



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

11261
10
29

FRECUENCIA Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE Escherichia coli
PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS (VTEC) EN CASOS DE DIARREA EN
POBLACIONES URBANA Y RURAL.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS,
AREA DE MICROBIOLOGIA, PRESENTA:

Q.F.B. NELIDA RUTH PARRA MALDONADO

ASESORA: DRA. SILVIA GIONO CEREZO

CO-ASESOR: Dr. JAVIER TORRES LOPEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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

	<u>CAPITULOS</u>	<u>PAGINA</u>
I.	RESUMEN	1-2
II.	INTRODUCCION	3-20
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21-22
IV.	OBJETIVOS	23
V.	HIPOTESIS	24
VI.	MATERIAL	25-26
VII.	METODOS	27-37

1. Determinación de la frecuencia de E. coli productoras de citotoxinas.
 - 1.1. Aislamiento e identificación de las cepas.
 - 1.2. Producción de citotoxinas.
 - 1.3. Preparación de la monocapa de células HeLa.
2. Cuantificación de citotoxinas.
3. Tipificación de las cepas de E. coli productoras de citotoxinas.
 - 3.1. Pruebas de biotipificación

CAPITULOSPAGINA

3.2.	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.	
4.	Análisis estadístico.	
4.1.	Evaluación de las diferencias.	
4.2.	Estimación del grado de asociación.	
VIII.	RESULTADOS	38-44
IX.	DISCUSION	45-57
X.	CONCLUSIONES	58-59
XI.	BIBLIOGRAFIA	60-70
XII.	APENDICE	71-76

RESUMEN.

Se ha sugerido que las cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas Vero (VTEC) pueden causar diarrea o colitis hemorrágica. Sin embargo, en países en desarrollo no existen suficientes estudios epidemiológicos para apoyar dicha aseveración, por tal motivo, en este estudio se investigó la frecuencia de aislamiento de cepas de VTEC, en pacientes con diarrea y sin diarrea de una población urbana y otra rural. Se procesaron 1430 cepas 361 provenientes de 118 individuos del poblado rural (Cadereyta, Qro.) y 1069 correspondientes a 233 sujetos de la población urbana (D. F.), el número total de sujetos correspondieron a: 95 casos del grupo testigo, 213 casos del grupo de diarrea sin sangre y 43 casos de diarrea con sangre.

La actividad citotóxica se demostró en un ensayo con monocapas de células HeLa. Se determinó: el nivel de producción de citotoxinas por diluciones decimales seriadas de sobrenadantes de cultivo en medio caldo soya tripticaseína. De las cepas VTEC se estudiaron los biotipos siguiendo el esquema - de Crichton (11) y resistotipos por pruebas de sensibilidad

a 10 antimicrobianos utilizando el método de dilución seriada en medio de Mueller-Hinton.

Se aislaron cepas productoras de toxina Vero en 20% de los individuos sanos, 45% en los casos de diarrea sin sangre y 76.2% en pacientes con diarrea con sangre de la población rural ($P < 0.05$).

Los valores de riesgo relativo para los dos últimos grupos fueron 3 y 12, respectivamente.

En la población urbana los resultados fueron de 13%, 7.9% y 4.5% respectivamente, con un riesgo relativo menor a la unidad.

Las cepas pertenecientes a las dos poblaciones presentaron una distribución amplia en cuanto a biotipos y resistotipos. El 75% de las cepas VTEC pertenecieron a los biotipos 5, 6, 13, 14, 15 y 16 de Crichton. Cabe destacar que una proporción importante (78%) de las cepas VTEC presentaron actividad de oxinitina descarboxilasa.

Se concluyó que: La frecuencia de colonización por VTEC fue -- significativamente mayor en la población rural que en la población urbana. En la población rural existe un riesgo importante de que individuos infectados por VTEC presenten diarrea secretora acompañada de sangre.

INTRODUCCION:

En los países en vías de desarrollo de América Latina, Asia y de Africa y, por lo tanto en México, la diarrea infecciosa si que siendo uno de los problemas de salud pública más importantes.

La Organización Mundial de Salud informó que en 1983 fallecieron en estos países cinco millones de niños a consecuencia de la diarrea (48). Además se estima que 750 millones de niños menores de cinco años enferman de diarrea cada año en todo el mundo (25), lo que señala la magnitud del problema, que también representa una carga económica considerable para los presupuestos insuficientes de los países en desarrollo.

La terapia de hidratación oral, que constituye uno de los mejores logros terapéuticos, ha incidido de una manera definitiva en la disminución de las tasas de mortalidad por diarrea.

En México, la tasa de mortalidad por diarrea ha disminuído en forma sostenida en los últimos 55 años, gracias quizá al incremento de nivel sanitario (mayor número de comunidades con dis pos ición de agua potable y drenaje) y sociocultural (dis mi nu ción del analfabetismo) y, por otra parte, a la aplicación de la terapia de hidratación oral, que fue practicada en forma -- elemental y casera por el Dr. Ceballos en 1959 (48), llegando a constituir un tratamiento reconocido por Acuerdo Oficial en

1983; pero aun así, alcanzó la cifra de 31,467 muertes por diarrea, la cual corresponde a una tasa de mortalidad de 43 por 100,000 habitantes (57).

La diarrea en términos de morbilidad en la República Mexicana ocupa un segundo lugar con 3'204,419 casos en el año 1985 -- (57).

En México los agentes etiológicos de la diarrea se han identificado en un 70% (Cuadro No. 1) (49, 56).

CUADRO No. 1

FRECUENCIA RELATIVA DE MICROORGANISMOS ENTEROPATOGENOS ENCONTRADOS EN NIÑOS CON DIARREA EN LA CIUDAD DE MEXICO.

MICROORGANISMO	PORCENTAJE
Rotavirus	15 a 20
Adenovirus	5
SR virus	5
<u>Escherichia coli</u>	
ETEC	18 a 20
EPEC	15 a 17
EIEC	1
<u>Campilobacter jejuni</u>	12 a 15
<u>Shigella</u> sp.	10 a 13
<u>Salmonella</u> sp.	2 a 6
<u>Giardia lamblia</u>	4 a 8
<u>Entamoeba histolytica</u> (trofozoitos)	1 a 2
<u>Cryptosporidium</u>	4
TODOS	70
Infecciones múltiples	20 a 25

Tomado de Olarte J. Boletín Mensual de Epidemiología (México)

1985; 1: 61-71

Cabe destacar la importancia de Escherichia coli como agente causal de diarrea, en el cuadro No. 1, representa aproximadamente un 36%; al sumar los distintos grupos diarreogénicos de E. coli del total de los patógenos identificados.

Establecida así, la frecuencia de los agentes etiológicos de la diarrea en México, queda aún un 30% de los casos que requieren de mayor investigación para identificar al agente patógeno.

La primera clase de E. coli diarreogénica, E. coli enteropatógena (EPEC), fue designada así por Neter (15, 43), quien confirmó la presencia frecuente de ciertos grupos serológicos en brotes epidémicos de diarrea, como ya había establecido -- Kauffman y col. en 1940 (17), al demostrar que ciertos --- miembros de los serogrupos 026, 055, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 y 0142 son los más prevalentes en casos de diarrea en todo el mundo.

Las EPEC carecen de los factores de patogenicidad descritos, tales como la enterotoxigenicidad asociada a la producción de toxina termoestable (ST) y/o toxina termolábil (LT) en determinadas cepas de E. coli, que se describieron consecutivamente a los estudios en asa ligada de intestino de conejo realizados por De y col. en 1956. Sin embargo, los experimentos con voluntarios (42, 78) demostraron que las cepas EPEC -

administradas por vía oral podían producir cuadros diarreicos, cuando se daban en dosis de 10^5 a 10^{10} microorganismos.

La virulencia de los enteropatógenos probablemente se produce por la manifestación de otros factores de patogenicidad diferentes de la toxigenicidad (LT y ST) o la invasividad (42).

Neter y col. en 1965 (42) resumió las evidencias que apoyaban la enteropatogenicidad de E. coli (EPEC), como sigue:

- a) La mayoría de los casos se presentaban en brotes diarreicos de grupos cerrados, los cuales se debían a un solo serogrupo.
- b) Las cepas de EPEC se aislaban con mayor frecuencia de materia fecal de lactantes con diarrea, que de las heces de lactantes sanos, o de las heces de niños mayores o de adultos.
- c) La capacidad de producir diarrea en voluntarios humanos estaba asociada con la administración oral de un solo serogrupo.
- d) La presencia de anticuerpos específicos contra el grupo EPEC se demostró, tanto en pacientes, como en voluntarios convalecientes.
- e) En los brotes de diarrea por E. coli, los estudios bacteriológicos exhaustivos y algunos estudios virológicos fueron incapaces de demostrar otro agente microbiano que justificara la presencia de diarrea.

Así, a pesar de que los datos epidemiológicos que establecieron

la asociación entre aislamiento de cepas EPEC y la presencia de diarrea y de las evidencias experimentales aportadas por la inoculación en voluntarios que lograron reproducir el cuadro diarreico, poco se conoce acerca de los mecanismos de patogenicidad de las EPEC.

La adherencia descrita en 1979 por Cravioto y cols. (8) para el grupo EPEC es quizá el único mecanismo de patogenicidad descrito a la fecha. Ellos demostraron la presencia de una adhesina diferente de CFA, en el 80% de las EPEC, que confiere a las bacterias la capacidad de adherencia a células HEP-2 resistente a la presencia de manosa.

Rothbaum y cols.en 1982 (65) y Clausen y col.en 1982 (7) demostraron la acentuada adherencia de la EPEC al epitelio de la mucosa del intestino delgado con producción de lesiones características y destrucción de las microvellosidades.

Durante mucho tiempo la verificación del serotipo fue la única característica del grupo EPEC.

La primera observación de la presencia de componentes tóxicos en EPEC fue hecha en 1971 (74), no obstante solo en la década de los 80s fue donde se hicieron varios trabajos orientados a la búsqueda de citotoxinas (16, 38, 55).

Smith y Linggood en 1971 (74) al estudiar la producción de enterotoxina en las cepas de EPEC de origen humano incluyeron 26

cepas de brotes de diarrea de infantes. En la cepa H19 que corresponde al serotipo 026:K60:H11, demostraron la presencia de un factor tóxico diferente de LT, que provocaba la acumulación de líquidos en los segmentos de asa ligada de intestino de conejo. Esta propiedad pudo transferirse a la cepa de E. coli K12F⁻ y así obtuvieron la cepa K12 Ent⁺. La cepa de E. coli H19 había sido aislada en 1967 de materia fecal de un bebé con diarrea (74).

En 1977 Konowalchuk y cols. (39) describieron una citotoxina, diferente de la enterotoxinas conocidas hasta entonces y la denominaron toxina Vero, porque dió efecto citotóxico en células Vero, a diferencia del efecto citotónico que se había demostrado con las enterotoxinas, observaron, además, que no manifestaba toxicidad en las células Y-1, ni en las células CHO. Los autores consideraron que este nuevo componente tóxico podía estar asociado con la enfermedad diarreica de humanos y de lechones.

En el trabajo de Konowalchuk y cols. (39) llamó la atención las cepas pertenecientes al serogrupo 026 (H19 y H30) ya que éstas, fueron dos de las tres cepas productoras de los niveles más altos de toxina y, particularmente, la cepa H19 en la que Smith y Linggood ya habían descrito una toxina diferente de LT en 1971 (74).

A partir de estos estudios se generaron numerosas investigaciones para determinar la presencia de citotoxinas en distintas -

cepas de E. coli, en todas incluyeron miembros del grupo EPEC, llegándose a establecer que la mayoría de las cepas, productoras de citotoxinas pertenecían a serogrupos: 026, 0111, 0128, 055 018, y 0125. Todos los trabajos señalan a las cepas pertenecientes al serotipo 026:H11 como las más frecuentes EPEC productoras de citotoxinas (8, 31, 36, 45, 68, 71, 80, 82).

Scotland y cols en 1979 y 1980 (67,68) concluyeron que el producto tóxico de la E. coli K12Ent⁺ era VT, sugiriendo así que la enterotoxina y la citotoxina de la cepa H19 eran idénticas.

Por ensayos de neutralización con suero antitoxina Shiga tipo 1 se demostró que existían cuando menos dos variedades de VT en las cepas de E. coli de origen humano (39, 70, 77).

Scotland y cols. (70) propusieron el nombre de VT-1 para la toxina neutralizable y VT-2 para la no neutralizables.

Los fagos lisogénicos que llevan la información para la producción de citotoxinas en las cepas de origen humano, fueron aislados de la cepa 026:H11 por Scotland y cols. en 1983 (69) Smith y cols. en 1983 y Willshaw y col. en 1985 y 1987 (75, 85,86).

Willshaw y cols. (86) demostraron que el fago de la cepa 026, H19 productora de VT-1 era diferente del fago E30480 aislado de E. coli 0157:H7 productora de citotoxina VT-2.

Los estudios de las condiciones óptimas de producción de las citotoxinas establecieron que la citotoxina VT-1 requiere de medios carentes de Fe, se obtiene en el sonicado de la masa bacteriana a partir de un cultivo en fase estacionaria, en tanto que para VT-2 son adecuados los medios de cultivo con concentración total de Fe inicia la aparición de citotoxina en el sobrenadante en la fase logarítmica llegando a la máxima concentración en la fase estacionaria de crecimiento del cultivo. Estas características señalaron, una vez más, la individualidad de cada una de las dos citotoxinas. (89)

De una manera paralela a trabajos de Konowalchuk y cols. otros investigadores desarrollaron distintos proyectos dirigidos a conocer otros factores de virulencia de E. coli, así ante la ausencia en EPEC de mecanismos de virulencia ya establecidos en otras E. coli (ETEC y EIEC) O'Brien y col. en 1977 (55) investigaron y demostraron la presencia de una toxina tipo Shiga, cuya acción podía ser neutralizada por un antisuero contra extractos crudos de toxina de Shigella dysenteriae tipo 1.

Este hecho fue confirmado plenamente en 1982 con la disponibilidad de antisueros monoespecíficos y, entonces, se le asignó el nombre de citotoxina tipo Shiga (51).

Algunos aspectos en el conocimiento de las citotoxinas de E. coli se presentan en el cuadro No. 2.

CUADRO 2.

ALGUNOS DATOS HISTORICOS EN EL ESTUDIO DE LAS CITOTOXINAS DE Escherichia coli

ESTUDIO	CONCLUSIONES	REFERENCIAS
Primera descripción de una toxina en EPEC.	Factor tóxico en H19 (026:K60:H11) diferente de LT.	Smith y Linggood 1971 (74)
Demostración de citotoxinas en cultivos de tejidos.	Citotoxina para células Vero Citotoxina para células HeLa	Konowalchuk y cols. 1977 (39) O'Brien y cols 1977 (55)
Nomenclatura	Verotoxina Citotoxina tipo Shiga VT1, citotoxina neutralizable con antisero Shiga y VT2 a la no neutralizable.	Konowalchuk y cols. 1977(39) O'Brien y cols. 1982 (51) Strockbine 1986 (77) Scotland y cols. 1985 (70) OMS 1987 (84)
Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones por VTEC.	Ensayos de citotoxicidad Inmunológicos Hibridización	Konowalchuk y cols. 1977(39) O'Brien y cols. 1982 (51) Donohue-Rolfe A y cols. 1977 (12) Willshaw GA. y cols. 1986 (86)

El avance en el conocimiento de las principales características de las dos citotoxinas producidas por cepas de origen humano, - permitió unificar criterios y asignar los nombres equivalentes a cada una de las dos: así, la citotoxina estructural y biológicamente semejante a la toxina Shiga elaborada por Shigella dysenteriae tipo 1, que fue neutralizada por la antitoxina Shiga, se designó como toxina "Shiga like" 1 (SLT-I) o Verotoxina (VT-1). La citotoxina no relacionada a la toxina Shiga se denominó "Shiga like" II (SLT-II) o Verotoxina 2 (VT-2) (84).

En este trabajo se adoptará la designación de VT-1 y VT-2 respectivamente.

CITOTOXINA VT-1 (SLT-I)

La toxina VT-1 fue descrita y purificada parcialmente por Konowalchuk y cols. (39) a partir de la cepa H30. O'Brien y cols establecieron que VT-1 tenía una estructura compuesta por subunidades semejantes a la de la toxina Shiga. La citotoxina VT-1 y la toxina Shiga, tienen un punto isoeléctrico idéntico (8) y la misma estabilidad relativa al calor, si se inactiva a 80°C durante 10 minutos pero no a 60°C por el mismo tiempo (38,53). En relación con su actividad biológica la toxina Shiga fue cinco veces menos activa que VT-1 en asa ligada de conejo, pero con una acción mucho mayor en la letalidad al ratón DL50 por inyección intraperitoneal en ratón: toxina Shiga 0.1ug y VT-1 2.0ug (61).

Las dos toxinas, Shiga y VT-1 dan reacciones inmunológicas cruzadas debido a que las dos toxinas son similares en la composición y secuencia de amino ácidos de las subunidades A y B, aunque tienen distintos pesos moleculares (58 KDa para la toxina Shiga y 48 KDa para la VT-1). (38)

El receptor para VT-1 en las células Vero es el glicolípido Gb3 (55).

CITOTOXINA VT-2 (SLT-II)

La citotoxina VT-2 purificada tiene una estructura compuesta por subunidades, similar a la VT-1, no es dissociable por la adición de mercaptoetanol, lo que indica que las subunidades no están unidas por puentes disulfuro (58).

Existen diferencias entre la actividad biológica de VT-1 y la de VT-2 que pueden resumirse así (38) :

- 1.- VT-2 es mil veces menos activa que VT-1 sobre células Vero.
- 2.- La dosis letal 50% de VT-2 en conejos es de 100 veces más alta que la de VT-1.
- 3.- La diferencia más importante constituye la respuesta a la inyección de las toxinas en intestino de conejo. VT-2 produce una cecitis hemorrágica franca, en contraste con la toxina VT-1 que ocasiona una diarrea moderada sin sangre.

La citotoxina VT-2 tiene distintos pI con valores que van de --

4.1 a 6.5, estas diferencias pueden ser el resultado del empleo de diferentes cepas de *E. coli* en la producción de estas toxinas (29,34,58,88,) que difieren en pI y que tienen en común la propiedad de no ser neutralizadas con suero antitoxina VT-1. La inyección intraperitoneal de la toxina SLT-I o SLT-II en ratones es letal (59). La inoculación de ratones con VT-2 por vía intraperitoneal estableció la DL_{50} en 0.27 ug y mostró los siguientes efectos tóxicos:

Los animales inoculados desarrollaron diarrea con sangre, alteraciones respiratorias, letargo, incoordinación y parálisis de las extremidades posteriores. Los animales murieron 1 a 4 días después de la inoculación, dependiendo de la dosis administrada (59).

Las manifestaciones tóxicas a nivel histológico fueron las siguientes:

En intestino produjo lesiones caracterizadas por daño y descamación de las células epiteliales de las criptas y de la superficie, lo que condujo a la pérdida de la membrana mucosa y a la subsecuente hemorragia a nivel de colon. Las lesiones fueron específicas para el colon y no afectaron otras porciones del tracto gastrointestinal como se había observado con cepas de EPEC no productoras de citotoxinas (15). También provocó lesiones en los riñones de los ratones, que se caracterizaron por una marcada vacuolización de las células del túbulo contor

neado proximal y exfoliación del epitelio renal de los túbulos contorneados distales y túbulos colectores.

En el bazo, nódulos linfáticos mesentéricos y tejido linfático asociado al intestino, se observó un efecto citotóxico importante ya que se presentó muerte celular, superior al 20%, en la vaina periarteriolar de los linfáticos, en las zonas marginales y en las áreas de las células T y B de los nódulos mesentéricos y en las placas de Peyer ileales (59).

El daño y cambios citolíticos en el bazo se caracterizaron por la presencia de células fagocíticas mononucleares con megacariocitos. La destrucción de megacariocitos, mediada por leucocitos, y la alteración de las funciones de las plaquetas, debida a la acción de las toxinas, puede jugar un papel en la microangiopatía renal del síndrome urémico hemolítico (59).

De todo lo anterior queda establecido el potencial patogénico de VT-2 de Escherichia coli y, por lo tanto, la posible participación de estas cepas citotoxigénicas VT-2 en los casos de diarrea, ya que la toxina tiene una acción específica en colon en este modelo experimental (59).

Las principales características de las dos toxinas VT-1 y VT-2 se resumen en el cuadro No. 3.

CITOTOXINA TIPO SHIGA II VARIANTE (SLT II V)

La citotoxina elaborada por cepas de E. coli aisladas de la enfer

CUADRO No. 3

CITOTOXINAS DE Escherichia coli

CARACTERISTICAS	SLT-I (VT-1)	SLT-II (VT-2)
UBICACION	Espacio periplásmico (38)	Extracelular (38)
CONDICIONES DE CULTIVO (Producción)	Medio carente de Fe (SynCase) (51)	Medio con concentración de Fe normal (Evans) (5)
ESTRUCTURA QUIMICA	Dos subunidades (52, 55)	Dos subunidades no disociables con mercaptoetanol (58)
FISICO-QUIMICAS		
Peso molecular	48-70 KDa (55)	64 KDa (58)
Punto isoelectrico	7.3 (55)	5.2 (57)
ESTRUCTURA ANTIGENICA		
Neutralizable con suero antitoxina de <u>Shigella</u> <u>dysenteriae</u> tipo 1	Si (55)	No (38)
CODIFICACION GENETICA	Fagos (50)	Fagos (50)
ACTIVIDAD BIOLOGICA:		
-Cultivo de tejidos	Lítica (Vero y HeLa) (51)	Lítica (Vero y HeLa) (38)
-Inoculación intraperitoneal en ratón.	Neurotóxica, enterotóxica nefrotóxica y letal (51)	Neurotóxica, enterotóxica, nefrotóxica y letal (59)
-Asa ligada de conejo	Acumulación de líquidos (55)	Acumulación de líquidos (59)

CUADRO No. 3

CITOTOXINAS DE Escherichia coli

CARACTERISTICAS	SLT-I (VT-1)	SLT-II (VT-2)
UBICACION	Espacio periplásmico (38)	Extracelular (38)
CONDICIONES DE CULTIVO (Producción)	Medio carente de Fe (Synchase) (51)	Medio con concentración de Fe normal (Evans) (5)
ESTRUCTURA QUIMICA	Dos subunidades (52, 55)	Dos subunidades no disociables con mercaptoetanol (58)
FISICO-QUIMICAS		
Peso molecular	48-70 kDa (55)	64 kDa (58)
Punto isoelectrico	7.3 (55)	5.2 (57)
ESTRUCTURA ANTIGENICA		
Neutralizable con suero antitoxina de <u>Shigella</u> <u>dysenteriae</u> tipo 1	Si (55)	No (38)
CODIFICACION GENETICA	Fagos (50)	Fagos (50)
ACTIVIDAD BIOLOGICA:		
-Cultivo de tejidos	Lítica (Vero y HeLa) (51)	Lítica (Vero y HeLa) (38)
-Inoculación intraperitoneal en ratón.	Neurotóxica, enterotóxica nefrotóxica y letal (51)	Neurotóxica, enterotóxica, nefrotóxica y letal (59)
-Asa ligada de conejo	Acumulación de líquidos (55)	Acumulación de líquidos (59)

medad edematosa de lechones, denominada toxina tipo Shiga II variante (SLT-II V) (38), difiere de VT-1 y de VT-2 por su inactividad a células HeLa y su toxicidad a células Y-1, además los genes que la codifican no se encuentran en fagos; pero hibridizan con los genes específicos para VT-2. Esta toxina es neutralizable con suero antitoxina VT-2.

ASOCIACION DE CITOTOXINAS CON ENFERMEDADES

Se han realizado estudios en diferentes países en donde se -- señala la frecuencia de cepas citotóxicas y su asociación con diferentes enfermedades como: diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (24, 30, 46, 76.).

Marques y cols. (45) establecieron los niveles de toxina -- que producían las cepas asociadas con casos de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, así como las cepas aisladas de alimentos relacionados con brotes de colitis hemorrágica. Ellas encontraron cepas hiperproductoras de toxina en los pacientes con diarrea que, en contraste con las -- cepas aisladas de individuos sanos producían niveles bajos de toxina.

En el cuadro No 4, se muestran distintos cuadros clínicos relacionados con la infección por VTEC y sus correspondientes porcentajes de aislamiento de E. coli productoras de citotoxinas.

CUADRO No. 4

RELACION ENTRE CUADRO CLINICO Y PRESENCIA DE Escherichia coli CITOTOXIGENICA (VTEC)

CUADRO CLINICO	LUGAR GEOGRAFICO	% CASOS CON VTEC	REFERENCIA
Diarrea	Alemania	24	Karch 1987 (33)
Diarrea	México	10 3.9*	García-Mendoza 1985 (18)
Diarrea	E.U.A.	79 24*	Cleary 1985 (8)
Diarrea	México	70 30*	Cravioto 1988 (10)
CH	Inglaterra y Gales	39	Smith 1987 (76)
CH (brote)	Anglia	58	Smith 1987 (76)
HUS	Canadá	73	Karmali 1983 (35)

* Por ciento de aislamiento del grupo control.

Riley y cols. en 1983 (63) estudiaron dos brotes, de una enfermedad intestinal poco frecuente, caracterizada por la iniciación súbita con dolor abdominal severo, diarrea con sangre y presencia de fiebre moderada o sin ella, concluyeron que la cepa de E. coli 0157:H7 pudiera estar asociada a dicho cuadro clínico en base a las siguientes evidencias;

- a) No se encontró ningún otro agente etiológico responsable de tal patología.
- b) Este serotipo se aisló de las heces de los enfermos; pero no de las de los individuos sanos.
- c) Las otras cepas de E. coli 0157:H7 que existían hasta -- 1983 en el CDC habían sido aisladas de pacientes que en 1975 presentaron una enfermedad idéntica a la descrita.

En 1983 O'Brien y cols. (53) describieron que las cepas de E. coli del serotipo 0157:H7 tienen la capacidad de producir citotoxinas. Scotland y cols. (70) demostraron que algunas cepas de este serotipo inclusive eran capaces de producir las dos toxinas VT-1 y VT-2.

Se ha establecido la asociación de las cepas de E. coli 0157:H7 capaces de sintetizar citotoxinas con un amplio espectro de enfermedades desde infección asintomática, diarrea sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico y puede llegar a causar la muerte (31, 66).

DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR VTEC.

La recuperación de las cepas de VTEC no siempre es una tarea sencilla, debido a su baja proporción en la población general de E. coli presente en las heces, por lo que se han propuesto distintos recursos para salvar esta dificultad en los métodos de laboratorio para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por VTEC.

Algunos autores (35) recomiendan hacer el ensayo de citotoxinas con un mínimo de 20 colonias, para así aumentar las probabilidades de encontrar cepas citotóxicas.

La investigación de citotoxinas a partir de materia fecal directamente, es otra posibilidad que ha ofrecido buenos resultados, ya que en algunos casos donde se ha demostrado la presencia de citotoxinas en heces no se logró el aislamiento de VTEC (40). De ahí los autores han concluido que la detección de VT en materia fecal (FVT) es el procedimiento más indicado para el diagnóstico de la infección por cepas de E. coli productoras de citotoxinas.

Karmali y cols. (37) para encontrar las escasas cepas de VTEC trataron con polimixina B, a la masa bacteriana de las colonias recolectadas mediante el arrastre con un hisopo, del área de crecimiento semiconfluente de los medios de primoincubación, produjeron así la liberación de las citotoxinas de los espacios

periplásmicos, con lo que lograron detectar hasta una cepa de VTEC en 100 colonias de E. coli.

Se han elaborado sondas para la detección, por hibridización, de citotoxinas, encontrándose cuando menos dos asociadas con enfermedad humana, aunque existen evidencias de más de dos tipos de ellas (20, 50, 54, 86,). Mediante el método de hibridización se ha llegado a una sensibilidad tal de hacer posible la demostración de una colonia de VTEC entre 1200 colonias (72).

En base a la incapacidad de las cepas del serotipo 0157:H7 para fermentar el sorbitol, la selección de las colonias no fermentadoras en Mac Conkey-sorbitol, constituyó un buen recurso en la recuperación de éstas cepas según estudios realizados en Canadá; sin embargo, las cepas 0157:H7 aisladas en México (81) fueron sorbitol positivas al igual que lo reportado para la mayoría (92%) de las cepas de la especie E. coli (17).

Los anticuerpos monoclonales han hecho posible la identificación de pequeños números de VTEC en los cultivos mixtos, por medio del método de transferencia de colonias a membranas -- ("colony blot") que constituye un valioso recurso de selección de VTEC en el primoisolamiento a partir de materia fecal, cultivos de alimentos y muestras ambientales (32).

Los métodos como la contraelectroforesis, el ensayo inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) y la inmunofluorescencia, se están utilizando también en la investigación de las infecciones

por VTEC (12).

El hallazgo de anticuerpos séricos neutralizantes contra las -
citotoxinas en pacientes con infecciones por VTEC, constituye
una evidencia útil en infecciones por estas cepas, cuando no
es posible el aislamiento del agente etiológico.

TIPIFICACION DE LAS VTEC.

En cualquier enfermedad de origen infeccioso bacteriano, la -
identificación del género y especie de un patógeno dado, no -
es suficiente para localizar un foco común de infección, re-
quiriéndose, para tal fin, de una caracterización más amplia
por biotipos, resistotipos, fagotipos, etc. También en VTEC
se ha realizado este tipo de estudios, particularmente con -
las cepas aisladas de brotes (13).

El serotipo O157:H7, que es el VTEC aislado con mayor frecuen
cia de los casos de colitis hemorrágica y síndrome urémico he
molítico en Canadá y E.U.A., se tipificó mediante estudio de
patrones fágicos de 98 cepas y se obtuvieron 14 diferentes ti
pos fágicos (1).

En base a las pruebas bioquímicas de fermentación de dulcitol
y ramnosa, Krishan y col. (40) establecieron cuatro biotipos
en las cepas del serotipo O157:H7.

Las cepas productoras de citotoxinas de serotipos diferentes

a 0157:H7 (serogrupos 05, 055, 0103, 0111ac y 0153), Dorn y cols. (13) las caracterizaron de acuerdo a varias propiedades asociadas a virulencia de E. coli tales como: capacidad de producción de las diferentes clases de citotoxinas, colicinas, -- presencia de factores de adherencia EAF, CVD419, hemaglutina-- ción y pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, encon--- trando una diversidad de estos caracteres.

Como era de esperarse, se observó que la caracterización de es- tas cepas de VTEC que tienen como única propiedad común la de poseer uno o más fagos que las habilita a producir toxinas, di- fiere de otras propiedades codificadas en distintas porciones del material genético.

Así, la tarea de buscar alguna propiedad que caracterice a la mayoría de las cepas VTEC de serotipos diferentes del 0157:H7 constituirá un estudio exhaustivo de caracteres enzimáticos y biológicos, dada la diversidad de cepas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .

Las cepas de E. coli citotoxigénicas se encuentran presentes - con cierta frecuencia en el grupo EPEC, y este grupo ocupa un lugar importante entre los agentes etiológicos productores de la diarrea en la población infantil de México. Es importante conocer qué proporción de E. coli es capaz de sintetizar citotoxinas en las cepas aisladas de casos de diarrea.

Tanto la importancia de la diarrea de origen infeccioso en México, como la creciente evidencia de que las VTEC se encuentran asociadas a cuadros diarreicos, fueron el motivo de estudiar - las cepas de E. coli aisladas de casos de diarrea y de individuos asintomáticos de una población del altiplano mexicano --- (Cadereyta, Querétaro) y de la población urbana (Distrito Federal), para conocer la frecuencia de aislamiento de E. coli -- productoras de citotoxinas y establecer su asociación con la - diarrea. Además, se planteó la necesidad de llegar a un conocimiento más amplio de las cepas VTEC por biotipo primario de Crichton y resistotipo, para establecer las diferencias o semejanza entre las cepas de los dos orígenes.

De esta manera, el presente trabajo podría contribuir a ubicar las cepas de E. coli productoras de citotoxinas entre los dis.

tintos agentes etiológicos de la diarrea en la población mexicana y quizá pueda impulsar a tomar medidas preventivas y terapéuticas más acordes con la etiopatogenia de la diarrea.

IV

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar la frecuencia de cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas en pacientes con diarrea de poblaciones urbana y rural.
- 2.- Establecer los niveles de toxina producidos por las cepas citotóxicas y su relación con la presencia de diarrea.
- 3.- Tipificar las cepas productoras de citotoxinas por:
 - a) Biotipos.
 - b) Resistotipos.

V

HIPOTESIS:

- 1.- Las cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas son más frecuentes en los aislamientos de casos de diarrea que de los aislamientos de individuos sanos.
- 2.- Las cepas productoras de niveles altos de toxina estarán más asociadas a casos de diarrea que las productoras de niveles bajos.
- 3.- Las cepas productoras de citotoxinas constituyen un grupo con caracteres biológicos semejantes de biotipo y resistotipo, independientemente de su origen.

MATERIAL:

Cepas testigo:

Escherichia coli K12 (VT-1 y VT-2 negativa)

933J (VT-1 positiva)

933W (VT-2 positiva) (70)

Cepas para el estudio:

Del área rural se estudiaron 361 cepas pertenecientes a 118 individuos (21 pacientes con diarrea con sangre, 48 con diarrea sin sangre y 49 casos asintomáticos).

En el área urbana participaron dos clínicas del IMSS en el Distrito Federal: la Unidad Médico Familiar No. 22 de San Jerónimo y la Unidad Médico Familiar No. 19 de Coyoacán.

En la recolección de cepas de la población urbana, se consideraron dos fases: la primera que incluyó todo los grupos (pacientes con diarrea con sangre, con diarrea sin sangre e individuos asintomáticos); y la segunda, que incluyó sólo pacientes con diarrea y sangre en heces.

Se aislaron 5 cepas de cada individuo y se obtuvo una muestra

de materia fecal por paciente.

Primera fase.- Se trabajó con 1069 cepas pertenecientes a 233 individuos (22 pacientes con diarrea con sangre, 165 pacientes con diarrea sin sangre y 46 casos testigo o asintomáticos).

Segunda fase.- Se incluyeron 5 cepas pertenecientes a un caso de diarrea sin sangre y 115 cepas de 23 casos de diarrea con sangre. De esta cepas se utilizaron sólo las productoras de citotoxinas para su caracterización.

El criterio de inclusión para los individuos sintomáticos fue, pacientes que tuvieran diarrea aguda con menos de 5 días de evolución y que acudieron a la Clínica por esa causa sin otro padecimiento de fondo (26).

Se consideraron como controles a los individuos que no habían presentado diarrea en los 15 días anteriores al muestreo.

La presencia de sangre fue registrada por observación macroscópica de materia fecal.

METODOS:

1.- Determinación de la frecuencia de cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas.

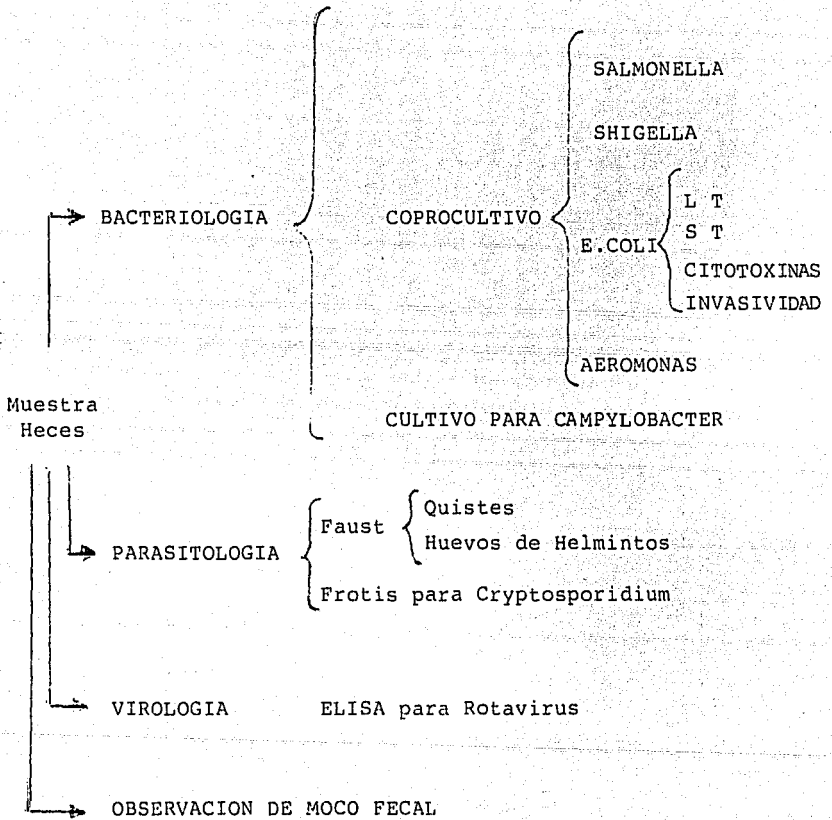
1.1 Aislamiento e identificación de las cepas.

De todos los casos se recolectó una muestra de heces recién emitidas.

Las muestras fueron procesadas de inmediato, en la fase inicial en el Laboratorio de la Clínica correspondiente (inoculación de medios de transporte, enriquecimiento y aislamiento) y trasladadas el mismo día al laboratorio de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del I.M.S.S., donde se realizaron los estudios que se anotan en el diagrama I.

De las muestras de Querétaro de la placa Mac Conkey se seleccionaron 4 colonias lactosa positivas con morfología comparable a la de Escherichia coli y, en las muestras del Distrito Federal, se seleccionaron 5 colonias de cada muestra, en las cuales se probaron los siguientes medios diferenciales: Kliger, medio de movilidad indol y ornitina (MIO), -

D I A G R A M A I



medio lisina fierro agar (LIA), citrato de Simons y RM-VP -- para llegar a la identificación de las cepas.

Las colonias identificadas como E. coli se conservaron en gelosa especial que tiene la siguiente fórmula (22) :

- Base para gelosa sangre.....20g
 - Peptona.....2.5g
 - Agar.....15.5g
 - Extracto de carne..... 1.5g
 - Agua destilada.....1000/ml
- pH 7.4

Los frascos con la gelosa especial inoculada con las cepas se engargolaron y se mantuvieron a temperatura ambiente por el tiempo que duró el estudio.

1.2 Producción de toxina (6)

Las cepas conservadas en gelosa especial se sembraron en 2 ml de caldo soya tripticaseina, incubándose por 4 horas a 37°C, en agitación. De este cultivo se utilizó 0.1 ml para inocular otro tubo con dos ml. de caldo soya tripticaseina y se dejó incubar por un período de 18 a 24 horas en cultivo estacionario a 37°C.

El sobrenadante libre de células se obtuvo por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 30 minutos y una segunda centrifugación a 10,000 r.p.m. durante una hora.

Los sobrenadantes se transfirieron con pipetas Pasteur estériles.

Los que se se usaron inmediatamente para el ensayo de citotoxicidad sobre células HeLa, o se quedaron en congelación a -20°C , hasta ser utilizados, por un tiempo máximo de dos semanas.

1.3 Preparación de monocapas de células HeLa. (44)

A una botella de 50 ml. con un cultivo celular con 100% de confluencia, se quitó el medio de cultivo y se le adicionó 1 a 2 ml. de tripsina al 0.05% distribuyéndose la solución en toda la superficie de la monocapa celular e incubándose a 37°C , por el tiempo requerido hasta observarse el desprendimiento de las células.

Se eliminó la solución mediante una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. Las células se suspendieron en 20 ml. de medio mínimo esencial (MEM) con suero fetal de ternera al 10% y se homogenizó por aspiración y vaciado de la pipeta con la que se adicionó el medio de cultivo. Esta suspensión se distribuyó en porciones de - 200 ul, por cada pozo de una placa de 96 pozos. Se incubó a 37°C, por 24 horas en ambiente de CO₂ al 5% y se observó la monocapa para registrar los pozos que tenían una confluencia alrededor de 80%.

1.4 Ensayo de citotoxinas (51).

Previo al uso de la monocapa de células, se cambió el medio de cultivo por medio mínimo esencial con suero bovino fetal al 3%. De cada uno de los sobrenadantes se aplicaron 25ul, por pozo con cultivo de células en microplaca de 96 pozos. Se incubó a 37°C en ambiente CO₂ al 5% y se observó el efecto citotóxico (lisis) a las 48 y 72 horas. La observación se hizo en microscopio invertido con el objetivo 10X.

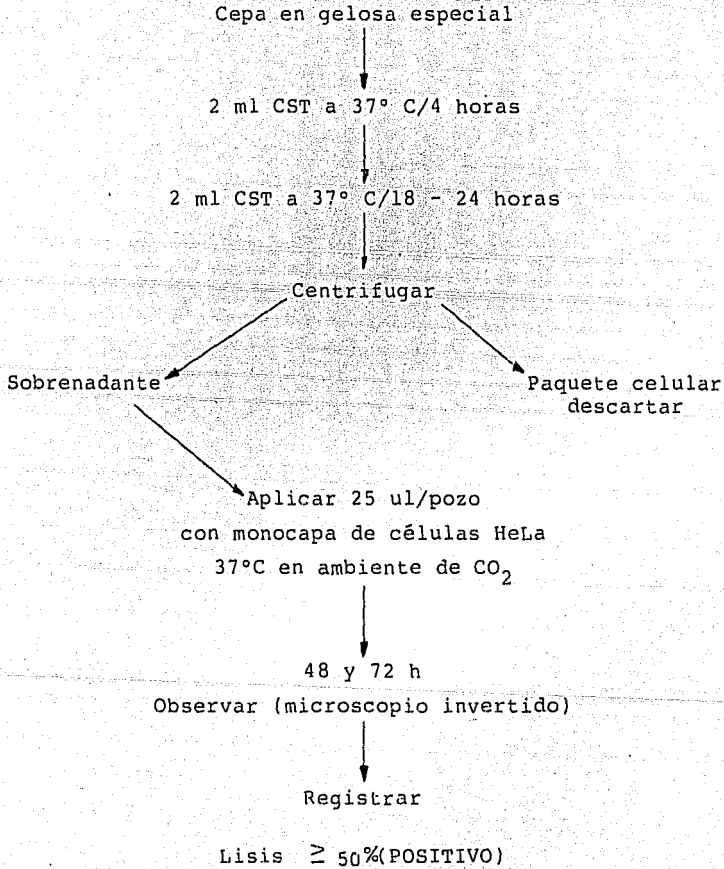
Se registró por ciento de lisis. Las pruebas que presentaron 50% o más de lisis se consideraron positivas. DIAGRAMA II.

Se consideró como caso positivo para aislamiento de VTEC aquel que tuviera cuando menos una colonia de E. coli productora de citotoxina (diagrama II).

En cada ensayo se incluyeron los siguientes testigos:

D I A G R A M A II

IDENTIFICACION DE CEPAS DE Escherichia coli CITOTOXICAS



- a) Testigo de células, pozo con monocapa de células al que no se le adicionó más que el medio de cultivo de células.
- b) Testigo de caldo soya tripticaseina, pozo con cultivo de células al que se le adicionó 25 ul. del medio para descartar la toxicidad del medio de cultivo de bacterias.
- c) Testigo negativo, sobrenadante de cultivo de cepa incapaz de producir citotoxina (K-12).
- d) Testigo positivo, sobrenadante de cultivo de las cepas --- 933 W productora de VT-2 y 933 J productora de VT-1.

2.- Cuantificación de citotoxina (45).

De cada uno de los sobrenadantes con acción citotóxica se hicieron diluciones 1:20, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , probándose cada una de éstas en monocapa de células HeLa, de igual forma que la ya descrita y se estableció la dosis lítica que es la inversa de la mayor dilución que presente 50% de lisis celular. Para ubicar a las cepas VTEC de acuerdo a su nivel de producción de citotoxinas, se utilizó el siguiente criterio:

Niveles de citotoxina producida por Escherichia coli

Bajo de	2×10^1	-	6×10^2	CD50
Moderado	10^3	-	10^4	CD50

Alto

 10^5 - 10^8 CD50

Marques 1986 (45)

Se hizo ensayo de neutralización de la toxina únicamente con un reducido número de cepas.

3.- Tipificación de las cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas.

3.1 Pruebas de biotipificación primaria (11).

Preparación de inóculo.- Se comprobó la pureza, sembrando cada una de las cepas en medio de Mac Conkey. Una colonia bien característica y aislada se inoculó en una placa de agar de soya tripticaseína y después de 24 horas de incubación a 37°C, se hizo una suspensión en NaCl 0.85% para tener una densidad de 1×10^9 unidades formadoras de colonias por ml. Se utilizó un volumen de 0.02 ml de la suspensión bacteriana como inóculo para cada uno de los tubos de prueba. La preparación de los medios para las pruebas bioquímicas se describe en el apéndice.

Procedimiento.- Cada uno de los tubos para las pruebas bioquímicas, con el correspondiente caldo base y el respectivo sustrato (rafinosa, sorbosa, dulcitol y ornitina), se inoculó con la suspensión bacteriana. Se utilizaron como controles los medios basales sin el sustrato de prueba.

Los tiempos de incubación fueron los siguientes:

Sorbosa 48 horas, dulcitol 48 horas, rafinosa 72 horas y la -- prueba de la descarboxilación de la ornitina 48 horas.

Interpretación.- La prueba de la fermentación de carbohidratos positiva se manifestó por la acidificación del medio y la des-- carboxilación por la alcalinización. Con los resultados obteni-- dos, se ubicó cada cepa estudiada en el biotipo primario corres-- pondiente, de acuerdo a lo descrito por Crichton en el Cuadro No. 5.

3.2 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (2,83).

Se utilizaron los siguientes antibióticos con los correspondien-- tes valores de corte:

<u>Antibiótico:</u>	<u>Concentración ug/ml</u>
Tetraciclina	4
Ampicilina	32
Estreptomina	32
Cloranfenicol	16
Trimetoprim/sulfametoxazol (TMT/SMZ)	32
Gentamicina	8
Amikacina	16
Cefalotina	32

CUADRO No. 5

RESULTADOS DE 16 BIOTIPOS PRIMARIOS DE Escherichia coli

BIOTIPO PRIMARIO No.	RESULTADO DEL BIOTIPO PROBADO EN:			
	Rafinosa	Sorbose	Ornitina	Dulcitol
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-

Tomado de Crichton 1985 (11)

+ fermentación en rafinosa, sorbosa y dulcitol

+ descarboxilación de la ornitina

Kanamicina	16
Cefotaxima	32

Los valores de corte fueron tomados de acuerdo a los niveles séricos más altos que se alcanzan a dosis terapéuticas de los antimicrobianos (27).

Se incluyeron en el ensayo dos concentraciones adicionales: Máxima (concentración de 2 diluciones previas a la del valor de corte en una serie de diluciones al doble) y mínima (concentración de 2 diluciones posteriores a la del valor de corte en una serie de diluciones al doble).

La preparación del medio de cultivo con cada uno de los antibióticos está descrita en el Apéndice.

Preparación del inóculo.- Cada una de las cepas se sembró por estría cruzada en placas de agar soya triptosa, para comprobar la pureza de la cepa (83). Se seleccionaron 4 ó 5 colonias y con una porción de cada una de ellas, se preparó una suspensión en caldo soya tripticaseína, ajustándose la turbidez al tubo No. 2 de la escala de Mac Farland que corresponde a 1×10^8 UFC por ml. De esta suspensión se hizo una dilución 1:20 que se utilizó como inóculo.

Inoculación de los medios.- Con las distintas suspensiones bac

terianas, se llenaron los pozos de la placa del replicador, mediante el cual se inocularon las series de cajas correspondientes a cada uno de los antibióticos, comenzando por la caja testigo (sin antibióticos) y continuando con las otras tres cajas en orden creciente de concentración de antibióticos: mínima, valor de corte y máxima. Se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se leyeron y registraron los resultados como sensible o resistente.

Interpretación.- Las placas se observaron en el siguiente orden: por principio la placa testigo y, si en ésta había desarrollo, se prosiguió con la observación de las otras tres.

Si existía inhibición del desarrollo con la concentración de antibióticos del valor de corte y esta observación era congruente con los resultados de las placas de mínima y máxima concentraciones, la cepa fue catalogada como sensible. De otra manera; si la placa con la concentración del valor de corte presentaba desarrollo y esto era confirmado por los resultados de las placas de mínima y máxima concentraciones, la cepa fue catalogada como resistente.

Los resultados se tabularon por número de antibióticos diferentes a los que las cepas presentaron resistencia.

4.- Análisis estadístico:

4.1 Evaluación de las diferencias por la prueba de X^2 .

Se utilizaron tablas de contingencia 2 x 2, por lo tanto el grado de libertad fue 1. Se tomó el nivel de significancia igual o menor que 0.05.

En todos los casos en los que las frecuencias fueron las requeridas para su aplicación, se utilizó la fórmula de χ^2 .

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (73)$$

De lo contrario, se utilizó la prueba exacta de Fisher (73) para muestras pequeñas.

4.2 Estimación del grado de asociación entre presencia de diarrea y cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas.

Para el cálculo de Riesgo Relativo (RR) se utilizó la fórmula:

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c} \quad (46, 79)$$

donde el significado de: a, b, c, y d es el siguiente:

		Enfermedad	
		D ⁺	D ⁻
Factor de riesgo	VT ⁺	a	b
	VT ⁻	c	d

- D⁺ presencia de diarrea
- D⁻ ausencia de diarrea
- VT⁺ positivo el aislamiento de VTEC
- VT⁻ negativo el aislamiento de VTEC

VIII

RESULTADOS:

El cuadro 6 presenta los resultados encontrados en la población total estudiada (rural más urbana) de donde se aislaron cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas con una frecuencia de 16.8% en el grupo testigo y un porcentaje semejante -- (16.4%) en el grupo de diarrea sin sangre; en tanto que en el grupo de diarrea con sangre la frecuencia fue de 39.5% con un valor de $P < 0.05$ cuando se compararon los grupos testigo y diarrea con sangre.

En el análisis independiente de cada una de las dos poblaciones, en el cuadro No. 7 se presenta la frecuencia de aislamiento de VTEC en la población rural (118 casos), donde se observó que -- tanto en el grupo de diarrea sin sangre (n=48) como en el de -- diarrea con sangre (n=21), se obtuvo una mayor recuperación de cepas de E. coli productoras de citotoxinas que en la población general, correspondiendo a 45.8% y 76.2% respectivamente. Estos aislamientos dieron un valor de $P < 0.05$ al compararlos con el grupo control.

El cuadro No. 8 analiza la población urbana, en donde se estudiaron 233 casos y se observó que la frecuencia de aislamiento fue

CUADRO No. 6

FRECUENCIA DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINA (VTEC) EN
 PACIENTES CON DIARREA DE COMUNIDADES URBANA Y RURAL

GRUPO	CASOS ESTUDIADOS	CASOS POSITIVOS	% POSITIVOS
TESTIGO	95	16	16.8
DIARREA SIN SANGRE (DSS)	213	35	16.4
DIARREA CON SANGRE (DCS)	43	17	39.5*
T O T A L	351	68	19.3

*P < 0.05

CUADRO No. 7

FRECUENCIA DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINA (VTEC) EN
PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD RURAL

G R U P O	NUMERO DE CASOS ESTUDIADOS	POSITIVOS (%)
TESTIGO	49	10 (20.4)
DIARREA SIN SANGRE (DSS)	48	22 (45.8)*
DIARREA CON SANGRE (DCS)	21	16 (76.2)*
T O T A L	118	48 (40.6)

*P < 0.05

CUADRO No. 8

FRECUENCIA DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINAS (VTEC) EN
 PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD URBANA

G R U P O	NUMERO DE CASOS ESTUDIADOS	POSITIVOS (%)
TETIGO	46	6 (13.0)
DIARREA SIN SANGRE (DSS)	165	13 (7.9)
DIARREA CON SANGRE (DCS)	22	1 (4.5)
T O T A L	233	20 (8.5)

más baja: grupo testigo 13%; diarrea sin sangre 7.9% y diarrea con sangre 4.5%; no se encontró diferencia estadísticamente -- significativa en ninguno de los grupos de pacientes con dia-- rrea.

En el cuadro No. 9 se presentan los valores de riesgo relativo (RR) de desarrollar diarrea debido a la presencia de E. coli - citotóxica, en los diferentes grupos estudiados. Los valores obtenidos fueron menores a la unidad para la población total en los grupos de pacientes con diarrea (DSS y DCS) y de pacien tes con diarrea sin sangre; en tanto que para el grupo de dia- rrea con sangre, al compararlo con el grupo testigo, el valor fue de 3.22, dando un valor semejante (3.33) en la preparación del grupo de diarrea con sangre con el grupo de diarrea sin - sangre.

En la población rural todos los valores fueron superiores a - la unidad, en tanto que para el grupo de diarrea (DSS y DCS) fue de 4.7 . Para el grupo de diarrea sin sangre el valor -- fue de 3.3 que también se dió para el grupo de diarrea con -- sangre al compararlo con el grupo de diarrea sin sangre y un valor de 12 para el grupo de diarrea con sangre al compararlo con el grupo testigo. Para la población urbana todos los va- lores fueron menores a la unidad. El grado de asociación en- tre diarrea y aislamiento de cepas de E. coli productoras de

CUADRO No. 9

RIESGO RELATIVO (RR) DE DESARROLLAR DIARREA DEBIDA A LA
PRESENCIA DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINAS

GRUPOS ESTUDIADOS	VALORES (RR) EN LAS POBLACIONES					
	TOTAL		RURAL		URBANA	
	No.	(RR)	No.	(RR)	No.	(RR)
DIARREA (DSS + DCS)	256	1.25	69	4.7	187	0.5
DIARREA SIN SANGRE (DSS)	213	0.97	48	3.3	165	0.57
DIARREA CON SANGRE (DCS)	43	3.22	21	12.48	22	0.31
DIARREA CON SANGRE*	43	3.33	21	3.3	22	0.55

* En comparación con el grupo de diarrea sin sangre.

No. = Número de casos estudiados.

citotoxinas de los grupos de diarrea en ambas poblaciones, se presenta en la Figura No. 1. El cuadro No. 10 presenta los resultados por grupos etarios de la población rural donde no se observan diferencias significativas en la recuperación de cepas de Escherichia coli productoras de citotoxinas, para ninguno de los grupos de edad pero sí se observa que los porcentos más altos corresponden al grupo de diarrea con sangre.

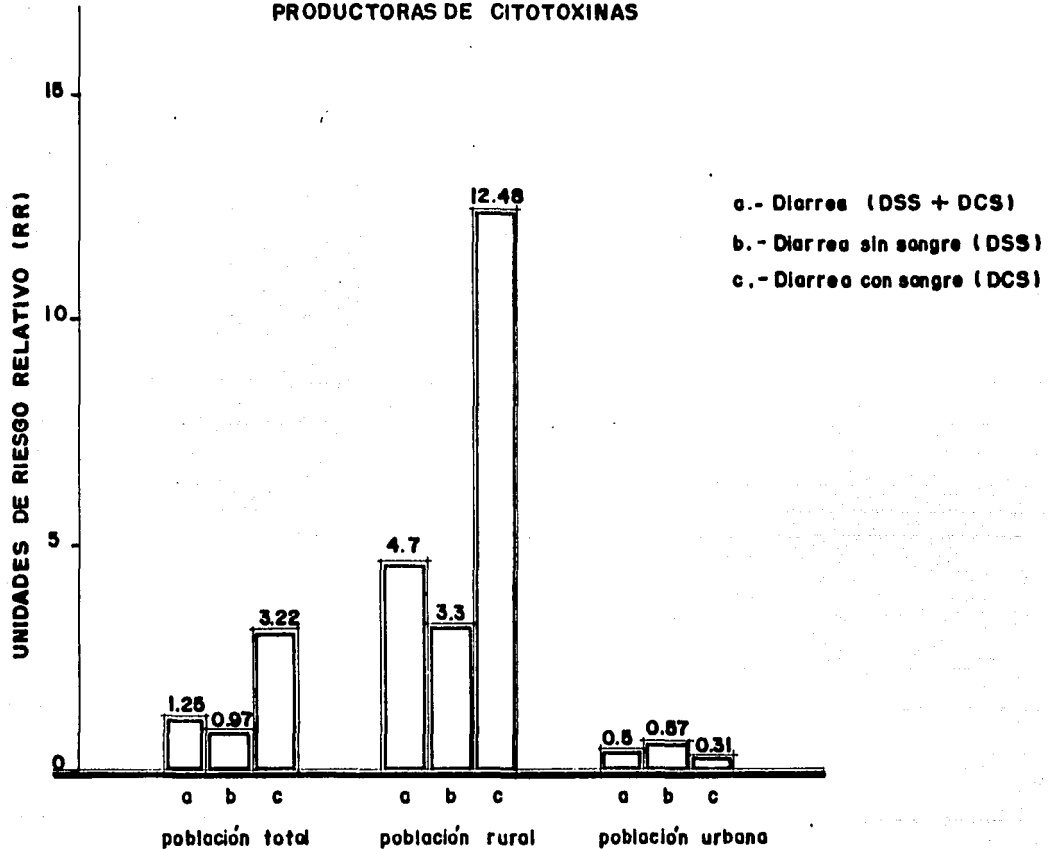
El cuadro No. 11 presenta los resultados por grupos etarios para la comunidad urbana, sin que existan diferencias significativas en los tres grupos para aislamiento de cepas citotóxicas y solamente se observó un aislamiento en el grupo de diarrea con sangre.

En los cuadros 12 y 13 se presentan los casos con aislamiento de E. coli productoras de citotoxinas en los que coincide con la presencia de otro agente patógeno, con una frecuencia que va desde 6 casos en el grupo de diarrea con sangre de la población rural hasta 12 casos en el grupo de diarrea sin sangre de la población rural.

Los niveles de producción de citotoxinas de las cepas correspondientes a la población rural (n=118) y a la urbana (n=233) se reportan en el cuadro 14, observándose que en los niveles bajo y moderado se obtuvieron diferencias significativas --

FIGURA 1

GRADO DE ASOCIACION ENTRE DIARREA Y PRESENCIA DE *Escherichia coli*
PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS



CUADRO No. 10

IDENTIFICACION DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINAS (VTEC) EN
 PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD RURAL DE ACUERDO A LA EDAD

GRUPOS ETARIOS	TESTIGOS n=49		DIARREA SIN SANGRE n=48		DIARREA CON SANGRE n=21	
	No.+/No.	No. Est. (%)	No.+/No.	No. Est. (%)	No.+/No.	No. Est. (%)
< 5 AÑOS	2/12	(16.7)	16/35	(45.7)	10/14	(71.4)
5 < 15 AÑOS	3/14	(21.4)	5/10	(50.0)	4/4	(100)
≥ 15 AÑOS	5/23	(21.7)	1/3	(33.3)	2/3	(66.7)

No.+/No. Est. = Número de casos con aislamiento de VTEC/Número de casos estudiados

CUADRO No. 11

IDENTIFICACION DE Escherichia coli PRODUCTORA DE CITOTOXINAS (VTEC) EN
 PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD URBANA DE ACUERDO A LA EDAD

GRUPOS ETARIOS	CONTROLES n=46		DIARREA SIN SANGRE n=165		DIARREA CON SANGRE n=22	
	No.+/No.	Est. (%)	No.+/No.	Est. (%)	No.+/No.	Est. (%)
< 5 AÑOS	3/17	(17.6)	2/51	(3.9)	0/7	(0.00)
5 < 15 AÑOS	1/11	(9.1)	3/21	(14.3)	0/4	(0.00)
≥ 15 AÑOS	2/18	(11.1)	8/93	(8.6)	1/11	(9.1)

No.+/No. Est. = Número de casos con aislamiento de VTEC/Número de casos estudiados

CUADRO No. 12

ASOCIACION DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS
 CON OTROS AGENTES PATÓGENOS AISLADOS DE LA POBLACION RURAL

GRUPOS	TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	No. CASOS CON <u>E. coli</u> CITOTOXICA		
		COMO UNICO PATOGENO	CON OTRO PATOGENO	TOTAL
TESTIGO	49	6	4 ^a	10
DIARREA SIN SANGRE	48	10	12 ^b	22
DIARREA CON SANGRE	21	10	6 ^c	16

- a) 2 ETEC (LT) / 1 E. histolytica / 1 Rotavirus.
- b) 4 ETEC (ST) / 3 ETEC (LT) / 1 Giardia lamblia / 1 Campylobacter / 1 Rotavirus / 1 ETEC (ST), G. lamblia / 1 ETEC (ST, LT).
- c) 2 ETEC (ST) / 1 ETEC (ST, LT) / 1 Giardia lamblia / 1 Giardia lamblia, Rotavirus / 1 Rotavirus.

CUADRO No. 13

ASOCIACION DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS CON
OTROS AGENTES PATOGENOS AISLADOS DE LA POBLACION URBANA*

GRUPOS	TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	No. CASOS CON <u>E. coli</u> CITOTOXICA		
		COMO UNICO PATOGENO	CON OTRO PATOGENO	TOTAL
TESTIGO	46	5	1 ^a	6
DIARREA SIN SANGRE	166	5	9 ^b	14
DIARREA CON SANGRE	45	5	8 ^c	13

a) 1 ETEC (LT), EPEC (018 ab).

b) 2 ETEC (LT,ST) / 2 EPEC (086,055) / 2 Aeromonas hydrophila /
1 ETEC (LT) / 1 Shigella sonnei, ETEC (LT) / 1 Salmonella
gpo B, ETEC (LT, ST).

c) 4 Shigella sonnei / 2 Shigella flexneri / 1 Shigella boydii /
1 Rotavirus.

* Incluye las muestras de las dos fases.

CUADRO No. 14

DISTRIBUCION DE CASOS DE LAS POBLACIONES RURAL Y URBANA DE ACUERDO A LA CAPACIDAD DE PRODUCCION DE CITOTOXINAS DE LAS CEPAS DE Escherichia coli

NIVELES DE PRODUCCION DE TOXINAS	POBLACIONES			
	RURAL No.	n=118 (%)	URBANA No.	n=233 (%)
a) BAJO*	28	(23)	9	(3)
b) MODERADO*	18	(15)	9	(3)
c) ALTO	2	(2)	2	(1)
NEGATIVO	70	(59)	213	(91)

* $P < 0.05$ en población rural vs. población urbana.

a) $2 \times 10^1 - 6 \times 10^2$ CD50; b) $10^3 - 10^4$ CD50; c) $10^5 - 10^8$ CD50.

($P < 0.05$), cuando se compararon entre sí las poblaciones urbana y rural.

En el cuadro No. 15 se anota la distribución de las cepas VTEC de la población rural en los distintos grupos con sus correspondientes niveles de toxina. El mayor número de cepas ($P < 0.05$) se encontraron en niveles bajos del grupo de diarrea con sangre. Las dos cepas productoras de nivel alto correspondieron: una al grupo testigo y la otra al grupo de diarrea sin sangre. El cuadro 16 presenta el potencial citotoxigénico de las cepas aisladas de la comunidad urbana sin observarse diferencia significativas en ninguno de los grupos. Los porcentajes no alcanzaron el 10%. Las cepas capaces de producir niveles altos de citotoxina se aislaron: una del grupo control y la otra del grupo de diarrea sin sangre. Para la caracterización de las cepas se trabajó con 48 cepas de la población rural y 33 de la población urbana, una cepa por caso con aislamiento de VTEC. En el cuadro 17 se presentan los diferentes biotipos, ordenados según la frecuencia descendente de las 48 cepas VTEC de la población rural y las 33 de origen urbano. Se distribuyeron en 15 de los 16 biotipos primarios de Crichton (10), ya que ninguna cepa correspondió al biotipo 9 ($\text{raf}^- \text{sorb}^+ \text{Orn}^+ \text{Dul}^+$). Al comparar el número de cepas correspondientes a los biotipos 15 y 4 de las poblaciones rural y urbana se obtu-

CUADRO No. 15

POTENCIAL CITOTOXIGENICO DE CEPAS DE Escherichia coli AISLADAS DE MATERIA
FECAL DE PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD RURAL -

ORIGEN DE LAS CEPAS, GRUPO	NUMERO DE CASOS ESTUDIADOS	NIVEL DE CITOTOXINA PRODUCIDO		
		BAJO POSITIVOS (%)	MODERADO POSITIVOS (%)	ALTO POSITIVOS (%)
TESTIGO	49	4 (8.16)	5 (10.20)	1 (2.04)
DIARREA SIN SANGRE	48	12 (25.00)	9 (18.75)	1 (2.08)
DIARREA CON SANGRE	21	12 (57.14)	4 (19.04)	0 (0.00)

CUADRO No. 16

POTENCIAL CITOTOXIGENICO DE CEPAS DE Escherichia coli AISLADAS DE MATERIA
 FECAL DE PACIENTES CON DIARREA DE UNA COMUNIDAD URBANA

ORIGEN DE LAS CEPAS, GRUPO	NUMERO DE CASOS ESTUDIADOS	NIVEL DE CITOTOXINA PRODUCIDO		
		BAJO POSITIVOS (%)	MODERADO POSITIVOS (%)	ALTO POSITIVOS (%)
TESTIGO	46	1 (2.17)	4 (8.69)	1 (2.17)
DIARREA SIN SANGRE	165	7 (4.24)	5 (3.03)	1 (0.60)
DIARREA CON SANGRE	22	1 (4.54)	0 (0.00)	0 (0.00)

CUADRO No 17

DISTRIBUCION (%) EN BIOTIPOS DE LAS CEPAS DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS DE LAS POBLACIONES RURAL Y URBANA.

BIOTIPO	FRECUENCIA		DISTRIBUCION DE LAS POBLACIONES			
	No.	CEPAS	RURAL	n=48	URBANA	n=33
14	14		8	(17)	6	(18)
6	11		9	(19)	2	(6)
5	10		8	(17)	2	(6)
16	10		5	(10)	5	(15)
13	8		7	(15)	1	(3)
15*	8		2	(4)	6	(18)
4*	5		0	(0)	5	(15)
10	4		4	(8)	0	(0)
2	3		1	(2)	2	(6)
3	2		0	(0)	2	(6)
12	2		2	(4)	0	(0)
1	1		1	(2)	0	(0)
7	1		1	(2)	0	(0)
8	1		0	(0)	1	(3)
11	1		0	(0)	1	(3)
9	0		0	(0)	0	(0)

* $P < 0.05$ en los biotipos 15 y 4, población rural-vs- población urbana.

vieron diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el cuadro 18 se anotan los resultados positivos a la fermentación de rafinosa sorbosa y dulcitol y descarboxilación de la ornitina pruebas bioquímicas que integran el biotipo primario, observándose una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los resultados de ornitina de la población urbana y los de la población rural. Los resultados de las pruebas de sensibilidad a 10 antimicrobianos, sin considerar los resultados de la gentamicina y cefotaxima por no existir diferencias entre las cepas, aparecen en el cuadro 19, donde se propone un patrón de 26 resistotipos en base a los resultados de resistencia a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 antimicrobianos. El resistotipo I fue sensible a todos los antimicrobianos, del II al V presentaron resistencia a un solo antibiótico, del VI al X fueron resistentes a 2 antibióticos, del XI al XVI fueron resistentes a 3 antibióticos, del XVII al XX resistentes a 4 antimicrobianos, del XXI al XXIV fueron resistentes a 5 antimicrobianos, y los resistotipos XXV y XXVI fueron resistentes a 6 antimicrobianos. La distribución de las cepas de orígenes rural y urbano en grupos de resistotipos se presenta en el cuadro 20. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos al comparar las dos poblaciones.

CUADRO No. 18

COMPORTAMIENTO BIOQUIMICO DE LAS CEPAS DE Escherichia coli
 AISLADAS DE LAS POBLACIONES RURAL Y URBANA

PRUEBAS BIOQUIMICAS	RURAL n=48		URBANA n=33	
	No.	POSITIVAS (%)	No.	POSITIVAS (%)
RAFINOSA	20	(41)	14	(42)
SORBOSA	8	(16)	10	(30)
ORNITINA*	38	(79)	13	(39)
DULCITOL	19	(39)	12	(36)

* P < 0.05 población rural vs. población urbana.

CUADRO No. 19

RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE
CITOTOXINAS AISLADAS DE POBLACIONES RURAL Y URBANA

TIPO	RESISTENTE A:	TIPO	RESISTENTE A:
I	NINGUNO	XIV	Tc, Sm, Km
II	Tc	XV	Tc, Sm, Cm
III	Ap	XVI	Ap, Sm, Cm
IV	Sm	XVII	Tc, Ap, Sm, Cm
V	Cft	XVIII	Tc, Ap, Sm, Cft
VI	Tc, Cm	XIX	Tc, Ap, Sm, TS
VII	Tc, Sm	XX	Tc, Ap, Sm, Km
VIII	Ap, Sm	XXI	Tc, Ap, Sm, Cm, Km
IX	Tc, Ap	XXII	Tc, Ap, Sm, TS, Cm
X	Ap, Cft	XXIII	Tc, Ap, Sm, Cm, Cft
XI	Tc, Ap, Km	XXIV	Tc, Ap, Sm, Gm, Km
XII	Tc, Ap, Sm	XXV	Tc, Ap, Sm, TS, Cm, Km
XIII	Tc, Ap, Cm	XXVI	Tc, Ap, Sm, TS, Cm, Cft

Antibióticos ensayados:

Tc tetraciclina, Ap ampicilina, Sm estreptomina, Cm cloranfenicol, TS TMT/SMZ, Gm gentamicina, AK amikacina, Cft cefalotina, Km kanamicina, Cfx cefotaxima.

CUADRO No. 20

FRECUENCIA (%) DE DISTRIBUCION DE CEPAS DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE CITOTOXINAS EN GRUPOS DE RESISTOTIPOS DE LAS POBLACIONES RURAL Y URBANA

GRUPOS DE RESISTOTIPOS	No. DE ANTIBIOTICOS A LOS QUE HUBO RESISTENCIA	POBLACIONES ESTUDIADAS	
		RURAL n=48 (%)	URBANA n=33 (%)
I	0	17 (35)	9 (27)
II - V	1	11 (23)	14 (42)
VI - X	2	5 (10)	3 (9)
XI - XVI	3	7 (15)	2 (6)
XVII - XX	4	5 (10)	0 (0)
XXI - XXIV	5	2 (4)	3 (9)
XXV - XXVI	6	1 (2)	2 (6)

Del cuadro 21 al 26 se presentan los distintos grupos de las - dos poblaciones y se reporta el nivel de producción de citotoxinas que fueron capaces de producir en relación con el biotipo y el resistotipo.

En el cuadro 21 se describe el grupo testigo de la población rural, donde los biotipos 5 y 6 fueron los más frecuentes correspondiendo 2 casos al primero y 3 al segundo. Los resistotipos I, II y III constituyen el 70% en este grupo.

En el grupo de diarrea sin sangre de la población rural cuadro 22, se observa que la combinación 5/I' fue la más frecuente con tres cepas del nivel bajo y una del nivel alto.

En el grupo de diarrea con sangre de la población rural cuadro 23, la distribución en biotipos y resistotipos fue amplia y las combinaciones con una frecuencia de 2, fueron 10/II y -- 13/I.

En el grupo testigo de la población urbana cuadro 24, se nota la ausencia de los biotipos 5 y 6.

En el grupo de diarrea sin sangre de la población urbana cuadro 25, el biotipo 6 se encontró en dos cepas dentro del nivel bajo de toxina.

En el grupo de diarrea con sangre de la población urbana cuadro 26, los biotipos 4 y 15 tuvieron 3 cepas cada uno en el nivel

CUADRO No. 21

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DEL GRUPO TESTIGO DE LA POBLACION RURAL

<u>N I V E L</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	5	I	1
	6	I	1
	15	I	1
	16	IV	1
MODERADO	5	XVI	1
	6	I	1
		III	1
	10	II	1
		III	1
ALTO	14	I	1

CUADRO No. 22

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA SIN SANGRE DE LA
 POBLACION RURAL

<u>NIVEL DE PROD. DE TOXINA</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	5	I	3
	6	I	1
		X	1
	7	II	1
	13	IX	1
	14	I	1
		XII	1
		XX	1
	15	XVII	1
	16	VI	1
MODERADO	1	XVIII	1
	2	XXIV	1
	5	XIX	1
	6	XV	1
	12	XXVI	1
	13	I	1
ALTO		VII	1
	14	I	1
		XX	1
	5	I	1

CUADRO No. 23

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE DE LA
 POBLACION RURAL

<u>NIVEL DE PROD. DE TOXINA</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	5	XXI	1
	6	XI	1
		XIII	1
		II	2
	12	XIII	1
	13	I	2
		II	1
	14	I	1
	16	V	1
IX		1	
MODERADO	6	III	1
	13	XIV	1
	14	II	1
	16	I	1

CUADRO No. 24

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DEL GRUPO TESTIGO DE LA POBLACION URBANA

<u>NIVEL DE PROD. DE TOXINA</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	14	VII	1
MODERADO	4	I	1
	13	II	1
	15	II	1
	16	XXII	1
ALTO	8	XXIII	1

CUADRO No. 25

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA SIN SANGRE DE LA
 POBLACION URBANA

<u>NIVEL DE PROD. DE TOXINA</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	2	VI	1
	4	III	1
	6	I	1
		II	1
	14	II	1
	15	II	1
	16	I	1
MODERADO	3	IX	1
	5	I	1
	14	II	1
		IV	1
	16	I XXIII	1
ALTO	15	XXV	1

CUADRO No. 26

BIOTIPOS Y RESISTOTIPOS DE CEPAS DE Escherichia coli
 PRODUCTORAS DE DIFERENTES NIVELES DE CITOTOXINAS,
 AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE DE LA
 POBLACION URBANA

<u>NIVEL DE PROD. DE TOXINA</u>	<u>BIOTIPO</u>	<u>RESISTOTIPO</u>	<u>No. CEPAS</u>
BAJO	2	VIII	1
	3	I	1
	4	II	2
		III	1
	5	XII	1
	11	I	1
	14	XXV	1
	15	I	2
		II	1
	16	II	1
MODERADO	14	II	1

bajo de toxina.

En el cuadro 27 se muestran las combinaciones posibles de biotipo y resistotipo de VTEC y la ubicación en diferentes niveles de producción de citotoxinas.

El biotipo 1 únicamente apareció en la combinación 1.XVIII dentro del nivel moderado, al igual que los biotipos 7, 8 y 11 que solamente se observaron en una sola de las combinaciones. Los biotipos 5, 6, 13, 14 y 16 dieron el mayor número de combinaciones con 5, 7, 5, 7 y 7 resistotipos diferentes, respectivamente. Las combinaciones 5/I y 14/I aparecen en los tres niveles de producción de citotoxinas.

En el cuadro 28, se presentan las características de las cepas productoras de citotoxinas, expresado en porcentos.

Los resistotipos se agruparon de acuerdo al número de antibióticos diferentes a los que demostraron resistencia y de los biotipos se indican los resultados positivos a las cuatro pruebas bioquímicas.

CUADRO No. 27

ASOCIACIONES BIOTIPO/RESISTOTIPO DE LAS CEPAS DE
Escherichia coli PRODUCTORAS DE LOS DIFERENTES NIVELES
 DE CITOTOXINAS

<u>N I V E L</u>	<u>No.</u>	
BAJO	48	2,VI; 2,VIII; 3,I; 4,II; 4,III; 5,I; 5,XII; 5,XXI; 6,I; 6,II; 6, X; 6,XI; 6,XIII; 7,II; 10,II; 11,I; 12,XIII; 13,I; 13,II; 13, IX; 14,I; 14,II; 14,VII; 14,XII; 14,XX; 14,XXV; 15,I; 15,II; 15, XVII; 16,I; 16,II; 16,IV; 16,V; 16,VI; 16,IX.
MODERADO	29	1,XVIII; 2,XXIV; 3,XI; 4,I; 5,I; 5,XVI; 5,XIX; 6,I; 6,III; 6,XV; 10,II; 10,III; 12,XXVI; 13,I; 13,II; 13,VII; 13,XIV; 14,I; 14, II; 14,IV; 14,XX; 15,II; 16,I; 16,XXII; 16,XXIII.
ALTO	4	5,I; 8,XXIII; 14,I; 15,I.

CUADRO No. 28

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE Escherichia coli PRODUCTORAS
DE CITOTOXINAS DE LAS DOS POBLACIONES ESTUDIADAS

P O B L A C I O N	NIVEL DE PROD. CITOTOXINA			BIOTIPOS % POSITIVOS				GRUPOS DE RESISTOTIPOS % POSITIVOS						
	Bajo	Moderado	Alto	Rafinosa	Sorbose	Ornitina	Dulcitol	0 ^a	1	2	3	4	5	6
URBANA n=33	60	33	6	42	30	39	36	27	42	9	6	0	9	6
RURAL n=48	58	37	4	41	16	79	39	35	23	10	15	10	4	2

^aLa cifra indica el número de antibióticos a los que las cepas son resistentes.

IX

DISCUSION:

En el análisis de los resultados de la población total y que corresponde a la suma de las poblaciones urbana y rural, la frecuencia más alta (39%) se encontró en el grupo de pacientes con diarrea con sangre que presentó una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la comparación tanto con el grupo testigo como con el de diarrea sin sangre; lo que sugiere que VTEC es un patógeno importante en casos de diarrea con sangre. El 20.3% de VTEC encontrado en individuos sintomáticos (pacientes con diarrea sin sangre y pacientes con diarrea y sangre en heces) de la población total en este estudio, se ubica dentro de una amplia gama de valores encontrados en trabajos previos; así, en un trabajo longitudinal realizado en Brasil (23) se logró aislar VTEC en 3.3% de los casos de diarrea. En Canadá, Pai y col. en 1988 (60) en un estudio prospectivo en tres hospitales, establecieron que VTEC podría considerarse como el enteropatógeno más frecuente (3.06%) de 5414 casos de diarrea con sangre.

En México, Cravioto y col. 1988 (10) aislaron E. coli productora de SLT-I en 70% de niños con diarrea y en 30%, de niños testigos, provenientes de población rural.

Scotland y col. en 1980 (68) encontraron un 10% de VTEC en 253 EPEC aislados de casos de diarrea.

En Inglaterra y Gales, Smith y col. (76) señalan una presencia de 40% en casos de colitis hemorrágica.

En nuestro estudio, el aislamiento de VTEC en la población general de los individuos sintomáticos (20.3%) fue superior al porciento de los otros patógenos (Shigella 12.3% Salmonella 2.4%, E. h. stolytica 1.1%) (26).

Esta mayor frecuencia de aislamiento de VTEC la señala Karma li en su revisión de 1989 (38), a fin de enfatizar la importancia de la E. coli productora de citotoxinas en los procesos diarreicos, pero además, como un factor de riesgo para cuadros clínicos de mayor gravedad como son las complicaciones de la infección por VTEC (síndrome urémico hemolítico -- HUS y púrpura trombocitopénica trombótica TTP) para individuos colonizados con estas cepas.

Las frecuencias de aislamiento de VTEC en los distintos grupos (control, diarrea sin sangre y diarrea con sangre) de las poblaciones rural y urbana, señalan que la población rural en su grupo de diarrea con sangre presentó el valor más elevado (76%), hecho que ha sido observado en otros estudios (60, 62, 82).

La comparación de frecuencias de aislamiento de VTEC del grupo de diarrea con sangre (76%) con el de diarrea sin sangre (45%) alcanza una diferencia significativa ($P < 0.05$), lo cual señala la importancia de VTEC en diarrea con sangre.

Los valores de riesgo relativo (RR) confirman esta observación, ya que para el grupo de diarrea con sangre de la población rural, el RR fue de 12, lo que indica una asociación 12 veces mayor a la del grupo testigo, que lo expone a presentar diarrea debido a la colonización por VTEC. Además, el valor de RR se mantiene en una cifra significativa de 3.3 para el grupo de diarrea con sangre de la población rural al compararlo, con el grupo de diarrea sin sangre, manifestando que hay una estrecha relación entre la presencia de sangre y el aislamiento de VTEC.

La mayor frecuencia de aislamiento de VTEC en la población rural podría deberse a la convivencia más cercana, que mantiene esta población con los animales domésticos. Estos últimos se han considerados reservorios, ya que se han obtenido cepas de E. coli productoras de citotoxinas de las heces y de los productos de diferentes especies animales como: bovinos, caprinos y aves (14, 19, 47). De ahí que cabe la posibilidad que los animales de Cadereyta, Qro. también constituyan el foco de infección para los humanos. Lo que sugiere la necesidad de investigar VTEC en los animales domésticos de esta localidad.

Por otra parte, en la población rural la práctica del fecalismo al aire libre, que facilita la transmisión de enteropatógenos de persona a persona (4), puede haber influido en la mayor frecuencia de recuperación de las cepas VTEC. Una situación semejante de mayor frecuencia de aislamiento de VTEC, en población

rural se observó en Inglaterra (38), aunque no precisamente en casos de diarrea sino en síndrome urémico hemolítico. En nuestro estudio en la población urbana los porcentajes de recuperación de VTEC fueron: diarrea sin sangre 7.9%, diarrea con sangre - 4.5%; valores que fueron significativamente menores a los obtenidos en la población rural que fueron, diarrea sin sangre - 45.8% y diarrea con sangre 76.2%.

No se observó asociación alguna entre la frecuencia de aislamiento y el cuadro clínico, lo que sugiere que VTEC tuvo poca importancia en la diarrea aguda de esta población urbana.

Además se observó la presencia de otros patógenos lo que dificultó la interpretación del papel de VTEC en la diarrea. Así, en el grupo de diarrea sin sangre se presentaron 9 casos en los que coincide la presencia de VTEC con otro patógeno y se observó E. coli enterotoxigénica (LT, ST), Aeromonas hydrophila, Shigella sonnei, Salmonella del grupo B, donde cualquiera de estos microorganismos pudo ser el responsable del cuadro diarreico, solo o en asociación con E. coli productoras de citotoxinas.

En los casos de diarrea con sangre de la población urbana hubo 7 casos de coexistencia de E. coli citotóxica con otro entero patógeno y particularmente con Shigella, lo que confirma la presencia de más de un agente etiológico en algunos casos de diarrea, como fue descrito por Olarte (56) en un estudio con

niños de la Ciudad de México, en quienes la diarrea estuvo asociada con infecciones múltiples en un 20 a 25% de los casos. No obstante que las cepas VTEC son gérmenes que presentan una amplia gama de posibilidades en cuanto a su patogenicidad (24), fue difícil definir su participación en el cuadro diarreico de estos pacientes.

La ausencia de asociación entre el aislamiento de VTEC y la presencia de diarrea en pacientes de la población urbana, pudo ser la manifestación de que los cuadros clínicos correspondieron a otros enteropatógenos que se aislaron con más frecuencia, especialmente del género Shigella. En la identificación de E. coli productoras de citotoxinas en pacientes con diarrea de la comunidad rural, se observó que al grupo etario de < 5 años, perteneció aproximadamente el 50% de los casos, en este grupo hubo mayor por ciento de aislamiento, comparativamente con otros grupos etarios al considerar porcentos relativos del total de casos con aislamiento de VTEC, así en menores de 5 años 58%, en pacientes entre 5 años y menores de 15 años 25% y en mayores de 15 años 16%, estos datos fueron en parte semejantes a lo que se había encontrado en el trabajo del área rural de México (10) -- donde el grupo etario de menores de un año fue el más productivo en el aislamiento de VTEC, particularmente VT-1.

La mayor frecuencia de aislamiento de VTEC en menores de 5 años

en comparación con los otros grupos etarios de la misma población, señaló que los niños de este grupo se encontraban más frecuentemente colonizados por VTEC y además que las frecuencias de aislamiento fueron significativamente mayores en los individuos que presentaron diarrea y valores aún mayores se observaron para los casos de diarrea con sangre. De ahí que en los niños menores de 5 años de Cadereyta, Qro. se debe considerar a las cepas de VTEC como probable agente etiológico de la diarrea, particularmente cuando esté acompañada de la presencia de sangre en heces.

En la comunidad urbana a diferencia de la rural, el grupo etario que más casos de aislamiento de VTEC proporcionó, fue el de mayores de 15 años.

La mayoría de las cepas de E. coli citotoxigénicas tanto de la población rural como de la población urbana pertenecieron a los niveles bajo ($2 \times 10^1 - 6 \times 10^2$ DC₅₀) y moderado ($10^3 - 10^4$ DC₅₀). Se observó que no hubo una asociación entre los niveles altos de toxina y presencia de diarrea y de sangre en heces, ya que de las dos cepas capaces de producir citotoxinas a niveles altos de la población rural, una pertenecía al grupo testigo y la otra al de diarrea sin sangre, situación que se repitió en los dos casos de la comunidad urbana. Esta distribución no concuerda con lo observado por Karch en 1987 (33) quien encontró --

los mayores niveles de toxina en las cepas aisladas de heces -- acompañadas de sangre; aunque también se han encontrado cepas productoras de niveles altos de citotoxina en individuos asintomáticos (81), lo que sugiere que la acción de las citotoxinas está determinada por la relación huésped-parásito o bien que la producción de toxina es únicamente uno de los factores requeridos por la bacteria para la manifestación de toxicidad "in vivo" (41).

Se ha observado que las cepas productoras de niveles bajos de citotoxinas tienen una distribución más amplia, que incluye casos asintomáticos (38). En el presente trabajo se observó que las VTEC productoras de niveles bajos de citotoxinas se encontraron en los casos de diarrea.

Naturalmente estos resultados tienen las limitaciones inherentes a un estudio transversal y al método de producción de citotoxinas que utiliza el sobrenadante del cultivo en caldo soya tripti caseína con la concentración normal de Fe, que no es la más adecuada para obtener VT-1; a pesar de ello, la producción de VT-1, se comprobó en cada uno de los ensayos de citotoxinas, porque se incluyó en cada microplaca la acción tóxica del sobrenadante -- del cultivo de la cepa testigo 933J productora de VT 1 que había sido cultivada de igual manera en caldo soya tripti caseína. Constantemente se encontró para esta cepa un fuerte efecto tóxico con

lisis de alrededor de 100%. La consistencia en la producción de toxina por esta cepa productora de VT-1 confirma lo observado por Zepeda y cols (89), que en medios con Fe VT-1 fue sintetizada siempre, en cantidad suficiente para hacer posible la demostración de su presencia por ensayo en cultivo de tejidos. De ahí que el cultivo en caldo soya tripticaseína aunque no es el óptimo para la producción de VT-1, pero que es útil en la selección de cepas citotóxicas productoras de ambas citotoxinas VT-1 y VT-2.

En el ensayo de neutralización realizado únicamente con 10 cepas, 3 resultaron neutralizadas con el antisuero VT-1, 3 con el VT-2 y las cuatro restantes se inhibieron parcialmente con los antisueros VT-1 y VT-2 probados por separado.

Solamente con la identificación por pruebas de neutralización de las citotoxinas con sueros específicos, de todas las cepas que presentaron acción tóxica a células HeLa, se tendría la posibilidad de afirmar que efectivamente se trata de una citotoxina Vero. A pesar que Chart (6) consideró adecuado el uso de los sobrenadantes de los cultivos de caldos con concentración total de Fe, como método apto de selección inicial en la investigación de VTEC.

Con los resultados de este trabajo queda la posibilidad que algunas cepas hayan disminuido la producción de citotoxinas por

encontrarse en un medio con Fe: pero en otro trabajo que se --
realizó en forma paralela con medio de Syncase y haciendo el en
sayo de citotoxinas a partir del sonicado de las mismas bacte--
rias no obtuvieron títulos mayores; de ahí que podríamos pensar
que estos títulos bajos fueron verdaderos, y no estuvieron in---
fluenciados mayormente por la presencia de Fe.

Sobre la base de estos resultados, se plantea la necesidad de --
continuar la investigación de las cepas de E. coli productoras -
de citotoxinas asociadas con diarrea, con estudios longitudina--
les que incluyen individuos asintomáticos (portadores) y casos
de diarrea en los que se logre el aislamiento de VTEC, cuyas ce
pas tengan capacidad de producir distintos niveles de citotoxi--
nas.

Esto permitiría corroborar los resultados del presente estudio,
y en consecuencia la ubicación de las cepas de VTEC que alcanza
ron un lugar importante, (20%) en frecuencia con relación a --
otros patógenos como: Shigella, Salmonella, Campylobacter y --
Entamoeba histolytica en la diarrea infecciosa de los individuos
de poblaciones urbanas y rurales de la República Mexicana (26).
La determinación sistemática de los serotipos de E. coli que ha
sido abandonada en la mayoría de los laboratorios clínicos, de-
bería tomarse en cuenta para futuros estudios ya que en este --
trabajo se realizó parcialmente, sobre todo en el grupo de meno

res de dos años de la población urbana en los que se encontró los serogrupos: 055, 086, 0111, 018ab, 018ac, en el total de las cepas estudiadas; pero únicamente 3 cepas de los serogrupos: 086, 018ab y 055, correspondieron a cepas VTEC. La identificación completa de los serotipos incluyendo los antígenos flagelares permitiría establecer la asociación entre serotipos y cepas productoras de citotoxinas, al igual que en algunos países donde se ha señalado reiteradamente a determinados serotipos de EPEC como los más frecuentes (68, 87). Un estudio longitudinal tendría no sólo la capacidad de señalar la asociación entre la infección por VTEC y diarrea sino también de relacionarla con sus complicaciones, que son las que mayores tasas de morbilidad han registrado (36). Además, un estudio longitudinal sería el adecuado para investigar los factores de riesgo de los casos esporádicos, que por el momento son desconocidos, de manera particular en una comunidad urbana (3).

En la caracterización de las cepas VTEC por medio del biotipo primario de Crichton, de un total de 81 cepas estudiadas, 77 (95%) se distribuyeron en 11 biotipos con frecuencias que van de 14 a 2 cepas por biotipo. Ahora, si se consideran únicamente los biotipos con frecuencia de 8 ó mayores quedan incluidas 61 cepas que corresponden al 75% del total estudiado,

en donde hubo una coincidencia de resultados en las pruebas bioquímicas como sigue: sorbosa negativa 100%, rafinosa negativa 66%, ornitina positiva 78% y dulcitol negativo 50%, mismas que dan el perfil de similitud de la mayoría de las cepas VTEC en este estudio. Así, a pesar de que no se encontró un biotipo en particular al que pertenezcan la mayoría de las cepas, sí se establecieron los biotipos primarios de Crichton (biotipos números 14, 6, 5, 16, 13, 15) en los cuales se encontró distribuido el 75% de las cepas, sin que esto sea aplicable a la selección de cepas pertenecientes a un determinado biotipo que particularmente estuviera asociado con la producción de VT.

La frecuencia de cepas con capacidad para descarboxilar la ornitina fue mayor en las cepas de este estudio (78%), que la reportada en la literatura para la descripción de la especie E. coli (57.8%) (17). Faltaría estudiar la frecuencia de ornitina descarboxilasa en las cepas de E. coli no productoras de citotoxinas aisladas de estas localidades, para establecer si existe alguna asociación entre esta capacidad enzimática y la producción de citotoxinas. Las pruebas de descarboxilación de la ornitina y de la lisina fueron utilizadas por Haldane (28) para incrementar la especificidad (de 11.3% a 33.6%) de un medio básico selectivo para E. coli O157:H7, mediante la exclusión de las cepas incapaces de descarboxilar la ornitina y la lisina. De

ahí que dentro de las pruebas bioquímicas del biotipo primario la mayor frecuencia de ornitina descarboxilasa en las VTEC debe ser investigada más a fondo porque podría ser una prueba -- bioquímica auxiliar para seleccionar cepas VTEC, de manera similar que las cepas no fermentadoras del sorbitol han sido seleccionadas en la investigación de cepas de E. coli 0157:H7 -- (18, 40) con buen rendimiento en determinadas localidades geográficas.

El comportamiento bioquímico de las VTEC por separado, demostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) para las cepas ornitina positivas de la población rural (79%) contra las cepas con igual actividad enzimática de la población urbana.

Esta diferencia es el resultado de la distribución de las cepas pertenecientes a las poblaciones rural y urbana en los distintos biotipos, se observó que las cepas aisladas en la población del Distrito Federal, preferencialmente corresponden a -- biotipos con la prueba ornitina descarboxilasa negativa, inclusive en los biotipos 4 y 15 que las diferencias fueron significativas, el mayor número de cepas corresponde a la población urbana.

La mayoría de las cepas VTEC aisladas de poblaciones rural y urbana se distribuyeron en los resistotipos del I al XVI, en la población rural 40 de las 48 cepas (83%) y en la población

urbana 28 de las 33 cepas (84%), lo que demuestra que una buena proporción fue sensible a todos los antimicrobianos (resistotipo I) o bien que presentaron resistencia a 1, 2, y 3, antibióticos diferentes (del resistotipo II al XVI). No se encontró diferencia significativa entre las frecuencias de distribución de los resistotipos de las dos poblaciones. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado en trabajos previos donde la mayoría de las cepas VTEC fueron sensibles a los antimicrobianos (13).

La amplia distribución en 26 resistotipos puede explicarse por el origen de las cepas ya que pertenecen a casos aislados de población abierta.

CONCLUSIONES:

- 1.- La frecuencia de colonización por cepas VTEC fue significativamente mayor en la población urbana que en la población rural.
- 2.- En la población rural, las cepas VTEC parecen ser una causa importante de los casos de diarrea con sangre; mientras que en la población urbana, VTEC no parece ser importante en cuadros diarreicos.
- 3.- El riesgo relativo de desarrollar enfermedad al estar colonizado con VTEC es significativamente mayor en la población rural que en la urbana, y el grupo etario con el mayor riesgo fue el menor de 5 años de edad.
- 4.- A diferencia de otros estudios no hubo relación entre niveles de producción de VT "in vitro" y el cuadro clínico en los pacientes donde se aislaron las cepas.

- 5.- Ninguno de los biotipos de Crichton, resultó particularmente asociado a cepas productoras de VT.
- 6.- La mayor frecuencia de cepas con capacidad para descarboxilar la ornitina entre las VTEC podría ser utilizada como una característica selectiva primaria en el estudio de estas cepas.
- 7.- En las dos comunidades estudiadas, se encontró una amplia variedad de cepas, de acuerdo a biotipos y resistotipos; lo que sugiere que en estas comunidades no predomina algún tipo de cepa.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S.
Phage-typing scheme for Escherichia coli 0157:H7
J. Infect. Dis. 1987; 155: 806-809.
- 2.- Barry AL.
Dilution test: General considerations, en Barry LA, ed.
The antimicrobial susceptibility test. Principles and
Practices Lea & Fabiger, Philadelphia 1976 p. 71-80.
- 3.- Bryant HE, Athar MA, Pai CH.
Risk factors for Escherichia coli 0157:H7. Infection in
an urban community.
J. Infect. Dis. 1989; 160 (5): 858-864.
- 4.- Carter AO, Borczyk AA, Carlson JAK.
A severe outbreak of Escherichia coli 0157:H7 associated
hemorrhagic colitis a nursing home.
N. Engl. J. Med. 1987; 317: 1496-1500.
- 5.- Chart H, Scotland SM, Rowe B.
Production of cerocytotoxin by strain of Escherichia coli
as related to the availability of iron.
FEMS. Microbiol. Lett. 1987; 48: 385-390.
- 6.- Chart H, Scotland SM, Rowe B.
Detection of very cytotoxin produced by strain of Esche-
richia coli grown in iron replete and iron restricted
media.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verotoxin-Producing Escheri--
chia coli Toronto 1987 STF-8.
- 7.- Clausen CR y Christie DL.
Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropa-
thogenic Escherichia coli.
J. Pediatr. 1982; 100: 358-361.
- 8.- Clearly T, Mathewson J, Faris E, Pickering L.
Shiga-Like Cytotoxin production by Enteropathogenic Es--
cherichia coli Serogrups.
Infec. Immun. 1985; 47: 335-337.

- 9.- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe BA.
An Adhesive factor found in strain of Escherichia coli belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes.
Curr. Microbiol. 1979; 3: 95-99.
- 10.- Cravioto A, Vázquez V, Soria A, Navarro A, Ortiz M.
Production de citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 en cepas de Escherichia coli aislada de niños con diarrea en una comunidad rural.
Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1988; 45: 206-210.
- 11.- Crichton P, Old DC.
Biotyping of Escherichia coli: Methods and Applications. En Sussman M. ed. The virulence of Escherichia coli. Reviews and Methods. London: Academic Press 1985; 315-332.
- 12.- Donohue-Rolfe A, Kelley MA, Bennish M, Keusch G.
Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Shigella Toxin.
J. Clin Microbiol. 1986; 24: 65-68.
- 13.- Dorn CR, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B.
Properties of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7.
Epidemiol. Inf. 1989; 103: 83-95.
- 14.- Doyle MP, Schoeni JL.
Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry.
Appl Environ. Microbiol 1985; 53: 2394-2396.
- 15.- Edelman R, Levine M.
Summary of a workshop on enteropathogenic Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 1983; 147: 1103-1118.
- 16.- Edelman R, Karmali MA, Fleming PA.
Summary of international Symposium and Workshop on Infections Due to Verocytotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 1988; 157: 1102-1104.

- 17._ Ewing W.
Identification of Enterobacteriaceae.
4th ed. New York: Elsevier 1986: 97-121.
- 18.- Farmer JJ, Davis BR.
H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single-tube screening medium for detecting Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis.
J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 620-625.
- 19.- Francis DH, Janke BH, Andraos CY.
Hemorrhagic colitis in calves.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Toronto 1987 AMV-2.
- 20.- Gannon VPJ, Gyles CL.
Four types of Escherichia coli Verotoxins.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verotoxin-Producing Escherichia coli 1987; STF-15.
- 21.- García-Mendoza E.
Determinación de toxinas LT VT y factores CFA/I CFA/II en 365 cepas de Escherichia coli aisladas de niños recién nacidos con y sin diarrea (Tesis Profesional).
México, D.F. Instituto Politécnico Nacional E.N.C.B. 1985.
- 22.- Giono S.
Conservación y mantenimiento de microorganismos.
Bioquímica 1979; II: 379-382.
- 23.- Giugliano LG, Giugliano R.
Incidences of Verocytotoxin Producing Escherichia coli in children of a poor community of Manaus (Brazil).
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Toronto 1987 CEP-12.
- 24.- Gransden WR, Damm MAS, Anderson JD, Carter JE, Lior H.
Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7.
J. Infect. Dis. 1986; 154: 522-524.
- 25.- Guiscafré H. Muñoz O. Gutiérrez G.
Normas para el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda.
Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1986; 43: 702-707.

- 26.- Guiscafré H, González S, Parra R, Lemus H, Alvarez MT, Guiscafré JP, Muñoz O.
III Etiología y cuadro clínico de los casos estudiados.
Arch. Invest. Méd. (Méx) 1988; 19: 361-368.
- 27.- Guiscafré H y Leaños B.
Resistencia de enterobacterias y Pseudomonas a viejos y nuevos antimicrobianos.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 1989; 46: 163-170.
- 28.- Haldane DJM, Damm MAS, Anderson JS.
Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (Shiga-like) toxin producing Strain of Escherichia coli 0157:H7.
J. Clin. Microbiol 1986; 24: 652-653.
- 29.- Head SC, Petric M, Richardson SE, Roscoe ME, Karmali MA.
Purification and characterization of Verocytotoxin 2.
FEMS Microbiol. Lett. 1988; 51: 211-216.
- 30.- Ish-Shalom N, Arbus GS, Karmali MA, Petric M.
Clinical and Prognostic Features of Verotoxin (VT)-Producing E. coli (VTEC)-Associated Hemolytic Uremic Syndrome (HUS).
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Escherichia coli. Toronto 1987 HUS-11.
- 31.- Johnson M, Lior H, Bezanson GS.
Cytotoxin Escherichia coli 0157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada.
Lancet 1983; i: 76.
- 32.- Karch H, Strockbine NA, O'Brien A.
Growth of Escherichia coli in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin producing strains by colony blot assay.
FEMS Microbiol Lett. 1986; 35: 141-145.
- 33.- Karch H, Heesemann J, Lauf S.
Phage-Associated Cytotoxin Production by and Enteroadhesiveness of Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Infants with Diarrhea in West Germany.
J. Infect. Dis. 1987; 155: 707-715.
- 34.- Kai A, Itoh I, Yamada S, Kudoh Y, Ohashi M.
Purification and Characterization of Verocytotoxin Produced by Escherichia coli 0145:NM.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Infections. Toronto 1987 STF-4.

- 35.- Karmali M, Steele ABT, Petric M, Lim C.
Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli.
Lancet 1983; i: 619-620.
- 36.- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Cheung R, Arbus GS.
The Association Between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 1985; 151: 775-782.
- 37.- Karmali M, Petric MA, Lim C, Cheung R, Arbus GS.
Sensitive Method for detecting low number of verotoxin-producing Escherichia coli in mixed cultures by use of colony sweeps and polymixin extraction of Verotoxin.
J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 614-619.
- 38.- Karmali M.
Infection by Verotoxin-Producing Escherichia coli.
Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 15-38.
- 39.- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S.
Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli.
Infect. Immun. 1977; 18: 775-779.
- 40.- Krishnan C, Fitzgerald VA, Dakin SJ, Behme JR.
Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by Escherichia coli O157:H7.
J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 1043-1047.
- 41.- Law D.
Virulence factors of enteropathogenic Escherichia coli.
J. Med. Microbiol. 1988; 26: 1-10.
- 42.- Levine M.
Escherichia coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent.
J. Infect. Dis. 1987; 155: 377-389.
- 43.- Levin M, y Edelman R.
Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea Epidemiology and Pathogenesis.
Epidemiol. Rev. 1984; 6: 31-50.

- 44.- Manual de prácticas de Virología.
Instituto Politécnico Nacional - Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología.
México, D.F. 1989 ISBN 968-29-2449-9.
- 45.- Marques LRM, Moore MA, Well JG, Wachsmuth IK, O'Brien
AD.
Production of Shiga-like toxin by Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 1986; 154: 338-341.
- 46.- Mc Nutt LA, Woolson RF.
Statistical Analysis Of 2 x 2 Tables Infect. Control
Hosp.
Epidemiol. 1988; 9: 420-423.
- 47.- Mohammad A, Peiris JSM, Perera LP.
A longitudinal Study of Verocytotoxin Producing Esche-
richia coli (VTEC) Infection in a cohort of calves.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Es-
cherichia coli. Toronto 1987 AMV-1.
- 48.- Mota-Hernández F.
Programa Nacional de Hidratación Oral en Diarrea 1983-
1986, Evaluación y Perspectivas.
Salud Pública de Méx. 1987; 29: 268-274.
- 49.- Muñoz O., Coello-Ramírez P, Serafín F. Olarte J, Picke
ring L, Dupont H, Gutiérrez G.
Gastroenteritis infecciosas aguda. Etiología y su co-
rrelación con las manifestaciones clínicas y el moco -
fecal.
Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1979; 10: 135-145.
- 50.- Newland JW, Neill R.
DNA Probes for Shiga-like Toxins I and II and for Toxin-
Converting Bacteriophages.
J. Clin. Microbiol. 1988; 26: 1292-1297.
- 51.- O'Brien AD, La Veck G.
Production of Shigella dysenteriae Type I Like Cytotoxin
by Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 1982; 146: 763-769.
- 52.- O'Brien AD, La Veck GD.
Purification and characterization of a Shigella dysente-
riae I like toxin produced by Escherichia coli.
Infect. Immun. 1983; 40: 675-683.

- 53.- O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. Escherichia coli 0157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga)-like cytotoxin. Lancet 1983; i: 702.
- 54.- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strain that cause hemorrhagic colitis on infantile diarrhea. Science 1984; 226: 694-696.
- 55.- O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev. 1987; 51: 206-220.
- 56.- Olarte J. Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 1985; 42: 66-72.
- 57.- Olarte J. El problema de las diarreas infecciosas. Boletín Mensual Epidemiología México 1986; 1: 61-71.
- 58.- Padhye VV, Kittell FB, Doyle MP. Purification and Physicochemical properties of a unique Vero Cell from Escherichia coli 0157:H7. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986; 139: 424-430.
- 59.- Padhye VV, Beery JT, Kittell FB, Doyle MT. Colonic hemorrhage Produced in mice by unique Vero Cell cytotoxin from Escherichia coli strain that causes hemorrhagic colitis. J. Infect. Dis. 1987; 155: 1249-1253.
- 60.- Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson W, Sims HV, Woods DE. Epidemiology of Sporadic Diarrhea due to Verocytotoxin-Producing Escherichia coli: A two-year Prospective Study. J. Infect. Dis. 1988; 157: 1054-1057.
- 61.- Petric M, Karmali MA, Richardson S, Cheung R. Purification and biological properties of Escherichia coli verocytotoxin. FEMS. Microbiol. Lett. 1987; 41: 63-68.

- 62.- Remis RS, Mc Donald KL, Riley LW, Puhr ND, Wells JG, Davis BR, Blake PA, Cohen LM.
Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with Escherichia coli 0157:H7.
Ann. Intern. Med. 1985; 101: 624-626.
- 63.- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Mc Gee HB, Well JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML.
Hemorrhagic colitis Associated with a rare Escherichia coli serotype.
N. Engl. J. Med. 1983; 308: 681-685.
- 64.- Robaey G, Surmont I, Lemmens P, Coremans G, Vantrappen G, Vandepitte J.
Haemorrhagic Colitis and Verotoxin-Producing Escherichia coli 0157 in Belgium.
Lancet 1987; i: 1495-1496.
- 65.- Rothbaum R, Mc Adams J, Gianella R, Partin JC.
A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants.
Gastroenterology 1982; 83: 441-454.
- 66.- Ryan CA, Tauxe RV, Hisek GW, Well JG, Stoez PA, Mac Fadden HW, Smith PW, Wright GF, Blake PA.
Escherichia coli 0157:H7 diarrhea in a nursing home: - clinical, epidemiological, and pathological findings.
J. Infect. Dis. 1986; 154: 631-638.
- 67.- Scotland SM, Day NP, Rowe B.
Production by strains of Escherichia coli of a cytotoxin (VT) affecting Vero cells.
Society for General Microbiology Quarterly 1979; 6: 156-157.
- 68.- Scotland SM, Day NP, Rowe B.
Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of Escherichia coli belonging to traditional enteropathogenic serogroups.
FEMS. Microbiol. Lett. 1980; 7: 15-17.

- 69.- Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B.
Vero cytotoxin production in strains of Escherichia coli is determined by genes carried on bacteriophage.
Lancet 1983; ii: 216.
- 70.- Scotland SM, Smith HR, Rowe B.
Two distinct toxins active on Vero cells from E. coli 0157.
Lancet 1985; ii: 885-6.
- 71.- Scotland SM, Willshaw GA, Smith RH, Cheasty T, Rowe B.
Production of Vero Cytotoxins VT, and VT2 by strain of Escherichia coli isolated from human or animal Infections.
Abstr. Int. Symp. Workshop Verotoxin-Producing Escherichia coli. Toronto 1987 LFE-1.
- 72.- Scotland SM, Rowe B, Smith HR, Willshaw GA, Gross RJ.
Verocytotoxin producing strains of Escherichia coli - from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA Probes.
J. Med. Microbiol 1988; 25: 237-243.
- 73.- Siegel S.
Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta.
Décimo primera reimpresión México: Ed. Trillas, 1988: 130.
- 74.- Smith WH y Linggood MA.
The transmissible nature of Enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of Escherichia coli.
J. Med. Microbiol 1971; 4: 301-305.
- 75.- Smith WH, Green P, Parsell Z.
Vero cell Toxins in Escherichia coli and Related Bacteria: Transfer by Phage and conjugation and toxic action in Laboratory Animals, Chickens and Pig.
J. Gen. Microbiol. 1983; 129: 3121-3137.
- 76.- Smith HR, Gross JR, Rowe B, Fry NK.
Haemorrhagic colitis and vero cytotoxin-producing Escherichia coli in England and Wales.
Lancet 1987; i: 1062-1063.

- 77.- Strockbine N, Marques L, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien A.
Two Toxin-Converting Phages from Escherichia coli - 0157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biological Activities.
Infect. Immun. 1986; 53: 135-140.
- 78.- Sussman M.
Escherichia coli in Human and Animal Diseases. En Sussman ed. The virulence of Escherichia coli Review and Methods.
London: Academic Press 1985: 7-45.
- 79.- Svejgaard A, Platz P, Rider LP.
HLA and Disease 1982 A Survey.
Imm. Rev. 1983; 70: 193-217.
- 80.- Varghese A, Bouzari S.
Verotoxin production by Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC).
Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin-Producing Escherichia coli. Toronto 1987 LFE-10.
- 81.- Vázquez V, Arredondo M, Trujillo F, Cravioto A.
Relación entre aislamiento de cepas de Escherichia coli 0157:H7 y presencia de colitis hemorrágica en niños.
Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1987; 44: 444-447.
- 82.- Wade WG, Thom BT, Evans N.
Cytotoxic enteropathogenic Escherichia coli.
Lancet 1979; ii: 1235-1236.
- 83.- Washington II JA,.
Susceptibility Test: Agar Dilution en Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition.
Washington DC, American Society for Microbiology, 1985: 967-971.
- 84.- WHO.
Programme for Control of Diarrhoeal Diseases Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections.
CDD/83.3 Rev. 1 1987.
- 85.- Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Rowe B.
Cloning of genes determining the production of Vero cytotoxin by Escherichia coli.
J. Gen. Micro. 1985; 131: 3047-3053.

- 86.- Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Field AM, Rowe B. Heterogeneity of Escherichia coli phages encoding Vero Cytotoxins: Comparison of cloned sequences determining VT-1 and VT-2 and development of specific gene probes. J. Gen. Micro. 1987; 133: 1309-1317.
- 87.- Wilson MW, Bettelheim. Cytotoxic Escherichia coli serotypes. Lancet 1980; i:201.
- 88.- Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of a vero toxin from Escherichia coli O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. Microb. Pathogen. 1987; 3: 21-30.
- 89.- Zepeda-López HM, Eslava-Campos C, Torres FJ, Giono S. Influence of iron on the production of two cytotoxins by one strains of Escherichia coli. Rev. Lat-amer. Microbiol. 1989; 31: 317-321.

X I I

APENDICE:

SOLUCION Y MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA LOS
CULTIVOS CELULARES

Solución de Tripsina al 5% (44).

FORMULA:

Solución A de PBS (20 x)	50 ml.
Agua destilada.....	950 ml.
Tripsina 1:250	50 g.
Rojo de fenol	0.5 ml.

PREPARACION:

En un frasco limpio y seco mezclar el PBS con el agua. Agregar tripsina y agitar hasta que se disuelva por completo, añadir el rojo de fenol y ajustar el pH a 7.8 con NaOH 1N.

Agitar a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente dejar en reposo a 4°C por 24 horas.

Clarificar la solución filtrando con papel filtro de poro fino.

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 μm .

Distribuir en frascos limpios y estériles en volúmenes de 2 ml.

Tapar perfectamente y sellar con cinta adhesiva. Conservar a -20°C hasta por un año.

Medio mínimo esencial (MEM) (44).

FORMULA:

MEM Eagle (10 x)	10	ml.
Solución de Penicilia-Estreptomicina.....	1	ml.
Glutamina 20 mM	1	ml.
Bicarbonato de sodio al 4.4%	3	ml.
Suero bovino fetal	3-10	ml.
Agua destilada	90	ml.

PREPARACION:

Preparar la mezcla en condiciones de esterilidad.

MEDIOS PARA PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA DETERMINACION
DE BIOTIPOS

Medio para pruebas de fermentación (11).

Medio basal.

Peptona	15	g
Púrpura de bromocresol.....	0.02	g
Agua destilada	1000	ml
(Esterilizar a 121°C por 15 minutos)		

Soluciones de carbohidratos: rafinosa, sorbosa, dulcitol.

Carbohidrato.....	10	g
Agua destilada.....	100	ml
(Esterilizar en baño de vapor a 100°C por una hora).		

Añadir la solución de carbohidratos al medio basal para tener una concentración de 0.5%. El medio completo distribuirlo en volúmenes de 4 ml. en tubos estériles y volver a esterilizar en baño de vapor a 100°C por 30 minutos.

Medio para descarboxilación de aminoácidos (11).

Medio basal.

Peptona	5	g
Extracto de levadura.....	3	g
D-glucosa.....	1	g
Púrpura de bromocresol.....	0.02g	
Agua destilada.....	1000	ml

Al medio base se añade el aminoácido a la concentración final de 0.5% (peso/volumen).

Se ajusta el pH a 6.7 y se distribuye en porciones de 5 ml. en tubos de tapón de rosca, se esteriliza en autoclave. Los tubos se mantienen bien cerrados hasta su uso.

El control es el medio basal sin aminoácido.

SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LAS PRUEBAS DE
SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Reguladores de fosfatos (R-PO₄) para disolver antimicrobianos
(2).

Reactivo (grado analítico)	g/1000 ml de agua destilada (R-PO ₄)	
	pH6	pH8
K H ₂ PO ₄	1.8	0.75
K ₂ H PO ₄	8.2	16.4

Solventes y diluyentes para las soluciones de antimicrobianos
(2).

<u>Antimicrobiano:</u>	<u>Solvente:</u>	<u>Diluyente:</u>
Tetraciclina	Agua	Agua
Ampicilina	R-PO ₄ pH8	R-PO ₄ pH6
Estreptomina	Agua	Agua
Cloranfenicol	Etanol	Agua
TMT/SMZ (1:19)*	Agua	Agua
Gentamicina	R-PO ₄ pH8	Agua
Amikacina	Agua	Agua
Cefalotina	R-PO ₄ pH6	Agua
Kanamicina	R-PO ₄ pH8	Agua
Cefotaxima	Agua	Agua

Diferentes concentraciones de antimicrobianos que se utilizaron para las pruebas de sensibilidad (27).

Antimicrobiano:	Concentración en ug/ml		
	Conc. baja	Valor de corte	Conc. alta
Ampicilina	8	32	128
Tetraciclina	1	4	16
Estreptomicina	8	32	128
Cloranfenicol	4	16	64
TMT/SMZ (1:19)*	8	32	128
Gentamicina	2	8	32
Kanamicina	4	16	64
Amikacina	4	16	64
Cefalotina	8	32	128
Cefotaxima	8	32	128

* Trimetoprim/Sulfametoxazol (1:19)