

80A  
2g.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**"CARACTERIZACION DE CEPAS ADHERENTES DE  
Escherichia coli AISLADAS DE NIÑOS CON Y  
SIN CUADROS DIARREICOS".**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
P R E S E N T A :  
**ANA MARIA SAUCEDO PEREZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F., Cd. Universitaria

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	Págs.
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
I. GENERALIDADES.....	4
i.- Importancia de <u>E. coli</u> en las enfermedades - entéricas.....	4
ii.- Clasificación actual de las cepas de <u>E. coli</u> que ocasionan diarrea.....	8
iii.- La adherencia en <u>E. coli</u> .....	15
iv.- <u>E. coli</u> enteroadherente (ECEA).....	27
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
A. EQUIPO.....	28
B. MATERIAL.....	29
C. METODOS.....	32
RESULTADOS.....	40
DISCUSION.....	42
III. CONCLUSIONES.....	45
IV. ANEXO.....	46
V. BIBLIOGRAFIA.....	52

## INTRODUCCION

La enfermedad diarreica constituye una de las principales causas de muerte en niños menores de cinco años y también ocasiona altas tasas de morbilidad entre la población adulta de los países en vías de desarrollo; se define fisiopatológicamente como un síndrome por mala absorción de agua (60,71) que origina incrementos en el contenido de líquido y el número de evacuaciones. Entre sus variantes más frecuentes destacan la disentería, que se caracteriza por la presencia de moco y sangre en la materia fecal (con espasmos abdominales, pujo y tenesmo), y la denominada diarrea infecciosa, que se acompaña de vómitos, fiebre, anorexia y malestar general. En cuanto a sus complicaciones, éstas son diversas aunque la deshidratación es la más común, además en los lactantes suelen aparecer intolerancia a la lactosa, sobre todo cuando el agente infeccioso es un rotavirus (16) y, en menor número de ocasiones, el íleo paralítico, la neumatosis intestinal, peritonitis, septicemia, insuficiencia renal y perforación intestinal.

Los agentes etiológicos causantes de diarrea son generalmente difíciles de aislar e identificar, ya que ello depende de factores tales como la época del año, la edad del paciente, la región geográfica, las condiciones sanitarias de la población y los recursos tanto técnicos como económicos de cada laboratorio. En la Ciudad de México se han realizado estudios sobre su incidencia (65), encontrándose que los

agentes más frecuentes son los rotavirus, Salmonella, Shigella, Escherichia coli enterotoxigénica, Giardia lamblia y Entamoeba histolytica (60).

No obstante, se ha demostrado que otros microorganismos también son capaces de producir cuadros intestinales en el humano; en particular, Escherichia coli invasiva, parvovirus, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter fetus subespecie jejuni, Yersinia enterocolitica y Clostridium difficile, aunque aparentemente sus índices de morbilidad se encuentran condicionados a situaciones epidemiológicas aún no bien definidas (48). A esta lista deben agregarse ciertos serotipos de Escherichia coli, algunos adenovirus y coronavirus, lo mismo que bacterias tales como Klebsiella, Enterobacter, Proteus y Pseudomonas, que eventualmente llegan a producir enterotoxinas y/o citotoxinas (48).

Este trabajo contempla como finalidad fundamental la de actualizar e incrementar los datos que se tienen sobre E. coli causante de diarrea; concretamente, de aquéllos que se relacionan con:

- la confiabilidad de algunas de las pruebas más empleadas para investigar a las cepas enteropatógenas.
- uno de los primeros pasos involucrados en su mecanismo de patogenicidad: la adherencia.

## OBJETIVOS

- Evaluar la confiabilidad del suero "Pasteur" en lo que respecta a su utilización para detectar a las cepas ECEP, comprando sus resultados con los obtenidos con otros sueros polivalentes - más específicos.
- Analizar si los patrones de adherencia, que los investigadores sólo citan cuando se refieren a ECEP, se presentan también en cepas de E. coli que no pertenecen al grupo mencionado.
- Evaluar la exactitud de las pruebas de hemaglutinación que se emplean para poner de manifiesto a los factores colonización I y II, tomando como referencia los resultados obtenidos mediante la técnica de aglutinación placa con suero específico anti-fimbria.

## I. GENERALIDADES

### i. Importancia de Escherichia coli en las enfermedades entéricas.

La etiología de las diarreas se empezó a investigar hace más de un siglo cuando E. coli se descartaba como posible agente causal, debido a que se le aislaba indistintamente de muestras procedentes de individuos con y sin diarrea (51); así, durante un tiempo se le consideró sólo como parte de la flora intestinal del humano.

Sin embargo, en 1897 Lesage sugirió la existencia tanto de cepas "perjudiciales" como "inofensivas" de E. coli las cuales podían ser diferenciadas serológicamente (52).

Posteriormente, el mismo investigador encontró que mientras el suero de personas convalecientes de diarrea aglutinaba con bacterias obtenidas de otros pacientes durante las epidemias, éste no reaccionaba con otros patógenos entéricos o con cepas de E. coli provenientes de individuos sanos (73).

Entre 1908 y 1910, Bahr en un estudio epidemiológico en niños con diarrea (53); concluyó que E. coli juega un papel relevante en esta enfermedad asimismo, en 1920, Adam (73) llevó a cabo una serie de investigaciones bacteriológicas sobre diarrea infantil en las cuales logró diferenciar bioquímicamente distintos grupos de E. coli; más tarde

Goldschmidt, profundizando en el trabajo de Adam, demostró que estas mismas cepas también podían ser diferenciadas serológicamente (53).

En 1935, Dulaney y Michelson describieron un severo brote de gastroenteritis producido por una variante colonial a la que denominaron Bacterium coli mutabile, la cual resultaba antigénicamente homogénea (15).

A pesar de todas estas evidencias, no se aceptó a E. coli como uno de los agentes causales de diarreas sino hasta 1945, cuando Bray reconoció su importancia, sobre todo en los brotes diarreicos (5). Este investigador identificó a E. coli y la denominó Bacterium coli napolitanum (5). En 1945, Bray y Beavenen (6) inmunizaron conejos con este bacilo y utilizaron su suero para efectuar pruebas de aglutinación en placa mediante las cuales identificaban al microorganismo en muestras de pacientes convalescientes de diarrea.

Las observaciones de Bray fueron confirmadas en otros estudios realizados en diferentes partes del mundo: en Escocia, Giles (28) describió dos cepas de E. coli, denominadas alfa y beta, que fungían como responsables de diferentes brotes diarreicos; por otra parte, Taylor (85), identificó serológicamente a una cepa de E. coli causante de brotes de enteritis en guarderías londinenses y la denominó D 433.



Kauffman (40), en 1940, diseñó un método para tipificar a los distintos grupos de E. coli, basándose en sus antígenos somáticos "O", flagelares "H" y capsulares "K".

Kauffman, Dupont, Ewing y Taylor (24,40,85) emplearon esta misma técnica para tipificar a los distintos grupos de E. coli asociados con diarrea en infantes, encontrando que sólo los serogrupos O111, O119, O127 y O129 eran responsables de los brotes diarreicos que ocurrían en diferentes partes del mundo.

Además, mediante la serotipificación, determinaron que Bacterium coli napolitanum, E. coli alfa y E. coli D - 433 pertenecían al serogrupo O111 y que E. coli beta correspondía al O55.

Con estas observaciones, algunos grupos de investigación establecieron que E. coli de los serogrupos O26, O55, O111, O119, O126 y O127 debían considerarse como enteropatógenos relacionados con brotes diarreicos, sin embargo, otros cuestionaron dicho planteamiento aduciendo que no podía determinarse la patogenicidad de las cepas tan sólo por sus características serológicas (53).

En el período comprendido entre 1972 y 1977 se realizaron estudios profundos encaminados a averiguar la capacidad de esta especie para producir enterotoxinas e invadir células, encontrándose que estas características raramente se presentaban en cepas consideradas dentro de los serogrupos "enteropatógenos"; de esta forma, apareció la clasificación

que divide actualmente a las cepas de E. coli causantes de diarrea en: productoras de enterotoxinas (enterotoxigénicas), invasivas (enteroinvasivas), generadoras de citotoxinas implicadas tanto en la colitis hemorrágica como en el síndrome urémico hemolítico (enterohemorrágicas) y enteropatógenas; estas últimas son aquellas cuyo mecanismo de patogenicidad no se relaciona con la síntesis de toxinas ni con la invasión de células (53). Este punto se tratará con mayor detalle en la siguiente sección.

Cabe señalar que algunos autores (53) llegaron a mencionar que las supuestas E. coli enteropatógenas no manifestaban las propiedades detectadas en otras cepas porque, al ser subcultivadas, perdían su toxigenicidad o el plásmido que codifica para invasividad; sin embargo Levine, demostró que dichas cepas no requerían de las propiedades señaladas para causar diarrea al realizar estudios en humanos voluntarios (51).

Clasificación actual de las cepas de E. coli que ocasionan diarrea.

Hasta hace algunos años la literatura se refería a todas las cepas de E. coli que causaban afecciones entéricas como "variantes enteropatógenas", sin embargo, en la actualidad se coincide en señalar que, dependiendo tanto del mecanismo a través del cual provocan alteraciones intestinales, como de los serotipos a los que pertenecen (tabla 1), las cepas deben clasificarse en alguno de los siguientes cuatro grupos (51):

ECET (E. coli enterotoxigénica)

ECEI (E. coli enteroinvasiva)

ECEH (E. coli enterohemorrágica)

ECEP (E. coli enteropatógena)

Los bacilos agrupados como ECET se caracterizan por producir las enterotoxinas termolábil (TL) y termorresistente (TR), las cuales inducen la salida de gran cantidad de agua de las células de la mucosa intestinal. Con ello, el paciente manifiesta una notable deshidratación sin fiebre, acompañada por náuseas, cólicos abdominales y evacuaciones sin leucocitos polimorfonucleares.

En el laboratorio, para llevar a cabo la detección de la toxina termolábil, se puede recurrir al método tradicional

TABLA 1

PRINCIPALES GRUPOS SEROLOGICOS "O" DE CEPAS DIARROGENICAS DE E.coli

<u>Categoría patogénica</u>	<u>Serogrupos O</u>
Enteropatógena (EPEC)	18, 26, 44, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128 ab, 142, 158.
Enterotoxigénica (ETEC)	1, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 25, 27, 60, 63, 75, 78, 80, 85, 88, 89, 99, 101, 109, 114, 115, 128 ac, 148, 153, 159.
Enteroinvasiva (EIEC)	28 ac, 112, 124, 136, 143, 144, 152, 164.
Enterohemorrágica (EHEC)	157

Tomado de: Rev. Inf. Dis. 7 :321-340. (1985)

que utiliza asa ileal de conejo; sin embargo, en la actualidad existen técnicas más precisas como las que incluyen sueros anti-toxina, cultivos celulares donde se observan alteraciones morfológicas de las mismas (29), o bien, a la más reciente que emplea sondas que sólo hibridizan con las cepas que poseen el plásmido que codifica para su síntesis (65). Para poner de manifiesto a la toxina termorresistente, se utiliza la prueba con ratón lactante (27) o métodos inmunológicos tales como RIA o ELISA (84), los cuales requieren el empleo de un suero antitoxina que se prepara con la ayuda de una proteína acarreadora, ya que dicha toxina posee un peso molecular muy bajo y, por tanto, no es inmunogénica por sí misma.

Por lo que respecta a E. coli enteroinvasiva, se ha observado que posee un plásmido de 140 megadaltons que codifica para la producción de algunas proteínas de membrana externa que le confieren la capacidad de penetrar en células epiteliales de la mucosa intestinal, reproducirse y provocar su destrucción, lo anterior provoca la presencia de moco, sangre y abundantes polimorfonucleares en la materia fecal, además de fiebres altas y dolores abdominales severos como sucede en la disentería por Shigella sp (77)

Es importante mencionar que E. coli enteroinvasiva posee algunas características idénticas a Shigella, ya que al igual que ésta, es inmóvil y no fermenta la lactosa; además, ambas cruzan antigénicamente (53).

Su identificación en el laboratorio se realiza utilizando cultivos celulares (53,84) o mediante métodos inmunológicos tales como el de ELISA que utiliza anticuerpos contra las proteínas de membrana externa asociadas a la invasividad (53); otro método nuevo incluye la utilización de DNA que sólo hibridiza con las cepas que poseen el plásmido; además, puede emplearse el método tradicional de Sereny que consiste en inocular la cepa en la conjuntiva de un cobayo; dicha cepa se considera invasiva si 48 horas después aparece conjuntivitis en el animal (84).

En cuanto a las ECEH, se ha encontrado que sólo está involucrado el serotipo O157:H7, el cual se relaciona directamente con la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (53). Los principales signos clínicos son fiebre y una notable presencia de sangre en las heces aunque con ausencia de leucocitos polimorfonucleares; esta última característica diferencia la enfermedad por ECEH de la provocada por ECEI o Shigella (51).

Las cepas de dicho serotipo que se aíslan de pacientes con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico poseen plásmidos que codifican para las citotoxinas semejante a la Shiga y Vero. La primera es aparentemente idéntica a la potente citotoxina/neurotoxina/enterotoxina producida por Shigella dysenteriae tipo 1 (51), ya que también reacciona y es neutralizada por anti-toxina de Shiga. Muchas cepas

también elaboran una segunda citotoxina llamada Shiga-like 2 ó toxina Vero que no es afectada por la antitoxina mencionada (53).

Por lo que respecta al grupo ECEP, éste es el que generalmente ocasiona confusión, ya que cuando los investigadores se refieren a él, muchos lectores piensan lógicamente pero erróneamente que se trata de cualquier E. coli capaz de ocasionar trastornos intestinales; sin embargo, este grupo sólo se integra por las cepas cuyo mecanismo de patogenicidad no se relaciona con la producción de enterotoxinas ni con invasividad.

En la actualidad se ha incrementado el interés por caracterizar debidamente a este grupo, al grado de que se intenta establecer su clasificación mediante diversas vías: serológicamente en función de su antígeno O (24,79), en base a su forma de adherirse a células HeLa o Hep 2 en presencia de D-manosa (78) o de acuerdo a su capacidad para incorporar en su genoma fragmentos de DNA que codifican para una proteína de membrana externa a la que se ha denominado EAF (Factor enteroadherente de E. coli enteropatógena) (46).

Por lo que toca a los métodos serológicos, se ha asociado este grupo a serotipos bien definidos que pueden detectarse utilizando sueros polivalentes como el "Pastaur"; sin embargo, varios autores reportan poca confiabilidad en los resultados correspondientes (17), ya que sólo el 50% de los

aislamiento reportados como ECEP son confirmados como tales el propósito con sueros provenientes de laboratorios de referencia.

Por otro lado, Trabulsi y Scalisey (78) observaron que ECEP se adhieren a células HeLa o Hep 2 mostrando dos característicos patrones de adherencia: "adherencia localizada" o "adherencia difusa"; éstos se describen en la siguiente sección.

Por lo que corresponde a la aplicación de técnicas de inóculo genético para efectuar la detección de ECEP, destacan los trabajos de Nataro y cols (68), quienes obtuvieron una sonda de una kilobase que solo hibrida con el DNA de cepas de E. coli que muestran "adherencia localizada". En la sección de "Adherencia" se hace referencia a este punto con más detalle.

Debido a la interrumpante sobre el mecanismo de patogenicidad de este grupo, muchos investigadores han estudiado el fenómeno. Así, Polotsky (53) notó que las cepas ECEP causaban lesiones histopatológicas en el intestino humano; concretamente destruían las microvellosidades aunque sin invadir las.

Más tarde, Cantley y Elahi (7) analizaron biopsias de intestino delgado de conejos inoculados con E. coli del serogrupo O15 (cepa SUEC-1) no productora de enterotoxinas y



de invasiva, detectando destrucción de las microvellosidades.

Posteriormente, Ullahen (87) reportó un caso de diarrea severa en una infante, en el cual evidenciaron este mismo fenómeno asociado a la presencia de una gran cantidad de E. coli ( $10^6$  microorganismos por mililitro) en las correspondientes biopsias del intestino. Knutton (45), aplicando la microscopía electrónica al estudio de enterocitos, propuso la posible explicación de la destrucción de las microvellosidades: él postula que se lleva a cabo un proceso de vesiculación de la membrana en dos etapas: el evento inicial que se presenta al adherirse la bacteria al receptor celular a través de pili y, el segundo, que parece estar asociado a alteraciones del epitelio intestinal, el cual experimenta la elongación y vesiculación de sus microvellosidades durante la adherencia íntima; al parecer, este último fenómeno también está mediado por adhesinas localizadas en la superficie bacteriana (EGF).

En dicho proceso de destrucción de las microvellosidades influyen las concentraciones de calcio, ya que cuando se encuentran por arriba de las normales, los filamentos de actina se rompen en porciones más cortas y, bajo estas condiciones, cada vellosidad se torna termodinámicamente inestable permitiendo que las bacterias se unan rápidamente

A su vez, (1961).

Con estos y otros estudios actuales se espera que en un futuro inmediato pueda establecerse con exactitud el mecanismo de patogenicidad de E. coli enteropatógena, para que al sumarse esto con lo que se conoce sobre los otros grupos sea posible diseñar algún método que prevenga eficazmente las diarreas en infantes.

La adherencia en E. coli.

La adherencia, por sí sola, no constituye una característica exclusiva de las bacterias patógenas, tal como lo demuestra el hecho de que se manifiesta en los microorganismos autóctonos que colonizan los sitios de diferentes aspectos animales (50); de hecho, es gracias a ella que los miembros de la flora habitual pueden proteger al huésped impidiendo que otros agentes patógenos o extraños se establezcan libremente en sus mucosas.

La adherencia de E. coli al epitelio intestinal se ha atribuido a múltiples factores: entre otros, a la presencia de fibrinas, proteínas de membrana externa, cúpula y glicocálix (50,59); ello se ha podido comprobar in vitro gracias a la realización de ensayos que utilizan cultivos celulares tales como los de células HeLa (procedentes de carcinoma de cérvix), Hep 2 (de carcinoma de faringe) y otros cultivos primarios obtenidos con células de epitelio bucal, de intestino o de tracto urinario.

Dichas técnicas se han ido perfeccionando a través del tiempo al grado de que, en la actualidad, se emplean radioisótopos que proporcionan mayor sensibilidad (71).

También se ha recurrido a la quimioluminiscencia, la cual tiene lugar cuando se libera oxígeno al adherirse las bacterias a Flagelitos, esto finalmente origina un incremento

en la luminiscencia en la presencia de luminal (3).

Las fimbrias tienen importancia en la adherencia bacteriana y figuran entre las estructuras más estudiadas; se localizan en la superficie bacteriana, su naturaleza química es proteica, tienen apariencia fibrilar y su distribución radial permite a ciertos bacilos permanecer en el tejido colonizado no obstante la existencia de mecanismos de " limpieza " que protegen las superficies epiteliales en los animales superiores; asimismo, determinan el sitio específico de infección, ya que en ellas reside la capacidad de muchas bacterias para que se establezca interacción entre su superficie y la de las células huésped. Dicha selección del ecosistema depende de que el parásito manifieste cierto tropismo hacia los tejidos y de que exista homología entre "receptores" y "ligandos" (41).

En 1921, Kellanius y Lindberg (42) clasificaron a las fimbrias en "manosa sensibles" y "manosa resistentes" dependiendo de si el mencionado carbohidrato podía bloquear su capacidad de adhesión. En consecuencia, actualmente se acepta que las primeras no aglutinan eritrocitos de diferentes especies en presencia de D - manosa y, en contraste, las segundas sí lo hacen en presencia de carbohidrato mencionado.

### Pili manosa sensibles.

La mayoría de las cepas silvestres de E. coli poseen pili "manosa sensibles", también denominados "tipo 1", o "fimbrias comunes". Estas estructuras confieren a la bacteria la capacidad de adherirse a macrófagos peritoneales de rata, polimorfonucleares humanos (3), levaduras (36) y células Vero (75); sin embargo, dicha característica se pierde al adicionar previamente una lectina denominada concanavalina A o bien D-manosa, debido a que estas sustancias bloquean los receptores D-manósidos que pudieran ocupar los pili tipo 1.

Este tipo de pili se produce en cultivos líquidos y estáticos a temperaturas óptimas de 37°C, adquiriendo la apariencia de una película delgada sobre la superficie; en gelosa nutritiva las colonias fimbriadas son circulares, brillantes y presentan bordes regulares (75). Cabe destacar que estudios recientes han logrado establecer que la información genética que codifica para la síntesis de estas estructuras se encuentra en el cromosoma bacteriano (43).

### Pili manosa resistentes

En 1964, Williams y Smith (34) describieron una fiebris manosa resistente a la cual consideraron "factor de virulencia"; ésta (KPS) se encuentra en cepas toxigénicas de

E. coli aisladas de cerdos que padecen diarrea severa y se ha caracterizado como un filamento flexible constituido por unidades globulares proteicas carentes de carbohidratos y lípidos; tiene un peso molecular de 23,000 y una longitud de 8 a 12 nm (37) y, además, presenta tres variantes antigénicas: K89ab, K89ac, K89ad (34); por otro lado confiere a las bacterias que lo poseen la capacidad de aglutinar eritrocitos de cobayo en presencia de D-azosa (40).

Es interesante señalar que el calostro de las cerdas contiene anticuerpos protectores que proporcionan a los neonatos resistencia contra las bacterias que lo contienen; Rutter y Jones (74) inmunizaron hembras preñadas con pili K89 purificado y beneficiaron a los neonatos con E. coli toxigénica K89+; en tales condiciones, solamente murió un 13% de los cerdos recién nacidos y, en contraste, el 70% de los procedentes de hembras preñadas no inmunizadas falleció por diarrea al efectuarse el peso correspondiente.

Smith y Lingood (21) reportaron otro antígeno responsable de la adherencia bacteriana al epitelio intestinal, el K99, presente en cepas de E. coli toxigénica que provocan diarrea severa en bodenros, corderos y lechones. Graaf y cols (31) lo caracterizaron determinando que tiene un peso molecular de 18,400, un punto isoeléctrico de 9.5 y una longitud de 7 a 8 nm; según otras observaciones, su expresión se favorece

en medios con poca aereación, bajas concentraciones de glucosa, a temperaturas de 37° C y durante la fase logarítmica, ya que su producción declina en la fase estacionaria (43).

Por su parte Morris (62) demostró que las cepas que poseen el K79 producen paralelamente otro antígeno fimbrial (denominado F41), cuyas propiedades morfológicas lograron establecer parcialmente en una mutante denominada E41 (la cual solo produce este antígeno): está formado por una subunidad proteica con peso molecular de 27,500 y otra más grande aún no caracterizada. Además, como se detectó que solo se produce in vivo, se le atribuyó algún papel en la patogénesis de la diarrea (23).

Otra fimbria manosa resistente de E. coli es la denominada 987 P; ésta posee un peso molecular de 23,000, un punto isoelectrico de 3.7; se encuentra en cepas enterotoxigénicas aisladas de cerdos con diarrea y determina la adherencia del microorganismo a las microvellosidades del intestino, tanto in vivo como in vitro; las cepas que la producen poseen una cápsula que actúa sinérgicamente con la fimbria para lograr la colonización del intestino delgado de los cerdos (11).

El estudio de este tipo de estructuras ha proporcionado interesantes resultados: las vacunas con pili purificados

K89, K99 y 987 F) inhiben la adherencia bacteriana a la mucosa pues compitan con los bacilos por los receptores y, por lo tanto, protegen contra las enfermedades diarreicas (54).

También se ha logrado conferir inmunidad pasiva a las crías vía calostro y, en este caso, la acción de los anticuerpos parece ser bactericida y logra proteger a las nuevas generaciones (11,67).

La adherencia en las cepas ECET de origen humano.

En cepas de E. coli aisladas de humanos con diarrea también se han detectado fimbrias manosa resistentes que promueven la adherencia; concretamente, en las enterotoxigénicas existen las denominadas CFA I (Colonization Factor Antigen), CFA II (18,19,20,21,22,23) y E 8775 (10).

Los pili CFA I y CFA II se han investigado extensamente, encontrándose que los primeros están constituidos por filamentos cuyos pesos moleculares son de  $1.6 \times 10^6$ , su estructura primaria consta de 147 aminoácidos y posee una región terminal hidrofóbica que ayuda a mantener su integridad. Por su parte, el CFA II (2) es un filamento serológicamente diferente al CFA I, que está integrado por tres antígenos a los que Smith (82) ha denominado CS1, CS2,



CS3 (Coli Surface) y a los cuales Cravioto y Scotland (10) han asignado las siglas de 1, 2, 3; sus respectivos pesos moleculares son de 14,800, 15,300 y 16,300 y se ha observado que dichos antígenos se encuentran asociados como CS1 y CS3 o CS2 y CS3, dependiendo del biotipo bacteriano (tabla 2).

Los factores de adherencia CFA I y CFA II están codificados por plásmidos de 60 megadaltons y su presencia correlaciona con la producción de las enterotoxinas termolábil (TL) y termoestable (TE), ya que las informaciones genéticas que codifican para las fimbrias y las mencionadas enterotoxinas se encuentran muy cerca en el genoma plasmídico; fenotípicamente, se presentan como CFA II, TE+, TL+, CFA I+, TE+, TL-, CFA II+, TL+, TE+, CFA II+, TE+, TL- o CFA II+, TL+, TE-. Cabe destacar que nunca se ha encontrado la presencia de CFA I y CFA II en una misma cepa (43). Según se ha establecido estos o el E 0775 se asocian sólo a serogrupos integrados en su totalidad por ECST (Tabla 3) y su producción se estimula cuando la bacteria crece en medios de cultivo enriquecidos (Agar CFA) a 37°C, ya que su síntesis se inhibe a temperaturas de incubación de 18°C.

Para llevar a cabo la detección de esta clase de fimbrias, se utilizan pruebas de hemaglutinación que incluyen el empleo de eritrocitos de diferentes especies en presencia de D-manosa; así, las bacterias CFA I+ aglutinan a

TABLA 2

HEMAGLUTINACION MANOSA RESISTENTE DE CEPAS DE E.coli DE SEROTIPO 06:H16

No. de Cepas	Producción de Toxinas		CFA II			Biotipo
	ST	LT	CS1	CS2	CS3	
2	+	+	+	-	+	A
1	+	+	+	-	+	A
5	+	+	+	-	+	A
1	+	+	+	-	+	A
3	+	+	+	-	+	A
1	+	+	+	-	+	A
3	+	+	+	-	+	A
2	+	+	-	+	+	B
11	+	+	-	+	+	B
1	+	+	-	+	+	B
1	+	+	-	+	+	B
2	+	+	-	+	+	B
1	+	+	-	+	-	C
2	+	+	-	+	+	C
1	+	+	-	+	+	C
1	+	+	-	+	+	C
2	+	+	-	+	+	C
3	+	+	-	+	+	C
1	-	+	-	+	+	F

Biotipo A: Adonitol positivo; dulcitol, rafinosa, ramnosa y sorbosa negativo.

Biotipo B: Adonitol y ramnosa positivo; dulcitol, rafinosa y sorbosa negativos.

Biotipo C: Adonitol, rafinosa y ramnosa positivo; dulcitol y sorbosa negativo.

Biotipo F: Ramnosa positivo; adonitol, dulcitol, rafinosa y sorbosa negativos.

TABLA 3

FACTORES DE COLONIZACION EN Escherichia coli.

Factor de coli nizacion.	Grupo Patógeno	Huesped Natural	Papel en Virulencia	Eritrocitos que aglutinan	Serogrupo
Tipo 1 (somático)	30-70% de todas las cepas.	No Hues- ped espe- cífico.	No probado	Cobayo (MS)	-
K88	ETEC	Lechones	Confirmado	Cobayo (MR)	08, 45, 138, 141, 147, 149, 157.
K99	ETEC	Becerro	Confirmado	Caballo, borrego (MR)	08, 9, 20, 101, 64.
987 P	ETEC	Lechones	Confirmado	Ninguna	09, 20, 141.
F41	ETEC	Becerro	No probado	Cobayo, humano (MR)	09, 101.
CFA I	ETEC	Humano	Probable	Humano, bo- vino, pollo. (MR)	015, 25, 63, 78.
CFA II (CS1, CS2, CS 3)	ETEC	Humano	Probable	Bovino, po- llo (MR)	06, 8.
E8775	ETEC	Humano	No probado	Humano, bo- vino (MR)	025, 115, 167.
CFA III*	ETEC	Humano	No probado	Humano, bo- vino, pollo.	?
CFA III	ETEC	Humano	No probado	Ninguno	?
Sin nombre	Indefinido	Humano	No probado	Bovino	?
EAF/R1	EPEC	Conejo	Probable	Ninguno	015
EAF	EPEC	Humano	Probable	Ninguno	026, 55, 111, 119, 126, 126 127, 128.

Nota: Abreviaturas: MS=manosa sensibles; MR=manosa resistente; ETEC=E.coli enterotoxi-  
génica; EPEC=E.coli enteropatógena; CS=Antígeno de superficie de E.coli; CFA=Factor de  
Colonización; EAF=Factor adherente de cepas enteropatógenas.

\*CFA III = Fimbrias diferentes aún no bien caracterizadas.

Tomado de: Rev. Inf. Dis. 7:3 :321-340. (1985)

los eritrocitos humanos A y los CFA II a los bovinos (a 4<sup>o</sup> C); sin embargo, se ha observado que este método es poco confiable, pues sólo muestra una especificidad del 69% (1) cuando se le compara con el de inmunodifusión, el cual emplea suero específico anti-fimbria; para efectuar este último, dicho suero se puede obtener de dos formas: una de ellas corresponde a la descrita por Evans (19), quien inmuniza conejos con una cepa que presenta la fimbria denominada H 10407 CFA I+ o la 1392 CFA II+ (según sea el caso) para obtener un suero que posteriormente adhiere con otra cepa que carezca del pili correspondiente (por haberse subcultivado en varias ocasiones). El segundo método se basa en la previa purificación de los pili después de haberlos separado de la bacteria por desprendimiento mecánico; así se aísla mediante precipitaciones y ultracentrifugaciones repetidas con sacarosa y finalmente se purifica por cromatografía (47); una vez efectuado lo anterior, se inmunizan los conejos obteniéndose el suero deseado.

Knutton (45) describió otra fimbria en una cepa de E. coli enterotóxigena del serogrupo O140:H28, la cual no aglutina eritrocitos humanos ni bovinos, pero que también podrían participar en la adherencia de dicho microorganismo a la mucosa intestinal humana.

Fundamentalmente, los estudios a los que se someten las fimbrias tienen como finalidad la de investigar qué tanto influyen dichas estructuras en la patogenia de la diarrea

causada al humano por E. coli; en este sentido, existen dos corrientes: Evans y cols (18,19,20,21) opinan que el CFA I y CFA II son indispensables para que E. coli se adhiera al intestino porque contribuyen a la colonización del epitelio intestinal; además, consideran que el uso de vacunas con estos pili pueden representar un avance importante en la prevención de las enfermedades intestinales. La otra corriente, liderada por Levine, Cravioto e Isaacson (10,51), sugiere que estas estructuras no constituyen un prerrequisito de virulencia para todas las cepas ECET que causan diarrea en humanos, pues existen otros factores que permiten su adherencia al epitelio; entre éstos mencionan a las lectinas, las proteínas de membrana externa, los glicocálices y a "otras adhesinas aún no detectadas"; la existencia de éstas es apoyada en trabajos tales como los que se citan a continuación (89,69,12,90).

En 1984, Williams y cols describieron una proteína de superficie presente en dos cepas de los serotipos O7:H4 y O21:H-, la cual interviene en la capacidad de dichos microorganismos para adherirse y penetrar a las células HeLa y Hep 2 en presencia de D-manosa (89). Los investigadores mencionados determinaron que dicha proteína tiene un peso molecular de 14,000, que su temperatura óptima de producción es de 37° C y que confiere a la bacteria la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos en presencia de D-manosa.

Orskov (69) detectó una proteína capsular a la que llamo 71, la cual se encuentra en las cepas de los serotipos O21:K4:H4 y O25:K4:Ha; según comprobó, ésta desempeña un papel importante en la adherencia de estos bacilos tanto a las células epiteliales del tracto urinario como a las bucales humanas, en presencia de D-manosa; el mismo autor demostró que las cepas mutantes que carecían de esta estructura no presentaban la propiedad señalada. Esta proteína sólo se produce incubando el microorganismo a 37°C y no se manifiesta a 18°C y su peso molecular es de 14.400 según se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida.

En 1986, Darfeuille (12) describió otra proteína de membrana externa que posee capacidad de adherirse a células epiteliales del intestino delgado humano en presencia de D-manosa pero que, a diferencia de la descrita por Williams y cols (90), no aglutina eritrocitos humanos. Esta se detectó en una cepa enterotoxigénica aislada de un paciente con diarrea y, en estudios posteriores, se logró determinar que tiene un peso molecular de 16 megadaltons y que puede extraerse por calentamiento (60°C durante 20 minutos); cabe hacer mención de que su expresión se ha asociado a un plásmido de 65 megadaltons.

La adherencia en las cepas ECEP.

En cuanto al grupo ECEP, su adherencia se ha atribuido a una proteína de membrana externa, a la cual, Levine (50) denominó EAF (Factor Adherente de E. coli enteropatógena) y que según observaciones de algunos investigadores como Williams (29) y Baldini (73) está codificada por un plásmido de 50 a 70 megadaltons. Baldini (73) comprobó que las ECEP de los serogrupos más frecuentes (O55, O111, O119, O127, O128, O142) presentan dicho plásmido y que su eliminación conduce a la pérdida de la capacidad de adherencia; asimismo, demostró que cuando dicho elemento extracromosomal se transfiere a otra cepa originalmente no adherente (E. coli K12), esta adquiere la propiedad de adherirse al epitelio correspondiente.

Scaletsky y Trabulsi (70) observaron que la adherencia de E. coli enteropatógena a células HeLa y hep 2 se presenta respetando dos patrones diferentes: a uno se le denomina "adherencia localizada" y tiene lugar cuando las bacterias forman grupos en áreas localizadas de la célula huésped originando entre una y tres microcolonias; por su parte, la "adherencia difusa" se manifiesta cuando los bacilos se adhieren prácticamente a toda la superficie de la célula sin originar acúmulos limitados.

Dichos patrones de adherencia se han asociado más

recientemente a ciertos serogrupos, encontrándose que mientras la "localizada" se presenta en serogrupos comunes, la "difusa" se manifiesta en otros menos frecuentes (O44, O86, O114) (78).

Como consecuencia de dicho hallazgo, en 1985, Nataro y cols siguieron esta misma línea de investigación y obtuvieron una sonda de un kilobase que sólo hibrida con el DNA de las cepas ECEP que muestran "adherencia localizada" y no con aquellas que presentan "adherencia difusa": así diseñaron un método que detecta a las cepas con "adherencia localizada" que pertenecen a los serogrupos más frecuentes de ECEP y que, además, permite clasificar a E. coli enteropatógena en 2 clases: I y II (73).

La clase I incluye a las cepas que reaccionan con la sonda y, por lo tanto, a las que presentan adherencia localizada y pertenecen a los serogrupos más frecuentes de ECEP; lógicamente en la clase II se han colocado a aquellas que, no habiendo reaccionado con la sonda, se adhieren en forma difusa y pertenecen a serogrupos poco comunes de ECEP.



v. E. coli enteroadherente (ECEA).

Mathewson, Dupont y Levine (58) sugieren la adición de otro grupo a los cuatro reconocidos en E. coli: el enteroadherente. Su planteamiento se fundamenta en el hecho de que han aislado cepas de casos de "diarrea del turista" en individuos que viajan a México, cuyas propiedades no coinciden con las que se clasifican dentro de los otros, es decir, cepas que no son productoras de toxinas ni invasivas y que tampoco pertenecen a serogrupos de ECEP y que, sin embargo, se adhieren a cultivos de células hep-2.

Este tipo de E. coli podría asociarse a algunos casos de "diarrea del viajero" según un estudio realizado por Mathewson en 1985 (58); dicho investigador encontró que un 14.8% de individuos afectados por "agentes desconocidos" presentaba cepas ECEA y que, en contraste, sólo un 3.6% de adultos sanos estaba colonizado por este tipo de microorganismo.

No obstante, deberá realizarse un mayor número de estudios sobre el particular para que la propuesta de dichos investigadores sea tomada en cuenta por el resto de los infectólogos.

## APPARATUS EXPERIMENTAL

### A. EQUIPG

Estufa 37C

Centrifuga clinica

Microscopio invertido

Horno

Autoclave

Campana de flujo laminar

Microscopio Optico

Congelador de Nitrogeno liquido

Balanza granataria

Balanza analitica

Refrigerador

Congelador

Baño María

Agitador magnético

## B. MATERIAL

Material para manejo de cepas bacterianas:

Asa bacteriológica

Machero

Cajas petri de plástico

Tubos de 13x100

Portaobjetos

Matraz Erlenmeyer de 500 mililitros

Colorantes para la técnica de Gram

Material para cultivos celulares:

Botellas de vidrio de paredes planas

Botellas de plástico de 25,80 cms para cultivos  
celulares

(Nucion No.cat=163371,153732)

Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mililitros

Probetas

Frascos de vidrio para almacenar soluciones

Micropipeta 0-50 microlitros

Jarra de anaerobiosis modificada para cultivos celulares

Criotubos con tapon de rosca (Nucion No.cat=366524)

Filtros Millipore

Placa de 24 pozos (Nucion No.cat=146465)

Medios de cultivo, soluciones y reactivos:

Ager CFA

Agar soya tripticaseína

Gelosa especial

Caldo Evans

Solución amortiguadora de fosfatos

Solución de Alsever

Solución de D-manosa al 1%

Solución de bicarbonato de sodio

Solución de penicilina estreptomicina

Solución de tripsina al 5%

Solución de verseno al 0.05%

Medio mínimo esencial de Eagle con 10% de suero fetal de ternera

Medio mínimo esencial de Eagle con 2% de suero fetal de ternera

Cristal violeta en ácido cítrico

NOTA: La composición y preparación de los medios de cultivo, soluciones y reactivos pueden consultarse en el anexo.

Material Biológico:

1. Células HELA (carcinoma de cérvix)

2. Conejos de Nueva Guinea de 1-3 kilogramos de peso

3. Ratones blancos (cepa CD1)

4. Cepas testigo.

- E. coli H10407 (O78:K2:H11) CFA I+

- E. coli H10407-P (O78:K2:H11) CFA I -

- E. coli 1392 (O6:H16 Biotipo A ) CFA II +

5. Cepas analizadas

385 cepas de E. coli aisladas de muestras obtenidas en la Unidad de Pediatría del Centro Médico.

De las 385 cepas que se investigaron, 278 procedían de 81 niños que no presentaban trastornos intestinales. 80 de 17 niños con diarrea y 27 cepas eran de procedencia desconocida.

## C. METODOS

### C.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA DE E.coli.

La muestra fecal se sembró por estria cruzada en agar McConkey o EMB y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron al azar cinco colonias lactosa + y se efectuaron pruebas bioquímicas en TSI, LIA, MIO, Citrato de Simmons y urea de Christensen, a razón de un juego por colonia. Estas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas y posteriormente las cepas identificadas bioquímicamente como E. coli se sembraron por duplicado en geloso especial a partir del TSI, incubándose a 37°C durante 24 horas; finalmente, se sellaron con parafina y se conservaron a 4°C. Es importante señalar que lo antes mencionado fue realizado con el apoyo de otras personas adscritas al laboratorio en el que se llevó a cabo la investigación.

### C.2. IDENTIFICACION SEROLOGICA DE E. coli ENTEROPATOGENA

Se tomó una asada del tubo de gelosa especial y se sembró en medio agar soya triplicaseína, el cual se incubó a 37°C durante 24 horas. Una vez que se propagó la cepa, sobre un portadiscos se prepararon tres suspensiones en solución salina isotónica.

La primera se homogeneizó perfectamente y se observó para detectar si se trataba de una cepa autoaglutinable.

de ser así, no se realizaba la serología.

La segunda se mezcló con acriflavina 1:1000, se homoge-  
neizó y cuando se manifestaban grumos se descartaba por  
considerarse ruginosa. La tercera gota se mezcló con un  
suero polivalente del Instituto Pasteur el cual contenía  
anticuerpos contra todos los serogrupos de E. coli  
enteropatógena; las cepas que aglutinaron con dicho suero  
se investigaron con los sueros Poli I, Poli II, Poli A,  
Poli B, Poli C.

Cabe señalar que las cepas que no aglutinaron con éstos  
se calentaron durante una hora a 100°C antes de volver a  
enfrentarse con los mismos sueros. Las reacciones con el  
suero Pasteur tuvieron como finalidad detectar a las cepas  
de ECEP, mientras que las efectuadas posteriormente con  
otros polivalentes confirmaban o cuestionaban los  
resultados obtenidos con el suero Pasteur.

## C.3. CULTIVOS CELULARES

### C.3.1 Tratamiento del material.

Se puso especial cuidado en que el material de vidrio  
utilizado para cultivos celulares (botellas, pipetas,  
cubreobjetos, frascos para almacenar soluciones etc.)  
estuviera perfectamente limpio y libre de cualquier  
residuo de sustancias tóxicas que pudieran interferir en  
la propagación y el mantenimiento de los cultivos

celulares; por tal motivo, fue necesario someterlo a un tratamiento efectivo antes de emplearlo.

Este consistió en colocar el material en una solución de hipoclorito 1:66 durante 24 horas, lavarlo 10 a 15 veces con agua corriente y después introducirlo otras 24 horas en una solución de ácido clorhídrico 1:33; posteriormente, se lavó con agua corriente (10 a 15 veces), se enjuagó 3 veces con agua destilada y después con agua desionizada. Finalmente, se secó en el horno durante 3 horas a 180°C, se enfrió, tapó y esterilizó durante 2 horas a 180°C.

#### C.3.3 Propagación de los cultivos celulares.

Se utilizaron células HeLa (de carcinoma de cérvix) para el ensayo de adherencia, las cuales se propagaron tanto en botellas de vidrio de 50 cm previamente tratadas como en otras nuevas de plástico de 25 y 30 cm.

El medio de cultivo empleado para su propagación fue el Medio Mínimo Esencial de Eagle con 10% de suero fetal bovino.

Cabe mencionar que si se contaba con un abasto suficiente de células y únicamente se requería mantener la monocapa, dicho medio se utilizaba con sólo 2% de suero fetal bovino.



Para realizar pases de una botella con 100% de confluencia a otra, primero se empleó un mililitro de solución de tripsina-versen: 1:250, el cual se distribuyó en toda la monocapa durante 15 segundos y se eliminó por la cara opuesta al crecimiento; posteriormente, se volvió a adicionar un mililitro de solución de tripsina-verseno, repitiéndose la operación y con golpes suaves a la botella, se observó cómo se desprendía la monocapa. Se adicionó medio de cultivo y se distribuyó en una o varias botellas según las necesidades de trabajo.

### 3.3 Preparación de placas con células HeLa.

Se utilizó una botella de 50 cm que contenía células al 100% de confluencia; su contenido se tripsinizó y una vez que se contaron las células en una cámara de Neubauer, se adicionó Medio Mínimo Esencial de Eagle con 10% de suero fetal de ternera, hasta obtenerse 40,000 células por mililitro.

Con una pipeta de cinco mililitros se homogeneizó la suspensión y se adicionó un mililitro de ésta en cada uno de los 24 pozos de una placa, los cuales contenían un cubreobjetos previamente tratado y estéril; a 12 pozos se les adicionaron además 0.5 mililitros de D-manosa al 5%; la placa se incubó a 37°C en una cámara de anaerobiosis modificada con 10% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37°C.

#### C.4. ENSAYO DE ADHERENCIA DE E. coli: A CELULAS HeLa.

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo Evans durante 18 horas a 37°C, se ajustó el inóculo bacteriano de acuerdo al tubo 4 de Mac Farland (24 U Klett) y se diluyó 1:4 con PBS completo.

Se utilizó una placa que contenía 24 pozos; en todos estos se habían depositado cubreobjetos con monocapas de células HeLa y sólo 12 de ellos contenían, además, D-mannosa. Cada una de las cepas se inoculó en un pozo con D-mannosa y en otro sin dicho carbohidrato; la placa se incubó durante 3 horas a 37°C y, transcurrido dicho tiempo, los cubreobjetos se lavaron 6 veces con PBS completo; las preparaciones se fijaron con metanol absoluto y se procedió a realizar su tinción con cristal violeta en ácido cítrico; se observaron al microscopio de luz, considerándose que una copa era adherente cuando había más de 10 bacterias adheridas a más del 50% de las células que integraban la monocapa.

#### C.5. HEMAGLUTINACIÓN

Se obtuvo sangre humana tipo A de donadores voluntarios utilizándose como anticoagulante un mililitro de ácido cítrico al 3.8%; después se separaron los eritrocitos y se lavaron con PBS completo. Los glóbulos rojos se diluyeron 1:4 con PBS completo y se almacenaron en solución de

Alsever y de esta suspensión se efectuó otra dilución 1:4 con PBS completo, a la cual se adicionó 1% de D-manosa para efectuar la prueba. El mismo procedimiento se aplicó para obtener los eritrocitos bovinos.

Aglutinación en placa. Cada cepa en estudio se propagó en agar CFA incubándose durante 18 horas a 37°C; posteriormente se seleccionó una colonia y se homogeneizó con solución salina isotónica antes de serle adicionada una gota de eritrocitos; se mezcló con un aplicador de madera a temperatura ambiente y se realizó la lectura correspondiente.

La cepa testigo H10407-F provenía de un cultivo en agar Soya Trypticaseína incubado a 18°C.

Para la determinación de CFA II, la prueba se realizó a 4°C con eritrocitos bovinos.

#### C.6. OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-CFA.

##### C.6.1 Obtención de la cepa lisa H10407 (CFA I+).

La cepa se cultivó en agar CFA a 37°C durante 18 horas y se cosechó con PBS completo; se ajustó el inóculo a 2400x10<sup>6</sup> microorganismos por mililitro (49 U Klett) y se administró intraperitonealmente a ratones; después de 24 horas, éstos se sacrificaron realizándose después un lavado peritoneal con solución salina isotónica estéril. El líquido colectado se sembró en agar Mac Conkey y en agar

CFA. Del agar CFA se escogieron posteriormente cuatro colonias a las cuales se efectuaron pruebas bioquímicas, la prueba de acriflavina para corroborar que eran lisas y la prueba de hemaglutinación con eritrocitos humanos A en presencia de D-manosa al 1% para determinar la presencia de CFA.

#### C.6.2 Preparación del inmunógeno.

La cepa se propagó en Agar CFA a 37C y se cosechó después de 18 horas con FBS completo. La suspensión se ajustó a aproximadamente  $100 \times 10^6$  bacterias por mililitro y se adicionó 0.5% de formalina; la suspensión se mantuvo a 4C durante 48 horas y finalmente se diluyó 1:10 con FBS completo.

#### C.6.3 Inmunización

La suspensión se inyectó cada cuatro días en la vena marginal de un conejo, incrementándose la cantidad correspondiente en cada administración 0.1, 0.2, 0.25, 0.5 y 0.8 mililitros respectivamente; ocho días después de suministrada la quinta dosis se aplicó un primer refuerzo de 1 mililitro del antígeno; y el segundo, vía intramuscular a 36 días de la primera dosis. Ocho días después se sangró al conejo y tras previa centrifugación de la sangre y eliminación de los eritrocitos, el suero

obtenido se conservó a 4°C.

#### C.6.4 Adsorción del suero.

La cepa H10407-P lisa CFA I- se propagó en TSA a 18°C durante horas y se cosechó con PBS completo; por cada gramo de bacterias se adicionó un mililitro de suero, incubándose posteriormente a 56°C durante 24 horas; después se separó el suero del paquete bacteriano y se repitió dicho proceso de adsorción hasta que el suero no presentara aglutinación con la cepa H10407-P.

#### C.6.5 Titulación del suero.

Se prepararon diluciones seriadas del suero adsorbido utilizándose PBS completo y se probó la aglutinación con la cepa H10407 en portaobjetos; el título del suero se consideró como la última dilución que aglutinaba al inóculo bacteriano.

## RESULTADOS

Las cepas analizadas se probaron con el suero polivalente del Instituto Pasteur el cual, teóricamente, sólo aglutina a las cepas pertenecientes a serogrupos enteropatógenos (ECEP); en este contexto, se encontró que 64 presentaron determinantes antigénicos homólogos a anticuerpos contenidos en dicho suero.

Por otro lado, sólo 34 de las 64 cepas Pasteur-positivo aglutinaron, además, con alguno de los otros sueros polivalentes que se emplearon: 7 lo hicieron con el Poli I, 9 con el Poli II, 4 con el Poli A, 1 con el Poli B y 13 con el Poli C.

Por lo que respecta al ensayo de adherencia a células HeLa en presencia de D-manosa, se encontró que, de las 385 cepas analizadas, 13 mostraron adherencia difusa, 10 adherencia localizada y 2 ambos patrones a la vez. De las primeras, sólo 4 aglutinaron con suero Pasteur, 1 resultó tanto Pasteur-positivo como Poli I-positivo y las 9 restantes no manifestaron positividad con alguno de los sueros empleados; en cuanto a las cepas que evidenciaron adherencia localizada y las que presentaron ambas formas, ninguna de ellas aglutinó con algún polivalente.

Cabe señalar que también se llevó a cabo el ensayo de adherencia en ausencia de D-manosa y, en tales condiciones, los datos obtenidos fueron los siguientes: 36 cepas mostraron

patrón de adherencia difuso, 9 el localizado, y 2 ambos patrones.

Por lo que se refiere a la determinación de CFA I o CFA II, dicha propiedad también se estudió en las 385 cepas mediante la prueba de hemaglutinación (tabla D). Sobre este particular los resultados fueron: ninguna presentó CFA II y sólo en 33 se puso de manifiesto el CFA I.

Sin embargo, sólo en 7 de éstas últimas se confirmó la presencia del pili correspondiente a través de la prueba de aglutinación en portabjetos en la que se empleó suero específico anti-CFA I preparado en conejo.

TABLA A

TABLA GENERAL DE RESULTADOS

Número de Cepa	Reacción con suero Pasteur	Reacción con sueros polivalentes	Adherencia en ausencia de D-Manosa		Adherencia en presencia de D-Manosa		Hema-glutinación	Agglutinación con suero anti CFAI
			Difusa	Localizada	Difusa	Localizada		
1001	+	Poli I	+	-	+	-	+	-
1017	+	Poli II	-	-	-	-	+	-
1020	+	-	+	-	+	-	+	-
1021	+	Poli I	+	-	+	-	+	-
1022	+	-	-	-	-	-	-	-
1025	-	-	-	-	-	-	+	+
1028	+	Poli I	-	-	-	-	-	-
1029	+	Poli II	-	-	-	-	+	-
1031	+	Poli II	-	-	-	-	-	-
1032	-	-	-	-	-	-	+	+
1054	+	-	-	-	-	-	-	-
1056	+	-	+	-	+	-	-	-
1072	+	-	-	-	-	-	-	-
1079	+	-	+	-	+	-	+	-
1086	-	-	+	-	+	-	+	-
1089	+	-	+	-	-	-	-	-
1097	-	-	+	-	+	-	+	+
1112	-	-	-	+	+	+	+	-
1114	-	-	+	-	+	-	+	-
1120	+	-	+	-	-	-	+	-
1123	-	-	+	-	-	+	-	-
1125	-	-	+	-	+	-	-	-
1134	+	Poli II	-	-	-	-	-	-
1139	+	-	-	-	-	-	-	-
1140	+	-	-	-	-	-	-	-
1145	+	-	-	-	-	-	-	-
1146	+	-	-	-	-	-	-	-
1147	+	Poli I	-	-	-	-	-	-
1150	+	-	-	-	-	-	-	-



TABLA GENERAL DE RESULTADOS

Número de Cepa	Reacción con suero Pasteur	Reacción con sueros polivalentes	Adherencia en ausencia de D-Manosa		Adherencia en presencia de D-Manosa		Hema-glutinación	Aglutinación con suero anti CFAI
			Difusa	Localizada	Difusa	Localizada		
1171	+	-	-	-	-	-	-	-
1176	+	Pol1 I	-	-	-	-	-	-
1177	-	-	-	+	-	+	-	-
1185	-	-	+	-	+	-	-	-
1189	-	-	-	+	-	+	-	-
1196	-	-	-	-	-	-	+	-
1198	+	Pol1 II	-	-	-	-	-	+
1211	-	-	+	-	+	-	+	+
1212	+	Pol1 I	-	-	-	-	-	-
1213	-	-	+	-	-	+	-	-
1214	+	-	-	-	-	-	-	-
1215	+	-	-	-	-	-	-	-
1234	+	Pol1 I	-	-	-	-	-	-
1237	-	-	+	-	+	-	-	-
1241	+	-	-	-	-	-	-	-
1242	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1254	+	Pol1 II	-	-	-	-	-	-
1255	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1256	+	-	-	-	-	-	-	-
1259	+	-	-	-	-	-	-	-
1260	+	-	-	-	-	-	-	-
1261	+	-	-	-	-	-	-	-
1264	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1272	+	-	-	-	-	-	-	-
1273	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1275	+	-	-	-	-	-	-	-
1276	-	-	+	-	-	-	-	-
1280	+	-	-	-	-	-	-	-
1283	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1284	+	Pol1 A	-	-	-	-	-	-
1290	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-
1294	+	-	-	-	-	-	-	-
1313	+	Pol1 C	-	-	-	-	-	-

TABLA GENERAL DE RESULTADOS

Número de Cepa	Reacción con suero Pasteur	Reacción con sueros polivalentes	Adherencia en ausencia de D-Manosa		Adherencia en presencia de D-Manosa		Hemaglutinación	Aglutinación con suero anti CPAI
			Difusa	Localizada	Difusa	Localizada		
1314	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1315	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1316	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1319	+	Poli A	+	-	-	-	-	-
1320	+	Poli A	+	-	-	-	-	-
1323	+	-	-	-	-	-	-	-
1326	+	-	-	-	-	-	-	-
1330	+	Poli II	-	-	-	-	-	-
1337	+	Poli B	-	-	-	-	-	-
1352	-	-	+	-	-	-	+	+
1353	-	-	+	-	-	+	-	-
1354	-	-	+	-	-	+	-	-
1355	-	-	+	-	-	+	-	-
1361	+	-	-	-	-	-	-	-
1362	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1363	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1364	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1365	-	-	+	-	-	+	-	-
1366	+	-	-	-	-	-	-	-
1372	+	Poli II	-	-	-	-	-	-
1388	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1389	+	-	-	-	-	-	-	-
1396	+	-	-	-	-	-	-	-
1400	+	Poli C	-	-	-	-	-	-
1412	-	Poli A	-	-	-	-	-	-
1418	-	-	-	-	-	-	+	+
1419	-	-	-	+	-	-	+	+
1421	+	Poli A	-	-	-	-	-	-

NOTA: No se incluyen 265 cepas que proporcionaron resultados negativos en todas las pruebas contempladas, 15 cepas con adherencia difusa en ausencia de D-manosa, 15 cepas que aglutinaron eritrocitos en presencia de D-manosa y no manifestaron positividad con el suero anti CPAI.

TABLA B

## RELACION DE CEPAS AGLUTINABLES Y SUS PROBABLES SEROGRUPOS Y SEROTIPOS

SUEROS EMPLEADOS	SEROGRUPOS O SEROTIPOS DETECTABLES	NUMERO DE CEPAS DETECTABLES
Pasteur	018, 020, 026, 028, 044, 055, 078, 086, 0111, 0114, 119, 124, 125, 126, 127, 128, 142.	30*
Poli I	026, 055, 078, 086, 0111; 0114, 0119.	7
Poli II	0124, 125, 127, 128	9
Poli A	0111:K58; 055:K59 026:K60; 0127a:K63	4
Poli B	0860:K61; 0128:K67 019:K69; 0124:K72 025:K70; 0126:K71	1
Poli C	018a; 18c:K77; 020a:K61; 0200b:K84; 028:K73; 044:K74; 012:K66	13

\*Sólo se incluyen las cepas que no aglutinaron, además, con algún otro polivalente.

TABLA C

## RESULTADOS DE ADHERENCIA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE D-MANOSA

	ADHERENCIA					
	EN AUSENCIA DE D-MANOSA			EN PRESENCIA DE D-MANOSA		
	Difusa	Localizada	Difusa/localizada	Difusa	Localizada	Difusa/localizada
Pasteur * Positiva	5	0	0	3	0	0
Poli I - Positiva	2	0	0	1	0	0
Poli II- Positiva	0	0	0	0	0	0
Poli A- Positiva	1	0	0	0	0	0
Poli B- Positiva	0	0	0	0	0	0
Poli C- Positiva	0	0	0	0	0	0
No.ECEP	30	4	2	9	10	2
TOTAL	38	9	2	13	10	2

\*Solo se incluyen las cepas que únicamente aglutinaron con suero Pasteur.

TABLA D

RELACION DE LAS CEPAS QUE AGLUTINARON ERITROCITOS HUMANOS A  
EN PRESENCIA DE D-MANOSA.

Cepa	Reacción con anti CFA <sub>I</sub>	Cepa	Reacción con anti CFA <sub>I</sub>
1001	-	1120	-
1003	-	1154	-
1015	-	1155	-
1018	-	1170	-
1020	-	1188	-
1021	-	1196	+
1022	-	1197	-
1025	+	1211	+
1029	-	1346	-
1032	+	1347	-
1067	-	1352	+
1074	-	1395	-
1079	-	1415	-
1089	-	1417	-
1097	+	1418	+
1112	-	1419	-
1115	-		

## DISCUSION

Los resultados obtenidos con el empleo del suero Pasteur, sugieren un elevado porcentaje de ECEP en el conjunto de cepas analizadas: 16% (64/385).

Sin embargo, los datos obtenidos con otros sueros polivalentes más específicos demuestran una baja confiabilidad del suero Pasteur en lo que se refiere a la detección de dicho grupo. Es decir, la cifra de 16% difiere de la de 9% (34/385) proporcionada por la prueba de aglutinación que contempla la utilización de un grupo de sueros polivalentes dentro del cual se incluyen el Poli I, Poli II, Poli A, Poli B y Poli C.

Lo antes mencionado coincide plenamente con lo establecido por Echeverría y cols (17), en el sentido de que el solo empleo del suero Pasteur propone una mayor incidencia de cepas ECEP, debido a que origina un notable número de "falsos positivos". Según el presente trabajo, éstos ascienden a 46% (30/64), lo cual implica una confiabilidad de tan solo 54% en la detección de ECEP si, para llevarla a cabo, únicamente se recurre a reacciones de aglutinación con suero Pasteur, luego, entonces, resulta necesario recurrir a sueros polivalentes y monovalentes para establecer que una cepa pertenece al grupo ECEP.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos mediante el ensayo de adherencia a células HeLa en presencia de D-mannosa éstos indican que los patrones descritos para ECEP en la

literatura, no son exclusivos de este grupo; este comentario se desprende del hecho de que, tanto la totalidad de las cepas que mostraron adherencia localizada como 4 de las que presentaron la difusa, no aglutinaron con ninguno de los sueros polivalentes que detectan ECEP por lo que, antes de investigar esta propiedad en una cepa determinada, es fundamental determinar por alguno de los métodos confiables que se trata de ECEP. Es decir, que un bacilo de la especie de E. coli manifieste alguno de los patrones mencionados no significa, por sí sólo, que aquel pertenece al grupo en cuestión.

Otro aspecto digno de señalarse corresponde al hecho de que los pili tipo 1, los cuales se encuentran en la mayoría de las cepas de E. coli (incluyendo las de la flora intestinal), pueden participar activamente en el fenómeno de adherencia bacteriana; ello se deduce de lo siguiente: de 19 cepas que evidenciaron el patrón difuso en ausencia de D-manosa (el cual bloquea el concurso de los pili 1) no mostraron patrón alguno y sólo cambiaron a la forma localizada en presencia de dicho carbohidrato.

Por lo que toca a las pruebas de hemaglutinación en presencia de D-manosa, los resultados no permiten realizar una evaluación de la que se utiliza para detectar el CPA II. Debido a que ninguna de las cepas analizadas originó la aglutinación de glóbulos rojos bovinos.

Sin embargo, en lo que concierne a la que se emplea para

poner de manifiesto el CFA I, se encontró que ésta posee una confiabilidad limitada: de las 33 copias que la dieron positiva, sólo 7 reaccionaron con el suero anti-CFA I; esto sugiere que podría un 78% de falsos positivos y, consecuentemente, que sólo debe aplicarse como tamiz. De hecho, la literatura le otorga un 68% de exactitud en relación a la prueba inmunológica de RID.



### III. Conclusiones.

1. En la clasificación de una cepa de E.coli como ECEP, la utilización de suero Pasteur o equivalente sólo posee valor presuntivo, siendo necesario confirmar los resultados con el empleo de sueros más específicos.
2. Los patrones de adherencia "difuso" y "lo calizado" no son exclusivos de los serogrupos ECEP. Sin embargo, ello no significa que su determinación carezca de valor en lo que corresponde a la caracterización de las cepas previamente clasificadas como ECEP.
3. La prueba de hemaglutinación, cuando se emplea para detectar presencia de CFAI en E.coli, sólo debe considerarse como prueba tamiz, ya que sus resultados tendrán que confirmarse mediante técnicas más confiables.

#### IV. ANEXO

##### Agar CFA (20)

Casaminoácidos .....	1 g
Extracto de levadura .....	0.15 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.005 g
MnCl <sub>2</sub> .....	0.0005 g
Agar agar.....	2.0 g
Agua destilada.....	100

##### Gelosa Especial (29)

Agar base sangre.....	20 g
Extracto de carne.....	1.5 g
Peptona de caseína.....	2.5 g
Agar agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Solución Amortiguadora de Fosfatos (15)

Solución A

NaCl.....8 g  
KCl.....0.2 g  
Na2HPO4.....1.15 g  
KH2PO4.....0.2 g  
Agua destilada.....800 ml

Solución B

CaCl2.....0.1 g  
Agua Destilada.....100 ml

Solución C

MgCl2.....0.1 g  
Agua Destilada.....100 ml

Las soluciones se esterilizan por separado en autoclave durante 15 minutos a 1.1 Kg/cm. La solución salina amortiguadora completa se hace mezclando 3 partes de la solución A, con una parte de la solución B y una parte de la solución C. El pH final es 7.2.

Caldo Evans (21)

Casaminoácidos.....2.0 g  
Extracto de levadura.....0.6 g  
NaCl.....0.25 g  
K2HPO4.....0.87 g  
Trazas\*.....0.1 ml  
Agua destilada.....100 ml

\*Trazas de metales

MgSO4.....5 g  
MnCl2.....0.5 g  
FeCl3.....0.5 g  
H2SO4.....0.005 ml

Aforar a 100 mililitros.

Cristal Violeta en ácido cítrico (56)

Cristal violeta.....1 g  
Ácido cítrico.....21 g  
Aforar a 100 mililitros con agua destilada.

Solución de Alsever (55)

Glucosa.....20.5 g  
Citrato de sodio.....8.0 g  
Ácido cítrico.....0.55 g  
NaCl.....4.2 g  
Agua destilada.....1000 ml

Soluciones y Reactivos utilizados en cultivos celulares.

Solución de bicarbonato de sodio al 4.4 %

Bicarbonato de sodio (J.T.Baker No.cat.M28679).....4.4 g  
Rojo de fenol.....100 micro  
litros  
Agua desionizada.....100 ml

Disolver el bicarbonato de sodio, adicionar el rojo de fenol y bajar el pH con CO<sub>2</sub> hasta que se presente un color rojo pálido. Esterilizar con filtro Millipore 0.45 de poro, envasar asepticamente y sellar.

Solución de penicilina estreptomicina (PES)

Penicilina G.....1000 U.I.  
Sulfato de estreptomina.....1.0 g  
Agua destilada.....10 ml

Disolver los antibioticos por separado en 5 mililitros de agua desionizada cada uno. Agitar hasta total disolucion. Mezclar las soluciones en un frasco estéril y conservar a 4°C.

Solución de tripsina al 5%

Solución A de PBS (20 x) .....50 ml  
Tripsina 1:250 (Difco).....50 g  
Agua destilada.....950 ml  
NaOH.....hasta pH de  
7.6.

Mecclar el PBS con agua, agregar la tripsina y agitar a 40° hasta que se disuelva por completo. Ajustar el pH hasta 7.6 y filtrar en papel de poro fino. Esterilizar con filtro Millipore de 0.22 de poro y almacenar a 4°C.

Solución de verseno al 0.05%

EDTA (Bionon).....0.05 g  
Agua desionizada.....100 ml

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y conservar a temperatura ambiente.

Solución de tripsina-verseno 1:250

Tripsina 5%.....1 ml  
Verseno 0.05%......250 ml

Mecclar en condiciones de esterilidad y conservar a 4°C.

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) al 10% de suero fetal de ternera.

MEM 10 x (In vitro No. cat ME-019) .....10 ml  
Suero fetal de ternera (In vitro No. cat ME-301)...10 ml  
Solución penicilina estreptomicina.....0.1 ml  
Agua desionizada.....80 ml  
Bicarbonato de sodio 4.4%.....hasta pH  
7.2

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) al 2% de suero fetal de ternera para mantenimiento.

MEM 10 x (In vitro No. cat ME-019).....10 ml  
Suero fetal de ternera (In vitro No. cat S-01).....2 ml  
Solución de penicilina estreptomicina.....0.1 ml  
Agua desionizada.....88ml  
Bicarbonato de sodio 4.4%.....hasta pH  
7.2.

## I. BIBLIOGRAFIA

1. Arhen, M. G., Gothefero, L., "Comparisons of methods for detection of colonization factor antigens on ETEC". J. Clin. Microb. 22/3/586-591 (1984).
2. Bergman, J., Mark, A., "Attachment factors among ETEC from patients with acute diarrhea from diverse geographic areas". Infect. Immun. 32/2/861-870 (1981).
3. Blumenstock, E., Jann, K., "Adhesion of piliated E. coli strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili". Infect. Immun. 35/1/264-269 (1982).
4. Braun, W., Bonestell, E., "Variation of characteristics in Brucella abortus variants and their detection". Am. J. Vet. Res. (1947).
5. Bray, J., "Isolation of antigenically homogeneous strains of Bacterium coli napolitanum from summer diarrhoea of infants" Journal of Pathology and Bacteriology 57/239-247 (1945).
6. Bray, J., Deavan, T. "Slide agglutination of Bacterium coli var napolitanum in summer diarrhoea" J. Path. and Bact. 60/395-401 (1949).
7. Cantey, J. R., Blake, R. K., "Diarrhea due to E. coli in the rabbit: a novel mechanism" J. Inf. Dis 135/454-462 (1977).
8. Costerton, W. J., Geasey, G., Cheng, J. K., "El mecanismo de adherencia de las bacterias" Investigacion y Ciencia 19 (1978).
9. Costerton, W. J., Irvin, T. R., "The bacterial glycocalyx: in nature and disease" Ann. Rev. Microb. 35/299-324 (1981).



10. Cravioto, A., Scotland, M., Rowe, S., "Hemagglutination activity and colonization factor antigen I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of E. coli isolated from humans" Infect. Immun. 36/1/189-197 (1982).
11. Chan, R., Acres, D., Costerton, W., "Use of specific antibody to demonstrate glycocalyx, K99 pili, and the spatial relationship of K99+ ETEC in the ileum of colostrum-fed calves" Infect. Immun. 37/3/1170-1180 (1982).
12. Darfeuille, Michoud, Forestier., "Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an ETEC strains." Infect. Immun. 52/2/468-475 (1986).
13. Denke, F., Thorne, M., Gorbach, A., "Attachment pili from Enterotoxigenic E. coli pathogenic for humans." Infect. Immun. 26/1/362-368 (1979).
14. Denke, F., Thorne, M., Gorbach., "Serotypes of attachment pili of Enterotoxigenic E. coli isolated from humans" Infect. Immun. 32/3/1254-1260 (1981).
15. Dulaney, A., Michelson, I., "A study of B. coli mutabilis from an outbreak of diarrhea in the new born" Am. J. Public Health 25/1241-1251 (1935).
16. Dulbecco, R., Vogt, M., "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses" J. Exp. Med. 97/167-175 (1954).
17. Echavarria, Taylor, J., "HeLa cell-adherent E. coli in children with diarrhea in Thailand" J. Inf. Dis 155/4/669-672 (1987).
18. Evans, G., Silver, P., "Plasmid controlled colonization

- factor associated with virulence in ETEC for humans" *Infect. Immun.* 12/3/656-667 (1975).
19. Evans, D., Evans, G., "Production of vascular permeability factor by Enterotoxigenic E. coli isolated from man" *Infect. Immun.* 9/5/725-730 (1975).
  20. Evans, G.D., Evans, J., Tjoa., "Hemagglutination of human group A erythrocytes by ETEC isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor" *Infect. Immun.* 18/2/330-337 (1977).
  21. Evans, G., Evans, J., DuPont, L., Tjoa., "Detection and characterization of colonization factor of ETEC isolated from adults with diarrhea" *Infect. Immun.* 19/2/727-736 (1978).
  22. Evans, G. D., Evans, J., "New surface associated heat-labile colonization factor antigen CFA II produced by ETEC of serogroups O6 and O8" *Infect. Immun.* 21/2/630-647 (1978).
  23. Evans, G., DuPont L., "Virulence factors of evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain E. coli 841" *J. Gen. Microbiol.* 118/107-113 (1980).
  24. Ewing, W. H., Tanner, K. E., "Investigator of E. coli O group 18 serotypes isolated from cases of infantile diarrhea" *Public Health Laboratory* 14/106-115 (1956).
  25. Ferguson, W. W., June, R. C., "Experiments on feeding adult volunteers with E. coli 111:84 a coliform organism associated with diarrhea" *Am. J. Hyg* 55/155-169 (1952).
  26. Gastra, Frits, De Graaf., "Host specific fimbrial adhesines of noninvasive enterotoxigenic E. coli strains" *Microb. Rev*

16/2/129-161 (1982).

27. Gianella, R. A., "Suckling mouse model for detection of heat-stable E. coli enterotoxin: characteristics of model" Bioquimia 2/14/379-382 (1976).
28. Giles, C., Sangster, G., Smith, J., "Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. Arch. Dis. Child 24/45-53 (1949)
29. Giono, C. E. "Conservacion y mantenimiento de microorganismos" Bioquimia 2/14/379-382 (1979)
30. Surrant, R. L., Brunton, L. L., "Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid sensitive in vitro assay to enterotoxins of Vibrio cholera and E. coli " Infect. Immun 10/320-327 (1974 ).
31. Graaf, K., "Production of K99 antigen by ETEC strains of antigen groups O8, O9, O20 and O101 grown at different conditions" Infect. Immun 27/1/216-221 (1980).
32. Honda, T., Arita, M., "Characterization of new hydrophobic pill of human ETEC: a possible new colonization factor. Infect. Immun 43/3/959-965 (1984).
33. Isaacson, E. R., "K99 surface antigen of E. coli: purification and partial characterization" Infect. Immun 15/1/272-279 (1977).
34. Isaacson, E. R., Fusco, C. P., "In vitro adhesion of E. coli to porcine small intestinal epithelial cells: pill as adhesive factors" Infect. Immun. 21/2/392-397 (1978).
35. Isaacson, E., "Factors affecting expressions of the E. coli

- pilus K89" *Infect. Immun.* 28/1/190-194 (1980).
36. Jann, K., Schidt, G., "E. coli adhesion to Saccharomyces cerevisiae and mammalian cells: role of piliation and surface hydrophobicity" *Infect. Immun.* 32/2/484-489 (1981).
  37. Jones, G. W., Rutter, J. M., "Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by E. coli in piglets" *Infect. Immun.* 6/9/918-927 (1972).
  38. June, R. C., Ferguson, W.W., "Experiments in feeding adults volunteers with E. coli O55:B5 a coliform organism associated with infantile diarrhea" *Am. J. Hyg.* 57/227-236 (1953).
  39. Karch, H. Heesemann, J., "Phage associated cytotoxin production by enteroadhesiveness of enteropathogenic E. coli isolated from infants with diarrhea in West Germany" *J. Inf. Dis.* 155/4/707- (1987).
  40. Kaufman, F., "The serology of the coli group" *J. Immunol.* 57/71-100 (1947).
  41. Keusch, C., "Specific membrane receptors: pathogenic and therapeutic implications in infectious diseases" *Rev. Infect. Dis.* 1/517-529 (1979).
  42. Kirby, A. C., Hall, E. G., Coackley, W., "Neonatal diarrhea and vomiting outbreak in the same maternity unit" *Lancet* 2/201-207 (1980).
  43. Klemm, A., "Fimbrial adhesines of E. coli" *Rev. Inf. Dis.* 7/3/321-337 (1985).
  44. Knutton, S., Lloyd, R., Candy, A., "Adhesions of ETEC human small intestinal enterocytes." *Infect. Immun.* 48/3/824-831

- (1985).
45. Knutton, S., Lloyd, R., McNeish, S., "Identifications of a new fimbrial structure in ETEC serotype O148:H28 which adherence to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor" *Infect. Immun.* 55/1/86-92 (1987).
  46. Knutton, S., Lloyd, R., Mc. Neish, S., "Adhesion of EPEC to human intestinal enterocytes and cultured human mucosa" *Infect. Immun* 55/1/69-77 (1987).
  47. Korhonen, A., "Purification of pili E. coli and Salmonella typhimurium " *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 24/154-157 (1980).
  48. Kunate, J., Gordillo., Paniagua., ENFERMEDADES DIARREICAS EN EL NINO. Ediciones medicas del H.I.M. Octava edición .Mexico D.F.
  49. Laporta, Z., Silva, M., Scaletski, A., Trabulsi, R., "Plasmid coding for drug resistance and localized adherence to HeLa cells in EPEC O55:H- and O55:H6. *Infect. Immun.* 51/2/715-717 (1986).
  50. Levine, M., "Hemagglutination and colonization factor in enterotoxigenic and enteropathogenic E. coli that cause diarrhea" *J. Inf. Dis.* 141/6/733-737 (1980).
  51. Levine, M., Edelman, R., "Enteropathogenic E. coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis" *Epidemiologic Rev* 6/31-50 (1984).
  52. Levine, M. M., Nataro, J. P., "The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic E. coli

- is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor" J. Infect. Dis 152/550-559 (1985).
53. Levine, M., "E. coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent" J. Infectious Diseases 155/3/377-389 (1987).
54. Lingood, A., Ellis, L., Porter, P., "An examination of the O and K specificity involved in the body - induced loss of the K88 plasmid from porcine enteropathogenic strains of E. coli" Blackwell Scientific Publications 123-127 (1979).
55. Manual de Inmunología E.N.C.B. (1982).
56. Manual de Virología E.N.C.B. (1982).
57. Masalagh, A., Moon, W., "Pilus production, hemagglutination, and adhesion by porcine strains of ETEC lacking K88, K99, and 987 P Antigens" Infect. Immun. 35/1/305-313 (1982).
58. Mathewson, J., Johnson, A., DuPont L., "A newly recognized cause of travelers diarrhea: enteroadherent E. coli" J. Inf. Dis. 151/3/471-474 (1985).
59. Mc.Conell, Smith., "Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat stable enterotoxin production isolated from ETEC comparison of their properties" Infect. Immun. 32/2/927-936 (1981).
60. Mirzahi, N., Muñoz, H. O., SINDROMES DIARREICOS. FISIOFATOLOGIA. Editorial Manual Moderno. Segunda Edición. México D.F.
61. Moon, W. H., Kohler., "Prevalence of pilus antigens, enterotoxins, enterotoxins types, and enteropathogenicity among

- K88 negative enterotoxigenic E. coli from neonatal pigs" Infect Immun. 27/1/222-230 (1980).
62. Morris, A. J., Stevens, E. A., Sojka, J.W. "Isoelectric point of cell - free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties" Infect. Immun. 19/3/1097-1098 (1978).
63. Morris, J. A., Thorns, C. J., Sojka, W. J. "Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strains E. coli B41" J. Gen. Microbiol. 118/107-113 (1980).
64. Morris, A. J., Scott, C. A., "Adhesion in vitro and in vivo associated with adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strains E. coli B41" Infect. Immun. 36/3/1144-1153 (1982).
65. Mosley, S.L., I. Hug., "Detection of enterotoxigenic E. coli by DNA colony hybridization" J. Inf. Dis. 142/6/892-892 (1980)
66. Muñoz, H. O., Olarte, J., DuPont, L., "Gastroenteritis infecciosa aguda, etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y el moco fecal" Arch. Invest. Med. 10/125 (1979).
67. Nagy, B., "Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxigenic colibacillosis" Infect. Immun. 27/1/21-24 (1980).
68. Nataro, P., Baldini, M., Levine, M. "Detection of an adherent factor of EPEC with a DNA probe" J. Infect. Dis. 152/3/560-565 (1985).
69. Orskov, I., Andersen, B., Diguid, P., "An adhesive protein capsule of E. coli." Infect. Immun. 47/1/191-200 (1985).

70. Pal, T., Passa, A. S., "Modified enzyme - linked immunosorbent assay for detecting enteroinvasive E. coli and virulent Shigella strains" J. Clin. Microbiol. 21/415-418 (1985).
71. Parson, L., Anwar, H., "In vitro adherence of radioactivity labeled E. coli in normal and cystitis prone females" Infect. Immun. 26/2/453-457 (1979).
72. Philips, S., "Diarrhea: A current view of the pathophysiology" Gastroenterology 63/495 (1972).
73. Robins, B., "Traditional enteropathogenic E. coli of infantile diarrhea" Rev. Infect. Dis. 9/1/28-50 (1987).
74. Rutter, J. M., Jones, G. W., Drown, G. T. H., "Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets again enteric disease caused by K88 positive E. coli" Infect. Immun. 13/667-676 (1976)
75. Salit, I. E., Gotschlich, E. C., "Type E. coli pili: Characterization of binding to monkey kidneys cells" J. Exp. Med. 146/1182-1195 (1977).
76. Salit, I. E., Gotschlich, E. C., "Hemagglutination by purified type 1 E. coli " J. Exp. Med. 146/1167-1181 (1977).
77. Sansonetti, O. J. "Genetics of virulence in enteroinvasive E. coli" Microbiology ASM 74-77.
78. Scaletsky, A. C., Silva, M., Trabulsi, R., "Distinctive patterns of adherence of EPEC to HeLa cells" Infect. Immun. 45/2/534-536 (1984).
79. Scaletsky, A., Silva, M., "Correlation between adherence to



- HeLa cells and serogroups, serotypes and bioserotypes of E. coli" Infect. Immun. 49/3/528-532 (1985).
80. Silverblott, J., Dreyer, B., "Effect of pili susceptibility of E. coli to phagocytosis." Infect. Immun. 24/1/218-223 (1979).
81. Smith, H. W., Lingood, M. A., "Further observations on ETEC enterotoxins with particular regard those produced by atypical piglet strains and buccal and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and K antigen possessed by calf and lamb strains" J. Med. Microb. 5/243-250 (1972).
82. Smyth, G. J., "Serological heterogeneity and biotype specificity of mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic E. coli of serotype O:K15:H16 isolated from travellers and infantile diarrhoea" FEMS Symp. Microbial Enveloped 109 (1980).
83. Snodgrass, R, Nagy, K., "Passive immunity in calf diarrhoea: vaccination with K99 antigen of ETEC and rotavirus" Infect. Immun. 37/2/586-591 (1982).
84. Sussman, M., "The virulence of E. coli" ASM Academic Press (1985)
85. Taylor, J., Powell, B. W., "Infantile diarrhoea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation" Med. J. 2/117-123 (1949).
86. Thomas, V., Cravioto, A., Scotland, M., "New fimbrial antigen types (EB775) that may represent a colonization factor in ETEC in humans" Infect. Immun. 35/3/1119-1124

(1982).

87. Ullan, Rollo., "Pathogenic of E. coli gastroenteritis in man another mechanisms" Med. Int. 302/2/99-101 (1980).
88. Wadstrom, T., Smith, A., "Hydrophobic adsorptive and hemagglutinating properties of ETEC with different colonization factor antigens and adherence factor" Second International Symposium on neonatal diarrhea University of Saskatchewan, Canada (1979).
89. Williams, H. P., Evans, H., Mc Neish., "Adherence of an enteropathogenic strain of E. coli human intestinal mucosa Is mediated by a colicinogenic conjugative plasmids" Infect. Immun. 32/2/393-402 (1979).
90. Williams, .Knutton, McNeish., "Characterization of nonfimbrial mannose-resistant protein hemagglutinins of two E. coli strains isolated from infants with enteritis " Infect. Immun. 44/3/592-598 (1984).