

11261  
ley  
3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Medicina

Las Enterotoxinas y su Implicación en la Patogénesis de la Diarrea: Caracterización Bioquímica y de Material Genético (Plasmidos), en Cepas Enterotoxigénicas de Escherichia coli.

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**  
(MICROBIOLOGIA)

P r e s e n t a :  
**M.C. Carlos A. Eslava Campos**

México, D. F.

1983

**FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
MATERIAL Y METODO	25
RESULTADOS	38
DISCUSION	43
CUADROS, ESQUEMAS Y FIGURAS	52
BIBLIOGRAFIA	103

LISTA DE CUADROS, ESQUEMAS Y FIGURAS

CUADROS

- I                    Número y Origen de las Bacterias Estudiadas
- II                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Pacientes) Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 3 horas.
- IIA                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Pacientes) Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.
- III                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua, Alimetros y de Origen Animal) Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 3 horas.
- IIIA                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua, Alimentos y de Origen Animal) Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.
- IV                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Pacientes). Descarboxilación de Aminoácidos.
- IVA                    Reacciones Bioquímicas en Cepas Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua, Alimentos y de Origen Animal) Descarboxilación de Aminoácidos.

CUADROS

- V Frecuencia de Descarboxilación ( $\%$ ) de Aminoácidos en Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas.
- VI Utilización de Aminoácidos por Cepas Enterotoxigénicas.
- VII Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua y de Pacientes). Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 3 horas.
- VIIA Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua y de Pacientes). Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.
- VIII Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Alimentos). Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 3 horas.
- VIIIA Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Alimentos). Fermentación de Carbohidratos. Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.
- IX Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Agua y de Pacientes). Descarboxilación de Aminoácidos.
- IXA Reacciones Bioquímicas en Cepas no Enterotoxigénicas (Aisladas de Alimentos). Descarboxilación de Aminoácidos.

CUADROS

- X Utilización de Aminoácidos por Cepas no Enterotoxigénicas.
- XI Comparación de % de Resistencia a Agentes Antimicrobianos entre cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas.
- XII Susceptibilidad a los Antimicrobianos. Cepas Enterotoxigénicas.
- XIII Susceptibilidad a los Antimicrobianos. Cepas no Enterotoxigénicas.
- XIV Migración Relativa y Peso Molecular de Plásmidos en Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas.
- XV Migración Relativa y Peso Molecular de Plásmidos en Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas.
- XVI Migración Relativa y Peso Molecular de Plásmidos en Cepas no Enterotoxigénicas.
- XVII Susceptibilidad a los Antimicrobianos en Cepas Transconjugantes.
- XVIII Reacciones Bioquímicas en Cepas Transconjugantes. Fermentación de Carbohidratos.
- XIX Migración Relativa y Peso Molecular de Plásmidos en Cepas Transconjugantes.

CUADROS

- XX Biotipos obtenidos en las Cepas Enterotoxigénicas, de A acuerdo a su Capacidad para Fermentar Carbohidratos y pa ra Descarboxilar Aminoácidos. (Lectura de Resultados de Fermentación de Carbohidratos a las 3 horas).
- XXA Biotipos obtenidos en las Cepas Enterotoxigénicas, de A acuerdo a su Capacidad para Fermentar Carbohidratos y pa ra Descarboxilar Aminoácidos. (Lectura de Resultados de Fermentación de Carbohidratos a partir de las 24 horas).
- XXI Biotipos obtenidos en las Cepas no Enterotoxigénicas, de A acuerdo a su Capacidad para Fermentar Carbohidratos y pa ra Descarboxilar Aminoácidos (Lectura de Resultados de Fermentación de Carbohidratos a las 3 horas).
- XXIA Biotipos obtenidos en las Cepas no Enterotoxigénicas, de A acuerdo a su Capacidad para Fermentar Carbohidratos y pa ra Descarboxilar Aminoácidos. (Lectura de Resultados de Fermentación de Carbohidratos a partir de las 24 horas).
- XXII Gérmenes Enteropatógenos Encontrados en Niños Menores de Dos Años, Estudiados en la Ciudad de México, en diferentes años.
- XXIII Cepas Enterotoxigénicas Identificadas  
Número y Origen.

CUADROS

- XXIV Frecuencia de Fermentación (%) de Carbohidratos por Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas. (Lectura de Resultados a las 3 horas).
- XXIVA Frecuencia de Fermentación (%) de Carbohidratos por Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigénicas. (Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas).
- XXV Resumen de Reacciones Bioquímicas (Fermentación de Carbohidratos y Descarboxilación de Aminoácidos) de Escherichia coli.
- XXVI Relación Entre Consumo de Antibióticos y Cepas Resistentes.
- XXVII Migración Relativa y Peso Molecular de Plásmidos en Cepas Transconjugantes y Donadoras.
- XXVIII Serogrupos de Escherichia coli Asociados con Cuadros Diarreicos.
- XXIX Biotipos Cepas Enterotoxigénicas Michael H. Merson, et al.
- XXX Biotipos Cepas Enterotoxigénicas H.R. Smith, et al.
- XXXI Biotipos Cepas Enterotoxigenicas M. Henriqueta L. Reis, et al.

## ESQUEMAS

- 1 Aislamiento y Caracterización de Cepas Enterotoxigénicas.
- 2 Representación Esquemática de Electroforesis en Geles de Agarosa (Cepas Enterotoxigénicas y no Enterotoxigenicas).
- 3 Representación Esquemática de Electroforesis en Geles de Agarosa.  
(Cepas Enterotoxigénicas).
- 4 Representación Esquemática de Electroforesis en Geles de Agarosa.  
(Cepas Enterotoxigénicas).
- 5 Representación Esquemática de Electroforesis en Geles de Agarosa.  
(Cepas Transconjugantes).
- 6 Representación Esquemática de Electroforesis en Geles de Agarosa.  
(Cepas Transconjugantes y Donadoras).

## FIGURAS

- 1 Prueba de Asa Ligada en Intestino de Conejo, Para Demostrar Capacidad Enterotoxigénica de Cepas de Escherichia coli.

**FIGURAS**

- 2            Migración Relativa de ADN Circular en Geles de Agarosa al 0.8% de Plásmidos de Peso Molecular Conocido.
  
- 3            Mortalidad por Enfermedades Diarreicas en la República Mexicana Durante los Años 1931 a 1975.
  
- 4            Mortalidad por Enfermedades Diarreicas en la República Mexicana (1931-1975), y en la Ciudad de Nueva York (1868-1912).

RESUMEN

Se estudiaron 262 cepas de Escherichia coli (157 aisladas de pacientes, 70 de agua y 35 de alimentos). Diez cepas enterotoxigénicas, se identificaron por el método de asa ligada en conejo y se investigaron desde el punto de vista bioquímico, de su capacidad de resistencia a los antimicrobianos y de la presencia de material genético extracromosómico. Sus características metabólicas presentaron algunas diferencias, con respecto a lo observado en cepas no enterotoxigénicas, sobre todo en la fermentación de carbohidratos y la descarboxilación de aminoácidos; con estos datos se elaboraron biotipos de ambos tipos de cepas, las cepas enterotoxigénicas dieron cinco biotipos diferentes y las no enterotoxigénicas nueve, no existiendo entre ambos grupos de biotipos ninguno que se compartiera. En la prueba de susceptibilidad se encontró que hay resistencia a algunos de los antimicrobianos de uso común en México, en los dos tipos de cepas.

Finalmente se observó que las cepas enterotoxigénicas comparten entre sí un mayor número de plásmidos comparativamente con los que presentan las no productoras de enterotoxinas.

S U M M A R Y

A total of 262 strains of Escherichia coli has been isolated from patients(157), water(70) and sea food(35), were tested for enterotoxin production by the rabbit ileal loop test. For this test, ten enterotoxigenic strains were obtained. Biochemistry capacity, antibiotic resistance and extracromosomal DNA presence was studied in enterotoxigenic and non enterotoxigenic Escherichia coli strains. Results show some biochemistry difference in both enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains. Antibiotic resistance in both strains was more important to antibiotics of common usage in México. Respect to extracromosomal DNA, enterotoxigenic strains share greater number plasmids between them, in comparison with the non enterotoxigenic Escherichia coli strains.

LAS ENTEROTOXINAS Y SU IMPLICACION EN LA PATOGENESIS DE LA  
DIARREA: CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y DE MATERIAL GENETICO  
(PLASMIDOS), EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE Escherichia coli

INTRODUCCION

La gastroenteritis infecciosa aguda es un problema mundial para todos los grupos etarios. De tres mil a cinco mil millones de casos de diarrea con cinco a diez millones de muertes ocurrieron entre 1977 y 1978 en diferentes ciudades de Asia, Africa y América Latina. (13-80).

La asociación de E. coli con cuadros de gastroenteritis aguda se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas. Su mecanismo de patogenicidad es de por lo menos dos tipos conocidos: por invasión del epitelio intestinal (E. coli enteroinvasiva) y por enterotoxinas (E. coli enterotoxigénica). Las cepas enterotoxigénicas ocupan los primeros lugares como agentes causales de diarreas, principalmente en los países en vías de desarrollo.

La identificación de éste microorganismo enterotoxigénico se realiza por la demostración de las toxinas que elabora; sin embargo, los procedimientos utilizados para éste propósito, en la mayoría de los casos, no están al alcance de un gran número de laboratorios. En los últimos años diferentes investigadores han podido indagar que cepas de E. coli productoras de enterotoxinas de origen humano poseen plásmidos que tienen información para la elaboración de enterotoxinas y de factores de colonización, y que, al parecer, se agrupan en un restringido número de serogrupos o serotipos y, por ende podrían ser caracte-

terizadas por métodos serológicos; sin embargo, el procedimiento presenta inconvenientes de cierta importancia, como es el que se requiere de un número considerable de antisueros, hecho que por sí solo restringe su utilidad para unos pocos laboratorios especializados. Todo lo anteriormente mencionado da bases para plantear la búsqueda de características particulares de las cepas enterotoxigénicas de E. coli, que permitan su fácil identificación.

## ANTECEDENTES

Las enfermedades infecciosas en México tienen una importancia de primera magnitud; las del aparato respiratorio ocupan el primer lugar como causa de muerte y las gastroenteritis el segundo (1). En cuanto a la morbilidad, se observa que no manifiestan una declinación sostenida, presentan variaciones condicionadas por eventos ecológicos cambiantes (2-3). La repercusión económica que estos fenómenos tienen sobre la sociedad y la familia es considerable.

La mucosa del aparato digestivo esta en contacto estrecho con la flora microbiana; el número de especies que la constituyen varía con la abundancia y clase de nutrientes. La flora intestinal tiene variaciones relacionadas con la edad del sujeto, lo que seguramente refleja el tipo de alimentación (4). En el recién nacido, cuando es alimentado con fórmula láctea, hay predominio de Bifidobacterium sp., y en los amamantados sobresale Lactobacillus. A esta flora inicial se agregan bacterias anaerobias facultativas como Escherichia coli y Streptococcus fecalis. Cuando es destetado la flora cambia y se asemeja a la del adulto, los gérmenes anaerobios estrictos Bacteroides, Fusobacterium, Peptococcus, Peptoestreptococcus, Difteroides y Vibriosis, (5-6-7) aventajan a los anaerobios facultativos.

El estómago normal carece de microorganismos por la acción bacte

ricida del ácido clorhídrico, en el intestino delgado la cifra de microbios es muy baja en las primeras porciones pero aumenta a medida que se alcanza la porción terminal del íleon, en cambio, en el colon, la población microbiana puede llegar a una cifra cercana a  $10^{10}$  bacterias por gramo de heces. Esta población puede modificarse por la dieta, y por otros factores, como alteraciones en el tránsito intestinal y la acción de antimicrobianos que suprimen las especies susceptibles y favorecen la implantación de organismos aloctótonos en cuya estancia, a pesar de ser temporal, pueden ejercer acción patógena (7). Algunas de estas bacterias son responsables de producir diarrea; sin embargo por los métodos de laboratorio a nuestro alcance, no se puede determinar el agente etiológico en todos los casos; aproximadamente en el 25% se reconoce 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, (8).

Entre las bacterias causantes de diarrea Escherichia coli ocupa un lugar prominente, su habitat natural es la región ileocecal y el colon (9); se clasifica dentro de la familia Enterobacteriaceae en la tribu Escherichia (10). Esta bacteria se consideraba patógena solamente cuando invadía tejidos extraños a su habitat como lo es el tracto urinario, el aparato respiratorio y, menos frecuente, el sistema nervioso central (9).

Sin embargo, desde hace varias décadas se sospechaba que podía ser causante de diarrea. Ya en 1923 hubo fundados indicios de sus relaciones con casos de diarrea infecciosa (11-12).

En 1945 Bray demostró la asociación de un tipo serológico específico de E. 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 lactante de 2 meses de edad una cepa de E. coli que poseía un antígeno somático que cruzaba con el antígeno "O" de Salmonella adelaide, a la que se le dio el nombre de Escherichia coli Gómez, que fue causante de la gastroenteritis y de la muerte de ese niño.

En 1952 Olarte y Varela observaron que la cepa E. coli Gómez, la bacteria aislado por Bray, (Bacterium coli napolitanum), así como la cepa Bacterium tipo Giles y Songster y la E. coli, serotipo O 111:B4 de Kauffman y Dupont; estaban relacionadas con brotes epidémicos de diarrea en lactantes (13). A partir de este descubrimiento se identificaron serotipos responsables de producir diarrea tanto en recién nacidos como en niños y adultos. Neter y col. denominaron a estas cepas de E. coli causantes de diarrea como enteropatogénica (EEC), para diferenciarlas de las cepas relacionadas con infecciones extraintestinales (14). En 1967 aparecen las primeras noticias en que se hacía saber que algunas cepas de E. coli eran capaces de elaborar enterotoxinas; inicialmente estas fueron aisladas de animales muy jóvenes con diarrea severa. Un año más tarde, en Calcuta, se hicieron estudios en pacientes adultos con cuadro diarreico semejantes a los producidos por Vibrio cholerae en quienes se aisló E. coli; las observaciones realizadas previamente en animales, hicieron pensar que estas bacterias aisladas en Calcuta podrían ser las responsables de esos casos de diarrea (15). Con el empleo de las técnicas utilizadas para la demostración de enterotoxinas elaboradas por V. cholerae, se pudo probar que

las cepas aisladas de esos pacientes también eran capaces de sintetizar enterotoxinas (17-18).

#### ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICA

En la actualidad se sabe que E. coli es capaz de generar por lo menos dos tipos de enterotoxinas que se pueden diferenciar por su resistencia al calor; una es termolábil (TL) y la otra termoestable (TE); presentan además diferencias en su composición química y en sus efectos sobre células eucariotes (17-19-24). La toxina TL de E. coli comparte características físicas, químicas y antigénicas con la enterotoxina de V. cholerae (TC). (19-20). Es una proteína con P.M. variable que puede exceder de 100,000; está constituida por dos subunidades llamadas "A" y "B", esta última compuesta por cinco fracciones las que en conjunto reciben el nombre de coligenoide. Las fracciones de la subunidad "B" pueden agruparse en dímeros y trímeros; esta subunidad a su vez, se observa en dos diferentes conformaciones denominadas "R" y "C"; la forma "R" se mueve con rapidez en un campo electroforético mientras que la "C" lo hace lentamente. Estudios recientes han mostrado que la conformación denominada "C" es la forma activa. Se ha observado además que la conversión de la forma "R" a la "C" es inducida por acción de la galactosa (21).

La enterotoxina TE se ha podido purificar a partir de cepas de origen animal y humano, su P.M. es de aproximadamente 10,000, está constituida de lípidos (83%) y proteínas (15%) con capacidad inmunogénica pobre (19-22).

Se ha observado en dos formas denominadas TEa y TEb, que mues-

tran diferencias en relación con el tipo de cepas que las producen y en la composición de aminoácidos (19-23-28). La producción de esta toxina es inhibida por algunos carbohidratos como: D-glucosa, D-gluconato y la L-arabinosa, mientras que el glicerol y el piruvato, solo disminuyen sus niveles. Se conocen otros mecanismos reguladores para su elaboración como el nivel de pH, notándose una producción óptima de toxina en pH de 7.2 a 8.0. (25).

En ambas enterotoxinas (TL y TE) el mecanismo de acción que presentan es diferente. La toxina TL tiene un mecanismo de acción parecido al de la toxina colérica; dispone de un receptor específico en las células del epitelio del intestino el gangliosido Gm1, este pertenece a los gangliosidos formados por complejos glucolípidos-cerebrósido que se encuentran en la membrana plasmática de la célula (19). Este gangliosido está constituido por galactosil N-acetilgalactosa minisialosil galactosil-glucosil ceramida; como se ha señalado, la galactosa activa la subunidad B de la enterotoxina, favoreciendo la penetración de la subunidad "A" que se encarga de activar la enzima Adenilato Ciclasa, que transforma el Adenosin 5 Trifosfato (ATP) en Adenosin mono fosfato cíclico (3',5'-AMPc) (19-22-27). El incremento intracelular de la concentración del AMPc induce cambios en el potencial eléctrico de la membrana, originando trastornos en la absorción de sodio, aumento de la secreción de cloro y salida de líquido en exceso por la pared del intestino (19-27).

El mecanismo de acción de la toxina TE no es bien conocido pero se sabe que induce incremento en la concentración de Guanosin mono fosfato cíclico (GMPc) (19-23-26).

## FACTORES DE ADHERENCIA

La superficie de E. coli está cubierta con "sustancias" antigénicas que inducen reacciones inmunológicas y síntesis de anticuerpos específicos que se utilizan para realizar su clasificación serológica; los antígenos de superficie más comunes son: el antígeno somático "O" que es un oligosacárido termoestable; el antígeno "H" o flagelar, de naturaleza proteica y termolábil; y el antígeno K o capsular, de composición polisacárida, termolábil, que en ocasiones enmascara al antígeno somático.

Estas estructuras antigénicas son comunes para todas las cepas de E. coli, patógenas ó no; sin embargo, algunas, que poseen capacidad para elaborar enterotoxinas, pueden presentar, estructuras que permiten su adherencia al epitelio intestinal, lo que favorece el establecimiento y proliferación de las mismas. Estos son conocidos en la actualidad como factores de adherencia o de colonización, habiéndose podido identificar varios tipos: los denominados K88 y 987P de origen porcino; el K99 aislado de bovinos y los factores CFA/I y CFA/II de cepas humanas, además de algunos otros que se han descubierto recientemente (29-30-31-32-33).

Las bacterias enterotoxigénicas para poder producir cuadros diarréicos, deben poseer, además de capacidad para elaborar enterotoxinas, factores de colonización.

Estos factores se pueden identificar en el laboratorio por su capacidad para aglutinar eritrocitos, efecto que no es inhibido por la acción de la D-manosa, como ocurre con otros apéndices de fijación co

nocidos como fimbrias de tipo 1, presentes en la mayoría de las cepas de E. coli. (34-35-36). Se ha observado que los factores de colonización tienen especificidad en relación al tipo de epitelio intestinal que colonizan, así como para los eritrocitos que aglutinan, propiedad que se utiliza para diferenciarlos entre sí. Estas estructuras presentan características que comparten; en su composición se encuentran la mayoría de los aminoácidos comunes; sin embargo, hay diferencias entre ellas, así tenemos que los antígenos K88 y CFA/I no poseen cisteína; por otro lado, su movilidad electroforética, su peso molecular y su especificidad de huésped, las diferencia.

La capacidad de estos factores para adherirse al epitelio intestinal, se relaciona con ciertas características observadas en la superficie de la mucosa intestinal. Tanto las bacterias, como las células eucariotes a los cuales se adhieren, poseen el mismo tipo de cargas; para que haya adhesión la acción repulsiva que se produce al acercarse ambas superficies debe ser vencida. Se ha observado que esto se logra por intermedio de fuerzas denominadas de corto y largo alcance, que operan cuando se unen las fimbrias con receptores específicos para cada factor de adherencia y que se localizan en la superficie de las células epiteliales (29). La naturaleza de estos receptores ha sido determinada, entre otros autores, por Kearns y Gibbons (29-38), quienes descubrieron que el epitelio intestinal de varias especies animales, presenta diferencias en los perfiles de glicolípidos.

Ayudados en estas observaciones, otros investigadores, utilizando

el antígeno K88, encontraron que la capacidad para aglutinar eritrocitos de cobayo por este antígeno, era inhibido por algunas glicoproteínas; lo que hizo suponer que un residuo Beta D galactosa pudiera estar involucrado en la interacción del K88 con los eritrocitos. Esto condujo a suponer que la Beta D galactosa debería encontrarse en el receptor del antígeno (30). Lo antes mencionado se ve apoyado por observaciones realizadas en cepas de E. coli aisladas de infecciones de vías urinarias, en las que se halló que los glicolípidos actúan como receptores de estas cepas cuando se hacen reaccionar, tanto con eritrocitos humanos, como con células del epitelio uretral (29-30-40).

#### MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMICO (plásmidos)

Los plásmidos son elementos genéticos autónomos que pueden ser heredados sin necesidad de estar ligados al cromosoma. Los plásmidos son importantes en medicina porque confieren resistencia a antibióticos, porque pueden codificar la síntesis de toxinas y otras proteínas, que incrementan la virulencia de las bacterias que las poseen. (41-42)

Para la clasificación de los plásmidos se toman en cuenta sus características más importantes. Los plásmidos R confieren resistencia a una o más drogas antibacterianas; los denominados plásmidos Col codifican para la elaboración de proteínas antibacterianas conocidas como Colicinas; los plásmidos degradativos codifican la síntesis de una variedad de enzimas catabólicas y los de virulencia incrementan la patogenicidad de la bacteria por diferentes mecanismos.

Las bacterias pueden contener dos o más plásmidos diferentes; si son capaces de coexistir, se denominan "Compatibles"; los plásmidos que

no pueden existir en la misma bacteria se llaman "Incompatibles", estos se pierden después de cierto número de generaciones, Sobre estas bases, los plásmidos son clasificados dentro de grupos de incompatibilidad.

Así mismo, los plásmidos pueden ser conjugativos, llamados también  $\text{Tra}^+$  (Transferibles) y no conjugativos o  $\text{Tra}^-$ . Los plásmidos conjugativos transfieren copias de ellos mismos de una bacteria a otra. Pueden también transferir fragmentos de DNA cromosomal entre las bacterias. (41-43).

Además de los plásmidos han sido descubiertos elementos genéticos conocidos como transposones y otros denominados "secuencias de inserción" (IS). Estas estructuras se pueden encontrar también en el cromosoma bacteriano y en fagos (42-43).

Los transposones tienen un tamaño que se encuentra en el rango de 1000 a 20,000 pares de bases. Son capaces de hacer copias de si mismos e insertarse por medio de secuencias invertidas dentro de moléculas de DNA con las cuales tienen poca o ninguna secuencia de homología. Los transposones codifican para características especificadas de plásmidos, como resistencia a antibióticos, producción de toxinas, etc.

Las "secuencias de inserción" son elementos genéticos que consisten de 768 y hasta 5700 pares de bases. Se encuentran en el cromosoma de muchos tipos de bacterias y bacteriófagos así como en plásmidos. Existen diferentes tipos de estos elementos, los denominados IS1 y IS2 que se pueden insertar en muchos sitios diferentes, pero se establecen preferentemente en ciertas regiones de la molécula de DNA.-

Sin embargo, no siempre se insertan exactamente en el mismo punto. Por su parte las secuencias de inserción conocidas como IS4, son altamente específicas y se insertan exactamente en el mismo sitio del genoma.

Una característica común de todas las "secuencias de inserción" y de transposones es la presencia de secuencias terminales repetidas e invertidas. Probablemente, estas secuencias terminales invertidas proporcionan a estos elementos transferibles el reconocimiento de los sitios para las nucleasas u otras enzimas que están involucradas en la transposición y recombinación "ilegítima".

#### Plásmidos ENT

Los plásmidos que confieren las capacidades para elaborar enterotoxinas son conocidas como Ent y han sido caracterizados parcialmente. En algunos se ha determinado su peso molecular, su contenido total de Guanina Citosina G-C y algunas otras propiedades. Gyles, So y Falcow (44), entre otros, señalaron que un plásmido transmisible era el responsable de conferir la capacidad para la elaboración de Enterotoxinas de ciertas cepas de E. coli.

Varias observaciones (19-29-45) han mostrado que la expresión de ambas toxinas (TL y TE) se puede encontrar codificada en un solo plásmido o en plásmidos diferentes.

Un plásmido que codifica para la producción de ambas enterotoxinas está constituido por una cadena sencilla de DNA con peso molecular aproximado de  $6 \times 10^7$  daltones. El plásmido que codifica para la elaboración de la toxina TL es heterogéneo y su peso molecular se en-

cuentra en un rango de  $2.1$  a  $8.0 \times 10^7$  daltones; observándose además, que se encuentra integrado en el cromosoma de un bacteriófago temperado. Es probable que este factor genético también forme parte de un transposon (29-42). Estudios recientes indican, que el gene que codifica la elaboración de la toxina TE, forma parte de un transposon; este gene tiene una secuencia de 500 pares de bases separadas por dos secuencias de inserción invertidas (ISI).

Algunos de los plásmidos que dirigen la síntesis de los factores de colonización han sido caracterizados: (29-45), observándose que la capacidad para la producción de K88 puede ser transferida junto con la propiedad para utilizar rafinosa como única fuente de carbono. - Shirpley y cols. (29), encontraron que los genes que confieren estas propiedades están localizados en un plásmido sencillo no conjugativo de aproximadamente 50 Megadaltons. (Md). El antígeno K88 tiene tres variedades antigénicas (K88ab, K88ac, K88ad) y sus determinantes se localizan sobre un fragmento HindIII de aproximadamente 7 a 8 Md (29).

La expresión del antígeno K88ac involucra 4 genes que están organizados en 2 operones. Uno de los operones posee genes para la síntesis de 3 polipéptidos y el otro tiene información para la elaboración de la fimbria.

Los polipeptidos tienen peso molecular y función diferente. Uno, con peso molecular de 17,000 d, se cree que actúa como regulador positivo del operón que gobierna la síntesis de la fimbria; de los otros dos polipéptidos, el de 70,000 d., al parecer favorece el anclaje de las fimbrias a la bacteria y el de 29,000 d, se encarga de la

adherencia de la fimbria al epitelio intestinal.

Un aspecto muy discutido esta en relación con la posibilidad de que un mismo plásmido posea la información tanto para factores de colonización como para la elaboración de la enterotoxina o que solo posean información para una sola de estas propiedades.

En el caso del antígeno K88 algunos investigadores refieren que en el mismo plásmido se encuentra la información relacionada con los factores de colonización y con la producción de ambas enterotoxinas (29-45). Sin embargo, Guinne y Jansen, han reportado cepas con plásmido que codifica para este antígeno pero que elaboran exclusivamente toxina TL.

En 1972 Smith y Linggod (29-46-47), reportan un plásmido conjugativo de aproximadamente 52 Md, relacionado con la síntesis del antígeno K99 y de la enterotoxina TE únicamente.

No obstante, las observaciones muestran que en la mayoría de las cepas enterotoxigénicas de E. coli de origen bovino y porcino los factores de colonización y las enterotoxinas estan codificados por diferentes plásmidos (29-48-49).

Con respecto a las cepas de origen humano, los plásmidos poseen información para ambas propiedades.

McConwell y cols. (29-50), encontraron en una cepa del serogrupo O78, un plásmido no conjugativo con peso molecular de 60 Md encargado de la síntesis del antígeno CFA/I y de la toxina TE y otra cepa del serotipo O63:H con un plásmido de 65 Md que presentaba el factor CFA/I

y elaboraba ambas toxinas (TL/TE) (51)

Esto hace pensar, que si la mayoría de las cepas de origen humano poseen plásmidos que tienen información tanto para la elaboración de enterotoxinas como para factores de colonización, se podrían agrupar en un restringido número de serogrupos o de serotipos y tal vez, ciertas cepas podrían tener capacidad para aceptar y donar este tipo de material genético con mayor facilidad y con más estabilidad que otras (29-53-54-55).

#### IDENTIFICACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS.

La identificación de cepas enterotoxigénicas se dificulta por no existir marcadores bioquímicos y características serológicas que las singularicen. Los métodos que se emplean para su caracterización se han enfocado, exclusivamente, en averiguar la acción de las enterotoxinas sobre diferentes modelos biológicos: inicialmente fueron ideados para la identificación de la toxina de V. cholerae y adaptados para descubrir las cepas enterotoxigénicas de E. coli. Algunas técnicas revelan ambos tipos de enterotoxinas, mientras que otras, solo una de las dos (22-27-89). En los trabajos iniciales se empleó en forma extensa la denominada Prueba de Asas Ligadas, que sirve para conocer el efecto fisiopatológico y el mecanismo de acción de las toxinas de V. cholerae y de las enterotoxinas de E. coli (56). Una suspensión bacteriana o un filtrado del cultivo de una cepa en estudio, es inoculada en segmentos ligados del fleo de conejos adultos o de lechones; (22), la prueba se considera positiva cuando los segmentos inoculados aparecen dilatados en un lapso entre 6 y 18 hs., según se trate de las to

xinas TE o TL respectivamente. La técnica es fácil de realizar; sin embargo, su alto costo impide el uso rutinario en la mayoría de los laboratorios.

Entre otras pruebas, que con este mismo objeto se han venido utilizando, se tienen la de Permeabilidad cutánea, que consiste en la inoculación intradérmica de filtrados de cultivo en animales de laboratorio, siendo los más recomendables, conejos jóvenes que son más sensibles; la prueba es positiva cuando se produce eritema, edema e induración en el sitio de la inyección. El componente activo fue llamado factor de permeabilidad vascular (FP) (19-57).

La producción de este factor es modificada por las condiciones de cultivo.

El modelo del ratón recién nacido (58), se utiliza para averiguar la existencia de la toxina TE de E. coli.

La perfusión "in vivo", en el Yeyuno de ratas (60), es un método cuantitativo muy sensible y útil para demostrar ambos tipos de enterotoxinas. El sistema es reproducible y responde a dosis muy bajas de toxina; sin embargo, es complicado y sólo se puede realizar en los laboratorios especializados.

Las pruebas in vitro han venido a desplazar considerablemente los modelos de pruebas en animales. Existen un gran número de células sensibles a la acción de las enterotoxinas, tanto de V. cholerae, como de E. coli, entre ellas se tienen las células adrenales Y1 (61); estas células crecen en monocapas confluentes y sufren cambios morfológicos y metabólicos cuando se exponen a la acción de productos como el ACTH

y AMPc lo que dió la idea para utilizarlas en la detección de la toxina TL de E. coli y la de V. cholerae. El efecto de estos productos se asocia con cambios en la morfología de las células, en su capacidad de adherencia y en incremento de la secreción de Delta 4-3 cetog esteroides.

Las células de Ovario de Hamster Chino (CHO) (62), es otro modelo de prueba in vitro, utilizado para detectar enterotoxinas. El efecto de estas toxinas sobre las células CHO y de fibroblastos, en cultivo, se demuestra por un incremento en la síntesis de colágena, así como por la elongación de las células y por la adhesión a un sustrato, todo ello relacionado con incremento en la concentración de AMPc. El efecto observado en estas células, es contrario al que se describió en las células adrenales, hecho que enfatiza la acción pleiotrófica, del AMPc en diferentes tipos celulares.

Es fácil percatarse de las dificultades involucradas en la identificación de cepas enterotoxigénicas de E. coli, motivando que se intenta desarrollar técnicas accesibles a la mayoría de los laboratorios clínicos. Bajo esta perspectiva, los procedimientos inmunológicos han adquirido gran importancia, como: la inmunohemólisis radial pasiva; el radio inmuno análisis (RIA) y el método de ELISA, que son de utilidad para la identificación de la toxina TL de E. coli. (63-64-65). Estos procedimientos son sensibles pero con dificultades técnicas no fácilmente salvables para un gran número de laboratorios.

Todo lo antes mencionado ha estimulado la búsqueda de otros procedimientos que puedan ser practicados por laboratorios de diagnóstico clínico como es el descrito por Takeshi Honda que utiliza como princi-

pfo el método de Eleck (66), con resultados aparentemente satisfactorios.

Anteriormente se había citado que la identificación serológica de cepas enterotoxigénicas de E. coli no era posible, porque las enterotoxinas son codificadas por plásmidos y es el cromosoma el encargado de la expresión de los antígenos de superficie que sirven para realizar la caracterización serológica de las bacterias. Esto trae como consecuencia, que un número muy extenso de serotipos puedan estar relacionados con la elaboración de enterotoxinas (67). Sin embargo, existen datos recientes que muestran que un gran número de cepas enterotoxigénicas de E. coli de origen humano aisladas de diferentes áreas geográficas, están limitadas a un número definido de serotipos (O: K: H) (17-67-68).

La asociación fue demostrada inicialmente y en forma convincente, en cepas productoras de ambas enterotoxinas y posteriormente en bacterias que elaboran exclusivamente la toxina TE (51).

Así mismo, diferentes observaciones han mostrado asociación más o menos estable entre ciertos serotipos y algunas características metabólicas (17-29). Esta última observación hace pensar que ciertos serobiotipos de clones especiales pudieran estar adaptados como portadoras de plásmidos y en este caso en particular, los relacionados con la producción de enterotoxinas (17-48-51-71). Estos hechos hacen abrigar esperanzas para la identificación de bacterias enterotoxigénicas las que podrían ser agrupadas en ciertos bioserotipos, facilitando su detección en un gran número de laboratorios.

Cabe mencionar que en la actualidad se trabaja intensamente sobre los factores de colonización que en un momento dado podrían ser de utilidad para la identificación de estos microorganismos productores de enterotoxinas. (29-34-40).

#### BIOTIPIFICACION

Los microorganismos, pueden modificar su medio ambiente y emplear sustancias en solución como fuente de energía aprovechable para su crecimiento y reproducción. Todas las actividades de las células son mediadas por enzimas; las reacciones químicas que para sobrevivir emplean los microorganismos, requieren de un gran número de enzimas cuya actividad se interactúa. Los productos químicos finales de algunas de estas acciones enzimáticas, pueden ser registradas en el laboratorio por medio de diferentes pruebas, que permiten establecer un patrón de actividad de la bacteria y que ayudará en la identificación y diferenciación de microorganismos de especies íntimamente relacionadas.

Aunque la serotipificación de Escherichia coli, en algunos casos, proporciona la diferenciación entre cepas de esta bacteria, no todos los laboratorios están capacitados para realizar este procedimiento en razón de lo laborioso y el alto costo que implican (10-29).

Esto ha ocasionado que diversos autores intenten la caracterización de las cepas de Escherichia coli aisladas tanto de vías urinarias, como de proceso diarreicos, utilizando la biotipificación por medio de diferentes pruebas bioquímicas (73-74-79).

La selección de substratos para la biotipificación debe ser lo suficientemente extensa, de manera que se pueda efectuar una buena di -

ferenciación entre las cepas en estudio.

En el caso particular de E. coli enterotoxigénicas algunos investigadores (17-51-68-71) realizan la tipificación bioquímica de esta bacteria asociada con la serotipificación, sin que hasta el momento se hayan establecido patrones característicos.

#### TRANSFERENCIA DE INFORMACION GENETICA

Actualmente se sabe que un gran número de géneros de bacterias pueden presentar recombinación genética (76). Los genes son transferidos entre células por medio de tres tipos de mecanismos; todos tienen ciertos rasgos en común en el proceso de recombinación, pero difieren de uno a otro en algunas características fundamentales.

El primero de estos mecanismos es la transformación, descubierta inicialmente en Pneumococcus; en la actualidad se ha establecido su existencia en otras especies de bacterias (7-76). En la transformación el mecanismo de transferencia del ácido nucléico se debe a la penetración al interior de una bacteria receptora de DNA libre, modificando la información genética que posee. Uno de los aspectos importantes para que se lleva a efecto la transformación, es lo que se conoce como competencia de la población de células receptoras. La competencia es un estado fisiológico que varía grandemente durante el ciclo celular. Se ha observado que las células competentes producen una protefina, que puede ser aislada y usarse para conferir competencia a otras células. Se piensa que puede ser un componente de la membrana que facilita la entrada del DNA, o que sea una enzima encargada de degradar algunos componentes de la superficie celular para descubrir el receptor para

el DNA. Se requieren tres eventos (separación de las dos hebras del fragmento de DNA, reconocimiento del receptor y penetración) para que se lleve a efecto la integración del ácido nucleico en el cromosoma bacteriano y obtener, finalmente, una célula transformada con nueva información genética.

Otro de los mecanismos de transferencia de material genético es la conjugación, la cual fue descubierta por Lederberg y Tatum (43-76) en Escherichia coli. Durante la conjugación una de las bacterias actúa como donador genético y la otra como recipiente. La capacidad de transferir material genético le es conferida a las bacterias por un elemento conocido como factor F, que se localiza en un plásmido. Este es transmitido únicamente por contacto directo de célula a célula.

El proceso de conjugación ocurre en dos pasos, ambos gobernados por genes del plásmido; en el primero, ocurren una serie de reacciones tanto en la superficie del donador como en la de la célula receptora con el resultado final de la formación de un puente de conjugación en el segundo, el DNA plasmídico pasa a través del puente, para que dar como un elemento genético extracromosómico, que, bajo ciertas condiciones, se puede integrar también al cromosoma.

Finalmente la célula receptora, al adquirir esta nueva informa-ción tiene características queanteriormente no poseía, entre ellas, la capacidad de transferir esta nueva información ya que a adquirido el factor  $F^+$ .

El último de los procesos conocidos involucrados en la transfe-rencia de información genética es la transducción (43-76). En este fe

nómeno un fragmento del cromosoma bacteriano es incorporado dentro de una partícula de bacteriófago. Cuando esta partícula infecta nuevas células huésped, convierte a este último recipiente en un cigoto parcial.

La transducción puede ser generalizada o especializada. En la transducción generalizada, las partículas fágicas transductantes contienen únicamente pequeñas cantidades del DNA del fago; mientras que en la transducción especializada, el fragmento del DNA de la célula huésped que es acarreado, está unido covalentemente a un gran segmento de DNA del fago.

En general, el conocimiento de estos procesos de recombinación de material genético entre bacterias, ha venido a aclarar aspectos relacionados con la alta variación que presentan en sus diversas características; propiedades bioquímicas y otras que no pueden ser explicadas por mutaciones.

## HIPOTESIS

Diversos antecedentes, señalan que ciertas cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli presentan características fermentativas y fisiológicas singulares, que nos sugieren: a) Si realmente Escherichia coli enterotoxigénica presenta propiedades metabólicas particulares, podrían algunas de estas ser utilizadas para realizar su identificación empleando métodos de laboratorio convencionales. b) Las particularidades metabólicas de estas bacterias, serán comunes aún entre cepas aisladas de diferentes áreas geográficas o se presentarán variaciones que pudieran estar relacionadas con las condiciones ecológicas de cada sitio.

En el diagrama 1 se describe el plan de trabajo, con el que se trata de estudiar lo propuesto en la hipótesis de trabajo

### OBJETIVOS

- 1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI DE DIFERENTES FUENTES (PACIENTES, AGUA Y ALIMENTOS).
- 2.- IDENTIFICACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS POR EL METODO DE ASA LIGADA EN CONEJO.
- 3.- ESTUDIO DE ALGUNAS CARACTERISTICAS METABOLICAS, RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS Y DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMICO EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS Y CEPAS NO PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINAS.
- 4.- CORRELACION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN AMBOS TIPOS DE CEPAS.
- 5.- TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMICO DE ALGUNAS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS A UNA CEPA RECEPTORA.
- 6.- ELABORACION DE BIOTIPOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS UTILIZANDO LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS METABOLICAS.
- 7.- COMPARACION ENTRE LOS BIOTIPOS OBTENIDOS EN NUESTRAS CEPAS CON LOS OBSERVADOS POR OTROS INVESTIGADORES.

## MATERIAL Y METODO

### MATERIAL

#### 1.- CEPAS

Se estudiaron 262 cepas de Escherichia coli de las cuales 157 eran de pacientes (del Hospital General Manuel Gea González), 70 aisladas de agua y 35 obtenidas de alimentos (mariscos).

#### CEPAS DE REFERENCIA

Cepas enterotoxigénicas; una de origen humano E. coli H-10407 y otra de origen porcino E. coli 10 p. E. coli K 12 (NaI<sup>r</sup> JM1456).

#### 2.- ANIMALES:

Se emplearon conejos machos Nueva Zelanda blancos de 2.5 a 3.0 kilogramos, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina.

#### 3.- SUEROS (Behring Werke A.G. Marburg Lahn R.F.A.)

Polivalente I (ANTI-OK-B-26,-55,-78,-86,-111,-114,-119)

Polivalente II (ANTI-OK-B-124,-125,-126,-127,-128)

Monovalentes ANTI-026 K60 (B6),-055 K59 (B5),-178 K80 (B-),

-086 K61 (B7),-0111 K58 (B4),-0114 K-(B-),

- 0119 K69 (B14)

ANTI-0124 K72 (B17),-0125 K70 (B15),-0126 K71 (B16),

0127 K63 (B8),-0128 K67 (B12).

#### 4.- MEDIOS DE CULTIVO

##### a) Para AISLAMIENTO

EOSINA AZUL DE METILENO (EMB) (Merck de México).

##### b) IDENTIFICACION

Agar-kigler (Merck), Rojo de metilo Voges-Proskauer ( Merck ),  
Medio de SIM (Merck), Medio de Simmons-agar citrato (Merck).

c) MEDIO PARA CONSERVAR CEPAS:

Tubos inclinados con 2.0% de peptona (Difco laboratorios, Detroit, Mich.), 0.5% NaCl (Merck) y 2.0% de Agar-Agar (Merck).

d) MEDIO PARA LA OBTENCION DE ENTEROTOXINA

Caldo soya tripticaasa (BBL, Becton, Dickinsonand Company), adicionado con 0.6% de Bacto dextrosa (Difco).

e) MEDIO MINIMO (M9)

NH <sub>4</sub> Cl (Merck)	1 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (J.T. Baker)	3 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	6 g.
NaCl (Merck)	0.5 g.
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (J.T. Baker)	0.25 mg/ml. conc. fi
Agua desionizada	1000 ml. naT.

f) MEDIO LURIA

Bacto triptona (Difco)	10 g.
Extracto de Levadura (Difco)	5 g.
Cloruro de sodio (Merck)	10 g.
Agua desionizada	1000 ml.
pH final 7.0	

El medio mínimo y el medio Luria fueron complementados con los siguientes substratos:

1o) CARBOHIDRATOS

Lactosa (Merck): Para el medio mínimo a una concentración final de 0.1%

2o) L-AMINOACIDOS (Merck,Difco)

A una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

3o) BASES:

Timina (Merck)

a) Para el medio Luria a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

b) Para el medio mínimo a una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

4o) VITAMINAS

Tiamina ( $B_1$ ) (Merck)

Para el medio mínimo a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

5o) AGAR AGAR (Merck)

En ambos medios se utiliza una concentración al 2%

g) MEDIOS PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD.

Agar Luria o Mueller Hinton agar (BBL) complementados con el anti-microbiano correspondiente.

Para el sulfametoxazol se utilizó el Medio Mínimo M9

ANTIMICROBIANOS

Ampicilina (SENOSIAIN)	25 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ conc. final	Gentamicina SCHERAMEX)	12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Cefalosporina (Química Hoech)	12.5 a 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ conc. final	Kanamicina (BRISTOL)	12.5 a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Cloramfenicol (PARKE_DAVIS)	25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ conc. final	Ac. Nalidixico (WINTHROP)	50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Estreptomycin (NYETH_VALES)	100-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ conc. final	Nitrofurazona (KRIYA)	50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
		Tetraciclina (Sigma)	25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
		Sulfametoxazol (Roche)	12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

## h) MEDIOS PARA BIOTIPIFICACION

### 1) PRUEBAS DE FERMENTACION:

Medio base caldo Rojo de Fenol (Difco) complementado con 0.5% de cada uno de los siguientes carbohidratos.

Sacarosa, Mio inositol, dulcitol, lactosa, D-Xilosa, D (+) arabinosa (Merck).

Adonitol, D-Sorbitol, Celobiosa, d levulosa, salicina, (+) Trealosa (Difco), D (+) Manosa, D Manitol, D (+) Galactosa (Pfanstiel Laboratories, INC.).

D (+) Rafinosa (Nutritional Biochemicals Corporation)

L (+) Ramnosa (Sigma Chemicals Company).

### 2) PRUEBAS PARA HIDROLISIS O DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS

Medio base caldo de Moller (Difco) con 1% de los aminoácidos.

L (+) Lisina, L Arginina y L Ornitina HCl (Difco).

### 3) HIDROLISIS DEL TWEEN 80

Amortiguador de fosfatos M/15 a pH 7.0 100 ml.

Tween 80 (Nutritional Biochemicals) 0.5 ml.

Rojo Neutro (J.T. Baker) Solución acuosa al 0.1% 2.0 ml.

### 4) HIDROLISIS DEL ALMIDON

Bacto peptona (Difco) 5.0 grs.

Extracto de carne (Difco) 5.0 grs.

Cloruro de sodio 5.0 grs.

Almidon soluble (Merck) 20.0 grs

Agar Agar 20.0 grs.

Agua destilada 1000.0 ml.

ph final 7.2

5) MEDIO PARA DETERMINAR CRECIMIENTO EN CLORURO DE SODIO

Agar nutritivo (Merck) adicionado de Cloruro de sodio a concentraciones de 4.0, 5.0 y 6.0%.

1) AMORTIGUADORES.

a) Amortiguador de Fosfatos M/15

SOLUCION A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck) 9.464 grs.  
previamente secado a  $130^\circ\text{C}$ .

$\text{H}_2\text{O}$  destilada 1000.0 ml.

SOLUCION B

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) 9.073 grs.  
previamente secada a  $110^\circ\text{C}$

Agua destilada 1000.0 ml.

Para obtener la solución a pH 7.0 se mezclan en la siguiente proporción:

Solución A 6.017 ml.

Solución B 4.011 ml.

b) AMORTIGUADOR TE 1X

0.05 M Trizma base (Merck)

0.003 M Sal tetrasódica, etilendiamino tetracético (EDTA) (J.T. Baker)

Ajustada con Acido acético glacial (J.T. Baker) a pH 8.0

c) AMORTIGUADOR BA

0.05 M Trizma base

0.002 M Sal disódica, etilendiamino tetracético

0.02 M Acetato de sodio (J.T. Baker)

0.018 M Cloruro de sodio

Ajustada con Acido acético glacial a pH 8.05

d) AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 8.0

SOLUCION A

0.02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Técnica química)

SOLUCION B

0.02 M.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck)

Para obtener el pH 8.0 se mezclan las dos soluciones en la siguiente proporción

Solución A                      5.3 ml.

Solución B                      94.7 ml.

A esta mezcla se le agregan 100 ml. de Agua destilada

j) SOLUCION NEUTRALIZADORA

Tris - HCl                      1.8 M

Trizma base                    0.2 M.

k) REACTIVOS

a) AGAROSA TIPO III

Para uso en electroforesis (Sigma)

b) ALPHA NAPHTOL (J.T. BAKER)

c) Azul de bromofenol (Merck) en glicerol (J.T. Baker) (0.1 ml. de una solución de azul bromofenol en agua por cada 5 ml. de glicerol).

d) BROMURO DE ETIDIO

1  $\mu\text{g/ml}$ . Concentración final

e) DIMETIL SULFOXIDO (N-N Dimetil formamida J. T. Baker)

f) DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS Sigma) al 10%

g) ETANOL (J.T. Baker)

h) ROJO DE METILO (Matherson Coleman and Beh).

i) LUGOL BACTERIOLOGICO

j) REACTIVO DE KOVACK

## METODO

### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS.

Las cepas, son resembradas en el medio de EMB para purificarlas, y posteriormente se practicaban pruebas bioquímicas utilizando los Medios de Kligler, de Citrato de Simmons, de SIM y del Rojo de Metilo Voges-Proskauer, (84).

Las cepas aisladas e identificadas se guardan en medio para conservación (85).

#### Determinación de Enterotoxigenicidad,

Se utilizó la técnica de asa ligada en conejo (56).

Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelanda, con peso aproximado de 2 a 3 Kg. La anestesia se realizó con Pentotal sódico a la dosis de 3 mg/kg, administrado por vía endovenosa, y se mantuvo con éter etílico por inhalación. La asepsia y antisepsia de la región abdominal se hace con Alkil dimetil bencil amonio (Zolvacsol). Se practica una incisión de aproximadamente 7 cms, de longitud a nivel de la línea media, con bisturí provisto de hoja No. 22 que abarca piel y tejido celular subcutáneo. Una vez expuesta la capa muscular, se corta ésta con tijeras para dejar expuesta la cavidad peritoneal. Se extrae el intestino delgado y se localiza la válvula ileocecal, 7 cm. por arriba de esta se practica una ligadura, utilizando seda (00); a partir de ésta se realizan nuevas ligaduras en íleo y yeyuno dejando un espacio de 10 cm. de longitud y de 3 cms. entre ellas,

En cada conejo se hicieron de 10 a 12 segmentos de 10 cms, y a cada una de éstas porciones se inocularon 2 ml, del filtrado de un culti

vo de bacterias en estudio, además, se emplearon como control positivo el filtrado de una cepa: enterotoxigénica conocida y como control negativo el medio de cultivo estéril sin sembrar, Una vez inoculados todos los segmentos se cerraron por planos. El animal se mantuvo hidratado, en reposo y a una temperatura de 25 a 30°C, durante un período de 18 hrs; al término del cual y previo sacrificio, se reabrió la cavidad abdominal y se observaron los resultados. Se consideraba la prueba positiva cuando el acúmulo de líquido tiene una relación longitud/volumen de entre 0,5 y 1 c.c. tomando en cuenta, también, que el control positivo y negativo dieran el resultado esperado.

#### OBTENCION DEL FILTRADO,

Inicialmente las bacterias en estudio se desarrollaron en un medio de caldo nutritivo durante toda la noche. De cada cultivo se tomaron 0,2 ml. y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml, que contienen 25 a 50 ml, respectivamente de Caldo Soya Tripticasa (58); una vez inoculados se incubaron en agitación en una agitadora Mazzini (W.M. Curtin and Co. Mod. 3623) colocada en un ambiente a 37°C durante 18 a 24 horas. El cultivo obtenido se centrifugó a 4,500 r.p.m. y a 4°C durante 45 minutos, el sobrenadante se esterilizó con filtros Millipore de 0,45 tipo HAWP (Millipore Corporation).

#### ESTUDIO BIOQUIMICO DE LAS CEPAS (Biotipificación)

Se empleó como medio Base Caldo Rojo de Fenol complementada con 0,5% de cada uno de los siguientes carbohidratos (84); Sacarosa, Inositol, Dulcitol, Lactosa, Xilosa, L(+) Arabinosa, Adonitol, D-Sorbitol, Celobiosa, Levulosa, Salicina, Trealosa, Manosa, D-Manitol, D (+)

Galactosa, D Rafinosa, L(+) Ramnosa. Los resultados de estas pruebas fueron leídos a las 3, 24, 48 y 72 horas.

Como medio base para la observación de la hidrólisis y descarboxilación de aminoácidos se utilizó el Caldo de Moller, complementado con L-arginina, Lisina y Ornitina a concentración del 1%. Los resultados fueron leídos a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

#### SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Se practicó la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos tanto de las bacterias que dieron positiva la prueba de enterotoxigenicidad como aquellas que resultaron negativas.

Se utilizó la prueba de difusión en placa (67-82-86), empleando el medio de Agar Luria, Agar Muller Hinton y Medio Mínimo M9; impregnados con los siguientes antimicrobianos, a diferentes concentraciones: ampicilina, ácido nalidixido, cefalosporina, cloranfenicol, estreptomina, gentamicina, kanamicina, nitrofurazona, sulfametoxazol, tetraciclina.

Para esta prueba se preparó un cultivo bacteriológico de 18 horas y se ajustó por medio de diluciones a una densidad equivalente a la de un tubo de McFarland al 0.5% (67-82-86).

De esta dilución se tomó con pipeta 0.1 ml, y se sembró por estufa cerrada, las cajas se incubaron por 24 hrs. a 37°C y se observaron los resultados (inhibición del desarrollo o crecimiento normal de la bacteria).

#### HIDROLISIS DEL TWEEN 80

Para esta prueba se emplea un medio que se prepara en el laboratorio (84). Este es inoculado con un cultivo bacteriano que se deja crecer toda la noche, y se incuba hasta por 5 días para determinar si es positiva o negativa la prueba, lo cual se establece por el cambio de coloración del medio.

#### HIDROLISIS DEL ALMIDON

Este medio también se preparó en el laboratorio (84). El inóculo se prepara igual que en la prueba antes señalada. La lectura de resultados se realiza a las 24 hrs. al agregar al cultivo obtenido una solución diluida de Lugol bacteriológico, determinando por este procedimiento si fue hidrolizado el almidón.

#### CRECIMIENTO EN CLORURO DE SODIO

Se utilizó agar nutritivo con cloruro de sodio a diferentes concentraciones; las cepas a probar se prepararon, también, en un cultivo que desarrolla toda la noche; con éste se inocularon los medios con cloruro de sodio, la lectura de resultados se realizó a las 48 hrs.

#### CARACTERIZACION DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMICO,

Obtención de DNA (87).

Para obtener el DNA es necesario romper la bacteria, la que se cultiva inicialmente, durante 18 horas en Caldo Luria; de este primocultivo, se tomó 1 ml. y se adicionó a un tubo que contenía 9 ml. de Caldo Luria o BHI, los tubos inoculados se incubaron en un baño maría a 37°C y con agitación (New Brunswick Scientific Co. Inc. Model 676), hasta que alcanzan una densidad óptica de 50 a 60 UK (fotocolorímetro Klett-Summer

son Model 800-3).

Una vez completado el desarrollo se centrifuga a 6,000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se resuspende y lava en dos ocasiones con amortiguador TE IX; después de la segunda lavada el sedimento fue re-suspendido con 0,25 ml. del mismo amortiguador añadiéndole además 0,05 ml. de Hidróxido de sodio 1M; se dejó reposar durante 10 minutos para agregarle 0,05 ml. de Dodecil sulfato de sodio al 10%, nuevamente se deja reposar por 10 minutos, al término de este tiempo se agregaron 0,05 ml. de solución neutralizadora. El siguiente paso consistió en incubar los tubos tratados a 45<sup>o</sup>C durante 4,5 horas en baño maría (Thelco, Precision Scientific Co, Model 83 Chicago 60647 U.S.A.). Finalmente estos tubos se colocaron a -20<sup>o</sup>C durante toda la noche.

Para separar el DNA de los restos celulares se descongela a temperatura ambiente el material contenido en los tubos, se decanta tratando de conservar el material de consistencia mucolide y aspecto cristalino, a este material se le agregó una gota de azul de Bromo-Fenol.

ELECTROFORESIS EN GEL (44-87-88).

El lisado bacteriano se somete a electroforesis en geles de agarosa para visualizar el DNA; se emplea Agarosa al 0,8% en amortiguador BA IX. Los geles se preparan en tubos de cristal de 11 x 0,5 cms, cuando se solidifican se uniformizan los extremos y uno de estos se cubre con gasa que se sujeta con un anillo de látex. Preparados los geles se colocan en la Cámara de Electroforesis (fabricación Nacional), llenando depósitos con amortiguador BA IX.

Para el corrimiento electroforético se utilizó una fuente de poder

(Fabricacion Nacional) ajustando la corriente a 50 miliamperes y 40 volts.- En cada gel se colocaron 50 · l de residuo mucoso del lisado y se deja en reposo durante 5 hrs. aproximadamente. Los geles se sacan al concluir este periodo y se colorean colocándolos en tubos que contienen una solución de Bromuro de Etidio.

Para visualizar el material genético se exponen los geles a una lám. para de luz ultravioleta (CHROMATO VUETRANS ILLUMINATOR MOD. C61 111 VOLTS 60HZ 1.47 AMPS) y son fotografiados con Pelicula Tri X Pan Asa 400 con filtro amarillo

#### CONJUGACION BACTERIANA

La cepa receptora (JM1456 NaI<sup>r</sup>), se deja en desarrollo durante toda la noche, y se diluye al 1:50 utilizando caldo Luria para obtener una densidad bacteriana de  $1 \times 10^8$  cels/ml.

La cepa donadora igual que la receptora se deja crecer durante toda la noche. La conjugación se realizó utilizando 4,5 ml del cultivo de la bacteria receptora y 0,5 ml de la donadora, la mezcla se incuba 24 hrs. a 30°C o a 37°C. La suspensión celular es centrifugada a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos; el paquete celular se resuspende en 5 ml, de medio mínimo y nuevamente es centrifugada; finalmente se prepara una suspensión bacteriana que se siembra en cajas de agar con mezcla de antibióticos para realizar la contra selección.

#### MEDIOS PARA CONTRASELECCION

Para este fin se utiliza Agar Luria adfcionado con Acido Nalidixico a una concentración de 40 g/ml y otro de los antimicrobianos a los que nuestra bacteria donadora es resistente; estos antimicrobianos se

utilizan a las mismas concentraciones empleadas en las pruebas de susceptibilidad. En estos medios se siembran las cepas conjugadas, a las 24 horas, las que crecen, son colocadas en cajas con un solo antibiótico. Estas cepas se utilizan posteriormente para las pruebas de fermentación y electroforésis.

#### CARACTERIZACION SEROLOGICA (10)

Se utiliza la prueba de aglutinación en placa; para realizarla las cepas son previamente cultivadas en Medio de Agar Nutritivo; a partir de este desarrollo se toma una colonia y se extiende en forma homogénea sobre un portaobjetos, se coloca a un lado una gota de suero; inicialmente se utilizan los sueros Polivalentes y de acuerdo al resultado se emplean posteriormente los sueros Monovalentes correspondientes, se mezclan el suero y el cultivo bacteriano y se aplica un movimiento rotatorio a la mezcla, la prueba se lee dentro de los dos minutos posteriores. Cuando el resultado no es satisfactorio, se prepara una suspensión del cultivo en solución salina al 0,85% y se calienta durante 30 minutos a 100°C para destruir el Antígeno K y dejar expuesto el Antígeno O; a continuación se siguen los mismos pasos señalados al principio

## RESULTADOS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION:** Se estudiaron 262 cepas de Escherichia coli, 157 aisladas de pacientes, 70 de agua de consumo y 35 de alimentos (Cuadro I).

**ENTEROTOXIGENICIDAD:** De las 262 cepas aisladas 10 dieron positiva la prueba de asa ligada; de estas 7 son de pacientes, 2 de agua y 1 de alimentos. En la figura 1 se muestra una reacción positiva.

**BIOTIPIFICACION:** En este estudio y en los restantes, se utilizaron, además de las 10 cepas enterotoxigénicas aisladas por nosotros, 2 cepas de control. Como puede apreciarse en los cuadros (II, IIA, III, IIIA) la producción de ácido, por fermentación de los carbohidratos utilizados, muestra diferencias apreciables, cuando la lectura se realiza a las 3 horas con respecto a la obtenida en la lectura a las 24 y 48 horas; a las 3 horas, el 100% (12) de las cepas dan positiva la prueba con la arabinosa, en cambio cuando la lectura se realiza a las 24 y 48 hrs., solo el 58.3% (7) de estas dan el mismo resultado; con la celobiosa, también a las 3 horas todas las cepas producen ácido y en la lectura a las 24 y 48 hrs. los resultados son negativos en las 12; en la lectura a las 3 hrs. de la prueba de rafinosa, nuevamente es positiva en el 100% y a las 24 y 48 hrs. solo el 75% da el mismo resultado; con la xilosa y el dulcitol, se aprecia un patron parecido al de los casos anteriores. Los otros carbohidratos utilizados, no dan variación de resultados en las diferentes lecturas. En la prueba de descarboxilación de aminoácidos (Cuadro IV, IVA), se puede observar que la L(+) lisina es utilizada por todas las cepas, la ornitina

por 8 y la arginina solo por 3 (Cuadro V). Los 3 aminoácidos son utilizados por el 16.6% de las cepas, 2 de ellos por el 58.3% y uno solo por el 25% (Cuadro VI). Las pruebas de hidrólisis del Tween 80 y del almidón fueron negativas con todas las cepas. El estudio de tolerancia al Cloruro de sodio mostró que la máxima concentración, soportada por estas cepas, es del 6% con excepción de las denominadas Pol1 P y 1980A que solo crecieron con una concentración del 5%.

Las pruebas de fermentación en las cepas no enterotoxigénicas se muestra en los cuadros (VII, VIIA, VIII, VIIIA). En estos se observa que a diferencia de las cepas enterotoxigénicas, la arabinosa cambió de positiva a las 3 hrs. a negativa a las 24 y 48 hrs. solo en dos de las cepas; la celobiosa dió la prueba positiva en el 69.2% de las cepas a las 3 hrs. y fue negativa en el 100% en las lecturas posteriores; con la rafinosa y el dulcitol se observaron también ligeros cambios de positiva a las 3 hrs. a negativo en las otras lecturas. Con los carbohidratos restantes no se presentan cambios en la lectura. Los resultados de las pruebas de descarboxilación se pueden observar en los Cuadros (IX, IXA). Encontramos que la arginina es el aminoácido más utilizado por estas cepas, la ornitina por el 69.2% y finalmente la lisina 58.3% (Cuadro V), así mismo el 30.7% de las cepas utiliza los 3 aminoácidos 38.4% 2 de los aminoácidos y 30.7% solo uno de estos (Cuadro X). La Hidrólisis del Tween 80 y del almidón, así como la tolerancia al Cloruro de sodio, mostró los mismos resultados que los observados en las cepas enterotoxigénicas.

**SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS:** Los resultados obtenidos en es-

ta parte del trabajo nos señalan que 7 de las cepas enterotoxigénicas (58.3%) son resistentes a la Ampicilina, 4 (33.3%) a la Kanamicina, 2 a la Tetraciclina y una a la Nitrofurazona (Cuadro XI); de las 12 cepas 6 de ellas (50%) son resistentes a 2 antimicrobianos, 3 (25%) a uno y tres de las cepas (25.0%) sensibles. (Cuadro XII).

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en las cepas no enterotoxigénicas señalan que el 30.7% de estas fueron resistentes a la Kanamicina y a la Tetraciclina y el 7.6% a la Ampicilina y Estreptomina (Cuadro XI). De las trece cepas estudiadas una de ellas fue resistente a 4 de los antimicrobianos utilizados, dos a dos o tras 2 a solo uno, las restantes 8 fueron sensibles a todos los antimicrobianos. (Cuadro XIII).

#### MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMICO, ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

El análisis del material genético extracromosómico de las cepas enterotoxigénicas, nos muestra que el número de bandas de DNA varió de 1 a 5 en las diferentes cepas estudiadas, esto puede apreciarse en los Esquemas (2 y 3); en los Cuadros (XIV y XV), se muestra la migración relativa, el peso molecular y número de plásmidos en cada una de las cepas estudiadas.

Las cepas no productoras de enterotoxinas mostraron de 1 a 4 bandas. Esquemas (2, 3, 4), plásmidos, migración relativa y peso molecular de estas cepas se pueden apreciar en los Cuadros (XIV, XV, XVI).

Para calcular la migración relativa y el peso molecular de los plásmidos presentes en las diferentes cepas se utilizó la gráfica de

la figura 2 (B9).

TRANSFERENCIA DE INFORMACION GENETICA. La transferencia de material genético extractomosómico entre algunas de las cepas enterotoxigénicas y una cepa receptora nos mostró el paso de información que codifica para resistencia a los antimicrobianos. (Cuadro XVII).

Por otro lado las pruebas de metabolismo (Fermentación de carbohidratos y Descarboxilación de a.a.), no se modificaron en las transconjugantes, en relación a lo observado en estas pruebas con la cepa receptora (Cuadro XVIII). En el Esquema 5 se observan el número de bandas de DNA que se transfirieron; en el Cuadro (XIX) se muestra número de plásmidos, migración relativa y peso molecular de estos en las cepas transconjugantes.

BIOTIPOS. Con los resultados obtenidos en las pruebas metabólicas (Fermentación de carbohidratos y Descarboxilación de aminoácidos), se elaboraron Esquemas de los Biotipos obtenidos con las diferentes cepas.

Como se puede apreciar en los Cuadros (XX, XXA, XXI, XXIA) las cepas enterotoxigénicas dieron 5 biotipos diferentes y las no enterotoxigénicas 9. Cuando la lectura de resultados de fermentación se hizo desde las 3 horas y 5, 4 y 8 respectivamente cuando la lectura se hizo hasta las 24 horas.

TIPIFICACION SEROLOGICA. A pesar de no contar con un número adecuado de sueros, se realizó aglutinación en placa únicamente de las cepas enterotoxigénicas.

El resultado obtenido muestra que solamente 3 de las 12 cepas pu-

podieron ser tipificadas adecuadamente la 89 P, 91P y 1980A presentando el serotipo -0111-K58-(84), las 9 restantes no aglutinaron con ninguno de los sueros utilizados.

## DISCUSION DE RESULTADOS

La ignorancia, la pobreza y la insalubridad consecuente, presentes en los países en desarrollo, son factores que propician tanto la desnutrición como la propagación de diversas enfermedades infecciosas y, entre éstas, en particular, las diarréicas.

Las enfermedades diarréicas afectan al niño desde el nacimiento, observándose un aumento notable en su incidencia, con el destete (13). Durante este período, el niño queda expuesto a numerosas fuentes de infección a través de los nuevos alimentos que ingiere; al mismo tiempo, en esta época de la vida, se presentan mayores índices de desnutrición, y con ellos se observan cuadros clínicos más graves y prolongados y, consecuentemente la tasa de letalidad es mucho mayor que en los bien nutridos.

En la figura 3, se muestran los datos relacionados con la mortalidad por enfermedades diarréicas en México desde 1931 a 1975 (13). En ésta se pueden observar, que la mayor incidencia se presenta en niños menores de un año y en el grupo de edad de 1 a 4 años; así mismo, la figura 4 nos muestra que en los países en desarrollo el problema es mayor que en los industrializados, en los cuales, en la actualidad el problema es de mínima importancia.

La etiopatogénia de la diarrea es variada, sin embargo, en los países en desarrollo, los colibacilos toxigénicos parecen representar el agente etiológico más común (13,17)

En niños mexicanos con cuadro de diarrea aguda, se ha identificado a E. coli enterotoxigénica como uno de los agentes más comunes, con una frecuencia que varía entre 7 y 47% (Cuadro XXII) (13, 77, 78, 79).

En este trabajo se encontró que la frecuencia de aislamiento de cepas enterotoxigénicas, fue del 3.8%. El bajo número de cepas aisladas se puede deber a dos razones fundamentales: Por un lado la fente de origen de las cepas identificadas fué diverso (Cuadro XXIII); y de las aisladas de seres humanos no fué posible conocer si procedían de sujetos con cuadro clínico característico.

En segundo lugar ha sido señalado por diferentes autores (13, 77, 78, 79), que es importante para aislar e identificar cepas enterotoxigénicas, seleccionar entre 5 y 10 colonias de cada caja en la cual se realizó el primo-aislamiento. En nuestro caso, esto no fué posible porque las bacterias nos fueron proporcionadas ya aisladas e identificadas bioquímicamente, motivo por el cual las cepas que probamos procedían de una sola colonia.

Las dificultades para la identificación de las cepas enterotoxigénicas, se deben a que los procedimientos utilizados, no están al alcance de la mayoría de los laboratorios. Con este antecedente y apoyados por diferentes observaciones (17,19,74,75), se intenta, en este trabajo, realizar la caracterización de cepas productoras de enterotoxinas analizando diversas características y propiedades metabólicas.

Se estudió su capacidad para fermentar carbohidratos y de descarboxilación de aminoácidos, con estos datos obtuvimos perfiles enzimáticos de las cepas toxigénicas, que a continuación discutimos.

En la fermentación de carbohidratos se observó variación de resultados entre las lecturas a las 3 y 24 hrs. más característica en las cepas enterotoxigénicas (Cuadros XXIV y XXIVA) y en particular con arabinosa, celobiosa, dulcitol, rafinosa y trealosa; en la lectura a las 3 hrs. se obtuvo resultado positivo en todas las cepas, negativizándose en algunas en las lecturas posteriores. Con respecto a las cepas no toxigénicas este cambio sólo se apreció con la celobiosa y la rafinosa. Hecho que señala la importancia que tiene realizar la lectura de resultados a partir de las 3 horas y además que este cambio fué más patente en las cepas enterotoxigénicas en las cuales se detectó en un mayor número de carbohidratos. Esta observación nos podría hacer pensar en que estas cepas pueden tener un comportamiento diferente al de las cepas no productoras de enterotoxinas.

Esta apreciación nos sugirió comparar nuestros datos con los reportados por Edwards y Ewing (10) que se muestran en el cuadro XXV.

Encontramos que existen diferencias en cuanto a la fermentación de celobiosa, dulcitol, rafinosa, ramnosa y salicina, cuando la lectura se hace a las 3 horas y con adonitol, arabinosa, rafinosa y sacarosa en la lectura a las 24 y 48 hrs.

En el caso de nuestras cepas no toxigénicas observamos un comportamiento similar al de las cepas productoras de enterotoxinas en la primera lectura, pero fué diferente en la lectura posterior en la que solo se apreciaron diferencias de resultados con un solo carbohidrato. Consideramos que este es un dato más para suponer que realmente presentan características fenotípicas particulares de las cepas enterotoxigé

nicas.

En el estudio de la capacidad para descarboxilar los aminoácidos, también encontramos diferencias entre las cepas productoras de enterotoxina y las que no la producen en particular con la lisina y la arginina. Así mismo en relación con la frecuencia en que se utilizaron los diferentes aminoácidos las productoras de enterotoxinas tuvieron menos variación (Cuadros V, VI y X). Por otro lado con estas pruebas no establecimos diferencias entre lo observado por nosotros y lo referido por Edwards y Ewing.

Además de las pruebas mencionadas, se practicaron otras, como la Hidrólisis del Tween 80, y del almidón; y la tolerancia al Cloruro de Sodio; este tipo de estudios se emplea para la caracterización de V. cholerae y la toxina TL de E. coli (15,17,19), pues se piensa que hay paso de información genética entre estas bacterias; por esta razón consideramos que era importante establecer si se hubiera presentado transferencia de características metabólicas; sin embargo, los resultados fueron negativos tanto con las cepas toxigénicas como con las no productoras de enterotoxinas.

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias entre las cepas enterotoxigénicas y las no productoras de enterotoxinas; aunque en algunos casos estas son mínimas. Consideramos es importante el uso de un gran número de substratos con lo cual se puede lograr una mejor caracterización, además estudiar un mayor número de cepas para establecer la confiabilidad del procedimiento.

El estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos permite seña-

nicas.

En el estudio de la capacidad para descarboxilar los aminoácidos, también encontramos diferencias entre las cepas productoras de enterotoxina y las que no la producen en particular con la lisina y la arginina. Así mismo en relación con la frecuencia en que se utilizaron los diferentes aminoácidos las productoras de enterotoxinas tuvieron menos variación (Cuadros V, VI y X). Por otro lado con estas pruebas no establecimos diferencias entre lo observado por nosotros y lo referido por Edwards y Ewing.

Además de las pruebas mencionadas, se practicaron otras, como la Hidrólisis del Tween 80, y del almidón; y la tolerancia al Cloruro de Sodio; este tipo de estudios se emplea para la caracterización de V. cholerae y la toxina TL de E. coli (15,17,19), pues se piensa que hay paso de información genética entre estas bacterias; por esta razón consideramos que era importante establecer si se hubiera presentado transferencia de características metabólicas; sin embargo, los resultados fueron negativos tanto con las cepas toxigénicas como con las no productoras de enterotoxinas.

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias entre las cepas enterotoxigénicas y las no productoras de enterotoxinas; aunque en algunos casos estas son mínimas. Consideramos es importante el uso de un gran número de sustratos con lo cual se puede lograr una mejor caracterización, además estudiar un mayor número de cepas para establecer la confiabilidad del procedimiento.

El estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos permite seña-

lar que la resistencia a los mismos, ha adquirido enorme importancia en los últimos años, la que está íntimamente relacionada con el uso de los agentes antimicrobianos; en el Cuadro XXVI (81) se muestra la frecuencia de resistencia en relación con el consumo de estos fármacos la más alta proporción de resistencia es para aquellos antimicrobianos que se consumieron en mayor cantidad. En nuestro trabajo encontramos que tanto las cepas enterotoxigénicas y las no enterotoxigénicas presentaron resistencia a algunos de los antimicrobianos de uso común en nuestro país (Cuadro XI). Este hecho nos parece de la mayor importancia, debido fundamentalmente a que en la mayoría de los niños con diarrea, al no identificarse el agente etiológico, frecuentemente son tratados con antimicrobianos, y si el microorganismo causal es resistente a éstos, el cuadro diarreico no mejora y, si por el contrario, se puede agravar.

En relación estrecha con las cepas resistentes de E. coli, se ha observado, en estudios realizados con animales alimentados con productos complementados con antimicrobianos, que se incrementa la frecuencia de aislamiento de cepas enterotoxigénicas (92), lo que probablemente también repercuta sobre el huésped humano.

Diferentes grupos han realizado estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas productoras de enterotoxinas (81,83); los resultados reportados son similares a los observados por nosotros.

Tomando en cuenta que en los plásmidos encargados de la expresión de enterotoxinas pueden encontrarse genes responsables de la resistencia a antimicrobianos, (49,81,82,93) se plantea la posibilidad de rea

lizar la caracterización de bacterias productoras de enterotoxinas por su capacidad de resistir la acción de los antimicrobianos; aunque esto no es del todo específico si se podría utilizar como un parámetro más, ya que hemos observado que entre las cepas enterotoxigénicas y las no enterotoxigénicas estudiadas se presentan patrones de resistencia diferentes. (Cuadros XII, XIII).

El estudio del material genético extracromosómico por electroforé<sup>u</sup>sis en gel lo realizamos como punto de referencia para efectuar el seguimiento epidemiológico de las bacterias en relación a su capacidad para portar cierto tipo de material genético y su asociación con el grado de virulencia. Los resultados obtenidos señalan que, en general, las cepas enterotoxigénicas portan un mayor número de plásmidos comparativamente con las no enterotoxigénicas, en las que se observan diferencias en el número y características de los mismos (Esquemas 2,3,4). Sin embargo, las cepas productoras de enterotoxinas (76P y 1980A) no mostraron la presencia de plásmidos, lo que no resulta congruente, pues por lo menos deben presentar uno que sería el encargado de la expresión de la toxina. Creemos que esto se puede deber a fallas en el procedimiento de extracción o al enmascaramiento de plásmidos por la banda de DNA cromosomal, ya que en el estudio realizado con las transconjugantes se apreciaba una banda apenas perceptible.

Por otro lado, dos de las cepas no productoras de enterotoxina (29A y 79A) presentaron un plásmido que fué compartido con las cepas enterotoxigénicas.

La cepa 29A, además, mostró características metabólicas similares a la cepa enterotoxigénica 91P.

Se menciona, que los plásmidos Ent, frecuentement son acompañados por otros plásmidos, los cuales son poco comunes o ausentes en cepas de E. coli aisladas de individuos asintomáticos o que proceden de otras fuentes (90), esto nos podría explicar la diferencia en el número y características de los plásmidos de los diferentes tipos de cepas estudiadas. La presencia de material genético extracromosómico en la mayoría de las cepas estudiadas y los datos referentes a la resistencia a los antimicrobianos de las mismas, nos dan bases para asegurar que se realiza intercambio a alta frecuencia de material genético.

Se realizó el estudio de conjugación tratando de establecer que plásmidos, presentes en algunas de las cepas enterotoxigénicas, se podían transferir. Se logró la transferencia de diferentes plásmidos, pero aparentemente el encargado de la producción de la toxina no se transfirió, esto se explica porque no todos los plásmidos son transferibles (91) y por otro lado que se requiere cubrir ciertos requisitos para que el fenómeno se presente; entre los que se puede señalar la capacidad del plásmido para transferirse, el tipo de cepa que lo posee y además la cepa receptora; ha sido observado en caso de E. coli que este proceso se efectúa a más alta frecuencia cuando se utiliza cepas de E. coli K 12. Sólo se logró determinar que los plásmidos encargados de la resistencia a antimicrobianos se transfirieron pues las cepas transconjugantes fueron capaces de crecer en los medios con mezcla de antibióticos; en el Esquema 5 se muestran las geles de las cepas donadoras y transconjugantes, pudiéndose apreciar los plásmidos que se transfirieron; en los Cuadros XXVII A y XXVII B se muestran el número de plásmidos, su

migración relativa y su peso molecular. Este tipo de estudios de transferencia nos ayudan a conocer, en forma general, para que codifican los diferentes plásmidos, para sí poder efectuar un control posterior de las cepas portadoras.

Relacionado con el estudio serológico de E. coli, ya se ha mencionado anteriormente, que las cepas enterotoxigénicas se pueden agrupar en un restringido número de serogrupos (53,54,57); en el Cuadro XXVIII se muestran algunos de los más frecuentes. En nuestro trabajo la caracterización por este procedimiento no se logró realizar en virtud del limitado número de sueros que poseemos, hecho que no permite realizar la caracterización completa.

Las cepas que se logró agrupar pertenecen al serotipo O111 K58 (B4) el cual no se encuentra incluido en el Cuadro XXVIII. Creemos que es importante valorar si este tipo de estudios pueden ser realizados por laboratorios con escasos recursos en los cuales, se carece de todos los sueros necesarios y por otro lado, que es imprescindible el estudio de las cepas más comunes en cada área geográfica, ya que esto disminuiría el gasto, al probar sólo los tipos de sueros más frecuentes.

Por último, quisiera señalar la importancia de las pruebas de fermentación y descarboxialción, para la elaboración de biotipos, procedimiento que se está tratando de reimplantar para la caracterización de diferentes bacterias (73,74,75). Con respecto a las cepas enterotoxigénicas, diferentes investigadores han realizado su estudio bioquímico, como un procedimiento complementario (68,69,71).

En nuestro trabajo se determinaron cinco biotipos diferentes con

las cepas enterotoxigénicas y nueve en las no toxigénicas no existiendo entre ambos tipos de cepas correspondencia de biotipo lo cual nos dá cierto apoyo para pensar que pueden existir biotipos característicos de las cepas enterotoxigénicas.

En los biotipos de nuestras cepas enterotoxigénicas y los reportados por otros autores, (68,69,71), que se muestran en los cuadros XXIX, XXX,XXXI, y los substratos utilizados en cada uno de los casos varían, esto nos sugiere que cada investigador realiza las pruebas que le aportan mayores datos. Lo cual ha impedido una comparación de datos; sin embargo, en los casos en los que fué factible, encontramos correlación entre nuestros resultados y los de estos autores.

CUADRO I

NUMERO Y ORIGEN DE LAS BACTERIAS ESTUDIADAS

---

PACIENTES (Coprocultivo)	P	157
Agua	A	70
Alimentos (Mariscos)	M	35
Total		262

---

Clave de identificación. P = paciente  
A = agua  
M = alimentos

CUADRO I

NUMERO Y ORIGEN DE LAS BACTERIAS ESTUDIADAS

---

PACIENTES (Coprocultivo)	P	157
Agua	A	70
Alimentos (Mariscos)	M	35
Total		262

---

Clave de identificación. P = paciente  
 A = agua  
 M = alimentos

CUADRO II

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE PACIENTES)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
**Po11 P	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
89 P	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
33 P	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
83 P	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
76 P	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
91 P	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
191 P	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
46 P	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+

Abreviaturas: ADO = adonitol ARA = arabinosa, CEL = celobiosa, RAF = rafinosa, RAM = ramnosa  
SAC = sacarosa, SAL = salicina, TRE = trealosa, XIL = xilosa, DUL = dulcitol

\* Lectura de resultados a las 3 horas

\*\* Cepa de Referencia H10407

CUADRO IIA

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE PACIENTES)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
Poli P	+	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-
89 P	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
33 P	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
83 P	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
76 P	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
91 P	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
191 P	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
46 P	-	+	-	+	-	+	(+)	+	+	+

\* Lectura de resultados a las 24 y 48 horas,<sup>11</sup>

(+) Positivo hasta las 48 horas,<sup>11</sup>

CUADRO III

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA, ALIMENTOS Y DE ORIGEN ANIMAL).  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
46 A	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1980 A	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
15 M	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
** CERDO	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+

\*Lectura de resultados a las 3 horas

\*\*Cepa de referencia 10P

CUADRO IIIA

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA, ALIMENTOS Y DE ORIGEN ANIMAL)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
46 A	-	+	-	+	-	+	(+)	+	+	+
1980 A	+	-	-	-	(+)	-	(+)	+	-	-
15 M	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
CERDO	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+

\* Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas

(+) Positivo hasta las 48 horas

CUADRO IV

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE PACIENTES)  
DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS\*

CEPA	ARG	LIS	ORN
Po11 P	(+)	+	-
89 P	(+)	+	+
33 P	(+)	+	+
83 P	-	+	-
76 P	-	+	-
91 P	-	+	+
191 P	-	+	(+)
46 P	-	+	+

Abreviaturas: ARG = arginina, LIS = lisina,  
ORN = ornitina.

+ = Positivo desde las 24 horas

- = Negativo

(+) = Positivo después de 48 horas.

\* = Lectura de Resultados hasta las 120 hrs.

CUADRO IVA

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA, ALIMENTOS Y DE ORIGEN ANIMAL)  
DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS\*

CEPA	ARG	LIS	ORN
46 A	-	+	+
1980 A	-	+	-
15 M	-	+	+
CERDO	-	+	+

\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

CUADRO V

FRECUENCIA DE DESCARBOXILACION (%) DE AMINOACIDOS  
EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS Y NO ENTEROTOXIGENICAS

AMINOACIDOS	NUMERO DE CEPAS POSITIVAS (%)	
	ENTEROTOXIGENICAS	NO ENTEROTOXIGENICAS
ARGININA	3 (25)	10 (76.9)
LISINA	12 (100)	7 (53.8)
ORNITINA	8 (66.6)	9 (69.2)

CUADRO VI

UTILIZACION DE AMINOACIDOS POR CEPAS ENTEROTOXIGENICAS

AMINOACIDOS	No. CEPAS	(%)
ARG, LIS, ORN	2	16.6
ARG, LIS	1	8.3
LIS, ORN	6	50.0
LIS	3	25.0

CUADRO VII

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA Y DE PACIENTES)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
23 A	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
29 A	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
77 A	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
79 A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
163 P	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
195 P	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
212 P	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
1055 P	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+

\* Lectura de Resultados a las 3 horas.

CUADRO VIIA

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA Y DE PACIENTES)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
23 A	-	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+
29 A	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
77 A	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
79 A	-	+	-	-	+	-	(+)	-	+	+
163 P	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
195 P	-	+	-	+	(+)	-	-	+	+	+
212 P	-	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+
1055 P	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-

\* Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.

(+) Resultado positivo a las 48 horas.

CUADRO VIII

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE ALIMENTOS)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
18 M	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
34 M	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
41 M	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
61 M	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
64 M	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+

\* Lectura de Resultados a las 3 horas.

CUADRO VIII A

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE ALIMENTOS)  
\*FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	DUL
18 M	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
34 M	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
41 M	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
61 M	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
64 M	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-

\* Lectura de Resultados a las 24 y 48 horas.

CUADRO IX

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE AGUA Y DE PACIENTES)  
\*DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS

CEPA	ARG	LIS	ORN
23 A	(+)	-	-
29 A	-	+	+
77 A	(+)	-	+
79 A	(+)	-	+
163 P	(+)	+	+
195 P	(+)	(+)	-
212 P	(+)	+	+
1055 P	(+)	+	+

\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

CUADRO IXA

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS  
(AISLADAS DE ALIMENTOS)  
\*DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS

CEPA	ARG	LIS	ORN
18 M	(+)	+	+
34 M	(+)	-	-
41 M	-	+	-
61 M	(+)	-	(+)
64 M	-	-	(+)

\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

CUADRO X

UTILIZACION DE AMINOACIDOS POR CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS

AMINOACIDOS	No. CEPAS	(%)
ARG, LIS, ORN	4	30.76
ARG; LIS	1	7.6
LIS, ORN	1	7.6
ARG    ORN	3	23.0
ARG	2	15.3
LIS	1	7.6
ORN	1	7.6

CUADRO XI

COMPARACION DE % DE RESISTENCIA A AGENTES ANTI-MICROBIANOS ENTRE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS Y NO ENTEROTOXIGENICAS.

AGENTE ANTIMICROBIANO	PORCIENTO DE CEPAS RESISTENTES	
	ENTEROTOXIGENICAS	NO ENTEROTOXIGENICAS
Ampicilina	58.3 (7)	7.6 (1)
Kanamicina	33.3 (4)	30.7 (4)
Tetraciclina	16.6 (2)	30.7 (4)
Nitrofurazona	8.3 (1)	0
Estreptomicina	0	7.6 (1)

CUADRO XII

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS CEPAS  
ENTEROTOXIGENICAS

---

CEPA				
33 P	Ap	Km		
46 P	Ap	Km		
46 A	Ap	Km		
15 M	Ap	Km		
83 P	Ap	Km		
CERDO			Nit	Tc
89 P	Ap			
91 P	Ap			
191 P				Tc

---

ABREVIATURAS: Ap = Ampicilina; Gm = Gentamicina; Km = Kanamicina  
Nit = Nitrofurazona; Tc = Tetraciclina.

CUADRO XIII

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS CEPAS  
NO ENTEROTOXIGENICAS

---

CEPA	Ap	Km	Sm	Tc
29 A	Ap	Km	Sm	Tc
18 M		Km		Tc
1055 P		Km		Tc
195 P				Tc
93 M		Km		

---

CUADRO XIV

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
Y NO ENTEROTOXIGENICAS

CEPA	PLASMIDO	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS x 10 <sup>7</sup>
33 P	A	0.28	-
	B	0.57	8.1
	C	0.71	5.2
46 P	A	0.50	9.6
	B	0.57	8.0
	C	0.64	6.3
	D	0.78	4.0
	E	1.42	.74
76 P	-	-	-
89 P	A	0.57	8.0
	B	0.71	5.2
	C	2.0	.62
83 P	A	0.46	23.0
	B	0.53	8.8
	C	1.6	.68
CERDO	A	0.53	8.8
	B	2.69	-
	C	3.46	-
46 A	A	0.50	9.6
	B	0.57	8.0
	C	0.64	6.3
79 A	A	0.5	9.6
	B	0.57	8.0
	C	0.71	5.2
29 A	A	0.46	23.0
	B	0.60	7.2
	C	0.66	5.8
	D	0.86	2.4
JM1456	Cepa sin plásmidos		

CUADRO XV

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
Y NO ENTEROTOXIGENICAS

CEPA	PLASMIDO	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS x 10 <sup>7</sup>
15 M	A	0.56	7.64
	B	0.68	5.8
	C	0.75	4.7
K 88	-	-	-
46 A	A	0.61	7.0
	B	0.69	5.5
	C	0.76	4.4
	D	1.3	.8
POLI P	A	0.53	9.4
33 P	A	0.69	7.0
	B	0.73	4.7
46 P	A	0.69	7.0
	B	0.66	5.8
	C	0.8	3.7
191 P	A	0.66	5.8
91 P	A	0.58	7.5
	B	0.70	5.2
*65 M	A	0.78	4.1
	B	1.92	.63
	C	4.14	-

\*\* JM1456

\* Cepa no enterotoxigénica

CUADRO XVI

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS

CEPA	PLASMIDOS	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS $\times 10^7$
1055 P	A	0.4	-
	B	1.6	.67
	C	3.0	-
93 M	A	0.4	-
	B	0.6	7.2
76 M	A	0.2	-
	B	4.0	-
82 A	-	-	-
18 M	-	-	-
79 A	A	0.4	-
	B	0.53	8.4
	C	0.6	7.2
	D	4.2	-
23 A	A	0.4	-
	B	4.3	-
10 M	-	-	-
*JM1456	-	-	-

\* Cepa receptora

CUADRO XVII

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS  
EN CEPAS TRANSCONJUGANTES\*

CEPA			
33 P Conj.	Ap	Km	Na1
46 P Conj.	Ap	Km	Na1
46 A Conj.	Ap	Km	Na1
15 M Conj.	Ap	Km	Na1
CERDO Conj			Tc Na1
191 P Conj.			Tc Na1
1980 A Conj.			Na1
Poll P Conj.			Na1

\* Cepa Receptora JM1456  
Cepas donadoras Enterotoxigénicas

CUADRO XVIII

REACCIONES BIOQUIMICAS EN CEPAS TRANSCONJUGANTES  
FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

CEPA	ADO	ARA	CEL	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	XIL
Po11 P	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
33 P	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
191 P	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
46 P	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
46 A	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
1980 A	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
15 M	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
CERDO	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+
*JM1456	-	-	-	+	-	+	-	(+)	+

\*JM1456 Cepa Receptora  
(+) Positivo a las 48 horas.

CUADRO XIX

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS TRANSCONJUGANTES

CEPA	PLASMIDOS	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS x 10 <sup>7</sup>
46 P	A	0.55	8.82
	B	0.66	7.0
	C	1.1	0.97
191 P	A	0.5	9.64
	B	1.05	.47
33 P	A	0.55	8.82
CERDO	A	0.5	9.64
46 A	A	0.55	8.82
	B	0.66	7.0
15 H	A	0.55	8.82
Po11 P	-	-	-
1980 A	-	-	-
33 P	A	0.29	-
	B	0.52	9.1
	C	0.70	5.2
	D	0.82	3.5
*JM1456	-	-	-

\* Cepa Receptora

CUADRO XX

BIOTIPOS OBTENIDOS EN LAS CEPAS ENTEROTOXIGENCIAS, DE  
ACUERDO A SU CAPACIDAD PARA FERMENTAR CARBOHIDRATOS\*  
Y PARA DESCARBOXILAR AMINOACIDOS\*\*

BIOTIPO	FERMENTACION DE:										DESCARBOXILACION DE:		
	ADO	ARA	CEL	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	ARG	LIS	ORN
1 n=3	+	+	+	+	+	(+)	-	(+)	+	+	(P)	+	X
2 n=2	-	+	+	+	+	(D)	+	-	+	+	(+)	+	+
3 n=2	-	+	+	+	+	+	+	(D)	+	+	-	+	-
4 n=3	-	+	+	+	+	-	+	(P)	+	+	-	+	+
5 n=2	-	+	+	+	+	+	+	(D)	+	+	-	+	+

\* Lectura de Resultados desde las 3 horas

\*\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

(P) Positivo retardado algunas cepas negativo

X Negativo algunas cepas positivo

(D) Reacción variable

(+) Positivo retardado.

CUADRO XXA

BIOTIPOS OBTENIDOS EN LAS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS, DE ACUERDO A SU CAPACIDAD PARA FERMENTAR CARBOHIDRATOS\* Y PARA DESCARBOXILAR AMINOACIDOS\*\*

BIOTIPO	FERMENTACION DE:										DESCARBOXILACION DE:		
	ADD	ARA	CEL	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	ARG	LIS	ORN
1 n=2	+	-	-	-	-	(+)	-	(+)	+	-	*(D)	+	-
2 n=4	-	+	-	+	+	-	+	*(D)	+	+	*(D)	+	+
3 n=2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	*(D)	+	+
4 n=3	-	+	-	+	+	+	+	X	+	+	-	+	X
5 n=1	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	(+)

\* Lectura de Resultados a partir de las 24 horas.

\*\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

X Tardía o negativa.

(D) Reacción variable.

CUADRO XXI

BIOTIPOS OBTENIDOS EN LAS CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS, DE  
ACUERDO A SU CAPACIDAD PARA FERMENTAR CARBOHIDRATOS\* Y  
PARA DESCARBOXILAR AMINOACIDOS\*\*

BIOTIPO	FERMENTACION DE:										DESCARBOXILACION DE:		
	ADO	ARA	CEL	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	ARG	LIS	ORN
1 n=2	-	+	(D)	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+
2 n=2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	(+)	(+)	(D)
3 n=2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	(D)	+
4 n=2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	(D)	(P)
5 N=1	-	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	-	-
6 n=1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
7 n=1	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	+
8 n=1	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	(+)	-	(+)
9 n=1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	-	-

\* Lectura de Resultados desde las 3 horas.

\*\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

(D) Reacción variable

(P) Positivo retardado o negativo

(+) Positivo retardado

CUADRO XXIA

BIOTIPOS OBTENIDOS EN LAS CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS, DE  
ACUERDO A SU CAPACIDAD PARA FERMENTAR CARBOHIDRATOS\* Y  
PARA DESCARBOXILAR AMINOACIDOS\*\*

BIOTIPO	FERMENTACION DE:										DESCARBOXILACION DE:		
	ADO	ARA	CEL	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	TRE	XIL	ARG	LIS	ORN
1 n=3	-	+	-	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)*	(D)*
2 n=2	-	(D)*	-	-	+	+	+	-	+	+	(+)	(+)*	+
3 n=2	-	+	-	(D)*	-	+	-	+	+	+	-	(+)*	(X)*
4 n=2	-	+	-	+	(D)*	(+)	-	-	+	+	(+)	(+)	(D)*
5 n=1	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
6 n=1	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	+
7 n=1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	(+)	-	(+)
8 n=1	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	(+)	-	-

\* Lectura de Resultados a partir de las 24 horas.

\*\* Lectura de Resultados hasta las 120 horas.

X Negativo algunas cepas positivo  
(D) Reacción variable  
(+) Positivo retardado

CUADRO XXII

GERMENES ENTEROPATOGENOS ENCONTRADOS EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS, ESTUDIADOS EN LA CIUDAD DE MEXICO, EN DIFERENTES AÑOS.

(Frecuencia Expresada en %)

FECHA DEL ESTUDIO	CONDICION CLINICA (No. de casos)	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS			
		Rotavirus	E. coli toxigénica	EPEC <sup>a</sup>	AGENTES CLASICO <sup>b</sup>
1974 (Julio-Octubre)	Con Diarrea (50)	- c	16	18	28
	Sin Diarrea (50)	-	2	0	2
1975 (Abril-Septiembre)	Con Diarrea (62)	26	47	24	18
	Sin Diarrea (0)	-	-	-	-
1976-1977 (Todo el año)	Con Diarrea (340)	17	7	-	29
	Sin Diarrea (98)	3	4	-	0

a = Serotipos enteropatógenos de *E. coli*

b = *Shigella*, *Salmonella*, *E. histolytica*, *G. lamblia*

c = No se estudió

Tomada de: Diarte, J.: Avances en el Conocimiento de la Etiopatogenia de las Diarreas: *Analectas de Medicina Mexicana* 2; Academia Nacional de Medicina, México, 1981. pp. 7-34.

CUADRO XXIII

CEPAS ENTEROTOXIGENICAS IDENTIFICADAS  
NUMERO Y ORIGEN

ORIGEN	NUMERO DE CEPAS ESTUDIADAS	CEPAS ENTEROTOXIGENICAS	%
Paciente	157	7	4.5
Agua	70	2	2.8
Alimentos	35	1	2.8
Total	262	10	4.0

CUADRO XXIV

FRECUENCIA DE FERMENTACION (%) DE CARBOHIDRATOS\*  
 POR CEPAS ENTEROTOXIGENICAS Y NO ENTEROTOXIGENICAS

CARBOHIDRATO	NUMERO DE CEPAS POSITIVAS (%)	
	ENTEROTOXIGENICAS	NO ENTEROTOXIGENICAS
Adonitol	1 (8.33)	0 (0)
Arabinosa	12 (100)	11 (84.6)
Celobiosa	12 (100)	9 (69.2)
Dulcitol	12 (100)	9 (69.2)
Rafinosa	12 (100)	10 (79.6)
Ramnosa	5 (41.6)	3 (23.0)
Sacarosa	6 (50.0)	4 (30.7)
Salicina	1 (8.33)	1 (7.6)
Trealosa	12 (100)	12 (92.3)
Xilosa	12 (100)	9 (69.2)

\* Lectura de Resultados a las 3 horas.

CUADRO XXIVA

FRECUENCIA DE FERMENTACION (%) DE CARBOHIDRATOS\*  
 POR CEPAS ENTEROTOXIGENICAS Y NO ENTEROTOXIGENICAS

CARBOHIDRATO	NUMERO DE CEPAS POSITIVAS (%)	
	ENTEROTOXIGENICAS	NO ENTEROTOXIGENICAS
Adonitol	3 (25)	1 (7.6)
Arabinosa	7 (58.3)	10 (76.9)
Celobiosa	0 (0)	0 (0)
Dulcitol	7 (58.3)	8 (61.5)
Rafinosa	9 (75.0)	7 (53.8)
Ramnosa	8 (66.6)	13 (100)
Sacarosa	9 (75.0)	6 (46.1)
Salicina	6 (50.0)	7 (53.8)
Trealosa	12 (100)	12 (92.3)
Xilosa	8 (66.6)	13 (100)

\* Lectura de Resultados a las 24 y 48 hrs.

CUADRO XXV

RESUMEN DE REACCIONES BIOQUIMICAS  
(FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS Y DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS)  
DE ESCHERICHIA COLI

NUMERO DE CEPAS ESTUDIADAS

SUBSTRATO	RESULTADO	1021		210		
		%+	(%+)*	RESULTADO	%+	(%+)*
Adonitol	-	4.7	(0.4)	d	10	(1.9)
Arabinosa	+	100		+	99	(0.5)
Celobiosa	-	3.3	(3.3)	d	1.9	(9.1)
Dulcitol	d	38.1	(17.9)	d	59.5	(12.4)
Rafinosa	d	53.9	(0.5)	d	42.4	(2.4)
Ramnosa	d	74		+ o (+)	88	(5.3)
Sacarosa	d	51.3	(5.3)	d	37.1	(7.2)
Salicina	d	37.1	(13.2)	d	53.8	(17.7)
Trealosa	+	98.4		+	99	(1)
Xilosa	d	69.7	(11.5)	+	95.1	(2)
Lisina	d	87.9	(1.2)	+	90.5	
Arginina	d	17.2	(44.8)	d	18.6	(5.2)
Ornitina	d	63.4	(7.1)	d	66.2	(1)

Tomado de EDWARDS P.R. and EWING W.H. IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE  
BURGESS PUBLISHING COMPANY.

+ 90% o más positivas entre 1 ó 2 días de incubación

(+) Reacción positiva después de 3 días o más

- Sin reacción (90% o más)

+ δ - Mayoría de las cepas positivas algunos cultivos negativos

- δ + Mayoría de las cepas negativas algunos cultivos positivos

d Diferentes reacciones +, (+), -

CUADRO XXVI

RELACION ENTRE CONSUMO DE ANTIBIOTICOS Y CEPAS RESISTENTES

ANTIBIOTICO	CONSUMO EN MEXICO 1977 (TONS)	CEPAS RESISTENTES (%)*
Tc	134	86.5
Su	111	70.8
Ap	101	63.7
Cb	0.3	55.0
Sm	133*	54.1
Ce	15	36.1
Kn	133*	35.6
Cm	85	45.2
Nx	20	9.6
Rif	5	4.0
Gm	0.55	2.2

\* Basada en el número total de cepas estudiadas: 295 E. coli, 198 Proteus mirabilis

63 Proteus indol positivo y 39 Salmonella sp.

\*\* Consumo total de Sm, Kn y Neomicina

Fuente: MOLECULAR BIOLOGY, PATHOGENICITY, AND ECOLOGY OF BACTERIAL PLASMIDS

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF GRAM NEGATIVE BACTERIA EN MEXICO:

RELATIONSHIP TO DRUG CONSUMPTION

YANKEL M. KOPERSZTOCH-PORTNOY

EDIT. STUART B. LEVY, ROYSTON C. CLOWES 1981

CUADRO XXVII

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS TRANSCONJUGANTES  
Y DONADORAS.

CEPA	PLASMIDOS	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS x 10 <sup>7</sup>
46 P Conj.	A	0.55	8.82
	B	0.66	7.0
46 P Don.	A	0.44	29.0
	B	0.55	8.82
	C	0.66	7.0
	D	0.77	4.4
	E	1.33	0.78
191 Conj.	A	0.55	8.82
191 Don.	A	0.55	8.82
33 P Conj.	A	0.55	8.82
33 P Don.	A	0.56	8.0
	B	0.69	5.76
CERDO Conj.	A	0.5	9.6
CERDO Don.	A	0.56	8.0
	B	2.75	-
	C	3.43	-
46 A Conj.	A	0.55	8.82
	B	0.66	7.0
46 A Don.	A	0.53	8.8
	B	0.61	7.0
	C	0.69	5.76

CUADRO XXVII CONT.

MIGRACION RELATIVA Y PESO MOLECULAR  
DE PLASMIDOS EN CEPAS TRANSCONJUGANTES  
Y DONADORAS

CEPA	PLASMIDOS	MIGRACION RELATIVA (cm)	PESO MOLECULAR DALTONS x $10^7$
15 M Conj.	A	0.5	9.6
15 M Don.	A	0.58	7.5
	B	0.64	6.3
	C	0.76	4.3
Pol1 P Don.	A	0.56	8.0
Pol1 P Conj.	-	-	-
*JM1456	-	-	-
33 P	A	0.29	-
	B	0.53	8.8
	C	0.70	5.2
	D	0.82	3.5

CUADRO XXVIII

SEROGRUPOS DE Escherichia coli ASOCIADOS CON CUADROS DIARREICOS

TIPO	SEROGRUPO O	SUJETOS QUE AFECTA	MECANISMOS DE PATOGENICIDAD
ENTEROTOXIGENICO	6,8,16,25,27,78, 148,159	Niños y Adultos	Enterotoxinas (TL, TE)
ENTEROINVASIVO	28ac,112ac,115 124, 136,143, 144, 147, 152	Adultos y Niños	Penetración de células epite- liales
ENTEROPATOGENO	26, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128,142	Niños (rara en Adultos)	Desconocido

MANUAL OF CLINICAL  
MICROBIOLOGY  
THIRD EDITION 1980

CUADRO XXIX

BIOTIPOS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
 MICHAEL H. MERSON, et al.  
 INFECTION AND IMMUNITY, Feb. 1979, p. 325-329

CEPA	FERMENTACION DE:							DESCARBOXILACION DE:		
	ADO	DUL	LAC	MAL	RAM	SAC	SORBI	SORBO	XIL	ORNITINA
1"	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2"	-	X	+	+	+	+	+	-	+	-
3"	-	-	+	+	+	X	+	-	+	D
4"	-	-	+	+	+	+	-	-	+	D
5"	-	-	+	+	D	-	-	-	+	-
6"	+	-	+	+	+	-	D	-	-	-
7"	-	+	+	+	+	X	+	+	+	+

D Diferentes reacciones con diferentes cepas

X Tardfa o negativa

CUADRO XXX

BIOTIPOS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
 H. R. SMITH, et al.  
 FEMS Microbiology Letters 6 (1979) 255-260

CEPA	DESCARBOXILACION DE:		UTILIZACION			FERMENTACION DE:				
	LISINA	ORNITINA	MUCATE	ADO	DUL	RAF	SAL	SOR	SAC	XIL
1 <sup>'''</sup>	+	-	-	+	-	-	(+)	-	-	-
2 <sup>'''</sup>	+	-	+	+	+	+	(+)	-	+	+
3 <sup>'''</sup>	+	+	+	-	+	+	(+)	+	(+)	+
4 <sup>'''</sup>	+	+	-	-	+	+	(+)	+	+	+
5 <sup>'''</sup>	+	+	+	-	(+)	+	(+)	-	+	+
6 <sup>'''</sup>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
7 <sup>'''</sup>	+	+	+	-	(+)	+	-	-	+	+
8 <sup>'''</sup>	+	+	+	-	-	+	(+)	+	+	+
9 <sup>'''</sup>	-	+	+	-	(+)	+	-	-	+	+

+ Positivo en uno ó dos días  
 (+) Reacción positiva dilatada  
 - Negativo

CUADRO XXXI

BIOTIPOS CEPAS ENTEROTOXIGENICAS  
 M, HENRIQUETA L. REIS, et al.  
 INFECTION AND IMMUNITY, Abr. 1980, p. 24-27

FERMENTACION DE:

CEPA

	ADO	CELO	DUL	RAF	RAM	SAC	SAL	XIL
1 <sup>a</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+
2 <sup>a</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+
3 <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+
4 <sup>a</sup>	+	-	-	D	D	-	+	+
5 <sup>a</sup>	-	-	+	+	+	+	-	-
6 <sup>a</sup>	+	-	-	-	+	-	-	+
7 <sup>a</sup>	-	D	+	+	+	+	+	+
8 <sup>a</sup>	-	D	-	+	+	+	(+)	+

D Diferentes reacciones con diferentes cepas

(+) Positivo después de 3 días

ESQUEMA 1

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS

TOMA DE PRODUCTOS

PACIENTES

AGUA

ALIMENTOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE E. coli  
Medios diferenciales                      Pruebas bioquímicas

IDENTIFICACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS

PRUEBA DE ASA LIGADA EN CONEJO

CARACTERIZACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS

Pruebas de susceptibilidad  
a antimicrobianos

Pruebas de fermentación de  
carbohidratos.  
Descarboxilación de amino-  
ácidos.  
Otras; (Biotipificación)

Material genético  
Extracromosómico  
Electroforésis en Gel

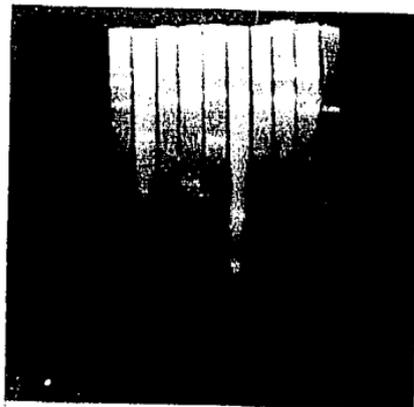
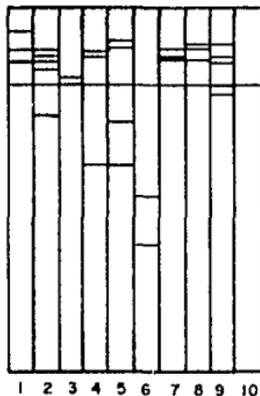
Conjugación  
Estudio BQ  
y de antimicro-  
bianos de trans  
conjugantes

CORRELACION DE BIOTIPOS ENTRE LOS OBSERVADOS  
POR DIFERENTES INVESTIGADORES Y LOS OBTENI-  
DOS POR NOSOTROS.

## ESQUEMA 2

### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

- 1.- 33 P \*
- 2.- 46 P \*
- 3.- 76 P \*
- 4.- 89 P \*
- 5.- 83 P \*
- 6.- CERDO \*
- 7.- 46 A \*
- 8.- 79 A \*\*
- 9.- 29A \*\*\*
- 10.- JMI456 \*\*\*

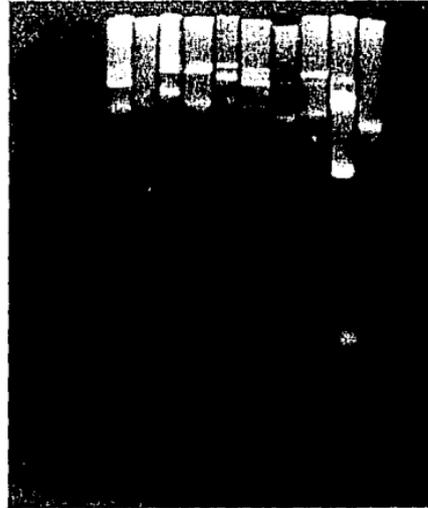
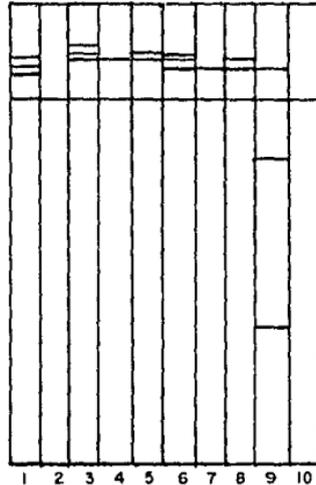


- \* cepas toxigénicas
- \*\* cepas no toxigénicas
- \*\*\* cepa receptora sin plasmidos

### ESQUEMA 3

#### REPRESENTACION ESUEMATICA DE ELECTROFORESIS . EN GELES AGAROSA

- 1.- 15 M
- 2.- K 88
- 3.- 46 A
- 4.- POLI HP
- 5.- 33 P
- 6.- 46 P
- 7.- 191 P
- 8.- 91
- 9.- 65 M \* \*
- 10.- JM1456 \*

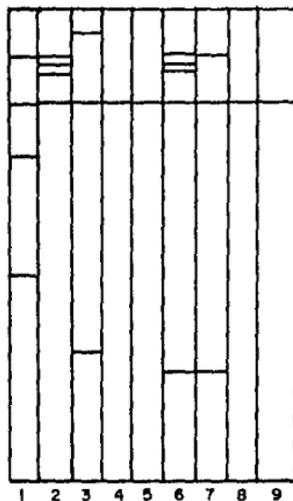


- \* cepa receptora
- \* \* cepa no enterotoxigénica

## ESQUEMA 4

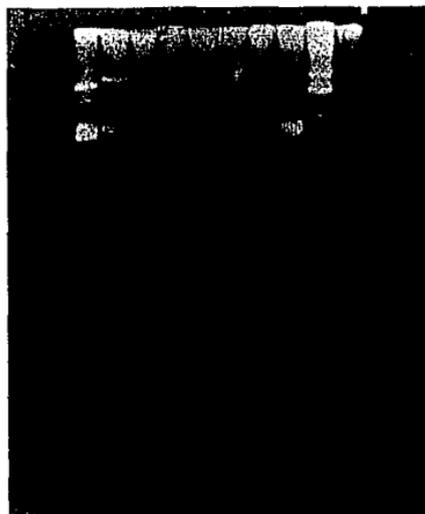
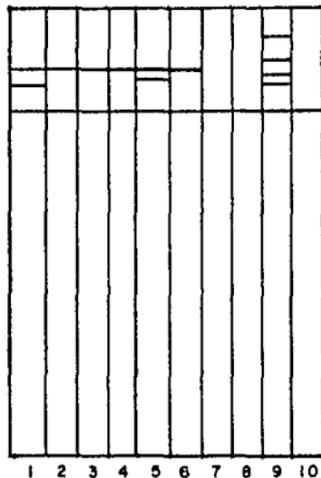
### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

1- 1055 P  
2- 93 P  
3- 76 M  
4- 82 A  
5- 18 M  
6- 79 A  
7- 23 A  
8- 10 M  
9- JMI456 W



**ESQUEMA 5**  
**REPRESENTACION ESQUEMATICA ELECTROFORESIS**  
**EN GELES DE AGAROSA**

- 1-46 P Conj.
- 2-191P Conj.
- 3-33 P Conj.
- 4-CER00 Conj.
- 5-46 A Conj.
- 6-15 M Conj.
- 7- POLI H Conj.
- 8-1980 A Conj.
- 9- 33 P
- 10- JMI456 \*

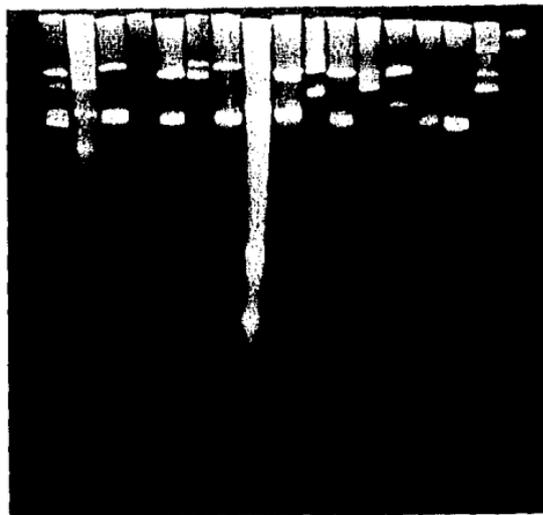
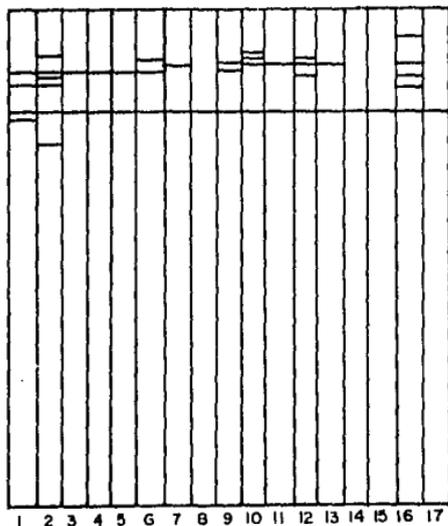


\* capa receptora

## ESQUEMA 6

### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

- 1: 46 P Con]
- 2: 46 P
- 3: 191 P Con]
- 4: 191 P
- 5: 33 P Con]
- 6: 33 P
- 7: CERDO Con]
- 8: CERDO
- 9: 46 A Con]
- 10: 46 A
- 11: 15 M Con]
- 12: 15 M
- 13: POLIA
- 14: POLI P Con]
- 15: JM 1456\*
- 16: 33 P
- 17: JM 1456



\* cepa receptora

Fig 1.- Prueba de asa ligada en intestino de conejo;  
para demostrar la capacidad enterotoxigénica  
de Cepas de Escherichia coli.

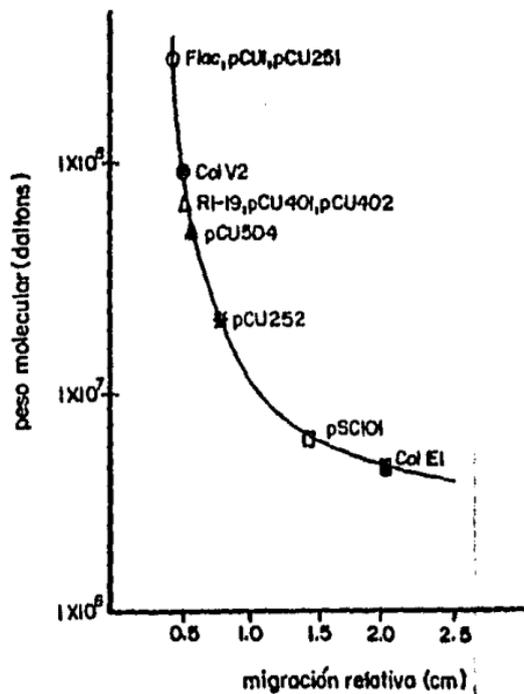
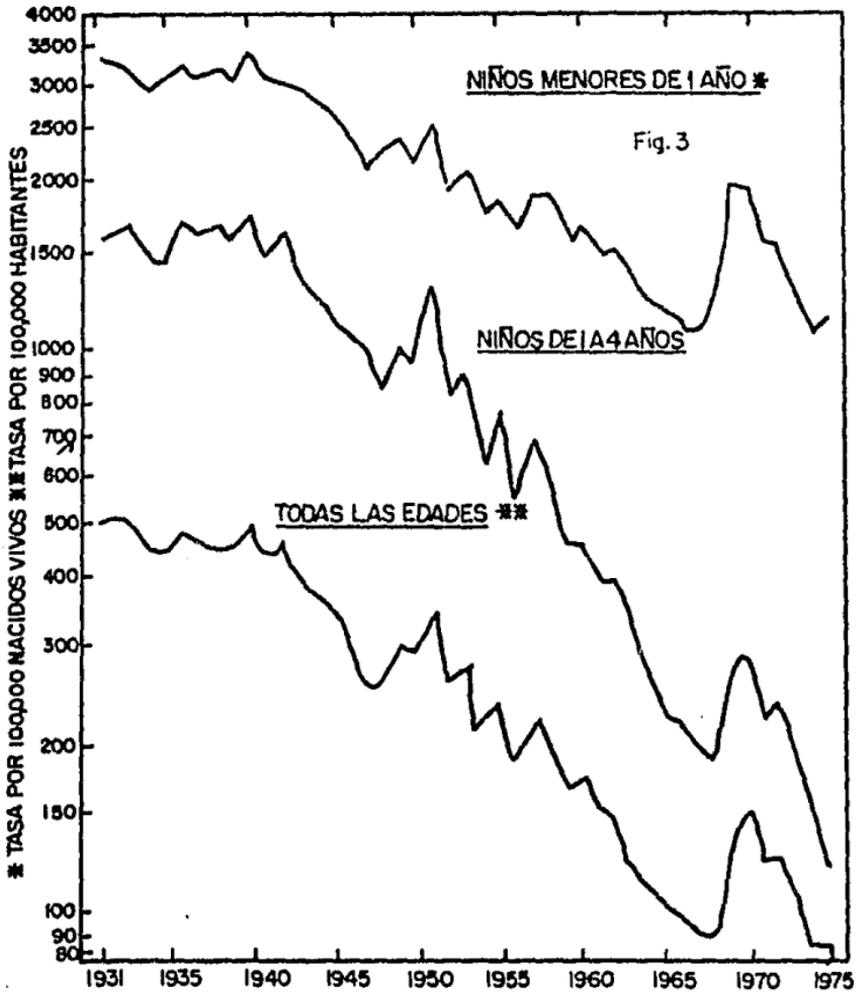
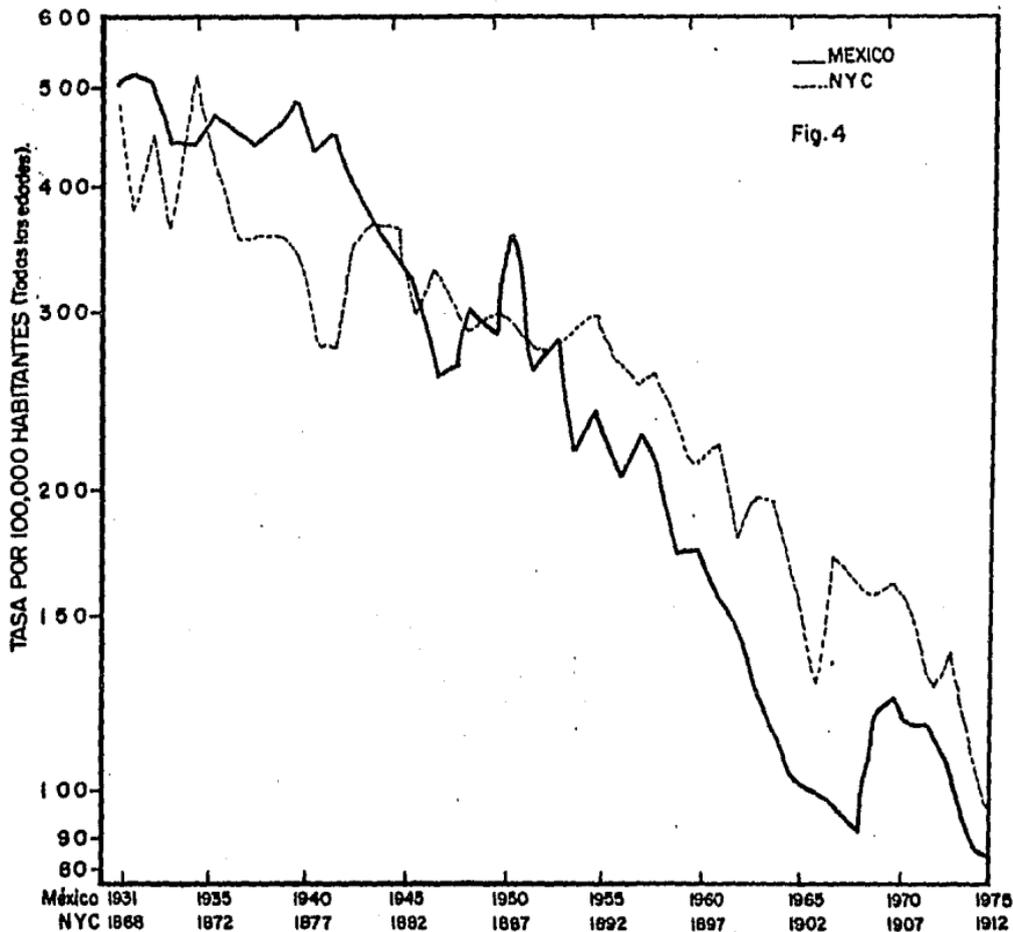


FIGURA 2: Migración relativa de ADN circular en geles de agarosa al 0.8% de plásmidos de peso molecular conocido (89).



Mortalidad por enfermedades diarreicas en la República Mexicana durante los años 1931 a 1975. (13).



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Compendio de Estadísticas Vitales de los Estados Unidos Mexicanos. Dirección General de Bioestadística. S.S.A., 1975.
- 2.- Kumate, J. y Gutiérrez, G.; Gastroenteritis (Diarrea Infecciosa); Manual de Infectología, Tercera edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México D.F., 1975, pags. 1-9.
- 3.- Gutiérrez, Gonzalo: Etiología de la Diarrea Infecciosa Aguda en Niños de la Ciudad de México; Progresos Recientes en Infectología. Instituto Mexicano del Seguro Social; Ed. Juan Solómines Palencia. México D.F., 1978.
- 4.- Savage, D.C.: Microbiol Ecology of the Gastrointestinal Tract. Ann Rev Microbiol. 31:107-133, 1977.
- 5.- Savage, D.C.: Indigenous Microorganism Associating with Mucosal Epithelia in the Gastrointestinal Ecosystem. Microbiology. Ed. Schessinger D.; Washington D.C.; American Society For Microbiology. 1975 p.p. 120-133.
- 6.- Hentges, D.J.: Resistance on the Indigenous Intestinal Flora to the Establishment of Invading Microbial Population. Microbiology.; Ed. Schessinger D., Washington D.C., American Society for Microbiology, 1975, p.p. 116-119.

- 7.- Nester, W.E.; Roberts, C.E.; Mc Carthy, B.J.; Pearsall, N.N.: Microbial Genetics; Alimentary Tract Infections and Food Poisonings. Microbiology, molecules, microbes, and man. Ed. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1973, p.p. 192-203, 469,486.
  
- 8.- Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Chatterjee, B.D.; Jacobs, B. and Sack, R.B.: Acute Undifferentiated Human Diarrhea in the Tropics I. Alterations in Intestinal Microflora. J. Clin Inves. 50:881-889, 1971.
  
- 9.- Freeman; A.B.: Bacilos Entericos; Tratado de Microbiologfa de Burrows; 21a edición; Nueva Editorial Interamericana; México D.F. 1983, p.p. 504-509.
  
- 10.- Edwards, P.R., y Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae: Tercera edición. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1972.
  
- 11.- Erwin, Neter, M.D.: Enteritis Due to Enteropathogenic Escherichia coli; Present-Day Status and Unsolved Problems. J. pediatr. 55: 223-229, 1959.
  
- 12.- Olarte, J.: Nuevos Conocimientos en Relación con la Etiopatogenia de la Diarrea. Bol Med Hosp Infant. 33:595-605, 1976.

- 13.- Olarte, J.: Avances en el Conocimiento de la Etiopatogenia de las Diarreas: Analectas de Medicina Mexicana 2; Academia Nacional de Medicina, México, 1981 p.p. 7-34.
- 14.- Dupont, H.L.; Formal, S.B; Hornick, R.D.: Pathogenesis of Escherichia coli diarrhoea. New Eng. Med. 285: 1-9; 1971.
- 15.- Sack, B.R.; Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Jacobs, B.; Chatterjee, B.D.; and Mitra, R.C.: Enterotoxigenic Escherichia coli Isolated From Patients with Severe Cholera Like Disease. J. Infect. dis. 123(4): 378-384.
- 16.- Bradley, S.R.: Human Diarrheal Disease Caused by Enterotoxigenic Escherichia coli . Ann Rev Microb; 333-352, 1975.
- 17.- Escherichia coli diarrhoea. WHO Scientific Working Group. Bull. WHO. 58:23, 1980.
- 18.- Williams, H.S.; and Gyles, C.L.: The Effect of Cell-Free Fluids Prepared From Cultures of Human and Animal Enteropathogenic Strains of Escherichia coli on Ligates Intestinal Segments of Rabbits and Pigs. J. Med Microbiol 3:403-409, 1970.
- 19.- Richards, K.L.; and Douglas, S.D.: Pathophysiological Effects of Vibrio cholerae and Enterotoxigenic Escherichia coli and their Exotoxins on Eucaryotic Cells. Mic. Rev. 42(3): 592-613, 1978.

- 20.- Klipstein, A.F.; and Engert, F.R.: Immunological Interrelationships Between Cholera Toxin and the Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxins of Coliform Bacteria. *Infect. Immun.* 18(1): 110-117, 1977.
- 21.- Gill, D.M.; Clements, J.D.; et al: Subunit Number and Arrangement in *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin. *Infect. Immun.* 33(3): 677-682, 1981.
- 22.- Pesti, Laszlo; and Lukacs, Klara: Staining Technique for Peptides of *Escherichia coli* Heat Stable Enterotoxin. *Infect Immun.* 33(1): 944-947, 1981.
- 23.- Rao, M. C.; Orellana, S.A.; Field, M. Robertson, D.C.; and Gianella, R.A.: 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*, 3(1) 165-170, 1981.
- 24.- Kapitany, R.A.; Scoot, A.; Forsyth, G.W.; McKenzie, S.L.; and Worthington R.W.: Evidence for two Heat-Stable Enterotoxins Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 24:965-966.
- 25.- Alderete, J.F.; and Robertson, D.C.: Repression of Heat-Stable Enterotoxin Synthesis in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 17(3):629-633, 1977.

- 26.- Gianella, R.A.; and Drake, K.A.: Effect of Purified *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin on Intestinal Cyclic Nucleotide Metabolism and Fluid Secretion. *Infect Immun.* 24(1);19-23, 1979.
- 27.- Field, M.; Fromm, D.; Al-Auqati, Q; and Greenough III, W.B.: Effect of Cholera Enterotoxin on Ion Transport Across Isolated Ileal Mucosa. *J Clin Inv.* 51:796-804, 1972.
- 28.- Whipp, S.C.; Moon, H.W.; and Argenzio, R.A.: Comparison of Enterotoxic Activities of Heat-Stable Enterotoxins from Class 1 and Class 2 *Escherichia coli* of Swine Origin. *Infect Immun.* 31(1);245-251, 1981.
- 29.- Gaastra, W.; and De Graaf, K.K.: Host-Specific Fimbrial Adhesins of Non Invasive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Mic. Rev.* 46(2);129-161, 1982.
- 30.- Middeldorp, J.M.; and Witholt, B.: K88-Mediated Binding of *Escherichia coli* Outer Membrane Fragments to Porcine Intestinal Epithelial Cell Brush Borders. *Infect Immun.* 31(1);42-51, 1981.
- 31.- De Graaf, F.K.; Klemm, P.; and Gaastra, W.: Purification, Characterization and Partial Covalent Structure of *Escherichia coli* Adhesive Antigen K99. *Infection Immun* 33(3);877-883, 1980.

- 32.- Evans, D.G.; Evans, D.J., Jr; and Tjoa, W.: Haemagglutination of Human Group A Erythrocytes by Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from Adults with Diarrhea: Correlation with Colonization factor. *Infect Immun.* 18(2): 330-337, 1977.
- 33.- Thomas, L.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.* 35(3):1119-1124, 1982.
- 34.- Cravioto, A.; Gross, R.J.; Scotland, S.M.; and Rowe, B.: Mannose-Resistant Haemagglutination of Human Erythrocytes by Strains of Escherichia coli from Extraintestinal Sources: Lack of Correlation with Colonisation Factor Antigen (CFA/I). *FEMS MIC LETT.* 6:41-44 1979.
- 35.- Cravioto, A.; Scotland, S.M.; and Rowe, B.: Haemagglutination Activity and Colonization Factor Antigen I and II in Enterotoxigenic and Non-Enterotoxigenic Strains of Escherichia coli Isolated From Humans. *Infect Immun* 36(1): 189-197, 1982.
- 36.- Evans, D.J., Jr; Evans, D.G.; and Dupont, H.L.: Haemagglutination Patterns of Enterotoxigenic and Enteropathogenic Escherichia coli Determined with Human, Bovine, Chicken, and Guinea Pig, Erythrocytes in the Presence and Absence of Mannose. *Infect Immun.* 23(2):336-346, 1979.

- 37.- De Graaf, F.K.; Klaasen-Boor, P; and Vanhes, J.E.: Biosynthesis of the K99 Surface Antigen is Repressed by Alanine. *Infect Immun* 30(1):125-128, 1980.
- 38.- Gibbons, R.A.; Jones, G.W.; and Sellwood, R.: An Attempt to identify the Intestinal Receptor for the K88 Adhesin by Means of Haemagglutination Inhibition Test Using Glycoproteins and Fractions from Sow Colostrum. *J Gen Microbiol*. 86:228-240, 1975.
- 39.- Ofek, I.; and Beachey, E.H.: Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of Escherichia coli. *Infec Immun*. 29(1):247-254, 1978.
- 40.- Clegg, S.; Evans, D.G.; and Evans, D.J., Jr.; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitating the Humoral Immune Response to the Colonization Factor Antigen of Enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect Immun*. 27(2):525-531, 1980.
- 41.- Extrachromosomal Elements, Microbiology, Edited by D. Schelessinger, Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1978 p.p. 217-220, 267-269.
- 42.- Bacterial Plasmids; Structure and Replication; Other Plasmids; Aspects of Microbiology 4; Kimber Hardy; Thomas Nelson; and Sons LTD; London; 1981, p.p. 3-19, 75-89.

- 43.- Hayes, W.; Conjugation; The Genetics of Bacteria and their Viruses: Studies in Basic Genetics and Molecular Biology; Second Edition; Blackwell Scientific Publications; OXFORD, LONDON, 1976, p.p. 650-657.
- 44.- Gyles, C; So, Magdalene; and Falkow, S.: The Enterotoxin Plasmids of Escherichia coli. J Infect Dis. 130(1):40-49, 1974.
- 45.- Freer, J.H.; Wadstrom, E.T.; and Smyth, C.J.: Occurrence of Fimbriae Among Enterotoxigenic Intestinal Bacteria Isolated from Cases of Human Infantile Diarrhoea. FEMS Mic Lett. 3:277-281, 1978.
- 46.- Guinee, P.A.; Velt Komp, J.; and Jansen, W.H.: Improved Minca Medium for the Detection of K99 Antigen in Calf Enterotoxigenic Strains of Escherichia coli. Infect Immun: 15:676-678, 1977.
- 47.- Guinee, P. A.; Jansen, W.H.; Agterbery, C.M.: Detection of the K99 Antigen by Means of Agglutination and Immunoelectrophoresis in Escherichia coli Isolates from Calves and its Correlation with Enterotoxigenicity . Infect Immun, 13:1369-1377, 1976.
- 48.- Reis; M.H.; Affonso, M. H.; Trabulst, L.R.; Mazaitis, A.J.; Maas, R.; and Maas, W.K.: Transfer of CFA/I-ST Plasmid Promoted by a Conjugative Plasmid in a Strain of Escherichia coli of Serotype O128 ac:H12. Infect Immun. 29(1):140-143, 1980.

- 49.- Mazaitis, A.J.; Maas, R.; and Maas, W.K.: Estructure of Naturally Occurring Plasmid with Genes for Enterotoxin Production and Drug Resistance. *J. Bacteriol.* 145(1):97-105, 1981.
- 50.- Mc Connell, M.H.; Smith, H. R.; Willshaw, A.M. and Rowe, B.: Plasmids Coding for Colonization Factor Antigen I and Heat Stable Enterotoxin Production Isolated from Enterotoxigenic Escherichia coli comparison of their Properties. *Infect Immun.* 32:927-936, 1981.
- 51.- Smith, H.R.; Cravioto, A.; Willshaw, G.A.; McConnell, M.H.; Scotland, M.S.; Gross, R.J.; and Rowe, B.: A Plasmid Coding for the Production of Colonization Factor Antigen I and Heat-Stable Enterotoxin in Strains of Escherichia coli of Serogroup O78. *FEMS Mic Lett*, 6:255-260, 1979.
- 52.- Penaranda, M.E.; Mann, M.B.; Evans, D.G.; and Evans, D.J. Jr.: Transfer of an ST:LT CFA/II Plasmid Into Escherichia coli K-12 strain RRI by Cotransformation with PSC 301 Plasmid DNA. *FEMS Mic Lett*, 8:251-254, 1980.
- 53.- Evans, D.J. Jr.; Evans, D.G.; Dupont, H.L.; Orskov, F.; and Orskov, I.: Patterns of Loss of Enterotoxigenicity by Escherichia coli Isolated from Adults with Diarrhea: Sugestive Evidence for an Interrelationship with Serotype. *Infect Immun.* 17:105-111, 1977

- 54.- Merson, M.H.; Orskov, F.; Orskov, I.; Sack, R.B.; Hug, I.; and Koster, F.T.: Relationship Between Enterotoxin Production and Serotype in Enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect Immun.* 23:325-329, 1979.
- 55.- Orskov, I.; and Orskov, F.: Special O:K:H Serotypes among Enterotoxigenic Escherichia coli Strains from Diarrhea in Adults and Children: Occurrence of CF (Colonization Factor) Antigen and Hemagglutinating Abilities. *Med Microbiol Immunol.* 163:99-110, 1977.
- 56.- Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Engstrom, G.W.; and Baetz, A.L.: Response of the Rabbit Ileal Loop to Cell-Free Products from Escherichia coli Enteropathogenic for Swine. *J. Infect dis*, 121(2): 182-187, 1970.
- 57.- Young, C.R.; Levine, M.M.; Craig, J.P.; and Robins-Browne, R.: Microtiter Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Immunoglobulin G. Cholera Antitoxin in Humans: Method and Correlation with Rabbit Skin Vascular Permeability Factor Technique: *Infect Immun.* 27(2):492-496, 1980.
- 58.- Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.C.; and Harden, L.B.: Test for Escherichia coli Enterotoxin Using Infant Mice: Application in a Study of Diarrhoea in Children in Honolulu. *J Infect Dis.* 125(4):407-411, 1972.

- 59.- Merson, M. H.; Yolken, R.H.; Sack, B.R.; Froehlich, J.L.; Greenberg, H.B.; Huq, I.; and Black, R.W.: Detection of Escherichia coli Enterotoxins in Stools. *Infect Immun.* 29(1):108-113, 1980.
- 60.- Klipstein, F.A.; Lee, C.S.; and Engert, R.F.: Assay of Escherichia coli Enterotoxins by in ViVo Perfusion in the Rat Jejunum. *Infect Immun.* 14(4)1004-1010, 1976.
- 61.- Echeverria, P.; Verheart, L.; Ulyanco, C.V.; and Santiago, L.T.: Detection of Heat Labile Enterotoxin Like Activity in Stools of Patients with Cholera and Escherichia coli Diarrhea. *Infect Immun.* 19(1):343-344, 1978.
- 62.- Guerrant, R.L.; Bruntan, L.L.; Schnaimant, T.C.; Rebhun, L.L.; and Gilman, G.A.: Cyclic Adenosine Monophosphate and Alteration of Chinese Hamster Ovary Cell Morphology: A Rapid, Sensitive in Vitro Assay for the Enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. *Infect Immun.* 10(2):320-327, 1974.
- 63.- Serafin, M.B.; Pestana, A.F.; Leonardo, M.B.; and Monteiro, A.R.: Single Radial Immune Hemolysis Test for Detection of Escherichia coli Thermolabile Enterotoxin. *J. Clin Microbio.* 14(5):473-478.

- 64.- Giannella, R.A.; Drake, K.W.; and Luttrell, M.: Development of a Radioimmunoassay for Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin: Comparison with the Suckling Mouse Bioassay. Infect Immun. 33(1):186-192, 1981.
- 65.- Sack, D.A.; Huda, S.; Neogi, P.K.; Daniel, R.R.; and Spira, W.M.: Microtiter Ganglioside Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Vibrio and Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxins and Antitoxin. J. Clin Microbiol. 11(1):35-40, 1980.
- 66.- Honda, T.; Taga, S.; Takeda, Y.; and Hiwatani, T.: Modified Elek Test for Detection of Heat-Labile Enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. J Clin Microbiol. 13(1):1-5, 1981.
- 67.- Enterobacteriaceae; Manual of Clinical Microbiology; American Society for Microbiology, 1980.
- 68.- Merson, M.R.; Orskov, F.; Orskov, I.; Sack, R.B.; Huq, I.; and Koster, F.T.: Relationship Between Enterotoxin Production and Serotype in Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun. 23(2):325-329 1979.
- 69.- Scotland, S.M.; Day, N.P.; Cravioto, A.; Thomas, L.V.; and Rowe B.: Production of Heat-Labile or Heat-Stable Enterotoxins by Strains of Escherichia coli Belonging to Serogroups O44, O114, and O128. Infect Immun. 3(1):500-503, 1981.

- 70.- REIS, M.H.; De Castro, A.F.; Regina, M.; Toledo, F.; and Trabulsi, L.R.; Production of Heat-Stable Enterotoxin by the O128 Serogroup of Escherichia coli. *Infect Immun.* 24(1):289-290, 1979.
- 71.- REIS, M.H.; Matos, D.P.; De Castro, A.F.; Regina M.; Toledo F.; and Trabulsi, L.R.: Relationship Among Enterotoxigenic Phenotypes, Serotypes, and Sources of Strains in Enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect Immun.* 28(1):24-27, 1980.
- 72.- Runnels, P.L.; Moon, H.W.; and Schneider, R.A.: Development of Resistance with Host Age to Adhesion of K99 Escherichia coli to Isolated Intestinal Epithelial Cells: *Infect Immun.* 28(1):298-300 1980.
- 73.- Crichton, P.B.; and Old, D.C.: Biotyping of Escherichia coli: *J. Med Microbiol.* 12:473-486, 1979.
- 74.- Old, D.C.; Crichton, P.B.; Maunder, A.J.; and Wilson, M.I.: Discrimination of Urinary Strains of Escherichia coli by Five Typing Methods. *Med Microbiol.* 13:437-444, 1980.
- 75.- Crichton, P.B.; Old, D.C.: Differentiation of Strains of Escherichia coli: Multiple Typing Approach. *J. Clin Microbiol.* 11(6): 635-640, 1980.

- 76.- Stanier, R.; Adelberg, E.A.; Ingraham, J.; Genetic Recombination; The Microbial World; Fourth Edition; Prentice-Hall, Inc.; Englewood Cliffs, New Jersey; p.p. 452-493, 1976.
- 77.- Evans, D.G.; Olarte, J.; Dupont, H.L.; Evans, D.J. JR.; Galindo, E.; Portnoy, B.L.; and Concklin, R.H.: Enteropathogens Associated with Pediatric Diarrhea in México City. J. Pediatr., 91:65, 1977.
- 78.- Pickering, L.K.; Evans, D.J. JR.; Muñoz, O.; Dupont, H.L.; Coello-Ramirez, P.; Vollet, J.; Concklin, R.H.; Olarte, J.; and Kohl, S.: Prospective Study of Enteropathogens in Children with Diarrhea in Houston and Mexico. J. Pediatr, 93:383, 1978.
- 80.- Pickering, L.K.; and Woodward, W.E.: Diarrhea in Day Care Centers. Ped. Infect Dis 1(1):47-51, 1982.
- 81.- Kupersztoch-Portnoy, Y.M.; Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria in Mexico; Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids; Stuart B. Levy; Royston C. Clowes and Ellen L. Koenig Ed.; 1981, p.p. 529-537.
- 82.- Echeverria, P.; and Morphy, R.: Enterotoxigenic Escherichia coli Carrying Plasmids Coding for Antibiotic Resistance and Enterotoxin Production. J. Infect Dis. 142(2):273-278, 1980.

- 83.- Langle, A.; Navarro, C.E.; Pulido, V.F.; Glono, C.S.; Determinación de la Resistencia a los Antimicrobianos de Escherichia coli Enterotoxigenica. Memorias XIV Congreso Nacional de Microbiología; Chihuahua, Chih., p.p. 40, 1983.
- 84.- Mac Faddin, J.F.; Enterobacteriaceae; Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins Company; Baltimore, 1976.
- 85.- Mundell, D.H.; Anselmo, C.R.; and Wishnow, R.M.: Factors Influencing Heat-Labile Escherichia coli Enterotoxin Activity. Infect. Immun, 14(2):383-388, 1976.
- 86.- Barry, L.A. PH.D.; Procedures for Testing Antibiotics in Agar Media. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins ed; Baltimore/London; 1980, p.p. 1-23.
- 87.- Meyers, J.A.; Sanchez, D.; Elwell, L.P.; and Falkow, S.; Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxiribonucleic Acid. J. Bacteriol. 127:1529-1537, 1976.
- 88.- Kado, C.I.; and Liu, S.T.: Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J. Bacteriol. 145(3) 1365-1373, 1981.

- 89.- Lopez, L.M.; Analisis Genético de Plásmidos Detectados en Enterobacterias. Tesis Profesional, Facultad de Química. U.N.A.M.; México, 1977.
- 90.- Smith, W.H.; and Linggood, M.A.: Transfer Factors in Escherichia coli with Particular Regard to their Incidence in Enteropathogenic Strains. J. Gen. Microb.; 62:287-299, 1970.
- 91.- Willetts, N.S.: Recombination and the Escherichia coli K-12 Sex Factor F. J. Bacteriol. 121(1):36-43, 1975.
- 92.- Bourque, R.; Lallier, R.; and Lariviere, S.: Influence of Oral Antibiotics on Resistance and Enterotoxigenicity of Escherichia coli. Can J. Comp. Med. 44:101-108, 1980.