. Estos estudios demuestran que los genes que controlan la producción de ECA se encuentran en el cromosoma bacteriano unidos a los que controlan la producción de lipopolisacárido de la pared celular (21). Vázquez y col. (25) utilizando cepas de E. coli con alto y bajo contenido de ECA lograron elevar el contenido de ECA en cepas con bajo nivel aparentemente por un proceso de conjugación bacteriana. Estos autores concluyeron que el control de la producción de ECA era plasmídico posterior a experimentos de "curación" con naranja de acridina, al conseguir que cepas que habían elevado su contenido de ECA regresaran a los niveles previos a la conjugación después del tratamiento. Con estos experimentos Vázquez y col. (25) concluyeron que en E. coli el ECA puede estar determinado por un plásmido transmisible.

En este estudio sin embargo, no se tomó en cuenta que la cepa donadora pudiera haber tenido algún vehículo (fago o plásmido) que habiéndose integrado al cromosoma bacteriano en la región que codifica para el ECA, pudiera transmitir por conjugación parte del cromosoma. Esto sería comprobable con la creación de cepas donadoras Hfr (con transmisión de alta frecuencia) que transmitiera el incremento en la producción de ECA con mayor frecuencia a cepas receptoras (26).

Dada la importancia epidemiológica que tienen los niveles de ECA en procesos diarreicos producidos por cepas de E. coli en niños prematuros y menores de seis meses (22, 23, 24) se ha considerado que sería de gran utilidad conocer si en cepas de E. coli el control genético de la producción de ECA está controlado por el cromosoma bacteriano, por un plásmido o por ambos.

El objetivo de estos experimentos era ver si el control de la producción de ECA era plasmídico y podía transmitirse por conjugación bacteriana de una bacteria receptora a otra donadora. Con el fin de esclarecer lo anterior se llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar el sitio del control genético de la producción de ECA. A diferencia de Vázquez y col. (25) en estos experimentos se utilizaron cepas donadoras y receptoras de E. coli ampliamente caracterizadas para los estudios de conjugación bacteriana, como se detallan en la siguiente sección sobre material y métodos.

Las cepas resultantes fueron inoculadas en asas de conejos para ver el grado de patogenicidad obtenido al cambiarse el contenido de ECA.

La posibilidad de que exista transmisión genética por conjugación de genes que controlan la producción de ECA podría explicar cómo cepas comensales de E. coli presentes en el intestino de recién nacidos e infantes menores de seis meses puedan convertirse en patógenas independientemente del arreglo de sus cadenas de lipopolisacáridos que determinan sus antígenos somáticos y que, hasta la fecha, se utilizan como marcadores de patogenicidad.

## MATERIAL Y METODO.

### I. Procesamiento de las cepas de Escherichia coli.

La pureza de las cepas de E. coli utilizadas se probó sembrándolas en medio de MacConkey. De ser único el crecimiento se tomó una colonia y se corroboró que fuera E. coli por pruebas bioquímicas (28). Las cepas purificadas se guardaron a temperatura ambiente en medio de huevo de Dorset (28).

### II. Obtención del lipopolisacárido de Salmonella typhimurium.

La cepa de Salmonella typhimurium utilizada se sembró en medio Gelosa-sangre y Shigella-Salmonella. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C; para corroborar el serotipo se efectuaron pruebas bioquímicas y de aglutinación con suero Anti 0, 4, 5, de Salmonella. De la caja de Gelosa-sangre se sembraron 5 cajas de medio de Agar-soya-tripticasina (TSA) y se incubaron 18 horas a 37°C. El crecimiento se cosechó con 10ml de solución salina (cloruro de sodio al 0.9%) y se hirvió con reflujo en baño de sal a 100°C durante 90 minutos; finalmente se centrifugó y guardó la suspensión a -20°C hasta su uso.

### III. Obtención de ECA.

Cada cepa a estudiar se sembró en 2 cajas de medio de TSA. Las cajas se incubaron durante 18 horas a 37°C. El - -

crecimiento se cosechó con solución salina y se ajustó a 125 Unidades Klett (UK), que corresponde aproximadamente a una concentración de  $11 \times 10^8$  bacterias/ml. La suspensión bacteriana se hirvió durante 90 minutos a  $100^\circ\text{C}$  con reflujo en baño de sal. Posteriormente se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos y se guardó el sobrenadante diluido 1:10 en alcohol absoluto a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### IV. Obtención del Título del Suero Anti-E. coli 014.

Se lavaron glóbulos rojos de carnero 4 veces con solución salina. Se tomaron 0.5ml de glóbulos rojos más 0.5ml de extracto de lipopolisacárido de Salmonella typhimurium y se incubaron durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavaron los glóbulos rojos forrados 3 veces con solución salina durante 5 minutos y se guardó la suspensión diluida al 1%. Se colocaron series de tubos, a los cuales se les agregó 0.5ml de solución salina, excepto al primero al que se agregó 0.5ml de antisuero contra E. coli 014 diluido 1:10. A partir del segundo tubo se efectuaron diluciones dobles seriadas del antisuero, agregándose finalmente 0.1ml de una suspensión al 1% de glóbulos rojos sensibilizados; los tubos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se tomó como título del antisuero el recíproco del último tubo que presentara aglutinación de los glóbulos rojos.

V. Titulación del contenido de ECA por inhibición de la hemaglutinación.

Se lavaron glóbulos rojos de carnero 4 veces - - durante 5 minutos con solución salina; se sensibilizaron (v/v) con extracto de Salmonella typhimurium incubándose durante 30 minutos a 37°C; se lavaron 3 veces con solución salina a 1,500 rpm durante 5 minutos y se diluyeron al 1% con solución salina.

Se colocaron series de 10 tubos, al tubo número 1 se le agregaron 0.5ml de solución salina más 0.5ml del extracto de E. coli (ver inciso III) efectuándose diluciones dobles seriadas; a cada tubo se le agregaron posteriormente 0.5ml del suero Anti- - E. coli 014.

La dilución del antisuero utilizada dependió del título obtenido previamente (ver inciso IV). Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C; se les agregó 0.1ml de la dilución al 1% de glóbulos rojos sensibilizados, se incubaron durante 30 minutos a 37°C; se centrifugaron a 1,500 rpm durante 3 minutos y se tomó como título de hemaglutinación el recíproco del último tubo que presenta ra esta reacción.

VI. Conjugación entre cepas de E. coli.

Para este estudio se utilizaron cepas de E. coli donadoras y receptoras. Cada cepa se sembró por separado en 3ml de caldo nutritivo, incubándose durante 18 horas a 37°C. Posteriormente se mezclaron 0.1ml de la cepa donadora con 0.1ml de la cepa - -



receptora. Se incubó esta mezcla a 37°C durante 18 horas para que se efectuaran las cruces. La mezcla se lavó 2 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.0, a 3,000 rpm durante 10 minutos. Se efectuaron diluciones seriadas y se sembró cada una en medio de MacConkey conteniendo antibióticos apropiados como medio de selección. Se contaron las colonias que hubieran crecido después de Incubar 18 horas a 37°C, se purificaron por resiembra, se comprobó que la cepa fuera la receptora por pruebas bioquímicas y se hizo titulación de ECA.

Se utilizaron en algunos casos cruces tripartitas usando inicialmente una mezcla entre la cepa donadora y una cepa con factor de transferencia para tratar de movilizar plásmidos de la cepa donadora original. Esta mezcla se cruzó posteriormente sin seleccionar, con una cepa receptora. La mezcla se incubó 18 horas a 37°C y se sembró en agar MacConkey con diferentes antibióticos como medio de selección.

#### VII. Obtención de la proteína A de Staphylococcus aureus Cowan I (29).

Se sembraron 10 cajas petri de 10 X 100cm con TSA con Staphylococcus aureus NCTC 8530. Se incubaron durante 18 horas a 37°C. El crecimiento en cada caja se cosechó con 10ml de solución salina y la suspensión obtenida se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 minutos. Se lavó 3 veces con la misma solución. Del paquete obtenido se tomaron 36.5ml y se le agregaron 0.5ml de formaldehído, dejándose reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 minutos, se lavó 3 veces con solución salina. Se calentó la suspensión durante 30 -

minutos a 80°C, se lavó 3 veces con solución salina y el sobrenadante se reconstituyó al 10% con solución salina. Se calentó la suspensión durante 30 minutos a 80°C, se lavó 3 veces con solución salina y se suspendió el paquete ajustándose a 1000 UK. Esta suspensión se guardó a -20°C hasta su uso.

#### VIII. Pruebas de Cohemaglutinación.

Se lavaron glóbulos rojos de carnero 4 veces a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 0.5ml de glóbulos rojos lavados más 0.5ml de lipopolisacárido de Salmonella typhimurium y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con solución salina durante 5 minutos a 1,500 rpm y se diluyeron al 1% con solución salina. El extracto de proteína A de S. aureus (ver Sección VII) se diluyó 1:4 y se tomó 1ml para forrarlo con 0.1ml de antisuero contra E. coli 014; se mezclaron en placa 10 microlitros de la dilución de glóbulos rojos sensibilizados más 10 microlitros del extracto y se observó si existía hemaglutinación.

#### IX. Pruebas de Asas ligadas de intestino de conejo.

Se utilizaron conejos híbridos adultos de 2.5 a 3 kg. de peso. Se dejaron en ayuno 18 horas antes de la cirugía. Bajo anestesia general se abrió el abdomen y se identificó el duodeno. A 10cm de esta porción se ligaron asas de intestino de 10cm de largo con seda 2-0 con intervalos de 5cm entre cada una. Se inocularon en secuencia determinada previamente por azar con 1ml de una

suspensión de aproximadamente  $10^9$  bacterias/ml en infusión de - - Cerebro-Corazón. Se cerró por planos el abdomen y se dio únicamente agua por vía oral al recuperarse el animal. Se sacrificaron los animales a las 18 horas, obteniéndose el intestino. Se midieron - las asas en extensión y se examinaron para ver la dilatación por - líquido acumulado. El líquido se extrajo con jeringa y se midió el volumen para hacer una relación de ml/cm de intestino. Se obtuvieron secciones de tejidos que se fijaron en formalina al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina para examinarse por microscopía de luz.

## RESULTADOS.

En este estudio se utilizaron 29 cepas de E. coli a las cuales se les efectuó determinación de antígeno común por medio de la técnica de inhibición de hemaglutinación. Los resultados obtenidos se pueden ver en el Cuadro 1. Existieron variaciones en cuanto a la cantidad de antígeno común entre las cepas utilizadas. En algunas el contenido de antígeno común fue alto con respecto a otras cepas, como las E. coli K-12, en las cuales su contenido de antígeno común fue generalmente bajo.

Posteriormente a las mismas 29 cepas de E. coli se les efectuaron pruebas bioquímicas diferenciales para comprobar su especificidad y llegar finalmente a su identificación (Cuadro 2). Todas las cepas utilizadas fueron capaces de fermentar glucosa. La fermentación de lactosa en algunas de ellas fue a las 24 horas; en todas, la reacción de rojo de metilo fue positiva y la prueba de Voges-Proskauer fue negativa, sin que ninguna produjera ácido sulfhídrico. Ninguna utilizó urea, fenilalanina, malonato ni gluconato de potasio. En todas las cepas hubo producción de indol; siendo 22 móviles y 7 no móviles.

El Cuadro 3 muestra los resultados de las conjugaciones bacterianas entre E. coli con alto y bajo contenido de ECA. En la cruz número 1 la cepa donadora fue E. coli 014K7H<sup>-</sup> y la cepa receptora fue E. coli 14R519, el medio selectivo fue MacConkey - adicionado con 10 µg/ml de ácido nalidíxico. Se obtuvieron un gran número de transconjugantes, escogiéndose 9 colonias únicas con diferente morfología para determinación de ECA, encontrándose en todas ellas un título más bajo que el de ambos progenitores.

La segunda cruce se efectuó entre E. coli - - 54R170 y E. coli H19HW, el medio selectivo utilizado fue MacConkey con 10 µg/ml de ácido nalidíxico más 20 µg/ml de streptomina. Se obtuvieron también gran número de transconjugantes escogiéndose 8 - colonias para la determinación de antígeno común, siendo éste más - bajo que el de ambos progenitores.

La tercera cruce se efectuó entre las cepas de - E. coli arriba mencionadas siendo el medio selectivo solamente MacConkey con 10 µg/ml de ácido nalidíxico. El número de transconjugantes obtenidas fue de 12, a las cuales se les determinó antígeno común, los resultados obtenidos fueron bajos con respecto a sus - - progenitoras.

La cuarta cruce se efectuó entre E. coli 014K7H<sup>-</sup> y E. coli 52R527, la primera fue utilizada como donadora y la segunda como receptora. Se utilizó como medio selectivo MacConkey con - 10 µg/ml de ampicilina y 30 µg/ml de colicina. El número de transconjugantes obtenido fue de 7, todas con títulos más bajos de ECA - que el encontrado en los progenitores.

En la quinta cruce se utilizó como cepa donadora E. coli 54R170 y como cepa receptora una E. coli transconjugante de la primera cruce con un antígeno común bajo. El medio selectivo - utilizado fue MacConkey al que se le adicionó 10 µg/ml de ácido - nalidíxico más 20 µg/ml de streptomina. El número de transconjugantes aisladas fue de 15, encontrándose títulos de ECA menores a - los de sus progenitores.

En tres casos se efectuaron cruces tripartitas - utilizando cepas de E. coli K-12 como intermedias para tratar de -

movilizar un plásmido (en caso que lo hubiese) que controlara genéticamente la producción de antígeno común en las cepas donadoras. - En la sexta cruzada la cepa donadora fue E. coli 014K7H<sup>-</sup>, la cepa intermedia fue E. coli 48R192 y la cepa receptora fue E. coli 52R527. El medio selectivo fue MacConkey con 10 µg/ml de ácido nalidíxico - más 20 µg/ml de tetraciclina. En este caso hubo demasiado crecimiento, por lo que se tomaron 18 colonias al azar, encontrándose en todas un contenido de antígeno común más bajo con respecto al de los progenitores (Cuadro 4).

La séptima cruzada se llevó a cabo con E. coli - - 014K7H<sup>-</sup> utilizada como donadora, como cepa intermedia E. coli - - 20R770 y como cepa receptora E. coli 52R527. Se le añadieron al - medio selectivo 10 µg/ml de ácido nalidíxico más 20 µg/ml de - - streptomycin. El número de transconjugantes obtenidas fue considerable, por lo que se tomaron al azar 13 colonias, encontrándose en todas un contenido de antígeno común bajo con respecto al de sus - progenitores.

Por último se efectuó una cruzada entre E. coli - 014K7H<sup>-</sup> como cepa donadora, E. coli K-12 22(1-16) F-like Km<sup>r</sup> como cepa intermedia y E. coli 54R527 como cepa receptora. El crecimiento se sembró en MacConkey adicionado con 10 µg/ml de ácido nalidíxico más 10 µg/ml de kanamicina. El número de transconjugantes obtenidas fue de 178, determinándose ECA en 17 de ellas. Se encontró - nuevamente en todas las transconjugantes un título de ECA menor al de ambos progenitores.

Para comprobar que se trataba de transconjugantes reales y no mutantes de los progenitores, a las cepas obtenidas de las conjugaciones 1, 4, 6, 7 y 8 se les efectuó prueba de - - -

cohemaglutinación, siendo todas negativas; las transconjugantes obtenidas de las conjugaciones 2 y 3 se aglutinaron con antisero Anti-E. coli 026, siendo todas negativas.

De acuerdo con los resultados anteriores, se escogieron cepas que presentaron el ECA más bajo, así como cepas de los progenitores originales, con las cuales se inocularon asas ligadas de intestino de conejos. La inoculación de las asas fue hecha al azar con cepas originales y cepas transconjugantes. De la primera conjugación se obtuvieron dos asas positivas. Ambas mostraron un alto grado de inflamación con secreción sanguinolenta. De las cruces 3 y 6 se obtuvo una cepa que dio un asa positiva respectivamente. En estas asas se observó un alto grado de inflamación con secreción líquida y presencia de pequeños coágulos. Todas las demás asas fueron negativas, como se puede ver en los Cuadros 3 y 4.

De las asas positivas se efectuaron cortes histológicos en los cuales se pudo observar pérdida total del revestimiento epitelial en las vellosidades, congestión total en las zonas de la mucosa, la submucosa, la muscular y en la serosa. En ésta última también se observó gran cantidad de neutrófilos infiltrados en el tejido conectivo, además de hemorragias en la serosa y la muscular. En el asa positiva de la tercera cruz se observó pérdida completa de la organización histológica.

## DISCUSION.

El aislamiento de un germen y su identificación - bioquímica no son suficientes para catalogarlo como patógeno, y menos aún para involucrarlo como agente causal de un padecimiento específico. Para ésto último se requiere que se cumplan los postulados de Koch que, para el caso de humanos sólo es posible completar los mediante estudios con voluntarios. La dificultad para realizar este tipo de estudios ha hecho necesario que se diseñen modelos experimentales, a través de los cuales se pueda confirmar la asociación entre ciertas enfermedades y los agentes que las causan.

En el caso de la diarrea aguda los avances en los últimos 15 años sobre la habilidad patógena que tienen los gérmenes asociados a estos procesos han permitido recientemente el planteamiento de programas de control basados en la elaboración de productos bacterianos específicos a usarse como vacunas.

Existe sin embargo un número grande de bacterias aisladas con frecuencia de pacientes con diarrea que no presentan - características patogénicas a nivel del laboratorio. Por largo - tiempo se pensó que estas cepas no eran en realidad patógenas por - no tenerse una comprobación experimental de su habilidad para producir secreción intestinal. Más recientemente se han utilizado otro tipo de marcadores para catalogar cepas bacterianas como patógenas en base a características determinadas genéticamente por el cromosoma bacteriano, que son más estables que aquellas codificadas por genes plasmídicos.



A raíz del descubrimiento de Kunin (19) de un antígeno común presente en todas las enterobacterias, se ha pensado en la importancia que puede tener esta sustancia para identificar y clasificar cepas patógenas. Por su cercanía física con los lipopolisacáridos que dan el antígeno somático en estas bacterias se pensó inicialmente que este nuevo antígeno común (ECA) pudiera servir como inmunógeno general para evitar colonización e infecciones por bacterias de origen entérico. El ECA, sin embargo, es un antígeno que no da una buena respuesta antigénica y poco a poco fue cayendo en desuso la idea de utilizarlo como vacuna.

Los únicos estudios clínicos realizados con referencia a la asociación de niveles de ECA en enterobacterias, en especial E. coli, y presencia de diarrea en lactantes fueron realizados en los años 60 por varios grupos del Hospital Infantil de México (22-24). Estas investigaciones revelaron que, como paradoja, las cepas de E. coli aisladas de niños con diarrea tenían títulos de ECA más bajos, que las aisladas de niños sin diarrea, o del mismo niño una vez que había cedido el cuadro infeccioso. Estos resultados aparentemente contrarios a los esperados han llevado al planteamiento de hipótesis alternas sobre la presencia de ciertos marcadores de patogenicidad y la fisiopatología del proceso infeccioso.

Resultados recientes en proceso de publicación por el grupo de Cravioto demuestran que la presencia de un ECA bajo en cepas de E. coli aisladas de pacientes con diarrea tienden a presentar con mayor frecuencia estadística adhesividad a células de cultivo de tejidos. Esta adhesividad *in vitro* se ha relacionado con habilidad *in vivo* para acercarse a las células epiteliales del intestino delgado y producción de diarrea en voluntarios humanos (30, 31).

El control genético de la producción de ECA ha sido estudiado fundamentalmente en mutantes de Salmonella (21), demostrándose que los genes que codifican para este antígeno son cromosómicos. En E. coli hasta el trabajo de Vázquez y col. (25) se había reportado también un control genético cromosómico. En la investigación de Vázquez y col. se demostró que se podía incrementar el contenido de ECA a través de modificar genéticamente una cepa de E. coli con bajo contenido de ECA con una de alto contenido por conjugación bacteriana. Los experimentos de "curación" con naranja de acridina mostraron que había existido transferencia de material genético durante la conjugación entre las cepas ya mencionadas, y que este material estaba relacionado con la producción de ECA.

En el presente trabajo, utilizando cepas donadoras y receptoras con características muy definidas que permiten descartar exactamente si las transconjugantes obtenidas de cada cruzas son mutantes de la cepa donadora, no fue posible confirmar los resultados de Vázquez y col. Por el contrario después de cada cruzas las transconjugantes obtenidas tuvieron títulos de ECA inferiores a los de sus progenitores. El hallazgo más interesante fue que dos de estas transconjugantes con títulos bajos se comportaron como patógenas en asas ligadas de intestino de conejo, mientras que ninguno de los progenitores fue capaz de producir un aumento de secreción a nivel intestinal. El paso de material genético en este caso hizo que una cepa de laboratorio sin capacidad patogénica en el modelo utilizado adquiriera habilidad para producir diarrea en diferentes conejos. En estudios posteriores se procederá a caracterizar este material genético transferido y su posible importancia en la producción de diarrea en humanos.

Los resultados demuestran también la posibilidad de que cepas de E. coli no patógenas presentes en la flora normal - de niños pequeños puedan adquirir material genético de otras bacterias, convirtiéndose en gérmenes capaces de producir enfermedad. - La relación entre títulos bajos de ECA en estas cepas y su habilidad patógena se encuentra en estudio en la actualidad.

Todas estas investigaciones permitirán en un futuro cercano el planteamiento de medidas preventivas más específicas que permitan un control de estas enfermedades que afectan grandes - poblaciones de este planeta.

## REFERENCIAS.

1. Puffer RR, Serrano CV: Patterns of mortality in childhood. PAHO Scientific Publications, Washington, D.C., 1973.
2. Cravioto A, Ortega R, Rodríguez P, Reyes RE, López D, Fernández G: Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos.  
1. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el período neonatal. Bol Méd Hosp Inf Mex, 42:287-296, 1985.
3. Pickering LK, Evans DJ, Muñoz O, DuPont ML, Coello-Ramírez P, Conklin RH, Olarte J, Kohl S: Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J Pediatr, 93:383-388, 1978.
4. Black RE, Brown KH, Becker S, Alim ARMA, Huq I: Longitudinal studies of infectious disease and physical growth of children in rural Bangladesh. Am J Epidemiol, 115:315-324, 1982.
5. Bray J, Beaven TED: Slide agglutination of Bacterium coli var. Neapolitanum in Summer diarrhea. J Path Bacteriol, 60:345-401, 1948.
6. Kauffmann F: The serology of the coli group. J Immunol, 57:71-100, 1947.

7. Varela G, Aguirre A, Carrillo J: Escherichia coli-gómez nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Méd Hosp Inf Méx, 3:623-627, 1946.
8. Giles C, Sangster G, Smith J: Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. Arch Dis Childh, 24:45-53, 1949.
9. Kauffmann F, DuPont A: Escherichia coli from infantile gastroenteritis. Acta Pathol Microbiol Scand, 27:552-564, 1950.
10. Lennette EH, Spaulding EH, Truant JP: Manual de Microbiología Clínica. 1a. edición, Salvat, S.A. Barcelona, pp. 192-220, 1981.
11. Rowe B: The role of Escherichia coli in gastroenteritis. Clin Gastroenterol, 8:625-644, 1979.
12. Guerrant RL: Pathophysiology of the enterotoxic and viral diarrheas. En: Chen LC, Scrimshaw NS eds: Diarrheas and malnutrition. New York: Plenum Publishing Corporation, pp. 23-43, 1983.
13. Dean EA, Isaacson RE: In vitro adhesion of pipiated Escherichia coli to small intestinal villous epithelial cells from rabbits and the identification of a soluble 987 P pilus receptor-containing fraction. Infect Immun, 36:1192-1198, 1982.

14. Gaastra W, y de Graaf FK: Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiol Rev*, 46:129-161, 1982.
15. Sansonetti PJ, d'Hauteville H, Formal SB, Toucas M: Plasmid-mediated invasiveness of "Shigella-like" Escherichia coli. *Ann Microbiol (Inst. Pasteur)* 132 A:351-355, 1982.
16. Riley LW, Remis RS, Helgenson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML: Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med*, 308:681-685, 1983.
17. O'Brien AD, Nataro JP: New concepts in the pathogenesis of enteropathogenic Escherichia coli diarrhea. En: Schlessinger D. ed: *Microbiology* 1985. Washington: American Society for Microbiology, pp. 78-82, 1985.
18. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing Escherichia coli. *J Infect Dis*, 151:775-782, 1985.
19. Kunin MC: Separation, characterization and biological significance of common antigen in Enterobacteriaceae. *Exp Biol Med*, 118:565-586, 1977.

20. Männel D, Mayer H: Isolation and chemical characterization of the Enterobacterial common antigen. Eur J Bacteriol, 86:361-370, 1977.
21. Makela HP, Mayer H: Enterobacterial common antigen. Bacteriol Revs, 40:591-632, 1976.
22. Carrillo J, Hashimoto B, Kumate J: Content of heterogenetic antigen in Escherichia coli and relationship to diarrhea in newborn infants. J Infect Dis, 116:285-296, 1968.
23. Hojyo KM, Miranda FI, Kumate J, Carrillo J: Efectos enteropato genéticos de Escherichia coli en asas ileales de conejos y en relación con el contenido en antígeno heterogenético. Bol Méd Hosp Inf Méx, 26:15-22, 1969.
24. Kumate J, Cravioto J, Hashimoto B, Vega L, Carrillo J: Content of common antigen of Escherichia coli and diarrhea of newborns and infants in Mexican preindustrial community. Ann N Y Acad Sci, 176:350-359, 1971.
25. Vázquez V, Ramírez VA, Kumate RJ: Transmisión Genética del Antígeno Común en Escherichia coli. XXXI Reunión Reglamentaria Asociación de Investigación Pediátrica, A.C., 1970. pp. 145-156, 1970.
26. Broda P: Plasmids. W.H. Freeman and Company Oxford and San Francisco United States of America, 1979.

27. Lennox ES: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P<sub>1</sub>. *Virology* 1:190-206, 1955.
28. Cowan ST, and Steel KJ: Manual for identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1965.
29. Kronvall GA: A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to protein A containing staphylococci. *J Med Microbiol*, 6:187-190, 1973.
30. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B: An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol*, 3:95-99, 1979.
31. Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD: The diarrheal response of man to some classical enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesive factor. *J Infect Dis*, 152: 550-559, 1985.



CUADRO 1. Cepas utilizadas y contenido de ECA por inhibición de hemaglutinación.

C E P A	Fuente	Título
21R868 K12 lac <sup>+</sup> Str <sup>R</sup>	1	1:8
54R170 K12 lac <sup>-</sup> Nai <sup>R</sup> F-Tc-Ap-Km	1	1:256
52R527 K12 lac <sup>-</sup> Nai <sup>R</sup> (14R519)	1	1:64
13R141 K12 lac <sup>+</sup> SSu	1	1:128
K12 22(1-16) R1-16 (Km <sup>R</sup> ) TLB <sub>1</sub> (Thres, Ieu, B <sub>1</sub> )	1	1:16
H19 HWS	2	1:32
K12 J5 (144-3) R(144-3) Kn <sup>R</sup> Cd. 1b, met, pro	1	1:256
O18 a CK 77	1	1:256
J53 Suc <sup>+1</sup>	1	1:32
K12 fim <sup>-</sup> lac fla <sup>-</sup>	1	1:64
AB 1157 10R151	3	1:16
54R30	1	1:8
O14	4	1:256
G-167 K12 Col <sup>+</sup> SSu <sup>+</sup>	1	1:128
G-168 K12 Col <sup>+</sup> Vt <sup>+</sup> SSu	1	1:64
14R519	1	1:32
G-176	1	1:32
G-241 Col <sup>-</sup>	1	1:32
G-242 Col <sup>-</sup>	1	1:8
G-243 Col <sup>-</sup>	1	1:16
G-244 Col <sup>-</sup>	1	1:16
G-246 SSu	1	1:128
G-247	1	1:128
H-19 Orig.	2	1:64
E-2348	1	1:8
G-245 (G-243-H19 Col <sup>-</sup> SSu <sup>+</sup> ) Sen by e.b.	1	1:32
O14K7H <sup>-</sup>	4	1:512
K12 Nai <sup>R</sup> fim <sup>-</sup> fla 48R387	2	1:8
20R770 T-A <sup>drh</sup> K12 lac <sup>+</sup> (1-like)	1	1:4

1. Laboratorio Central de Salud Pública, Londres, Inglaterra.
2. Dr. H. William Smith, Haughton Poultry Research Station, Cambridge, Inglaterra.
3. Dr. D.C. Old, Universidad de Dundee, Dundee, Escocia.
4. Colección INCYTAS-DIF.

CUADRO 2. Pruebas bioquímicas diferenciales para comprobar la especificidad de las diferentes E. coli utilizadas en el estudio.

C E P A S	Pruebas Bioquímicas	Glucosa	Lactosa	Rojo de Metilo	Voges-Proskauer	Indol	Acido sulfhídrico	Habilidad	Úrea	Malonato	Fenilalanina	Gluconato
21R868	K12 lac <sup>+</sup> Str <sup>R</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
54R170	K12 lac <sup>-</sup> NaI <sup>R</sup> F-Tc-Ap-km	+	A	+	-	+	-	+	-	-	-	-
52R527	K12 lac NaI <sup>R</sup> (14R519)	+	A	+	-	+	-	+	-	-	-	-
13R141	K12 lac <sup>+</sup> SSu	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
K12 22(1-16)	R1-16 (Km <sup>R</sup> ) TLB <sub>1</sub> (Thres, Ieu, B <sub>1</sub> )	+	A	+	-	+	-	-	-	-	-	-
H19	HWS	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
K12 J5	(144-3) R(144-3) Kn <sup>R</sup> Cd. Ib, met, pro.	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
018 a	CK 77	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
J53	Suc <sup>+1</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
K12	fim <sup>-</sup> lac fla <sup>-</sup>	+	A	+	-	+	-	-	-	-	-	-
AB 1157	iOR151	+	A	+	-	+	-	-	-	-	-	-
54R30		+	A	+	-	+	-	+	-	-	-	-
014		+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G-167	K12 Col <sup>+</sup> , SSu <sup>+</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-168	K12 Col <sup>+</sup> Vt <sup>+</sup> SSu <sup>+</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
14R519		+	A	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-176		+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-241	Col <sup>-</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-242	Col <sup>-</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-243	Col <sup>-</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-244	Col <sup>-</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-246	SSu <sup>-</sup>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-247		+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
H-19	Orig.	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
E-2348		+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G-245	{ G-243 H19 Col <sup>-</sup> SSu <sup>+</sup> Sen by e.b.	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
014K7H <sup>-</sup>		+	A	+	-	+	-	-	-	-	-	-
K12	NaI <sup>R</sup> fim <sup>-</sup> Fla 4dR387	+	A	+	-	+	-	-	-	-	-	-
20R770	T-A <sup>drh</sup> K12 lac <sup>+</sup> (1-like)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-

CUADRO 3. Estudio de transconjugantes de diferentes conjugaciones entre cepas con alto y bajo contenido de ECA.

Número de cruza	Cepa Donadora	Cepa Receptora	Medio Selectivo utilizado	Transconjugantes estudiadas/transconjugantes aisladas	Transconjugantes con ECA menor que 16	Transconjugantes positivas en asas de intestino de conejo
1	<u>E. coli</u> 014K7H <sup>-</sup>	<u>E. coli</u> 14R519	MacConkey con ácido nalidíxico	9/DPC*	9	2
2	<u>E. coli</u> 54R170	<u>E. coli</u> H19 HW	MacConkey con ácido nalidíxico + streptomicina	8/DPC*	8	-
3	<u>E. coli</u> 54R170	<u>E. coli</u> H19 HWS	MacConkey con ácido nalidíxico	12/12	12	1
4	<u>E. coli</u> 014K7H <sup>-</sup>	<u>E. coli</u> 52R527	MacConkey con ampicilina + colicina	7/7	7	-
5	<u>E. coli</u> 54R170	<u>E. coli</u> Hfr transconjugante	MacConkey con ácido nalidíxico + streptomicina	15/15	15	-

\*Demasiadas para contarse (DPC).

CUADRO 4. Estudio de transconjugantes de diferentes conjugaciones tripartitas entre cepas con alto y bajo contenido de ECA.

Número de cruce	Cepa Donadora	Cepa Receptora	Cepa Intermedia	Medio Selectivo utilizado	Transconjugantes estudiadas/transconjugantes aisladas	Transconjugantes con ECA menor que 16	Transconjugantes positivas en asas de intestino de conejo
6	<u>E. coli</u> 014K7H <sup>-</sup>	<u>E. coli</u> 52R527	<u>E. coli</u> 48R192	MacConkey con ácido nalidíxico + tetraciclina	18/DPC*	18	1
7	<u>E. coli</u> 014K7H <sup>-</sup>	<u>E. coli</u> 52R527	<u>E. coli</u> 20R770	MacConkey con ácido nalidíxico + streptomina	13/DPC*	13	-
8	<u>E. coli</u> 014K7H <sup>-</sup>	<u>E. coli</u> 54R527	<u>E. coli</u> K-12 22(1-16) F-like Km <sup>r</sup>	MacConkey con ácido nalidíxico + kanamicina	178/178	17	-

\*Demasiadas para contarse (DPC).