



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

Identificación de Cepas Invasivas de Escherichia coli
por pruebas bioquímicas.

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

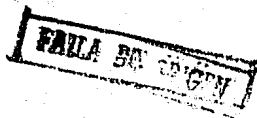
presenta

PEDRO MARTINEZ GONZALEZ



V N A M

CUAUTITLAN EDO. DE MEX.



1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

IDENTIFICACION DE CEPAS INVASIVAS DE Escherichia coli POR PRUEBAS BIOQUIMICAS

	Páginas
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS:	
General.....	12
Especificos.....	12
HIPOTESIS.....	13
MATERIAL Y METODOS:	
Material biológico.....	14
Pruebas bioquímicas.....	14
Prueba de invasividad.....	17
Prueba de virulencia.....	18
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	31
CONCLUSIONES.....	36
APENDICE "A"	
Preparación de medios.....	37
APENDICE "B"	
Preparación de reactivos y soluciones	39
APENDICE "C"	
Tratamiento de material.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	42

I N T R O D U C C I O N

Hasta finales de los años sesenta, la etiología de las diarreas sólo podía determinarse en aproximadamente el 20% de los casos, reconociéndose como agentes causales solo un número relativamente pequeño de microorganismos, como Shigella, Salmonella, los serotipos enteropatógenos de Escherichia coli, Vibrio colera y Entamoeba histolytica. Sin embargo en las últimas décadas las investigaciones realizadas acerca de las causas de la diarrea aguda y el desarrollo de nuevas técnicas para diagnóstico, permitio identificar nuevos agentes etiológicos - como Rotavirus, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, Clostridium difficile y las cepas enterotoxigénicas y enteroinvasivas de Escherichia coli (1).

Escherichia coli es un bacilo gram negativo y anaerobio - facultativo, descrito por primera vez en 1885 por Theodor Escherich (46). Es una bacteria común y numerosa en la flora fecal humana, se consideraba como patógeno oportunista cuando se encontraba fuera de su nicho ecológico.

Sin embargo apesar de que se sospechaba, no se tenían evidencias contundentes que pudieran afirmar que podría ser agente etiológico de enfermedades diarreicas. Fue hasta la década de los cuarenta en que estudios epidemiológicos se demostró -- que E. coli era responsable de diarrea epidémica en niños. Voluntarios humanos infectados con la bacteria, dieron mayor evidencia del caracter patógeno de este microorganismo (28). Debido a estos estudios se establecio la presencia del primer grupo patógeno de E. coli. En la actualidad se conoce que la habilidad para adherirse a la superficie de la mucosa del intestino, así como la producción de una toxina similar a la elaborada por Shigella dysenteriae tipo 1, forman parte fundamental de su mecanismo de virulencia (22). Estas E. coli se agrupaban en ciertos serogrupos y se designaron como enteropatógenas.

En los años sesentas se observó que ciertas cepas de -- E.coli producian una enterotoxina semejante a la producida por Vibrio colera, capaz de producir secreción fluida en segmentos ligados de intestino de conejo (18). Se identificó ta,mbién --

que ciertos serogrupos de E. coli eran capaces de invadir las células epiteliales de intestino y de producir queratoconjuntivitis en ojos de cobayo (3) provocando cuadros de disenteria en humanos, muy similar a la causada por Shigella, a éste grupo se le llamó E. coli enteroinvasiva. Más recientemente se han descrito cepas de E. coli capaces de producir dos potentes citotoxinas, una de las cuales produce efectos citotóxicos sobre cultivos de células Vero por lo cual se le denominó toxina Vero. Sin embargo estudios posteriores, demostraron que dicha citotoxina era neutralizada por anticuerpos contra la toxina de Shiga y en base a esto propusieron que se debería llamar toxina semejante a la de Shiga (SLT). Sin embargo el descubrimiento de una segunda toxina que no fue neutralizada con los anticuerpos contra la toxina Shiga pero que si producía efecto citotóxico en células Vero, produjo una controversia de como llamar ambas citotoxinas. Estos hallazgos indican que E. coli produce dos citotoxinas genéticamente relacionadas pero antigénicamente distintas, con actividades biológicamente similares, a las cuales se les a denominado Shiga like toxin I (SLT I) ó Vero toxin I (VT I) y Shiga Like Toxin II (SLT II) ó Vero Toxin 2 (VT 2). Las cepas productoras de citotoxinas causan cuadros severos de colitis hemorrágica y se han relacionado con el cuadro de síndrome urémico hemolítico. Estas cepas pertenecen principalmente al serogrupo O157:H7 y han sido llamadas -- E. coli enterohemorrágicas (36).

En los últimos años los conceptos sobre la forma en que E. coli puede causar diarrea se han aclarado bastante. Se a establecido una clasificación con la que la mayoría de los investigadores están de acuerdo, en ella se señalan cuatro mecanismos diferentes por los que E. coli puede causar diarrea:(27)

- 1) Producción de enterotoxinas; 2) Producción de citotoxinas;
- 3) Capacidad de adherencia e 4) Invasión de células epiteliales.

Las cepas de E. coli cuyo mecanismo de patogenicidad es la invasividad, se caracterizan por pertenecer a un número de serogrupos relativamente pequeño dentro de los que se incluyen: O28, O29, O42, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 y O167.

Las características de crecimiento en diferentes medios de cultivo fueron estudiadas, se observó que el crecimiento de estas bacterias se ve menos - inhibido en el medio de MacConkey que en otros medios de cultivo, señalando como factible utilizar en algunas cepas el medio de Hektoen (45).

Las características bioquímicas de E. coli invasiva se han estudiado poco, sin embargo la mayoría de los estudios coinciden en señalar que presentan características intermedias entre E. coli y Shigella (43), como se presenta en la tabla No. 1.

T A B L A 1

BIOTIPOS DE E. coli COMENZAL, ENTEROINVASIVA
Y Shigella spp.

PRUEBA	<u>E. coli</u>	EIEC	<u>Shigella</u>
Descarboxilación de lisina	88.7	0	0
Citrato	0	8.3	0
Movilidad	69.1	7.2 ^a	0
Lactosa	40.0	30.9	0.3
Gas de glucosa	91.1	73.2	0
Salicina	40.0	20.6	0
Ramposa	82.3	57.7	16.6

Los resultados están expresados en porcentaje de positividad.

a= Sólo la cepa 0124

EIEC= E. coli enteroinvasiva

Tomado de la referencia (43).

La relación entre E. coli y Shigella no es sólo en cuanto a comportamiento bioquímico, sino que incluso comparten características antigénicas y genéticas (43) como se observa en la tabla No. 2.

T A B L A 2

SEROGRUPOS "O" DE EIEC Y OTROS TIPOS DE Shigella

Serogrupos	Reacción antigénica	
	Identica	Reacción cruzada ^a
028		<u>S. boydii</u>
029		
042		
0112		<u>S. dysenteriae</u>
		<u>S. boydii</u>
0124 ^b	<u>S. dysenteriae</u>	
0136 ^c		<u>S. dysenteriae</u>
0143	<u>S. boydii</u>	
0144		<u>S. dysenteriae</u>
0152	<u>S. dysenteriae</u>	
0164		<u>S. dysenteriae</u>
0167		<u>S. boydii</u>

- a) Indica relatividad cruzada señalando que es solamente absorbible.
- b) Serogrupos de EIEC más comunmente aislados.
- c) Este serogrupo también da reacción cruzada con ----
S. boydii (anti 0136 aglutina S. boydii pero anti --
S. boydii no aglutina 0136).

Tomado de la referencia (43).

Los generos de Escherichia y Shigella están íntimamente - relacionados que no se pueden distinguir con base en la hibridación de los polinucleótidos de DNA. Esto facilita el poder realizar estudios que involucran recombinación genética, mediante los cuales se ha establecido que algunas de las regio-

nes del cromosoma bacteriano intervienen en la expresión del fenotipo invasivo (40). Estudios basados en el análisis de híbridos de E. coli K-12 y Shigella flexneri 2a, demostraron que por lo menos dos regiones cromosómicas bacterianas eran indispensables para la virulencia, el locus *Kep* que afecta la habilidad de Shigella flexneri para producir queratoconjuntivitis y regiones cercanas al operón de histidinamina¹) que codifican para antígenos somáticos "O". Se observó además que todos los híbridos rugosos eran incapaces de dar una prueba de Sereny -- positiva. Todos los resultados indican que es necesario un lipopolisacárido liso (LPS) para la penetración y multiplicación en el interior de las células y que la estructura de éste LPS puede ser un factor determinante en éste proceso (15).

Se transfirió a una cepa de E. coli K-12, regiones cromosómicas de Shigella que codifican para antígenos "O", así como el locus *purE*, no observando ninguna alteración de patogenicidad, por lo que se pensó que también eran necesarios locus extra-cromosomales para la expresión de la virulencia (40).

Posteriormente se señaló que un plásmido de 140 megadaltons(MDa), se encontraba relacionado con todas las cepas virulentas de Shigella y a aquellas variantes que perdían el plásmido eran uniformemente avirulentas, recobrando su virulencia -- cuando recobraban el plásmido de 140 MDa, los "locus" cromosomales ligados a el "locus" de histidina, la región arginina-mannitol y el "locus" *purE* son requeridos para la expresión total de virulencia en Shigella (40).

Hale y cols. encontraron entre las diferentes especies de Shigella un plásmido de 120-140 MDa que al ser cortado presentaba una notable homología con el plásmido de 140 MDa presente en E. coli enteroinvasiva, para ser cortado emplearon endonucleasas de restricción tipo I (22, 50). En un estudio que incluía un sistema de minicélulas a las que se les había incluido el plásmido de 140 MDa tenían su fenotipo invasivo. Mediante un marcador de metionina(35 S), se observó que por lo menos 10 polipéptidos con una masa molecular de por lo menos -- 12 y 62 Kilodaltons(KDa) eran siempre sintetizados en las minicélulas que contenían el plásmido asociado a la virulencia. Si

el inicio de una infección de células epiteliales involucra -- una interacción célula-célula es posible que las proteínas codificadas por el plásmido de 140 MDa se inserten en la membrana externa de los organismos invasivos funcionando como determinantes de virulencia (22).

En cuanto al papel de la toxina de Shiga, producida por Shigella dysenteriae tipo 1 o la toxina semejante a "Shiga" -- producida por E. coli; Hale y formal mediante estudios histológicos encontraron que cepas de Salmonella typhimurium (en la cual no se observa la producción de ésta toxina), después de ser fagocitadas, son llevadas invariabilmente a las placas linfoides, mientras que las cepas de Shigella se establecen en -- las células epiteliales causando destrucción de la mucosa y -- formando un absceso, lo cual se atribuye a la acción de la toxina que afecta inmediatamente la función celular inhibiendo -- síntesis proteica (5, 19).

Mediante estudios de cinética de crecimiento intracelular, se demostró que cepas de E. coli con el plásmido asociado a la virulencia, que casi no producían aShf, presentaban un crecimiento mucho mayor que una cepa altamente productora de ésta -- toxina (41). Por lo que el papel de la toxina dentro del mecanismo de patogenicidad de éste grupo de bacterias no es aún -- muy claro.

Para que un parásito pueda invadir tejidos se requiere de una serie de cualidades que sólo se presentan en un selecto -- grupo de microorganismos. Inicialmente el parásito debe ganar su entrada a la célula hospedadora. Para esto el parásito puede ser tomado pasivamente haciendo todo el trabajo el hospedador, ó bien puede forzar su entrada gastando su propia energía (29).

Hale y cols. establecieron que la infección de células -- epiteliales por Shigella requiere de actividad metabólica por parte de la bacteria. Ya que microorganismos virulentos no viables no eran capaces de penetrar tales células (20).

Ahora bien, para que el parásito pueda entrar a la célula hospedadora se requiere de un reconocimiento y una adherencia -- previa. Se observó que la penetración de Shigella flexneri a --

células HeLa (células de carcinoma uterino), ocurre por un mecanismo similar al de la fagocitosis realizada por fagocitos del sistema inmunológico, por lo que se cree que la fagocitosis de *Shigella* es llevado a cabo directamente y no por receptores mediadores de la endocitosis (6).

Knutton y cols. mediante microscopía electrónica estudiaron la adherencia de cepas de *E. coli* invasiva a cultivos de células HeLa y Hep-2. En este trabajo se describe la importancia que pueden tener las hemaglutininas presentes en la superficie de la bacteria para interactuar con los receptores presentes en las células hospedadoras (26). Mediante un análisis ultraestructural de la superficie de una cepa de ETEC establecen la presencia de una fimbria muy delgada que media la hemaglutinación manosa-resistente de glóbulos rojos y que permite a la bacteria adherirse a cultivos de tejidos; como al borde en cepillo de células del colon en humanos (23, 26). Mediante esta fimbria la bacteria puede evitar el efecto electrostático repulsivo que opera a una distancia de 10 nanómetros (nm) entre la bacteria y la célula, así como otros factores, tales como la capa de moco en la superficie de las células epiteliales -- que pueden ser penetradas por la estructura fina y circular de la fimbria (26).

Utilizando una cepa de *Escherichia coli* enteropatógena -- (EPEC) que expresaban los antígenos somáticos 3 y 4 de *Shigella*, demostraron que la adherencia inicial de estas bacterias es -- específica a las células M y no a las células epiteliales en general (25). Las células M son una ventana del sistema inmune en el intestino humano, se encuentran situadas en forma intercalada con las células epiteliales, y su borde en cepillo es -- bastante irregular. Estas células presentan actividad fagocítica y por medio de vacuolas transportan el material fagocitado hacia las placas de Peyer donde un grupo de células del sistema inmunológico se encargan del reconocimiento y procesamiento del antígeno para la producción de una respuesta inmune.

Una vez fagocitada la bacteria por la célula debe entonces evitar su destrucción, para esto el microorganismo debe libe-

rarse de la vacuola en la que fue incluido durante el proceso de penetración. Una posible vía de liberación, sería la producción de enzimas capaces de degradar la estructura celular que en ese momento envuelve a la bacteria. La producción de enzimas como parte del mecanismo de daño de una bacteria es un factor de virulencia importante que se ha descrito para otros microorganismos. Así, se ha encontrado como paso esencial, en la producción de enfermedad, la síntesis de proteasa por Pseudomona aeruginosa aislada de infecciones pulmonares (12), o la misma Shigella dysenteriae aislada de materia fecal capaz de producir mucinasas que hidrolizan azúcares de la mucina que bañan las células epiteliales del colon (2).

Winkler describió la acción de una fosfolipasa "A" por -- Rickettsia prowesakii (microorganismo invasivo) la cual era -- capaz de hidrolizar los glicerofosfolípidos de la membrana de células cuando aproximadamente cincuenta microorganismos via-- bles por célula eran centrifugados junto con la monocapa celu-- lar. Esta enzima puede ser usada por la bacteria para escapar de un fagosoma (50). En caso de EIEC la producción de una fos-- folipasa ha sido demostrada por medio de estudios de hemólisis de contacto, en los que la bacteria es centrifugada con eritro-- citos bovinos y posteriormente se mide la cantidad de hemoglo-- bina liberada, determinada por densidad óptica a 545 nm (41). Cabe mencionar que las cepas utilizadas en este estudio no --- producían hemólisis cuando eran probadas en un ensayo de pla-- ca.

Sansonetti y cols. demostraron que bacterias invasivas -- que habían perdido el plásmido de 140 MDa ya no causaban la -- lisis de eritrocitos y que la expresión de la actividad hemo-- lítica era dependiente de la temperatura, ya que esta se veía inhibida tras un período de crecimiento de la bacteria a 30 °C (37), ya libres en el citoplasma celular la bacteria debe en-- tonces multiplicarse. En el interior de una célula animal existe un medio extremadamente rico para el crecimiento de una bac-- teria, aunque no existen evidencias contundentes de que esto -- suceda (29). Por ejemplo, el nivel de hierro en los tejidos --

del hospedero enfermo se sabe que esta restringido, esto debido a que la mayoría del hierro corporal esta localizado intracelularmente como ferritina, hemosiderina ó grupo hemo y extracelularmente esta unido a proteínas captadoras de hierro de alta afinidad como la lactoferrina y la transferrina. Las bacterias patógenas se producen exitosamente bajo condiciones restringidas de hierro, desarrollando mecanismos para asimilar -- tal elemento del medio. Muchas bacteria patógenas presentan -- sistemas para captación de hierro de muy alta afinidad, en -- los que una característica esencial es la síntesis y secreción de sideróforos conjuntamente con la producción de proteínas de membrana externa (17). Los componentes de hierro así obtenidos favorecen entonces el desarrollo de la bacteria (21, 25, 48).

Griffiths y cols. examinando cuatro cepas de EIEC encontraron que cada una de ellas producción aerobactina (agente -- sideróforo) y una proteína de membrana externa de 76,000 Daltons durante su crecimiento en un medio con hierro escaso (17). Fue posible además identificar la region del cromosoma bacteriano que codificaba tanto para ala aerobactina como para la -- proteína de 75,000 Daltons que sirven para el receptor del sideróforo que ya ha captado el hierro, siendo tal region la --- arg-mtl del cromosoma de Shigella.

Después de la multiplicación intracelular, la bacteria -- debe entonces ser liberada de las células hospedadoras y por -- último el parásito debe sobrevivir en un periodo de transito -- hasta encontrar una nueva célula hospedadora (29).

La invasión de la mucosa gastrointestinal y principalmente las células del colon es un factor de virulencia importante; se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa, posteriormente se ve afectado el borde en cepillo del enterocito formandose una vesícula en la membrana de éste, que termina por permitir la penetración de la bacteria, se establece y multiplica en el interior de la célula y -- de ahí puede invadir a otras (2).

La capacidad invasiva en las cepas de E. coli se ha hecho evidente empleando modelos "in vivo" e "in vitro"; entre los--

primeros se encuentran la prueba de Sereny que fué la primera que se describió, esta consiste en colocar una gota de una suspensión bacteriana con aproximadamente 15×10^8 bacterias por mililitro en la conjuntiva de cobayos para buscar señales de conjuntivitis acompañadas de secreciones purulentas y edema a las 24, 48, 72, y 96 horas (41).

Yamaqata estudió la posibilidad de realizar la prueba de Sereny en ratones, por las ventajas que estos animales presentan en su manejo. Encontró que aunque la reacción desaparece más rápidamente y no es tan pronunciada en los cobayos, las cepas EIEC también daban una reacción positiva en la conjuntiva de ratones (43).

También es posible identificar diferencias en la virulencia de E. coli mediante la inoculación alantóidea de embriones de pollos con trece días de edad (31).

Nandadasa y cols. utilizaron cepas de EIEC aisladas de muestras diarreicas, demostraron que éstas cepas eran capaces de adherirse a la superficie de células Hep-2 y células HeLa, en condiciones que normalmente removían a bacterias no patógenas (53). Esta observación, abrió la posibilidad de utilizar los cultivos de células para la estandarización de una prueba de invasividad. En un estudio comparativo de la prueba de invasividad para cultivo de tejido y la prueba de Sereny se demostró la efectividad del método con monocapa celular para la identificación de cepas de EIEC y Shigella spp (10).

En años recientes la captación del colorante rojo congo, método indirecto para medir la captación del hierro por la bacteria, atribuido específicamente a los sideróforos y proteínas de membrana externa, se a utilizado como una prueba presuntiva para sugerir que una cepa de E. coli es enteroinvasiva y virulenta, ya que todas las E. coli rojo congo positivas pueden ser patógenas (32).

Al parecer la producción de exoenzimas es un factor determinante en la virulencia de EIEC; el establecimiento de un patrón enzimático resultaría ser un método alterno para la caracterización de este grupo de bacterias.

Las exoenzimas son enzimas hidrolíticas; es decir que su acción generalmente resulta en un desdoblamiento ó reducción del tamaño molecular de un sustrato (generalmente cambian una sustancia del estado coloidal al estado cristaloides). Al sembrar una bacteria en un medio con una sustancia coloidal dada (un sustrato) se puede examinar el agar alrededor de las colonias bacterianas para ver si este se ha modificado (generalmente se observa un halo de aclaramiento) o no, de esta forma es posible demostrar la presencia de una enzima en particular variando el sustrato en el medio de sembrado (2, 3).

Las diarreas infecciosas son un problema importante de salud en todo el mundo, sin embargo muestran particular seriedad en los países en vías de desarrollo, principalmente entre la población infantil. En el presente siglo se han realizado muchos avances para precisar la etiología de dichos padecimientos, así como los mecanismos de patogenidad. Sin embargo la identificación de muchas de estas bacterias, como aquellas cuyo mecanismo de patogenidad es la invasividad, sólo se cuenta con técnicas en las cuales el diagnóstico es muy costoso y muy tardado, siendo afectado directamente el estado de salud del individuo, y de forma indirecta, la economía del país. Por tal motivo se deben buscar procedimientos que ayuden a una identificación más rápida de estos agentes etiológicos de la diarrea.

O B J E T I V O S

G E N E R A L:

Buscar un patrón de pruebas bioquímicas para la identificación de cepas invasivas de E. coli (EIEC).

E S P E C I F I C O S:

Provar la capacidad invasiva en cultivos celulares (células HeLa) de cepas de E. coli aisladas de sujetos con y sin diarrea, y diarrea con sangre.

Determinar el patrón bioquímico de aquellas cepas que dan la prueba de invasividad positiva.

Determinar la posible correlación entre pruebas bioquímicas, invasividad a células y virulencia (prueba de Sereny), de las cepas estudiadas.

H I P Ó T E S I S

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) presenta características bioquímicas particulares que permiten su identificación en el laboratorio clínico.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Se estudiaron 299 cepas de E. coli aislada de heces de 60 individuos, 149 fueron recolectadas en la Clínica No. 22 en San Jerónimo, 150 recolectadas en la clínica No. 19 en Coyoacán. - Ambas clínicas se encuentran localizadas en el sur de la ciudad de México, D.F. 95 de las cepas se aislaron de pacientes con diarrea con sangre, 120 cepas de individuos solo con diarrea y 84 cepas de individuos asintomáticos. Las muestras se tomaron se sembraron en las clínicas. Para el aislamiento se utilizó - medio de MacConkey (Bioxón). De cada paciente se seleccionaron cinco colonias lactosas positivas y se identificaron mediante pruebas bioquímicas. Las cepas aisladas e identificadas se conservaron en medio de gelosa especial, manteniéndose a temperatura ambiente hasta su estudio. Como testigo positivo se utilizó la cepa 12298-2 de Escherichia coli proporcionada por el -- Dr. Alejandro Cravioto (Incytas DIF), como testigo negativo se utilizó la cepa 9001 proporcionada por la Dra. Silvia Giono -- (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN).

PRUEBAS BIQUÍMICAS:

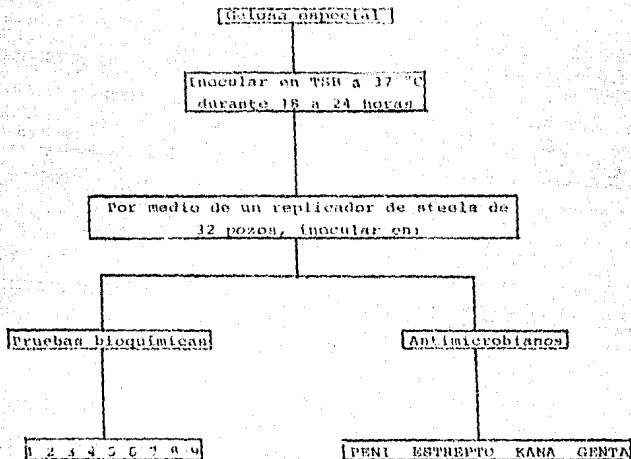
Para la caracterización de las cepas se utilizaron, la -- prueba de rojo congo de acuerdo a lo descrito por Sansonetti y Sasakawa (39, 41). Las cajas se prepararon con Agar Soya triplicaseína (TSA) (Bioxón) a las que se les adicionó el colorante rojo congo al 0.005% (p/v), concentración final. La prueba se considero positiva cuando la colonia adquiría un color rojo intenso y negativa cuando las colonias se observaban blancas. Para determinar la producción de lipasa y lecitinasa se utilizó el medio de Agar Yema de Huevo (37), una reacción positiva en la prueba de lipasa se determinó al observar un precipitado alrededor de las colonias, así como la formación de una capa iridicente ó capa perlada sobre las colonias; para hacer más aparente la reacción las colonias se cubrían con una solución saturada de sulfato de cobre (24). La producción de lecitinasa

se detectó al observar una zona opaca alrededor de las colonias (7, 24).

La capacidad para producir caseína se probó empleando la prueba en placa y en tubo con leche descremada (10), ésta además se estudio empleando leche tornasolada (Litmus Milk) (Difco). La prueba de hidrólisis de caseína en placa se consideró positiva cuando se presentaba aclaramiento del medio alrededor de las colonias (7). En la prueba en tubo, la peptonización del coagulo formado, se utilizó para considerar la producción de proteasa. Con leche tornasolada además de la producción de proteasa se observó la producción de ácido al virar el medio de cultivo de un color violeta a un color rosa, así como la reducción del medio cuando este adquiría un tono cremoso (7). Para seleccionar el antimicrobiano a utilizar en la prueba de invasividad se probaron cuatro antimicrobianos. Penicilina a una concentración 100 U.I. por mililitro; Estreptomicina a una concentración de 100 microgramos por mililitro; Kanamicina a una concentración de 15 microgramos por mililitro y Gentamicina a una concentración de 50 microgramos por mililitro. Para determinar si las bacterias eran sensibles o resistentes a los antimicrobianos, éstas se incubaron previamente en Caldo Soya Trypticaseína (TSB) incubadas de 18 a 24 horas a 37 °C y posteriormente se inocularon en cajas de agar Muller Hinton a las cuales se les había adicionado alguno de los antibióticos a probar a las concentraciones antes mencionadas (47). Las cepas se consideraban sensibles cuando en el medio se observaban menos de cinco colonias, y se consideraban resistentes cuando en el medio crecían más de cinco colonias. La inoculación de los diferentes medios, se realizó através de un replicador de Steels, a partir de un cultivo de 18 horas en TSB de cada una de las bacterias (24), (Diagrama 1).

DIAGRAMA 1

DETERMINACIÓN DEL PATRON BIOQUIMICO DE LAS CEPAS INVASIVAS Y
SENSIBILIDAD DE LAS MISMAS A LOS ANTIMICROBIANOS



- 1= Rojo CONGO 2= Lina de descarboxilada 3= agar Yema de huevo
4= Motilidad 5= Leche toronolada
6= Ornitina 7= MacConkey 8= Leche descremada en caja
9= Leche descremada en tubo ESTREPTO= Estreptomicina
PENI= Penicilina KANA= Kanamicina GENTA= Gentamicina

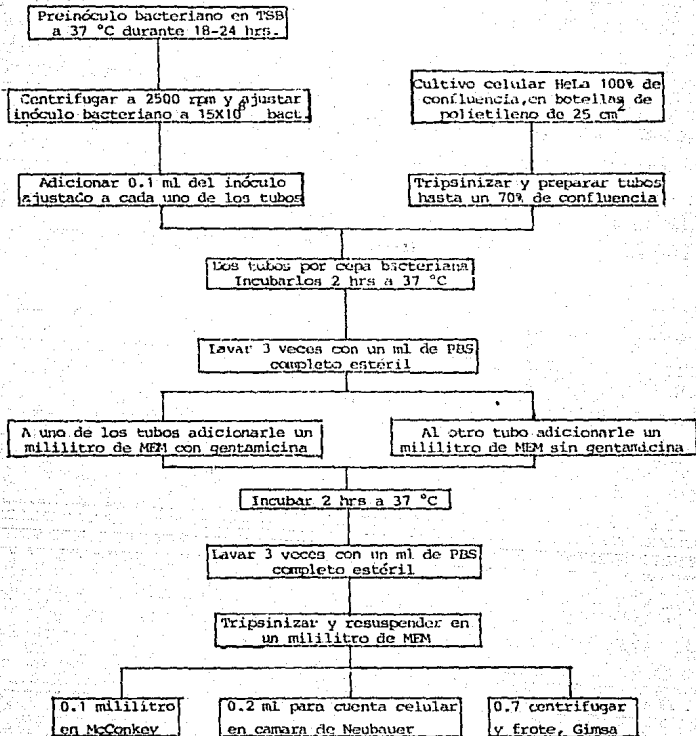
ten en una caja de agar MacConkey y con una varilla de vidrio en forma de "L" previamente flameada se distribuye para realizar cuenta de bacterias viables. 0.2 ml son utilizados para -- realizar una cuenta celular en camara de Neubauer. Los 0.7 ml restantes se centrifugaron a 300 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, y del paquete formado se tomó una muestra para realizar un frote el cual es fijado con metanol y teñido con colorante de Giemsa. La cuenta bacteriana obtenida del medio sin antimicrobiano, se utilizó como control del crecimiento bacteriano. El criterio que se tomó en cuenta para aceptar a una cepa como invasiva fue que por lo menos se contaran 130 colonias bacterianas en la caja en la que se sembró la muestra con antimicrobiano (Diagrama).

PRUEBA DE VIRULENCIA:

La prueba de virulencia en ojos de cobayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Sereny (42). De un crecimiento bacteriano en TSB de 18 horas, centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, el paquete bacteriano se ajusta a una concentración de 15×10^8 bacterias por mililitro. Una gota de esta suspensión es colocada en la conjuntiva del cobayo (Diagrama III). La --roacción se considera positiva si se produce queratoconjuntivitis a compañada de una secreción purulenta antes de las 96 --horas. Para esta prueba se utilizaron cobayos de 300-400 gramos.

DIAGRAMA 11

INVASIVIDAD DE LAS CEPAS DE E. coli A CULTIVOS CELULARES HeLa



- 3 -

DIAGRAMA III

PRUEBA DE SIKENY DE LAS CEPAS DE E. COLI INVARIANTE

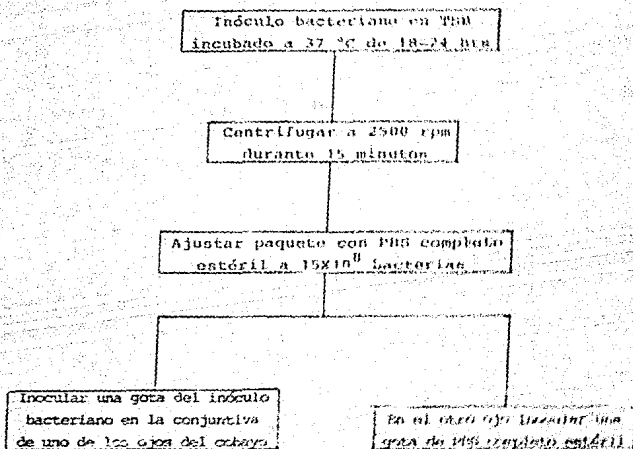
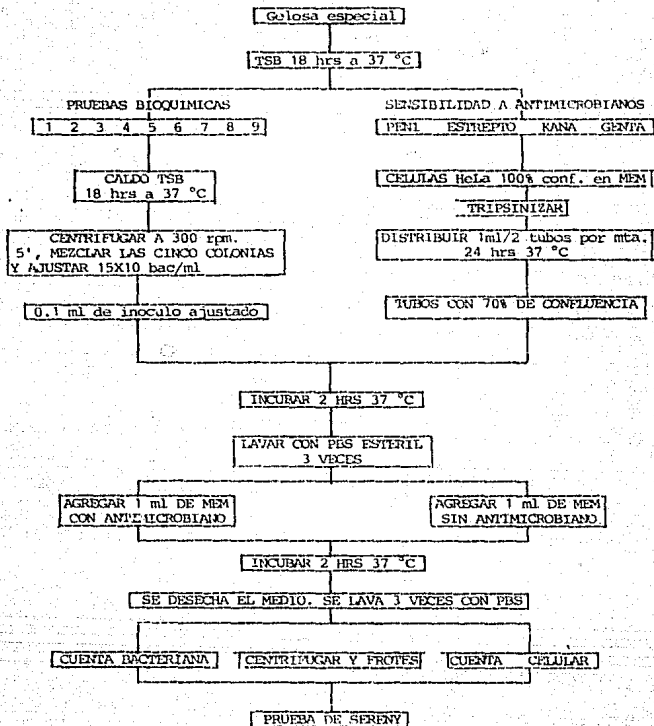


DIAGRAMA GENERAL



R E S U L T A D O S

Los pacientes que se estudiaron fueron de diferente edad y sexo (Tabla 1a, 1b, 1c).

T A B L A 1a

EDAD, SEXO Y CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA DE INDIVIDUOS ASINTOMATICOS

No. DE			CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA					
REGISTRO	EDAD	SEXO	PASTOSA	LIQ.	MOCCO	SANGRE	PMN	M. FECAL.
010	49a	F	+	-	-	-	0	+
012	2a	F	+	-	-	-	0	+
025	4a	M	+	-	-	-	0	+
027	3a	F	+	-	-	-	0	+
119	06m	F	+	-	-	-	0	+
122	36a	F	+	-	-	-	0	+
131	3a	F	-	+	-	-	0-2	+
140	28a	M	-	+	+	-	0	+
149	5a	M	+	-	-	-	0	+
158	6a	M	+	-	-	-	0	+
539	19m	F	+	-	-	-	0	+
548	7a	M	+	-	-	-	0	+
557	07m	F	+	-	-	-	0	+
634	42a	M	-	-	-	-	0	-
642	37a	M	+	-	-	-	0	-
706	04m	M	-	+	-	-	0	-
719	3a	F	+	-	-	-	0	+

a= años

m= meses

M. FECAL= Moco fecal

PMN= Polimorfo nucleares

LIQ= Líquida

T A B L A 1b

EDAD, SEXO Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE
PACIENTES CON DIARRREA

No. DE	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA								
	REGISTRO	EDAD	SEXO	PASTOSA	LIQ.	MOCO	SANGRE	PMN	M. FECAL
097	29a	M	-	+	+	-	-	2-4	+
098	8a	F	+	-	-	-	-	0	+
102	49a	F	-	+	+	-	-	0	+
103	39a	F	-	+	+	-	-	0	+
106	11m	M	-	+	+	-	-	0	+
108	5a	F	-	+	-	-	-	0	+
112	28a	M	-	+	+	-	-	0	+
113	22a	F	-	+	-	-	-	0	+
117	10m	M	+	-	-	-	-	0	+
118	13a	M	-	+	+	-	-	0-2	+
529	28a	M	+	-	-	-	-	0	+
530	28a	M	+	-	-	-	-	0	+
546	07m	M	+	-	-	-	-	0	+
547	58a	F	+	-	-	-	-	0	+
555	7a	F	-	+	-	-	-	0	+
623	39a	F	-	+	-	-	-	0-4	+
628	15a	M	-	+	-	-	-	0	-
633	28a	M	-	+	-	-	-	0	-
637	9a	M	-	+	-	-	-	0	-
641	39a	F	+	-	-	-	-	0	-
645	35a	M	-	+	-	-	-	0	-
700	22a	F	-	+	-	-	-	0	+
728	27a	F	+	-	-	-	-	0	+
844	3a	F	-	+	-	-	-	0-2	+

a= años

m= meses

M. FECAL= Moco fecal

LIQ.= Líquida

PMN = Polimorfo nucleares

T A B L A 1c

EDAD, SEXO Y CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA DE
PACIENTES DE DIARREA CON SANGRE

REGISTRO	EDAD	SEXO	CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA					
			PASTOSA	LIQ.	MOCO	SANGRE	PMN	M. FECAL
052	40a	F	-	+	+	+	10-15	+
181	44a	F	-	-	+	+	8-12	+
201	30m	M	-	+	+	+	0	+
203	25a	F	-	+	+	+	4-8	+
208	2a	M	-	+	+	+	8-10	+
238	4a	F	-	+	+	+	0-2	+
247	20m	F	-	+	+	+	14-16	+
275	2a	F	-	+	+	+	10-15	+
282	14a	F	-	+	+	+	+15	+
304	45a	M	-	+	+	+	10-15	+
565	15a	M	-	+	+	+	0	-
632	39a	F	+	-	+	+	0	+
658	5a	M	-	+	+	+	0	-
659	33a	F	-	+	+	+	0	-
701	26a	F	-	+	+	+	20-22	+
770	17a	M	-	+	+	+	10-17	+
795	51a	M	-	+	-	+	0	+
823	18m	M	-	+	-	+	0	+
865	37a	F	-	+	+	+	0	+

a= años

m= meses

M. FECAL= Moco fecal

LIQ.= Líquida

PMN= Polimorfo nucleares

Al realizar la caracterización bioquímica de las cepas encontramos que: cuarenta (13.4%) fueron rojo congo positivas, dieron positiva prueba de lecitinasasa 12(4.0%), 19(6.4%) fueron lipasa positiva, en prueba de litmus milk 130(43.5%) fueron positivas hasta digestión. La relación de positividad, de las pruebas con respecto al cuadro clínico fue similar en los tres grupos estudiados (tabla 2).

T A B L A 2

PROPORCION DE CEPAS QUE DIERON REACCION POSITIVA A LAS DIFERENTES
PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS, Y SU
RELACION CON EL CUADRO CLINICO

BIOQUIMICAS	CUADRO CLINICO			No. DE CEPAS	TOTAL(%)
	A	D	D C/S		
CAPTACION: ROJO CONGO	11/95	15/120	14/84	40/299	13.4
PRODUCCION DE: LIPASA	5/95	12/120	2/84	19/299	6.4
LECITINASA	1/95	11/120	0/84	12/299	4.0
PROTEASAS EN: LITMUS MILK	45/95	39/120	46/84	130/299	43.5
ID-CAJA	95/95	120/120	84/84	299/299	100
ID-TUBO	95/95	120/120	84/84	299/299	100

LD=Leche Descremada

A= Asintomáticos

D= Diarrea

D C/S= Diarrea Con Sangre

Con respecto a la sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos: Gentamicina, Penicilina, Kanamicina y Estreptomocina: se observó -- que el único al que fueron sensibles el 100% de las cepas, fue gentamicina. Con los otros antimicrobianos encontramos que: la sensibilidad a la penicilina fue de 48% en el grupo de los asintomáticos, 28% en el grupo de diarrea y 51% en el grupo de diarrea con sangre. Con kanamicina encontramos 30%, 43% y 51% en cada uno de los grupos respectivamente. Y por último, la -- sensibilidad a estreptomocina fue de 55% para el grupo de los asintomáticos, 50% en el grupo de diarrea y 61% en el grupo de diarrea con sangre (Tabla 3).

En la prueba de invasividad en cultivos de células HeLa -- empleando las mezclas de cinco colonias por paciente, encontramos que de las 60 mezclas probadas, 13(21.6%) fueron invasivas

de éstas 13 mezclas; 3(23.0%) pertenecieron al grupo de los asintomáticos, 4(30.8%) al grupo de pacientes con diarrea y 6(46.1%) al grupo de diarrea con sangre. Al probar individualmente esas mismas mezclas, se identificaron 30 cepas individuales invasivas que corresponden a 9(69.2%) de las 13 mezclas (Tabla 4a y 4b).

T A B L A 3

PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD DE LAS COLONIAS BACTERIANAS
SEGUN EL CUADRO CLINICO

C. CLINICO	PENI	ESTREPTO	KANA	GENTA
ASINTOMATICOS	48	55	30	100
DIARREA	28	50	34	99
DIARREA CON CON SANGRE	51	63	51	100

T A B L A 4a

CORRELACION ENTRE INVASIVIDAD EN MEZCLAS E INVASIVIDAD INDIVIDUAL

CEPAS	MEZCLAS		INVASIVAS	INDIVIDUALES		
	S/A	C/A		S/A	C/A	INVASIVAS
625	incon	incon	+	incon	(2) incon	(3) +
122	incon	incon	+	incon	(1) 356 c.	(1) +
539	incon	incon	+	incon	(2) incon	(3) +
097	incon	incon	+	incon	(1) 406 c.	(4) +
098	incon	incon	+	incon	(3) 300 c.	(5) +
103	incon	51 c.	-	incon	(4) incon	-
530	incon	incon	+	incon	(1) 500 c.	(5) +
					7 c.	-
					(1) incon	(4) +
					(3) 229 c.	(4) +

T A B L A 4b

CORRELACION ENTRE INVASIVIDAD EN MEZCLAS E INVASIVIDAD INDIVIDUAL

CEPAS	MEZCLAS		INVASIVAS	INDIVIDUALES		INVASIVAS
	NUMERO DE COLONIAS			NUMERO DE COLONIAS		
	S/A	C/A		S/A	C/A	
844	incon	incon	+	incon	23 c.	-
032	incon	incon	+	incon	(1) incon (3) 135 c.	(4) +
203	incon	incon	+	incon	(2) incon (3) 175 c.	(5) +
304	incon	256 c.	+	incon	45 c.	-
659	incon	118 c.	+	incon	incon	(1) +
701	incon	123 c.	+	incon	23 c.	-
823	incon	96 c.	+	incon	71 c.	-

c. = colonias S/A = Sin Antimicrobiano
 incon = incontables C/A = Con Antimicrobiano

La proporción de las cepas invasivas por mezclas, probadas individualmente, varió desde una colonia positiva (paciente 122 y 659), hasta cinco colonias (pacientes 098 y 203). Correlacionando la prueba de invasividad individual con la invasividad en mezclas obtuvimos una sensibilidad de 69.0%. Al relacionar invasividad a células con cuadro clínico encontramos que 7 cepas (2.3%) se aislaron del grupo de asintomáticos, 13 cepas (4.3%) de pacientes con diarrea y 10 cepas (3.3%) de individuos de diarrea con sangre (Tabla 5).

T A B L A 5

**CORRELACION DE LA PRUEBA DE INVASIVIDAD ENTRE
LAS MEZCLAS POSITIVAS
Y LAS CEPAS INDIVIDUALES DE DICHAS MEZCLAS**

ORIGEN DE LA CEPA	No. DE CEPA	MEZCLA	INVASIVIDAD A CELULAS	
			INVASIVIDAD	*INVASIVIDAD
ASINTOMATICOS	025	+	4/5 [†]	2.3
	122	+	1/5	
	539	+	3/5	
DIARREA	097	+	4/5	4.3
	098	+	5/5	
	530	+	4/5	
	644	+	0/5	
DIARREA CON SANGRE	032	+	4/5	3.3
	203	+	5/5	
	659	+	1/5	
	304	+	0/5	
	701	+	0/5	
	823	+	0/5	

*= Colonias invasivas

†= Total de colonias (Mezcla)

Correlacionando la edad, cuadro clínico e invasividad tenemos que de 65 cepas de 13 individuos de 0-2 años tres cepas fueron invasivas, todas pertenecientes al grupo de sujetos asintomáticos. De 45 cepas de nueve de 3-5 años se identificaron también tres cepas invasivas todas ellas de individuos asintomáticos. De 25 cepas de cinco pacientes de 6-10 años se identificaron cinco cepas invasivas correspondientes al grupo de pacientes con diarrea. En el grupo de individuos de 11-15 años no se identificaron cepas invasivas. De 144 cepas de 29 individuos de 16 años o mayores de 16 años, se caracterizaron

19 cepas invasivas, una fue del grupo de individuos asintomáticos, 8 de casos con diarrea y 10 de pacientes con diarrea y -- sangre (Tabla 6).

T A B L A 6

NUMERO DE INDIVIDUOS CON CEPAS INVASIVAS DE E. coli Y SU REACION
CON EDAD Y CUADRO CLINICO

EDAD	No. PACIENTE	ASINTOMATICOS	DIARREA	DIARREA SANGRE
0-2 a	13	1 [*] /5 [#]	0/3	0/5
3-5 a	9	3/5	0/2	0/2
6-10 a	5	0/2	5/3	0/0
11-15 a	4	0/0	0/2	0/2
16 ó más	29	1/5	8/14	10/10

*= No. de cepas invasivas

#= No. de individuos estudiados (cinco cepas por cada individuo).

Para la prueba de Sereny se seleccionaron las cepas invasivas que mayor número de colonias dieron en la cuenta bacteriana. Solo una cepa resultó virulenta (paciente 659, colonia 4) de todas las estudiadas. Dicha cepa pertenece a un individuo de 33 años -- con cuadro de diarrea con sangre, en este individuo también se le identificó S. flexneri (Tabla 7).

T A B L A 7

CEPAS INVASIVAS DE E. coli Y SU RELACION CON CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA, OTROS PATOGENOS Y EDAD DEL PACIENTE

CEPAS INVASIVAS	CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA						OTROS PATOGENOS	EDAD
	PASTOSA	LIQ.	MOCO	SANGRE	PMN	M.FECAL		
025 ₄ *	+	-	-	-	0	+	CTEC	4a
032 ₅	-	+	+	+	10-15	+	<u>S. sonnei</u>	40a
097 ₁	-	+	+	-	2-4	+		29a
098 ₃	+	-	-	-	0	+		8a
122 ₃	+	-	-	-	0	+		36a
203 ₄	-	+	+	+	4-8	+	<u>S. sonnei</u>	25a
530 ₅	+	-	-	-	0	+		26a
539 ₃	+	-	-	-	0	+		19m
659 ₄	-	+	+	+	0	-	<u>S. flexneri</u>	33a

*= Los subíndices indican el número de colonia de cada paciente.

LIQ.= Líquida

M.FECAL= Moco fecal

PMN= Polimorfo nucleares

CTEC= Escherichia coli citotóxica

D I S C U S I O N

Uno de los problemas más frecuentes de nuestros tiempos y que afecta en gran medida la economía de los países en vías de desarrollo es la diarrea. Entre los microorganismos más importantes como causas de diarreas esta E. coli, razón por la cual es uno de los patógenos más estudiados en los últimos años. A éste microorganismo se le han determinado diferentes mecanismos de patogenicidad. Uno de ellos es la capacidad de algunos serotipos para invadir el epitelio intestinal y producir diarrea de tipo bacilar (14). Su identificación como agente causal de diarrea es de vital importancia debido a que el tratamiento médico con antimicrobianos solo esta justificado en casos de diarrea con moco y sangre; generalmente producida por Entamoeba histolytica, Shigella spp y E. coli invasiva (11). - esta medida se a tomado principalmente principalmente porque - se ha observado que el uso indiscriminado de antimicrobianos - está propiciando la selección de mutantes resistentes, lo cual dificulta el manejo de pacientes con cuadros severo. Por otro lado en los casos de diarrea sin moco y sin sangre la rehidratación oral es suficiente para controlar el cuadro clínico. Para establecer la etiología del padecimiento y por ende la conducta terapéutica, es fundamental realizar la identificación oportuna y precisa del agente causal (11, 8).

Los metodos con los que se cuenta para identificar E. coli invasiva son costoso y tardados (Cultivo de células, prueba de Sereny e hibridización de DNA). Esto ha estimulado a que se -- pretenda realizar la identificación de dicho patógeno empleando procedimientos que pudiera utilizar cualquier laboratorio, como es el caso de la caracterización bioquímica.

Diferentes trabajos, realizados en Chile (13) y Brasil -- (44) se han orientado en este sentido, sin embargo se ha observado que la tarea no es fácil debido a la homología bioquímica que presenta la familia Escherichiae. Los resultados obtenidos por estos grupos de investigadores, indican que las cepas invasivas generalmente no descarboxilan la lisina y son inmóviles.

Nuestros resultados sin embargo no correlacionan con estos investigadores (Tabla 1). Consideramos que existen varias explicaciones al respecto. En nuestro caso trabajamos únicamente con cepas invasivas a células ya que únicamente una de las cepas fue Sereny positiva, lo cual nos habla de poblaciones diferentes. Nuestras cepas probablemente son portadoras del plásmido de 140 MDA pero quizá no poseen los factores de virulencia expresados en el cromosoma (región arg-mtl, operon de histidina y el "locus" Kcp)(15, 17). Lo cual las hace diferentes.

T A B L A 1

CORRELACION DE CEPAS INVASIVAS CON PRUEBAS BIOQUIMICAS
Y PRUEBA DE SERENY

CEPAS INVASIVAS	PRUEBAS BIOQUIMICAS							PRUEBA DE SERENY
	RC	LECIT.	LIPASA	LM	LD	M	O	
025 ₄ *	-	-	-	-	+	+	+	-
032 ₅	-	-	-	-	+	+	+	-
097 ₁	-	-	-	-	+	+	+	-
098 ₃	-	-	-	-	-	+	-	-
122 ₃	-	-	-	+	+	+	-	-
203 ₄	-	-	-	+	+	+	-	-
530 ₄	-	-	-	-	+	+	+	-
539 ₃	-	-	-	+	+	+	-	-
659 ₄	-	-	-	-	-	+	-	+

*= Los subíndices indican el número de colonias por cada paciente.

LD= Lisina Descarboxilasa

RC= Rojo Congo

LM= Litmus Milk

O= Ornitina

M= Motilidad

En este estudio la prueba de rojo congo resultó negativa en todas las cepas invasivas, sin embargo Maurilli y cols.(30)

han observado que todas las cepas invasivas son rojo congo positivas, aunque no todas las cepas rojo congo positivas llegan a ser invasivas. La propiedad de captar rojo congo está relacionada con un plásmido de 140 MDa; según Griffiths (16) y Maurilli, es una prueba que sugiere que cuando una cepa no da la prueba positiva, probablemente no sea portadora del plásmido y por lo tanto no sea invasiva. En nuestro estudio consideramos que las cepas si son portadoras del plásmido ya que la prueba de invasividad a células fue positiva, sin embargo suponemos que en el caso de la prueba de rojo congo para la expresión del plásmido se requieren condiciones particulares como es, una temperatura adecuada, concentración de hierro en el medio de cultivo. Variaciones de temperatura se presentan frecuentemente en el laboratorio a pesar de que se tenga gran cuidado, por otro lado los medios utilizados y las propiedades del agua probablemente no fueron óptimos ya que no nos aseguramos que la concentración de hierro fueran las óptimas necesarias. Qadri (16) descubrió otra propiedad en este tipo de bacterias. Demostró que la captación de rojo congo también depende de las propiedades hidrofóbicas de la superficie bacteriana. Observó que las cepas virulentas presentan mayor grado de hidrofobicidad, con relación a las cepas no virulentas y que a mayor hidrofobicidad mejor captación de rojo congo, estos cambios en la hidrofobicidad bacteriana se pueden deber a las condiciones de almacenamiento.

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se realizó para asegurarnos que en la invasividad a células no existirán falsos positivos, esto nos condujo a observar que más del cincuenta por ciento de las cepas resultaron resistentes a tres antimicrobianos, esta resistencia de E. coli invasiva podría ser un factor importante en el control de la diarrea ya que su empleo favorece la proliferación de estos microorganismos.

Utilizamos mezclas en la prueba de invasividad a cultivos de células HeLa para determinar su utilidad en la selección de cepas probablemente invasivas. En este estudio fue de gran utilidad ya que nos ahorro trabajo y recursos. Consideramos por lo tanto que podría ser utilizado para estudios en los que no

se cuente con las condiciones para utilizar la hibridación del DNA.

Encontramos 15% de cepas invasivas, porcentaje que es superior al señalado en reportes previos, que señalan 1-3%. Nosotros atribuimos esto a que los pacientes involucrados en el estudio son de edad y de sexo indistinto (Tablas 1a, 1b, 1c). La edad de los pacientes en los que se identificaron cepas invasivas, son mayores de dos años. La mayoría de estos individuos se encuentran colonizados por una gran variedad de patógenos entre los que se incluyen EIEC. EN un estudio realizado por Cravioto y cols. (8) señalan que durante los dos primeros años de vida, el niño se coloniza por diferentes patógenos y que es sólo durante esta etapa de la vida en que algunos de estos microorganismos tienen importancia clínica, después de este período el individuo puede estar colonizado, y solo desarrollar un cuadro de diarrea bajo circunstancias particulares. Sin embargo es importante mencionar que estos sujetos son fuentes importantes de transmisión. Aislamos una cepa invasiva a una niña de 19 meses que corresponde al grupo de los asintomáticos. El mismo Cravioto ha observado que cuando existe colonización del individuo por algún patógeno el desarrollo del cuadro clínico es variable. Esto puede deberse a que en determinadas etapas de la vida, los receptores intestinales se modifican ó cambian totalmente su estructura, y la bacteria no se adhiere a la célula (11).

En los casos de los individuos con diarrea consideramos que esta fue causada por EIEC ya que ningún otro patógeno fue aislado ó identificado. Consideramos que los pacientes no desarrollan un cuadro de disenteria por el hecho de ser adultos con una respuesta inmune adecuada ó porque las cepas probablemente, apesar de portar el plásmido de 140 MDA no son virulentas, al no poseer ó expresar los genes cromosomales relacionados con la virulencia de estas cepas, lo cual nos podría plantear la posibilidad de la propiedad de la invasividad (Plásmido de 140 MDA) sin la expresión ó presencia de genes cromosomales (regió arg-*mtl*, operón de histidina, "locus" Kcp), po-

dría ser responsable de diarrea en algunos individuos. Los otros tres pacientes con cepas invasivas, incluyendo la cepa de E. coli virulenta, presentan diarrea con moco y sangre, sin embargo también se les aislo Shigella por lo que resulta incierto determinar si E. coli invasiva fue responsable de la diarrea. Sería interesante seguir muestreando a los pacientes que solo presentan E. coli invasiva y cuando estos presentaran diarrea con moco y sangre, hacer una identificación de bacterias. Si solo se aislara E. coli invasiva se podría afirmar que todo el cuadro sería provocado por ésta.

Esperabamos que el individuo con E. coli invasiva, prueba de Sereny positiva y Shigella flexneri presentara un conteo de PMN mayor que en cualquier otra muestra de los individuos estudiados, debido a que la respuesta inmunológica sería mayor; sin embargo esto no sucedio por lo que este tipo de datos no nos informan mucho sobre los patógenos presentes en un cuadro de diarrea.

CONCLUSIONES

La identificación de cepas invasivas de E. coli - mediante las pruebas bioquímicas probadas, no fue posible.

La capacidad de E. coli para invadir cultivos celulares permite seleccionar a las cepas probablemente virulentas.

El uso de mezclas es un procedimiento confiable y de mucha utilidad cuando no se cuenta con recursos para realizar pruebas de hibridación del DNA.

La invasividad a células al parecer es un mecanismo relacionado con la producción de diarrea, aún cuando la cepa no posea los genes de la virulencia.

Es necesario estudiar más a fondo estas cepas para determinar que factores se asocian para producir un cuadro clínico.

El conteo de PMN en heces, no es un dato que ayude para el pronóstico del cuadro clínico.

A P E N D I C E "A"

PREPARACION DE MEDIOS

A G A R C A S E I N A (10)

Leche descremada (Sveltes)	100 g.
Agar nutritivo	15 g.
Agua destilada	1000 ml

La leche descremada se prepara a doble concentración, se esteriliza a 115 °C durante 10 minutos. Por separado se prepara el agar nutritivo también a doble concentración, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos, se deja enfriar y se mezclan ambas preparaciones con agitación vigorosa, se distribuyen en cajas de petri.

A G A R Y E M A D E H U E V O

Caldo de soya tripticaseína	30 g.
Digerido pancreático de caseína	40 g.
Fosfato de sodio dibásico	5 g.
Fosfato de sodio monobásico	1 g.
Cloruro de sodio	2 g.
Sulfato de magnesio	0.1 g.
Glucosa	2 g.
Agar-agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml

Disolver todos los componentes y ajustar el pH a 7.6, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, enfriar a 50-55 °C. Entretanto enfriar un huevo y ponerlo en etanol al 95% durante 1 hora, separar el huevo de su cascara.

Adicionar un huevo por cada 500 ml de la base de agar, agitar hasta tener una suspensión homogénea, distribuir en cajas de petri.

A G A R R O J O C O N G O (15)

Caldo de soya tripticaseína	30 g.
Agar-agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml

Se prepara una base de agar soya tripticaseína y se agrega el colorante rojo congo a una concentración final de -- 0.005%, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se distribuyen en cajas de petri.

A P E N D I C E "B"

PREPARACION DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS completo)

S o l u c i ó n "A"

Cloruro de sodio	80 g.
Cloruro de potasio	2 g.
Fosfato de sodio dibásico	11.5 g.
Fosfato de potasio monobásico	2 g.
Agua destilada	800 ml

S o l u c i ó n "B"

Cloruro de calcio	1 g.
Agua destilada	1000 ml

S o l u c i ó n "C"

Cloruro de magnesio	1 g.
Agua destilada	1000 ml

Cada solución se esteriliza por separado en autoclave a - 121 °C durante 15 minutos, se espera a que estén fríos y se mezclan en las siguientes proporciones: 80 ml de solución "A", 100 ml de solución "B", 100 ml de solución "C" y 720 ml de agua destilada (24).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A P E N D I C E "C"

TRATAMIENTO DE MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR

MATERIAL NUEVO (vidrio)

- 1.- Desempacar el material y enjuagar perfectamente con agua corriente. NO USAR ESCOBILLON, DETERGENTE O ABRASIVOS.
- 2.- Enjuagar con agua destilada, escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.
- 3.- Preparar para esterilizar.

MATERIAL SUCIO (No contaminado)

- 1.- Enjuagar con agua corriente.
- 2.- Pasar a un recipiente que contenga hipoclorito de sodio - comercial (Cloralex) 1:10. Cubrir el material totalmente con esta solución y evitar que se formen burbujas en el interior. Dejar el material en estas condiciones, durante 24 horas.
- 3.- Sacar y enjuagar exhaustivamente con agua corriente. Escurrir y sumergir en un recipiente que contenga una solución 1:66 de HCl en agua. Observar las mismas precauciones que en el punto anterior. Dejar durante 24 horas.
- 4.- Sacar y enjuagar perfectamente con agua corriente, escurrir y enjuagar con agua destilada varias veces.
- 5.- Escurrir y secar en el horno.

MATERIAL CON MEDIOS O LIQUIDOS CONTAMINADOS

- 1.- Vaciar el líquido contaminado contenido en el material, en un recipiente metálico. Esterilizar ambos en autoclave a 20 libras de presión durante 30 minutos.
- 2.- Eliminar el líquido y proceder desde el punto dos del caso anterior (material sucio no contaminado) para el lavado - del material.

TAPONES NUEVOS DE HULE

- 1.- Sumergir los tapones en una solución de NaOH 1N. Hervir -- durante 15 minutos.
- 2.- Enjuagar con agua corriente.
- 3.- Sumergir en una solución de HCl al 3% en agua. Hervir du-- rante 5 minutos.
- 4.- Ejuagar con agua corriente y posteriormente con agua des-- tilada.
- 5.- Escurrir y secar a temperatura ambiente.
- 6.- Meter los tapones en un frasco de vidrio, tapar sin apre-- tar y esterilizar.

TAPONES USADOS DE HULE Y/O PLASTICO

- 1.- Lavar uno por uno con sacate y detergente no iónico (Extran)
- 2.- Ejuagar con agua corriente y posteriormente con agua desti-- lada. Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.
- 3.- Meter los tapones a un frasco de vidrio, tapar sin apretar y esterilizar (24).

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alvarado, A.F. Guardo, B.C. Galindo, E. 1985. Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. - Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. 42(6): 354-359.
- 2.- Binns, M.M. 1985 Molecular Genetics of virulence in *Shigella*. Microbiological Sciences. 2(9): 275-278.
- 3.- Booth, B. Finfelstein, R. 1986. Presence of hemagglutinin/protease -- and other virulence factors in O1 and non-O1 *Vibrio cholera*. J. Infect. Dis. 154(1): 183-186.
- 4.- Bradshaw, J.L. 1976. Microbiología del laboratorio. Ed. El Manual Moderno. Impreso en México 1976. cap. 4: 46-61.
- 5.- Brow, E. Rothman, S. 1980. Inhibition of protein synthesis in intact - HeLa cells by *Shigella dysenteriae* toxin. Infect. Immun. 29(1): 98-107.
- 6.- Clerc, P. Sansonetti, P.J. 1987. Entry of *Shigella flexneri* in to --- HeLa cells: Evidence for Directed Phagocytosis Involving Actin Polymerization and Myosin Accumulation. Infect. Immun. 55(11): 2681-2688.
- 7.- Cowan y Steel's. 1982. Apéndice "A" y "C": En Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Ed. CBCSA. Impreso en --- México. 193-259.
- 8.- Cravioto, A. Reyes, R.E. Ortega, R. Fernández, G. Hernández, R. López, D. 1988. Prospective Study of Diarrhoeal Disease in cohort of Rural -- Mexican Children: Incidence and Isolate Pathogens during the first Two years of Life. Epidem. Inf. 101: 123-134.
- 9.- Daskaleros, P.A. and Payne, S.M. 1987. Congo red Binding Phenotype Is Associated with Hemin Binding and Increased Infectivity of *Shigella flexneri* in the HeLa Cell Model. Infect. Immun. 55(6): 1393-1398.
- 10.- Day, N.P. Scotland and Rowe. 1981. Comparison of an Hep-2 tissue --- culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness - in *Shigella spp* and *E. coli*. J. Clin. Microb. 13: 596-597.
- 11.- Díaz, E.C. Zarate, A.T. Villalpando, S.H. 1988. Archivos de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social. 19(4): 329-445.
- 12.- Döring, G. Ournesser, H.J. Botznhart, K. Fanning, B. Haiby, M. and -- Hofman, A. 1983. Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 147(4): 744-750.
- 13.- Evans, D.J. Evans, D.G. and Gorbach, S.L. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *E. coli* isolated from man. --- Infect. Immun. 8: 725-730.
- 14.- Faunder, G. Figueroa, G. Troncoso, M. and Cabello, F.C. 1988. Characterization of Enteroinvasive *escherichia coli* strain Isolated from --- Children with Diarrhea in Chile. Clinic. Microbiol. 26(5): 928-932.

- 15.- Formal, S. and Hornick, R.B. 1978. Invasive Escherichia coli. J. Infect. Dis. 137(5): 641-647.
- 16.- Genski, P. Sheahau, D.G. Washinton, O. and Formal, S.B. 1972. Virulence of Shigella flexneri hybrids expressing E. coli somatic antigens. Infect. Immun. 6(2): 104-110.
- 17.- Griffiths, E. Stevenson, P. Hale, T. and Formal, S.B. 1985. Synthesis of aerobactin and a 76,000 Daltons iron-regulated outer membrane protein by E. coli Infect. Immun. 49(1): 67-71.
- 18.- Guarrant, R.L. 1985. New concepts in the pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. Ed. Leive. Printed in USA. ASM Microbiology.
- 19.- Hale, T. and Formal, S.B. 1981. Protein synthesis in HeLa or HeLa -- 407 cells infect with S. dysenteriae 1, S. flexneri 2a or Salmonella typhimurium W118. Infect. Immun. 32(1): 137-144.
- 20.- Hale, T. Morris, R. and Bonventre, P.F. 1979. Shigella infection of HeLa intestinal epithelial cells: role of the host cell. Infect. Immun. 24(3): 887-894.
- 21.- Hale, T. Oaks, E. and Formal, S.B. 1985. Identification and antigenic characterization of virulence-associated plasmid-coded proteins of Shigella spp and enteroinvasive E. coli. Infect. Immun. 50(3): 620-629.
- 22.- Hale, T. Sansonetti, P. Schad, P. Austin, S. and Formal, S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in S. flexneri, S. sonnei and E. coli Infect. Immun. 40(1): 340-350.
- 23.- Hinson, G. Knutton, S. Lan-Po-Tang, Mcneish, M.A. and Williams, P. -- 1987. Adherence of human colonocytes of an E. coli strain from several infantile enteritis: Molecular and ultrastructural studies of a fibrillar adhesin. Infect. Immun. 55(2): 397-402.
- 24.- Holdeman, L.V. Cato, E.P. and Moore W.E. 1977. Anaerobe Laboratory - Manual. Metodos procedures an Specific test. The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory. 3: 125-128.
- 25.- Inman, R.L. Cantey, J.R. and Formal, S.B. 1986. Colonization virulence and mucosal interaction of an EPEC (Strain RDEC-1) expressing Shigella somatic antigen in the rabbit intestine. J. Infect. Dis. 154(5): 742-750.
- 26.- Knutton, S. Williams, P. Lloyd, D. Candy, C. and Mcneish, A. 1984. - Ultrastructural study of adherence to and penetration of cultured cells by two invasive E. coli strains isolated from infants with enteritis. Infect. Immun. 44(3): 599-608.
- 27.- Levine, M.M. 1987. Escherichia coli that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. J. Infect. Dis. 155(3): 377-385.

- 28.- Levine, M.M. Nataro, J. Korch, H. Baldini, M. Kuper, J. Black, R. Clements, M. and O'Brien, A. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic E. coli is dependent on a plasmid encoding an enteradheves factor. J. Infect. Dis. 152(3): 550-559.
- 29.- Maulder, J.W. 1974. Intracellular parasitism: life in an extremont. - J. Infect. Dis. 130(3): 300-306.
- 30.- Maurelli, A. Baurdry, B. D'Hanteville, H. Hale, T. and Sansonetti, P. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of - HeLa cells by S. flexneri. Infect. Immun. 49(1): 164-171.
- 31.- Maurelli, A.T. Blackmon, B. and Curtiss, R. 1984. Loss of Pigmentation in Shigella flexneri 2a Is correlated with loss of Virulence - and Virulence-Associated Plasmid. Infect. Immun. 43(1): 397-401.
- 32.- Maurelli, A.T. Blackmon, B. and Curtiss, R. 1984. Temperatre-Dependent Expression of Virulence Genes in Shigella Species. Infect. --- Immun. 43(1): 195-201.
- 33.- Minshaw, B. Jorgensen, J. Counts, G. and Falkau, S. 1978. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocyte and virulence for chicken embryos of extraintestinal E. coli isolates. Infect. Immun. 20(1): 50-54.
- 34.- Montgomerie, J. Bindereif, A. and Neilandes, J. 1984. Association - of hydroximate siderophore (aerobactin) with E. coli isolated from patients with bacteremia. Infect. Immun. 146(3): 835-839.
- 35.- Nandadasa, H.G. Saegent, G.F. Brown, M.G. McNaish, A.S. and Williams, P.H. 1981. The role of plasmids in adherence of invasive E. coli to mammalian cells. J. Infect. Dis. 143(2): 286-290.
- 36.- Padhye, V. Beery, J. Kittell, F. and Dayle, M. 1987. Colonic hemorrhage produce in mice by inique Vero cell cytotoxin from an ---- E. coli strain that causes hemorrhagic coliti. J. Infect. Dis. ---- 155(6): 1249-1253.
- 37.- Phillips, E. and Nash, P. 1985. Culter Media, In Manual of clinical Microbiology. American Society of Microbiology. Printed in USA. --- 111: 1051-1090.
- 38.- Qadri, F. Hossain, S.A. Ciznar, I. Haider, K. Livingh, A. Wadstrom, T. and Sack, D.A. 1988. Congo Red Binding and Salt Agregation as Indicators of Virulence in Shigella species. Infect. Immun. 26(7): -- 1343-1348.
- 39.- Sansonetti, P.J. Kopecko, D.J. and Formal, S.B. 1982. Involment of a plasmid in the invasive ability of S. flexneri. Infect. Immun. -- 35(3): 852-860.

- 40.- Sansonetti, P. Hale, T. Damin, G. Kapfer, C. Collins, H. and Formal, S.B. 1983. Alterations in the pathogenicity of E. coli K-12 after -- transfer of plasmid and chromosomal genes from S. flexneri. Infect. Immun. 39(3): 1392-1402.
- 41.- Sansonetti, P. Ryter, A. Clerc, P. Maurelli, A. and Maunier, J. 1986. Multiplication of S. flexneri within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect. Immun. 51(2): 461-469.
- 42.- Sasakawa, C. Kamata, K. Sakai, T. Murayama, S. Makino, S. and Yoshikawa. 1986. Molecular alteration of the 140-Megadalton plasmid ---- associated with loss of virulence and congo red binding activity in Shigella flexneri. Infect. Immun. 51(2): 470-475.
- 43.- Scotland, S.M. Gross, R.J. 1985. Laboratory Test for Enterotoxin Production Enteroinvasion and adhesion in Diarrhoeagenic Escherichia coli. In The virulence of Escherichia coli. Ed. Academic Press. Printed in USA. 19: 395-404.
- 44.- Sereny, B. 1975. Experimental Kurstoconjunctivitis Shigellosa. Acta - Microbiol Acad. Sci. Hung. 4: 367-376.
- 45.- Silva, R. Toledo, F. and Trabulsi, L. 1980. Biochemical and cultural characteristics of invasive E. coli. J. Clinic. Microb. 11(5): ---- 441-444.
- 46.- Sussman, M. 1985. Escherichia coli in human and animal disease. In - the virulence of Escherichia coli. Ed. Academic Press. Printed in -- USA. Cap. 2: 7.
- 47.- Thornsberry, C. and Sabath, L.D. 1985. Laboratory Test in Chemotherapy; Aproximate Concentration of Antimicrobial Agents Achived in Blood. In Manual of Clinical Microbiology. Four Edition. 107: 1015-1018.
- 48.- Valvano, M. Crosa, J. 1985. Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain Col V plasmid occur in the chromosome of a human invasive strain of E. coli K-12. Infect. Immun. 46(1): 159-167.
- 49.- Watanabe, H. and Miller, E. 1982. Large plasmids associated with ---- virulence in Shigella species have fuction necessary for epithelial cell penetration. Infect. Immun. 48(1): 260-262.
- 50.- Winkler, H. and Miller, E. 1982 Phospholipase A and the interection of Rickettsia prowazakii and mouse fibroblasts (L-929 cells). Infect. Immun. 38(1): 109-113.
- 51.- Yamagata, S. Takashi, S. Kurata, T. Sasakawa, M. 1986. The use of -- mice in the Sereny test as a virulence assay of Shigella and EIEC. -- Infect. Immun. 51(2): 696-698.