

42
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



RECEIVED
MAY 20 1991

ADHERENCIA A LA LINEA CELULAR HEP-2 DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA Y ENTEROTOXIGENICA AISLADAS DE
INFECCIONES ENTERICAS SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS

TESIS

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO

Presenta:

FIDELINA SILVIA CHIMAL RAMOS

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN.

México,D.F.

1991



FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

	pag.
Lista de Tablas y Cuadros	i
Lista de figuras, Gráficas y Diagramas	ii
abreviaturas	iii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	3
III GENERALIDADES	3
1. Antecedentes históricos.....	5
2. Características generales	6
a) Aislamiento	12
b) Identificación	13
3. Importancia clínica	15
a) Patogénesis	15
b) Manifestaciones clínicas	15
4. Mecanismos de patogenicidad	16
a) Estructuras antigénicas	16
b) Adherencia	20
c) Citotoxinas y enterotoxinas	23
IV OBJETIVOS	25
V MATERIAL	26
VI METODOLOGIA	29
VII RESULTADOS	38
VIII DISCUSION	51
IX CONCLUSIONES	54
X ANEXO: PREPARACION DE REACTIVOS	55
XI BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DE TABLAS Y CUADROS

No.	DESCRIPCION	pag.
TABLAS		
Tabla 1.	Principales agentes etiológicos causantes de diarrea en niños menores de 2 años	8
Tabla 2.	Algunas características de los factores de colonización establecidos o putativos identificados en <i>E. coli</i> enterotoxigénica ECET humana	19
Cuadro 1.	Clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el ensayo de adherencia a células HEp-2	40
Cuadro 2.	Frecuencia de la capacidad de adherencia a células HEp-2, mostrada por las cepas trabajadas de los diferentes grupos de <i>E. coli</i> (ECEP, ECET y no ECET no ECEP).	42
Cuadro 3.	Asociación entre la capacidad de adherencia a células HEp-2 de 42 cepas de ECET y 62 cepas de no ECEP no ECET y la presencia de diarrea.	46
Cuadro 4.	Comparación del porcentaje de adherencia en cepas del grupo ECET y no ECET no ECEP, entre cepas aisladas de muestras con cuadro clínico diarreico y asintomáticas.	47
Cuadro 5.	Relación entre la capacidad de adherencia a las células HEp-2 y los diferentes patrones de adherencia observados en los grupos de <i>E. coli</i> (ECET, ECEP y no ECET no ECEP).	50

LISTA DE GRAFICAS

No.	DESCRIPCION	pag.
Figura 1.	Distribución de las 93 cepas <i>E. coli</i> adherentes según su clasificación.	39
Figura 3.		
A)	Distribución de 44 cepas adherentes a células HEp-2 del grupo no ECEP no ECET de acuerdo al tipo de adherencia.	49
B)	Distribución de 31 cepas adherentes de ECEP a células HEp-2 de acuerdo a tipos de adherencia.	49
C)	Distribución de las 18 cepas adherentes a células HEp-2 de ECET de acuerdo a los tipos de adherencia.	49
Figura 3.	Fotografía microscópica en campo claro, mostrando el patrón de adherencia difusa (AD) observando en una cepa de <i>E.coli</i> monocapa de células HEp-2.	32
Figura 4.	Fotografía microscópica en campo claro, mostrando el patrón de adherencia localizado (AL) observando en cepa 42414 de la ATCC de ECEP a la monocapa de células HEp-2.	33
Figura 5.	Fotografía microscópica en campo claro, mostrando el patrón de adherencia agregativa (AA) observando en una cepa de <i>E.coli</i> a la monocapa de células HEp-2.	34

DIAGRAMAS

Diagrama 1.	Ensayo de adherencia de <i>E. coli</i> a la línea celular HEp-2	29
Diagrama 2.	Diagrama de dispersión de la capacidad de adherencia en cepas de <i>E. coli</i> pertenecientes al grupo no ECET no ECEP aisladas de cuadros clínicos sintomáticos y asintomáticos.	43
Diagrama 3.	Diagrama de dispersión de la capacidad de adherencia en cepas de <i>E. coli</i> pertenecientes al grupo ECET aisladas de cuadros clínicos sintomáticos y asintomáticos.	44

Abreviaturas

AA o A	- adherencia agregativa
AD o D	- adherencia difusa
AEDT	- solución del ácido etilendiaminotetraacético
AFC	- adhesina fimbrial de colonización
AL o L	- adherencia localizada
ATCC	- American typing tissue collection
CaCo 2	- línea celular de carcinoma colónico
CS	- antígeno de superficie de ECET
eae	- gen cromosomal en ECEP
ECEA	- <i>Escherichia coli</i> enteroadherente
EGEH	- <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEI	- <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEP	- <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECEA	- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EMB	- eosina azul de metileno
FAE	- factor de adherencia de ECEP
H	- antígeno flagelar
HEp-2	- línea celular de carcinoma laríngeo
GM1	- gangliósido
K	- antígeno capsular
KB	- Kilobases
LPS	- lipopolisacárido
nm	- nanómetros
MDa	- megadaltons
MME	- medio mínimo esencial
O	- antígeno común o Lipopolisacárido
SSAF	- solución salina amortiguadora de fosfatos
SSBH	- solución salina balanceada de Hanks
TE	- toxina termoestable
TL	- toxina termolábil

RESUMEN

Escherichia coli es un microorganismo catalogado inicialmente como componente normal de la flora, pero posteriormente como patógeno al encontrarse como el único agente etiológico productor de diarreas; por las características clínicas, epidemiológicas y de patogenicidad que presentan sus miembros se ha permitido su agrupación, siendo los grupos de EPEC (*E. coli* enteropatógena) y ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), los más involucrados en la producción de diarreas en infantes.

Con el propósito de estudiar en cepas de *E. coli* pertenecientes a los grupos de ECET, ECEP y de *E. coli* no ETEC no EPEC la habilidad que presentan de adherirse a células HEp-2 así como el tipo de adherencia que describen, se trabajaron a doble ciego 142 cepas que comprendieron estos grupos y que fueron aisladas de cuadros clínicos sintomáticos (diarreas) como de cuadros asintomáticos, el objeto de esta selección fue poder analizar si la capacidad y tipo de adherencia a esta línea celular es un buen modelo de estudio que de las bases para diferenciar a nivel de grupo a las *E. coli* y poder inferir el cuadro clínico de procedencia de las cepas. Se requirió partir de un ensayo de adherencia celular ya establecido que fue el de Cravioto et al. en 1979, el cual fue estandarizado para analizar la adherencia en el grupo ECEP, éste se modificó en la fijación y la tinción bajo el criterio de obtener cualitativamente mejores resultados al evaluar por observación microscópica ambos métodos

con cepas prototipo del grupo ECEP. Al analizar los resultados se observó que la utilización del ensayo de adherencia a células HEP-2 es un buen modelo de estudio para el análisis del mecanismo de la adherencia en la patogénesis de los grupos. Se evidenció que la capacidad de adherencia a esta línea celular por cepas de ECEP y ECET se relaciona significativamente al cuadro clínico del cual fueron aisladas. Al parecer no hay un patrón de adherencia (AD difuso, AL localizado y AA agregativo) que pueda caracterizar al grupo ECEP y no ECEP no ECET, presentándose más comúnmente en el grupo de ECET el patrón de adherencia AA.

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas ocasionan en México y otros países subdesarrollados gastos destinados a su prevención, tratamiento y control. La diarrea infecciosa aguda y otras infecciones gastrointestinales constituyen un gran problema de salud pública, siendo factores importantes de morbi- mortalidad en la población infantil principalmente, que es la más susceptible para adquirir y desarrollar este tipo de infecciones.

En países del Tercer Mundo se reporta de 5 a 10 millones de muertes al año por diarrea, presentándose del 15 al 25 % en los primeros 5 años de vida (1).

En México, según estadísticas del Sistema Nacional de Salud, en 1990 las infecciones intestinales ocuparon el segundo lugar como causas de morbilidad general con aproximadamente 3 millones de casos anuales (17).

Diferentes agentes enteropatógenos pueden producir diarrea, algunos sin invadir la mucosa intestinal alteran el mecanismo secretor de agua y electrolitos mediante toxinas y/o afectan la superficie de las membranas de las células epiteliales del intestino por su propiedad de adherirse y otros por la invasión directa de la mucosa intestinal, clasificándose a la diarrea como de tipo secretor e invasivo:

a) La diarrea de tipo secretor (no inflamativa), depende de mecanismos como la adherencia de las bacterias a las membranas epiteliales, representando este evento el primer paso en la patogénesis de la diarrea, lo que le permite permanecer en el lumen intestinal y posteriormente al producir toxinas alterar el mecanismo de la adenilato ciclasa y la bomba de sodio potasio, provocando así la profusa salida del agua y electrolitos.

b) La diarrea de tipo invasivo o desinteriforme es caracterizada por la presencia adicional de moco y sangre, es provocada por enteropatógenos los cuales además de adherirse invaden la mucosa y destruyen a las células epiteliales causando una reacción inflamatoria importante.

GENERALIDADES

1.- Antecedentes históricos

La bacteria *Escherichia coli* fué inicialmente descrita por Escherich en 1885, con el nombre de *Bacterium coli commune*, siendo entonces considerada como un organismo no patógeno, aunque se observó su presencia en infecciones del tracto urinario en niñas (41).

En la década de los 20's, *E. coli* se reportó como un agente etiológico causante de diarrea infantil (26). Posteriormente Bray en 1945, consideró como enteropatógeno a la *E. coli* al demostrar que una cepa antigénicamente diferente de las cepas *E. coli* aisladas anteriormente, era la responsable de los brotes de diarrea en niños lactantes y menores de cinco años en nosocomios y casas de cuna durante el verano (24). Un año después Varela et al. reportaron el aislamiento de *E. coli* de un caso mortal de diarrea (40).

Dada su creciente importancia en 1950 Kauffmann clasificó a *E. coli* dentro de un sistema de serotipificación, dividido en serogrupos sobre las siguientes bases: a) el lipopolisácarido termo-estable (antígeno O), b) antígeno flagelar termo-lábil (antígeno H) y c) el antígeno termo-lábil existente en la cápsula sobre la superficie bacteriana (antígeno K) (24).

2.- Características generales

La familia Enterobacteriaceae es un grupo grande y heterogéneo de bacterias gram-negativas, que comprende en su mayoría a colonizadores normales del tracto intestinal del humano y animales, además incluye a gran parte de los patógenos intestinales del humano. La importancia de estos bacilos queda de manifiesto en la frecuencia de aislamientos en muestras clínicas y su incremento en la resistencia a los antibióticos, requiriendo así el máximo de experiencia y conocimiento para su identificación precisa.

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y es el único miembro del género *Escherichia*. Es un bacilo Gram-negativo corto (0.5 x 4 μ m), anaerobio facultativo, no esporulado provisto de flagelos peritricos, fimbrias y puede o no presentar cápsula. Se ha subdividido en base a sus características bioquímicas (biotipos), antigénicas (serotipificación con los antígenos : O, K y H), fimbriales, a la susceptibilidad a bacteriófagos (fagotipos), a la producción de colicinas y a sus mecanismos de patogenicidad (23,41).

La colonización por *E. coli* se realiza inmediatamente después del nacimiento, es la especie predominante entre la flora normal anaeróbica facultativa del intestino con funciones importantes tales como: asimilación de nutrientes del huésped, proveedor de vitaminas en algunos animales y como flora importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal (15,41). Aunque la mayoría de las cepas se consideran no patógenas para el intestino,

algunas tienen un significado clínico cuestionable para el hombre, debido a su papel como agente patógeno causante de infecciones intestinales. Incluyendo infecciones del tracto urinario, bacteremia, diarrea relacionada a bacterias en turistas, meningitis neonatal y otra gran variedad de infecciones clínicas incluyendo la neumonía (26).

E. coli se considera una causa importante de síndrome diarreico, reconociéndose cinco categorías principales :

<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	ECEP	(7)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	ECET	(7)
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	ECEI	(7)
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	ECEH	(7)
<i>Escherichia coli</i> enteroadherente	ECEA	(11,13)

Que se distinguen por sus características patogénicas, clínicas, epidemiológicas y por su agrupación dentro de serotipos O : H específicos (24), siendo las dos primeras las más involucradas en la diarrea infecciosa en infantes (Tabla 1).

**PRINCIPALES AGENTES ETIOLOGICOS CAUSANTES DE DIARREA
 EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS**

AGENTE ETIOLOGICO	FRECUENCIA DE AISLAMIENTO (%)
<i>Campylobacter jejuni</i>	16.21
Rotavirus	12.38
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET)	11.48
<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)	10.53
<i>Shigella</i>	1.76
<i>Entamoeba histolytica</i>	1.59
<i>Salmonella sp.</i>	0.53
<i>Giardia lamblia</i>	0.17
Etiología desconocida	45.35

DATOS OBTENIDOS DE LA CLINICA DE DIARREAS DEL INNSZ
 HASTA MAYO DE 1989.

***E. coli* enterotoxigénica (ECET)**

ECET se considera un agente enteropatógeno importante principalmente de países en vías de desarrollo de Asia, Africa y America Latina, donde representa del 10 al 15% del total de diarreas producidas, siendo el 25% desarrollada en niños durante los primeros 5 años de vida, además ECET es la causa de diarrea en viajeros a dichos continentes (16).

Sus mecanismos para causar enfermedad implican la colonización del intestino delgado mediante la producción de adhesinas fimbriales de colonización (AFCs) y la producción de enterotoxinas (termolábil TL y termoestable TE), siendo ambos codificados por plásmidos (16). La diarrea líquida causada por ECET y la falta de atención médica producen la muerte por deshidratación de aproximadamente 800 000 niños por año (5). En estudios epidemiológicos se ha descrito la prevalencia de un número limitado de serotipos O:H de los cuales algunos elaboran ambas toxinas y usualmente poseen factores de colonización (40).

Cheney y Boedeker en 1983 mostraron que la cepa H10407 (serotipo O78:H11) era patógena al ser aislada de muestras diarreicas de viajeros y observaron que era el resultado a su habilidad para sintetizar y secretar ambas enterotoxinas.

E. coli enteropatógena (ECEP)

Escherichia coli enteropatógena ECEP fué el término utilizado por Neter en 1959 para referirse a serotipos de *E. coli* que fueron asociados epidemiológicamente con brotes de diarrea en infantes en los años 40's y 50's (24).

ECEP se definió como la clase de serogrupos somáticos O de *E. coli* involucrados epidemiológicamente como patógenos, sin estar relacionados sus mecanismos de patogenicidad a la producción de enterotoxinas TL y TE, no invaden el epitelio intestinal, son negativas a la prueba de Sereny y no producen diarrea de tipo desinteriforme (23,45).

Se considera a ECEP un agente causal de diarrea infantil principalmente en países subdesarrollados con pocas medidas de higiene, especialmente en las zonas urbanas dentro de cuneros y áreas cerradas y principalmente durante los 3 primeros meses de vida.

Las ECEP se adhieren íntimamente a la superficie del enterocito provocando una lesión histopatológica característica. Observaciones al microscopio electrónico muestran que la bacteria en la superficie del enterocito se adhiere causando una destrucción localizada de las microvelocidades y también ésta modifica la apariencia de la membrana del enterocito dejándolo literalmente libre de sus microvelocidades (quizá por efecto tóxico), para posteriormente proyectarse la membrana sobre la bacteria en forma de pedestal; dichos eventos pueden llevarse a cabo de manera

independiente a la presencia del plásmido pMAR2 de 60 MDa, al cual se pensó asociada esta propiedad (24). Lo anterior se demostró al extraerlo de una cepa del grupo ECEP (serotipo O127:H6), la cual presentó aún la capacidad de adherirse y fue susceptible a promover la pérdida de las microvelocidades e inducir la formación del pedestal en los enterocitos. Esto sugiere que otros factores codificados en genes del cromosoma pueden estar relacionados a dichos eventos. Batt et al. en 1988 demostraron que un sólo plásmido de 96.5 kb en la cepa ECEP O111ab:H contiene genes que expresan productos relacionados no sólo a la adherencia, sino también al daño característico producido en las microvelocidades intestinales (8). Estudios recientes realizados por Falkow et al. en 1991 demuestran que el plásmido FAE (factor de adherencia de ECEP) le confiere a la cepas la capacidad de adherirse de manera localizada a las células en ensayos *in vitro* y está relacionado a la rapidez de la formación de pedestal por el enterocito, pero no en sí a producir la clásica lesión histopatológica la cual se encontró que es codificada por el gen cromosomal eae que determina la producción del pedestal y la invasión de ésta al enterocito (12).

Aunque se reconoce a ECEP como un patógeno importante de gastroenteritis infantil, aún no se han dilucidado los mecanismos precisos por los cuales este organismo produce enfermedad. Es poco el conocimiento del fenómeno de la adherencia de este patógeno al epitelio intestinal así como de la estructuras celulares eucarióticas y bacterianas que participan en el evento.

a) Aislamiento

Escherichia coli puede crecer en varios medios de aislamiento primario para la recuperación de enterobacterias como son los siguientes:

- Agar Mac Conkey. Es un medio diferencial para la recuperación y selección de enterobacterias y bacilos Gram-negativos entéricos relacionados, donde se reconocen a fuertes fermentadores de lactosa como es el caso *Escherichia coli*, que forma colonias rojas o rosadas.

- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB). Es un medio diferencial utilizado para detectar enterobacterias o bacilos coliformes relacionados de muestras mixtas, *Escherichia coli* crece y desarrolla un color negro verdoso con brillo metálico.

- Agar Endo. Es un medio para aislamiento de coliformes y otros organismos entéricos de muestras clínicas, agua y alimentos; *E. coli* como fermentadora de lactosa forma colonias de color rojo o rosado, además de un brillo metálico por reacción de la fucsina básica (22).

Las colonias de *E. coli* crecen de manera óptima a una temperatura de 37°C en un período de 18 a 24 horas.

b) Identificación

Las características fenotípicas del género *Escherichia* son las siguientes:

Producción de indol +, rojo de metilo +, Voges-Proskauer -, citrato de Simmons -, sulfuro de Hidrógeno (TSI) -, hidrólisis de urea (ureasa) -, crecimiento en KCN -, movilidad + o -, hidrólisis de gelatina (22°C) -, lisina descarboxilasa +, arginina dihidrolasa tardía, ornitina descarboxilasa +/-, fenilalanina desaminasa -, DNasa a 25°C -, utilización de malonato -, gas a partir de D-glucosa +, ácido a partir de D-glucosa +, fermentación de lactosa +, fermentación de sacarosa +/-, fermentación de la melobiosa +, fermentación de D-manitol +, fermentación de dulcitol +/-, fermentación de salicina +/-, fermentación del adonitol -, fermentación del mio-inositol -, fermentación de D-sorbitol +, fermentación de L-arabinosa +, fermentación de rafinosa +/-, fermentación de L-ramnosa +, fermentación de trehalosa +, prueba de ONPG (β -galactosidasa) +, fermentación de maltosa +, fermentación de D-xilosa +, fermentación de celobiosa -, fermentación del α -metil-D-glucosido -, fermentación del erytritol -, hidrólisis de la esculina +/-, fermentación del D-arabitol -, fermentación del glicerol +, fermentación del mucato +, tartrato de Jordan's +, utilización del acetato +, lipasa -, reducción de nitratos a nitritos +, oxidasa Kovacs -

fermentación de D-mannosa +.(2)

Debido a que en el laboratorio de Infectología del INNSZ se estudia el uso de un micrométodo en uso estandarizado para la identificación del grupo ECEP, con el fin de evitar el realizar mediante la aglutinación en portaobjetos utilizando los antisueros específicos de DIFCO Laboratories, Detroit Mich., que son los siguientes:

Antisueros polivalentes A,B,C:

O26:K60, 055:K59, 0111:K58, O27:K63

Bacto *E. coli* O,K antisuero set A:

O26:K60, 055:K59, 0111:K58, O127a:K63 poly A

Bacto *E. coli* O,K antisuero set B:

O86a:K61, 0119:K69, 0124:K72, 0125:K70, 0126:K71, 0128:K67
poly B

Bacto *E. coli* O,K antisuero set C:

O18aO18c:K77, O20aO20c:k61, O20aO20b:K84, 028:K73, 044:K74,
O112aO112c:k66 poly C

Para identificar aquellas cepas de grupo ECET productoras de enterotoxinas se utilizan pruebas de ELISA: GM1-ELISA para la toxina TL y GM1-TE inhibición-ELISA para la toxina TE.

3.- Importancia Clínica

Los grupos de *E. coli* ECEP y ECET se encuentran involucrados como productores de diarrea infecciosa en la población infantil. La diarrea producida en niños y turistas por el grupo ECET es muy semejante a la producida por *Vibrio cholerae* y el grupo ECEP es el responsable de causar brotes esporádicos de enteritis infantil.

a) Patogénesis de ECET: La fuente de contagio son los individuos infectados siendo el principal vector el agua y alimentos contaminados. Las toxinas y fimbrias de adherencia al enterocito son sus principales mecanismos patogénicos. La toxina TL activa a la enzima adenilato ciclasa promoviendo la acumulación del AMP cíclico promoviendo la secreción de agua y electrólitos con la consecuente disminución en la absorción de las células del epitelio ciliado intestinal.

Patogénesis de ECEP: El recién nacido adquiere la infección de la madre por vía oral o por personal de enfermería que sean portadores asintomáticos. Una dosis de 10^8 bacterias provoca diarrea con una lesión inflamatoria a nivel del intestino delgado en la lámina propia por adhesión de la bacteria al enterocito.

b) Manifestaciones clínicas de ECET: ECET provoca una enfermedad que se autolimita generalmente, aunque en recién nacidos y prematuros puede ser mortal por la deshidratación y el desequilibrio electrolítico. Las evacuaciones son líquidas, abundantes y explosivas, sin moco, sin sangre, con vómito ocasional, náusea, dolor abdominal y fiebre en bajo grado (19),

limitándose la enfermedad a 3 o 5 días y rara vez más de una semana (1).

Manifestaciones clínicas de ECEP: El período de incubación es de 2 a 12 días en el cual ECEP coloniza, pueden o no presentarse evacuaciones líquidas y cuadro clínico diarreico, y si ésta se presenta las evacuaciones son escasas y sin cambio de consistencia, la infección se autolimita a los pocos días o bien a la cronicidad, en donde la infección se agrava con manifestaciones en otros órganos y sistemas provocando una septicemia con un alto índice de mortalidad. Las evacuaciones se presentan con gases y ocasionalmente con sangre, siendo de 16 a 30 veces por día y con la presencia de vómito, distensión abdominal, rechazo a alimentos, fiebre no superior a 38.5°C y pérdida de peso. En algunas ocasiones el cuadro clínico se prolonga por intolerancia secundaria a los disacáridos o por proliferación bacteriana en exceso con participación de otros enteropatógenos (1).

4.- Mecanismos de patogenicidad

a) Estructuras antigénicas

La membrana externa de los organismos Gram-negativos posee moléculas específicas que juegan un papel importante en la relación huésped parásito, así sus componentes pueden participar de manera selectiva en la adherencia e invasividad, resistencia a bactericidas y fagocitosis (25).

Los receptores son moléculas específicas de la membrana celular eucariótica que actúan como estructuras complementarias a las de la superficie bacteriana con actividad de similar a las lectinas llamadas ligandos o adhesinas.

La naturaleza química de las adhesinas es diversa. Se conocen adhesinas de naturaleza proteínica, polisacárida, lipídica y en forma compleja como glucolípidos y glucoproteínas.

De naturaleza proteínica son las fimbrias o pili, proteínas de membrana externa y antígenos flagelares. Las fimbrias o pili son apéndices citoplasmáticos rígidos más cortos y delgados que los flagelos, que asemejan hebras que emanan a varios nanómetros de la superficie y que presentan especificidad, antigenicidad, composición, expresión, estabilidad y dimensión variada, asociándose su presencia en *E. coli* a la capacidad de adherirse y proliferar en mucosas del intestino, tracto urinario, respiratorio y genital (3).

Las adhesinas de naturaleza polisacárida actúan en la colonización de las mucosas del huésped. El lipopolisacárido LPS de bacterias Gram-negativas confiere a algunos patógenos la capacidad de adherirse sin embargo, purificaciones del LPS de especies bacterianas no patógenas bloquean competitivamente la adherencia de cepas virulentas de organismos heterólogos, dando por tanto una reacción inespecífica (32,33).

Las adhesinas son importantes en las infecciones a nivel de las superficies mucosas al inicio del proceso patogénico, aunque la presencia de éstas en la superficie celular bacteriana no es

suficiente para que causen enfermedad sí facilitan que otros factores que causan daño tales como el crecimiento, toxigenicidad, movilidad, quimiotaxis, resistencia a defensas del huésped como anticuerpos bactericidas, complemento, fagocitosis, etc., se lleven a cabo (3).

Se ha observado que la presencia de ciertos azúcares está involucrada en la adherencia de las bacterias a las células del huésped. Dugid et al. en 1957 observaron que la adherencia de bacterias piliadas es inhibida a bajas concentraciones de D-manosa, ésta es constituyente común de glucolípidos y glucoproteínas presente en la membranas célula de las células epiteliales (37).

En la mayoría de las cepas de ECET la adherencia a la mucosa intestinal está mediada por fimbrias algunas de las cuales han sido denominadas factores de colonización, las cuales son antígenos específicos (11) (Tabla 2). Los más prevalentes en el humano son los AFCs: AFC/I, AFC/II y AFC/IV. AFC/I es un antígeno fimbrial pequeño y homogéneo, los AFC/II y AFC/IV están compuestos por más de un componente antigénico CS (antígenos coli asociados de superficie) (7,39,44).

Las cepas AFC/II usualmente expresan CS3 sólo o en combinación de CS1 y CS2 y las cepas AFC/IV expresan antígenos fimbriales CS4 o CS5 así como la CS6 no fimbrial (43,44). También se han identificado a ECET que portan solamente CS2, CS5 o CS6. Estos diferentes tipos de antígenos fimbriales son codificados por plásmidos, que en muchas ocasiones también determinan la producción de enterotoxinas (29,38,43).

Tabla 2 : Algunas características de los factores de colonización establecidos y putativos para *E. coli* enterotoxigénica.

Factores de colonización	Subgrupos	Morfología de las fimbrias	Diámetro de las fimbrias (nm)	Peso molecular de la subunidad proteínica (KDa)
CFA / I	-	rígida	7	15.058
CFA / II	CS1	rígida	7	16.800
	CS2	rígida	7	15.300
	CS3	flexible	2 o 3	14.500 o 15.500
CFA / IV	CS1	rígida	6	17.000
	CS2	rígida	5	21.000
	CS3	no fimbrial	-	14.500 o 16.000
PCFO159:H4		rígida	7	19.000
CFA / III		rígida 24.500	7 o 8	18.000 o
PCFO166		rígida	7	15.500 o 17.000
2230		no fimbrial		16.000

b) Adherencia

La adherencia celular es un proceso importante en los sistemas biológicos y aunque se considera no dañino favorece la interacción de factores de virulencia con sitios blanco en el huésped. Ahora la adherencia de la bacteria a la superficie de la mucosa intestinal del hospedero es un evento importante para el estudio de la patogénesis los microorganismos productores de enfermedades diarreicas y un parámetro útil en las estrategias para la prevención y control de enfermedades infecciosas (3).

La adherencia de los microorganismos a las membranas celulares del huésped tiene gran importancia, dado que requieren subsistir en un medio adverso, sometándose las superficies endoteliales y mucosas a constantes secreciones (saliva, orina, sangre y moco) las cuales son ricas en sustancias bactericidas; funciones mecánicas (tos, movimiento ciliar, descamación, estornudo y peristalsis) que junto con productos metabólicos contribuyen a la eliminación de bacterias, y éstas se adhieren para contrarrestar dichos mecanismos normales de limpieza.

La adherencia es un factor importante en la patogénesis de algunas bacterias; se necesitan estudios más detallados que permitan el conocimiento de receptores a nivel celular y bacteriano que intervengan en tal evento.

La adherencia es un proceso selectivo e importante en la patogenicidad de las bacterias, las cuales colonizan y dañan los

tejidos del huésped al haber el reconocimiento entre las adhesinas y los receptores, dicha unión bacteria-célula es mantenida por medio de interacciones hidrofóbicas determinadas por factores fisicoquímicos propios de la naturaleza química de las membranas, la composición química y la fisiología del microambiente.

Los mecanismos mediante los cuales las células se unen unas con otras son: interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones semejantes a las lectinas y diversos sacáridos.

Observaciones realizadas al microscopio electrónico de la mucosa intestinal infectada con ECEP revelan una íntima adherencia que consiste en 2 eventos: a) la adherencia del microorganismo a las microvellocidades mediante estructuras fimbriales de superficie o adhesinas codificadas por plásmidos y b) la formación de un pedestal en la superficie del enterocito que deja con respecto a la bacteria un espacio de 10 a 12 nm, en las regiones de unión se presenta la pérdida de microvellocidades y de asociación con los elementos del citoesqueleto con la acumulación bajo el pedestal una de una región densa de actina polimerizada. Aunado a éstos dos eventos se ha descrito un tercero relacionado a la infección de ECEP y es la capacidad de invasividad de algunas cepas de ECEP a los cultivos de células eucarióticas de mamíferos (12).

Se han encontrado lesiones idénticas en biopsias de infantes con diarrea causadas por cepas de ECEP de los serotipos O111, O119, O125 y en infecciones animales causadas por ECEP O126, O111, O114, O127, O128 y O142. Dicho fenómeno se ha observado más

frecuentemente en la adherencia *in vitro* a las líneas celulares de HEP-2 y HeLa (21).

Cravioto *et al.* (1979) encontró que en serotipos de ECEP aislados de brotes epidémicos un 80% de ellos presentaron adherencia a la línea celular HEP-2 (células de carcinoma laríngeo) (8), asociando esta propiedad a la presencia del plásmido pMAR2 que codifica para la adherencia localizada característica a la línea celular HEP-2, a este plásmido se le atribuye la propiedad inducir el "Factor de Adherencia de ECEP" FAE (20).

Estudios realizados por Cravioto *et al.* en 1979, demostraron que el 13% de las cepas de ECET estudiadas fueron adherentes a las células HEP-2 en presencia de D-manosa, quien señaló además que los factores de colonización AFC/I o AFC/II determinan la adherencia bacteriana independiente del pili tipo I (8).

Scaletsky *et al.* (1984) observaron que la adherencia de ECEP a las células HeLa describe 2 diferentes patrones de adherencia: Adherencia difusa AD en la cual las bacterias se distribuyen en toda la superficie de la célula y la adherencia localizada AL donde la unión está limitada a uno o varios sitios de la superficie celular (35). Nataro *et al.* en 1985, demostraron que dichos patrones están mediados por plásmidos. Hay un tercer patrón de adherencia observado en el cual las bacterias tienden a agruparse entre sí y de manera independiente a la superficie celular, al cual ha sido denominado agregativo AA.

Baldini *et al.* (24) realizaron estudios de transferencia de plásmidos para conferir de este modo la habilidad de adherirse a

cepas no adherentes. Estos trabajos dan la pauta para clonar los genes responsables de la adhesión de ECEP a células HEp-2 en orden para desarrollar una prueba de hibridización para identificar a *E. coli* con genes enteroadherentes.

c) Citotoxinas y enterotoxinas

Klipstein *et al.* en 1978 reportaron que diferentes cepas aisladas de brotes epidémicos de ECEP producían toxinas de naturaleza termolábil y termoestable, aunque no similares a la toxina TL y TE de ECET detectadas por ensayos convencionales (19). Sin embargo, Scotland *et al.* en 1981 reportaron que algunas cepas de los serogrupos O44, O144 y O128 son productoras de toxinas TL o TE aunque no por el método para el grupo ECET (36). O'Brien *et al.* en 1982 y Cleary *et al.* en 1985, demostraron la producción de una citotoxina similar a la toxina shiga producida por ECEP, aunque su producción no es universal y su porcentaje en el rendimiento varía de cepa a cepa, se sugirió su importancia en la patogénesis de ECEP (6,31). Se había determinado que la producción de toxina shiga, citoxina Vero y la adherencia eran los tres únicos marcadores de virulencia para ECEP. Después Falkow *et al.* en 1991 realizaron investigaciones que han revelado en algunas cepas de ECEP la capacidad adicional de invadir a las células (12).

Uno de los factores de virulencia más importantes para ECET son sus enterotoxinas TL, TE o ambas (23,41). La toxina TL es muy similar a la toxina del cólera tanto en su estructura como en su

función, esta compuesta por una subunidad tóxica A (A1+A2) y cinco subunidades B, las cuales adquieren una forma anillada por medio de enlaces covalentes y sobre la cual descansa la subunidad A; a diferencia de la toxina del cólera la toxina TL se acumula en el periplasma de la bacteria ECET y ésta no se libera hasta que el organismo muere o se lisa. Una vez en el citosol la subunidad A activa el complejo de la adenilato ciclase dando por resultado la acumulación del AMP cíclico intracelular que promueve la salida del agua y electrolitos de la célula. La toxina TL es fuertemente inmunogénica y ésta propiedad se ha visto asociada a la subunidad B de la molécula (18). La toxina TE está constituida por pequeños polipéptidos de 19 residuos de aminoácidos ricos en cisteína, que activa a la guanilato ciclase de las células epiteliales intestinales promoviendo el flujo de agua hacia el lumen intestinal (23). La toxina TE es excretada de la bacteria durante el crecimiento y no es inmunogénica en su forma nativa (13,34,42).

JUSTIFICACION

La información con respecto a la patogénesis del grupo ECEP que ha aportado el método de adherencia a la línea celular HEP-2, sugiere que siguiendo la misma metodología para diferentes grupos de *E.coli* puede indicarse en base a la relación entre la capacidad adherencia y el tipo de adherencia, la patogenicidad de las cepas en una población abierta.

OBJETIVOS

- 1) Estandarizar un ensayo de adherencia a células HEp-2 para cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a los grupos de ECEP, ECET y no ECEP no ECET.
- 2) Validar cualitativamente el ensayo de adherencia utilizando cepas de *E.coli* de referencia (cepas prototipo de EPEC provenientes de la ATCC 47152 y 42414).
- 3) Determinar la utilidad del método de adherencia a las células HEp-2 para definir la patogenicidad en otros grupos de *E. coli*.
- 4) Estudiar la relación que existe entre el grupo de *E. coli* y la capacidad de adherencia que presentan a las células HEp-2.
- 5) Asociar el cuadro clínico y los patrones de adherencia en la patogenicidad de los grupos trabajados.

MATERIAL

Aparatos :

Microscopio de luz invertido "Swift"
Microscopio de campo claro " Carl Zeiss"
Incubadora "Steri-cult 200"
Campana de flujo laminar "Veco"
Micropipetas "Labsystems Finnpiptette" 5 - 40 μ l
40 -200 μ l
Pipeta volumétrica de repetición Eppendorf
Balanza analítica

Material de plástico :

Microcámaras para ensayo celular "Lab Tek"
Botellas para crecimiento celular 80 cm^2 "Nunclon"
Tubos cónicos graduados de 15 ml
Pipetas serológicas 1, 2, 5, 10 y 25 ml
Puntas estériles
Jeringas desechables de 1, 5 y 20 ml

Material de vidrio :

Frascos graduados "Wheaton" 100, 250 y 500 ml
Matraces Erlenmeyer 100 y 1000 ml
Matraces aforados de 100 y 1000 ml
Vasos de precipitados de 100, 200, 500 y 1000 ml
Tubos de vidrio de 13 x 125 ml
Jeringa hipodérmica de 50 ml con adaptador metálico.

Probeta de 50 y 100 ml
Jarras para atmósfera microaerofílica
Pipetas Pasteur
Porta y cubre objetos
Cámara de Neubauer

Reactivos y soluciones :

Solución salina de amortiguadora de fosfatos para células
(SSAF) 0.15 M y pH 7.2
Solución de bicarbonato al 7.5 %
Solución salina balanceada de Hanks (SSBH)
Solución de ácido etilendiaminotetracético (AEDT)
al 0.03 %
Solución de tripsina al 1 %
Solución de AEDT 0.03 % con tripsina al 1 % en una
dilución 1:40
Solución de azul de tripano al 0.05 %
Solución de colorante Giemsa al 76 %
Solución de formaldehído al 10 %
L- Glutamina
Sulfato de gentamicina

Medios de cultivo :

Para cultivo celular:
Medio mínimo esencial (MME)
Para cultivo del microorganismo:
Medio de Mac Conkey
Medio de gelosa especial

Caldo de soya tripticaseína (CST) con D-manosa

Material biológico :

Se trabajó con 142 cepas de *E. coli* obtenidas en el Instituto Nacional de la Nutrición del banco de cepas del Departamento de Infectología, formado en el proyecto "Análisis del efecto protector de la leche materna a la adquisición de enfermedades entéricas".

Las 2 cepas prototipo de ECEP fueron donadas por el Dr. Alejandro Cravioto del Instituto Nacional de Salud Pública, las cuales pertenecen a serotipos clásicos aisladas de brotes de enteritis.

Línea celular HEP-2.

Otros : Aguja desechable de 18 x 38 ml

Membranas Millipore (tamaño de poro de 0.22 μ m

Tubo No. 3 de Mac Farland 9x x 10⁸ bacterias x ml)

ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR
DE E. coli A LA LINEA CELULAR HEP-2

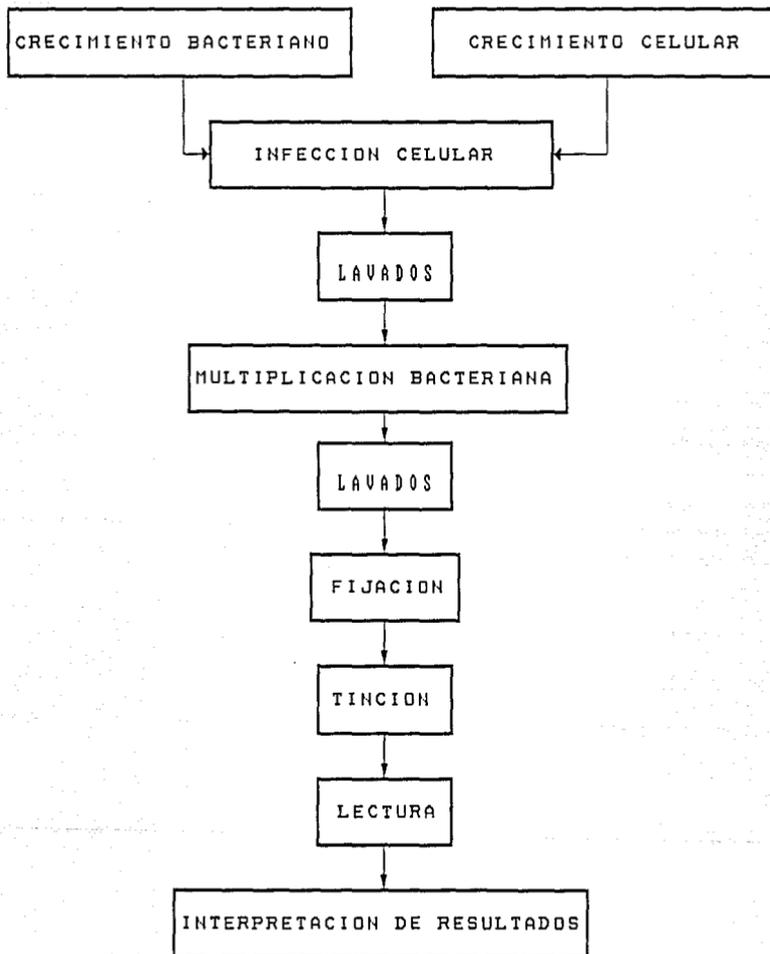


Diagrama 1

METODOLOGIA

Se utilizaron un total de 142 cepas (cuadro 1), obtenidas en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición, el número de cepas a trabajar se estableció en base a la capacidad personal para realizar los ensayos, reproducir en subsecuentes ensayos los resultados obtenidos en lectura al microscopio y la disponibilidad propia de material; las cepas de *E. coli* se aislaron de una cohorte de niños de la comunidad de San Pedro Mártir al sur de la Ciudad de México que presentaron cuadros clínicos sintomáticos y asintomáticos,

Crecimiento bacteriano:

Las cepas estuvieron almacenadas a una temperatura de -70°C se descongelaron y se sembraron en el medio de cultivo agar Mac Conkey con el objeto de determinar la viabilidad de las ellas, luego de ser crecidas se resembraron en un medio de gelosa especial que permitió mantenerlas durante un período de tiempo de aproximadamente 1 semana previa al ensayo.

Para el ensayo cada cepa se creció en 1 ml de caldo de soya tripticaseína con D- manosa al 1% (que se adicionó para inhibir adhesión mediada por el pili tipo I), incubándose a 37°C por un período de 18 a 24 horas. La concentración bacteriana óptima determinada para el ensayo fué de 9×10^8 UFC/ml (que corresponde al tubo # 3 de McFarland), la que permitió observar a microcolonias bacterianas evidentemente circunscritas en la superficie de las células. Una cantidad de 200 μl de MME sin antibiótico se utilizó

para ajustar esta concentración bacteriana, la que fue utilizada en una cantidad de 100 μ l para la infección celular por pozo de la microplaca para ensayo celular.

PATRON DE ADHERENCIA DIFUSO

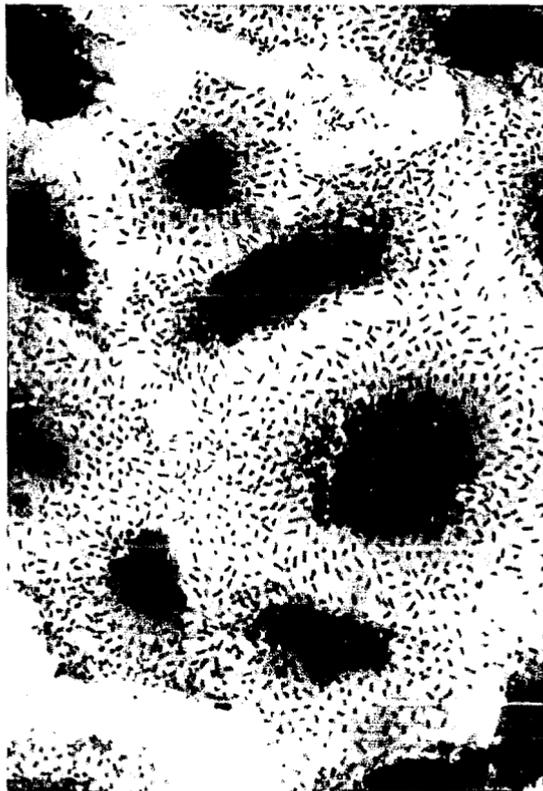


Figura 3: Fotografía microscópica en campo claro mostrando el patrón de adherencia difuso (AD) observado en de una cepa de *E.coli* monocapa de células HEp-2.

PATRON DE ADHERENCIA LOCALIZADO

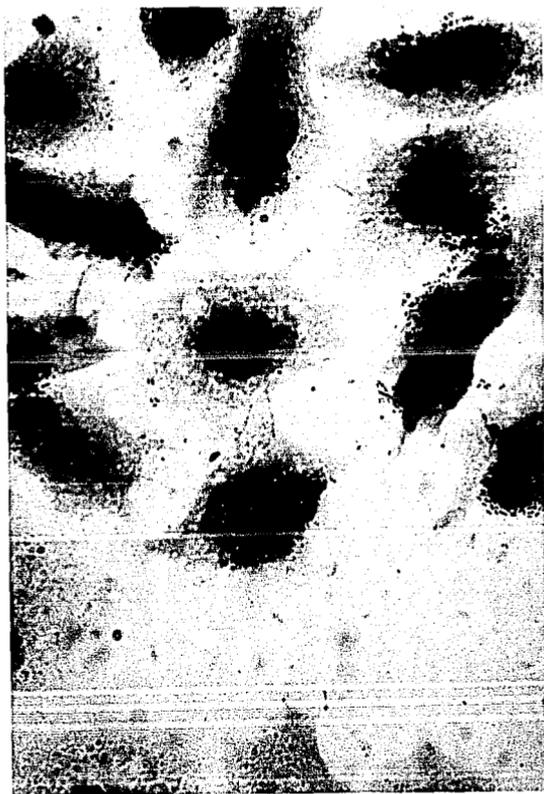


Figura 4: Fotografía microscópica en campo claro mostrando el patrón de adherencia localizado (AL) observado en cepa 42414 de la ATCC de ECEP a la monocapa de células HEP-2.

PATRON DE ADHERENCIA AGREGATIVOIVO



Figura 5: Fotografía microscópica en campo claro mostrando el patrón de adherencia agrgativo (AA) observado en una cepa de *E. coli* monocapa de células HEp-2.

Crecimiento celular:

- A) Se crecieron las células HEP-2 en botellas de poliestireno para crecimiento celular de 80 cm² con 25 ml de MME de crecimiento. Se incubaron a 37°C/ 5% CO₂ /85 % humedad, renovando el medio según los requerimientos metabólicos durante el tiempo necesario hasta obtener una monocapa confluyente.
- B) Se tripsinizó la monocapa celular de la siguiente manera:
- Se virtió el exceso de medio y se agregaron 4 ml de solución AEDT/SSAF 0.03% impregnando la monocapa y desechando el exceso.
 - Se procede igual al agregar la solución de AEDT/Tripsina
 - Se incubó la caja de cultivo durante 5 minutos a 37°C
 - Se requirió un golpe al extremo de la caja para el desprendimiento total de la monocapa.
 - A las células tripsinizadas se les agregó 5 ml de MME con antibiótico.
- C) Se realizó el conteo de células viables deseadas por el método de exclusión con azul de tripano al 1 % en SSAF; se hizo una dilución 1:10 (0.1 ml de células en MME y 0.9 ml de colorante) y se contaron las células vivas (no teñidas) en la cámara de Neubauer para posteriormente aplicar la siguiente fórmula:

Dilución = $\frac{\text{No. células}}{\text{No. cuadrantes}} \times \frac{\text{dilución (10)}}{\text{empleada}} \times \frac{\text{factor de conversión}}{\text{de la cámara (10000)}}$
~~No. de células cosechadas = (2×10^6)~~

- D) Se colocó la dilución celular en microplacas para ensayo celular, colocándose 400 μl por pozo e incubándose a 37°C/85 % humedad/ 5 % CO_2 / 24 H. Período en el cual las células se adhirieron a la superficie de la placa y se multiplicaron hasta formar una capa semiconfluente.
- E) Se lavaron las células con SSBH 3 veces.
- F) Las células fueron incubadas con 100 μl de la dilución bacteriana en MME ya señalada y realizada para cada cepa, el control negativo se hizo agregando a las células únicamente 100 μl de CST con D-manosa, para realizarse bien la infección, se incubaron las placas en jarras para atmósfera microaerofílica durante 3 horas a 37°C.
- G) Se lavaron las placas con SSBH con el objeto de eliminar a bacterias no adheridas.
- H) Se adicionó 200 μl de MME sin antibiótico por pozo y se incubaron a 37°C por 3 horas en jarras con atmósfera microaerofílica, como un período de multiplicación.
- I) Se lavaron las células 3 veces con SSAF estéril.
- J) Se fijaron con la solución de formaldehído en SSAF al 10%, agregándose 0.5 ml de formaldehído por pozo durante 24 horas.
- K) Se tiñeron las células infectadas con solución madre de Giemsa 0.2 ml por pozo durante 30 minutos.
- L) Se retiraron los soportes de la microplaca de cultivo celular

para la la lectura de la adherencia bacteriana al microscopio con el objetivo de inmersión.

- M) La lectura se realizó contando 100 células elegidas al azar, determinando el porcentaje de células con bacterias adheridas y los patrones de adherencia manifestados en el ensayo celular por cada cepa.

RESULTADOS

La adherencia es un mecanismo importante en la patogénesis de enteropatógenos como es el caso del grupo de ECEP, ensayos *in vitro* realizados usando diferentes líneas celulares han demostrado la utilidad e importancia que tiene el ensayo adherencia a células HEp-2 para el análisis de los mecanismos de patogénesis que presenta este grupo. La metodología del ensayo originalmente diseñado por Cravioto et al. en 1979 (8) se designó como estándar a seguir en estudios posteriores del grupo, realizándose en ella variaciones según el criterio del investigador.

En este estudio dos criterios fueron principalmente tomados en cuenta para modificar al ensayo de adherencia estándar:

- a) Mejorar fijación de las células, al observarse que en comparación con el fijador originalmente utilizado (metanol al 70 % durante 1 hora) el formaldehído (al 10 % por un lapso de 18 horas) permitió teñir a las células después de un período de tiempo considerable (aprox. 18 horas) sin promover con ello desecación o alteración en la morfología celular adicional a la propiamente causada durante la infección bacteriana, también ésto constituye una ventaja tomando en cuenta el tiempo utilizado para el desarrollo del ensayo.
- b) Modificar la concentración del colorante de giemsa de un 10 % a un 76 % (denominada solución madre), que mejoró a nivel cualitativo la observación microscópica de la infección bacteriana a las células, facilitando así la lectura de las placas del ensayo.

DISTRIBUCION DE LAS 93 CEPAS ADHERENTES DE *E. coli* SEGUN SU CLASIFICACION

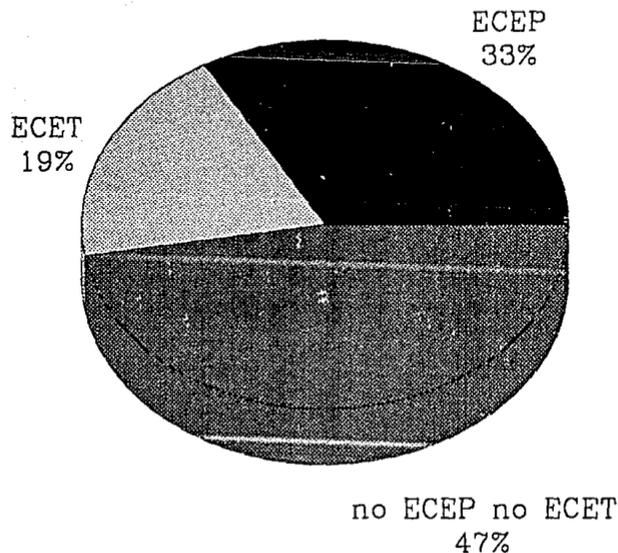


Figura 1

Cuadro 1: Clasificación de las cepas de *E. coli* utilizadas para el ensayo de adherencia a célula HEp-2.

Grupo de <i>E. coli</i>	No. total de cepas	Cuadro clínico	
		Diarreico	Normal
ECEP	4 0 *	4 0	0
ECET	4 2	1 9	2 3
<i>no ECET no ECEP</i>	6 2	2 0	4 2

* Incluye cepas prototipo

Obtenidas de banco de cepas del Departamento de Infectología del INNSZ.

De 142 cepas en total trabajadas de *E. coli*, 93 (65 %) de ellas fueron adherentes a las células HEP-2, el concepto ya establecido de cepa adherente se designa para aquellas cepas que presentan la capacidad de adherirse con al menos una bacteria a un número \geq del 40 % de un total de 100 células elegidas al azar.

Dentro del total de 93 cepas adherentes, los grupos de *E. coli* presentaron una diferente frecuencia en cuanto a su capacidad de adherirse (ver figura 1).

- El grupo ECEP presentó una capacidad de adherencia del 33 %.
- El grupo ECET presentó una capacidad de adherencia del 20 %.
- El grupo no ECET no ECEP fue capaz de adherirse en un 47 %.

Con el propósito de analizar la frecuencia de la capacidad de adherencia a células HEP-2 mostrada por los diferentes grupos de *E. coli*, se utilizó la prueba de chi cuadrada (ver cuadro 2) la cual indicó que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a la capacidad de adherencia a células HEP-2, siendo el grupo de las ECET el menos adherente (43 %) y el grupo de las ECEP el más adherente (77 %) respectivamente, la capacidad de adherencia que presentó el grupo de las no ECEP no ECET también fué grande (71 %).

Cuadro 2: Frecuencia de la capacidad de adherencia a células HEp-2, mostrada por las cepas trabajadas de los diferentes grupos de *E. coli* (ECEP, ECET y no ECET no ECEP.

GRUPO DE <i>E. coli</i>	CEPAS ADHERENTES	CEPAS NO ADHERENTES
ECEP	18 (43 %)	24 (57 %)
ECET	31 (77 %)	9 (23 %)
no ECEP no ETEC	44 (71 %)	18 (29 %)

Prueba de chi cuadrada

chi cuadrada (exp) = 12.690 chi cuadrada (toerica) = 5.99 p = 0.0017 gl = 2

p = Probabilidad.

gl = Grados de libertad.

• Incluye cepas prototipo.

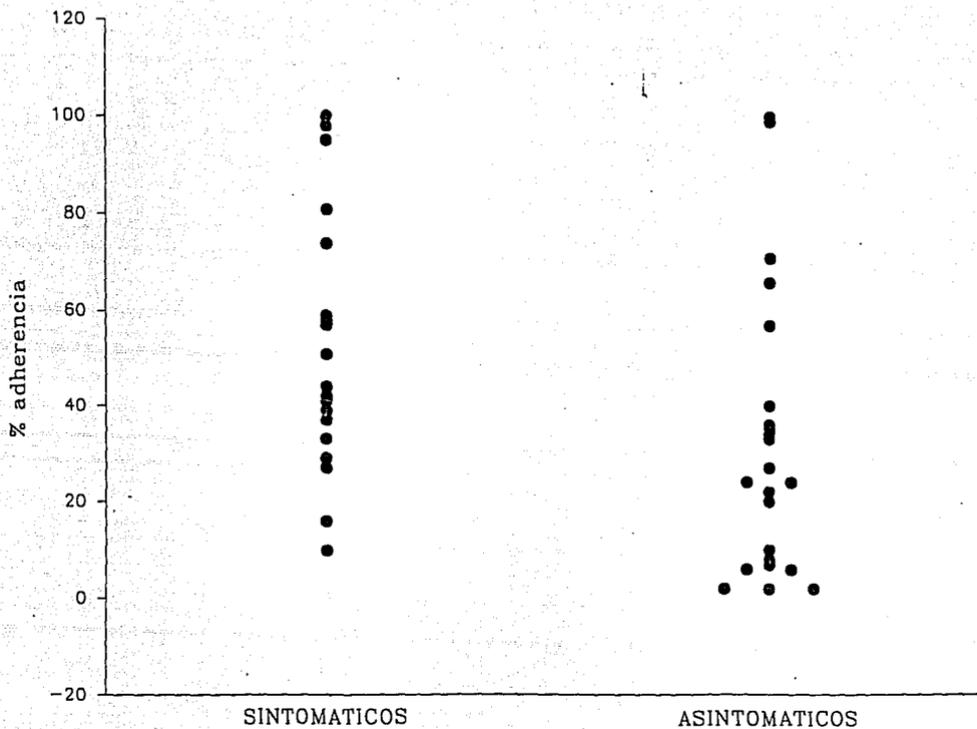


Diagrama 3: Diagrama de dispersión de la capacidad de adherencia en *E. coli* pertenecientes al grupo de ECET aisladas de cuadros clínicos sintomáticos y asintomáticos.

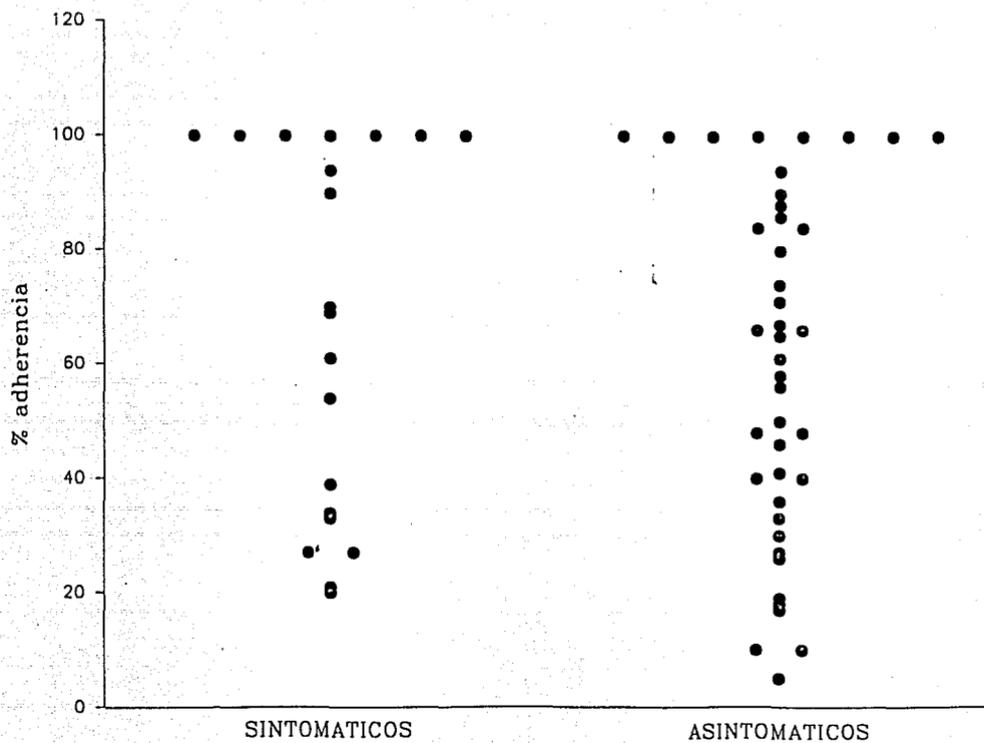


Diagrama 2: Diagrama de dispersión de la capacidad de adherencia en *E. coli* pertenecientes al grupo no ECET no ECEP aisladas de de cuadros clínicos sintomáticos y asintomáticos.

El análisis para los grupos ECET y no ECEP no ECET en relación a la capacidad de adherencia y el cuadro clínico sintomático y asintomático mostrado en las cepas correspondientes, se realizó mediante dos pruebas estadísticas: Prueba exacta de Fisher y la prueba de "t" de student (ver cuadro 3 y 4); de ambas se obtuvo para el grupo de las ECET que la capacidad de adherencia a células HEp-2 es un factor de riesgo considerable (R.M.=4.875) que está estrechamente asociado a la patogénesis del grupo (diarrea), siendo dicha asociación estadísticamente significativa ($p=0.028$), no obstante lo disperso del evento (1.09-22.36). El análisis mediante la prueba "t" de student indicó similares resultados en base a la obtención de un valor para "t" experimental (2.346) mayor al valor de "t" teórico (2.12) indicando que es estadísticamente significativa ésta relación.

Para el grupo no ECET no ECEP la asociación a células HEp-2 no es al parecer un factor de riesgo que determine que la cepa sea capaz de producir diarrea.

Cuadro 3: Asociación entre la capacidad de adherencia a células HEp-2 de 42 cepas de ECET y 62 cepas de no ECEP no ECET y presencia de diarrea.

CEPAS	cuadro clínico		Parámetros			
	Sintomáticas	Asintomáticas	n	R.M.	95 % I.C.	P
ECET sin adherencia	12	6	24	1		
ECET con adherencia	7	17	18	4.857	1.09-22.36	0.028
no ECEP no ETEC sin adherencia	13	31	44	1		
no ECEP no ETEC con adherencia	7	11	18	0.659	0.181-2.411	0.554

Prueba exacta de Fisher

n = No. de cepas; R.M. = Razón momios; I.C. = Intervalos de confianza; G.L. = Grados de libertad; p = Probabilidad.

Cuadro 4: Comparación del porcentaje de adherencia en cepas del grupo ECET y no ECET no ECEP, entre cepas aisladas de muestras con cuadro clínico diarreico y asintomáticas.

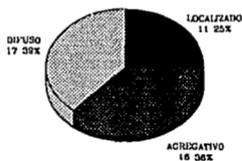
CEPAS	\bar{X} del % de adherencia		Parámetros			
	Diarreicas	Asintomáticas	n	t (exp.)	t (teo.)	G.L.
ECET	52	32	42	2.346	2.121	41
no ECEP no ETEC	67	60	62	0.831	2.000	61

Prueba 't' de Student.

n = No. de muestra; G.L. = Grados de libertad

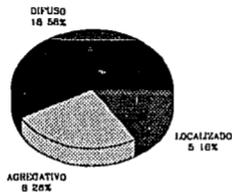
La relación que se encontró en cepas adherentes en cuanto al patrón de adherencia que mostraron en el ensayo a células HEp-2 (ver figura 2 y cuadro 5) , indica que no hay la presencia de un patrón de adherencia que caracterice a las cepas adherentes de ninguno de los grupos de *E. coli* trabajados, lo anterior fue deducido mediante la prueba de chi cuadrada que aportó un valor de $p= 0.432$ que indica que no es estadísticamente significativa dicha relación.

DISTRIBUCION DE 44 CEPAS ADHERENTES A
 CELULAS HEp-2 DEL GRUPO no ECEP no ECET
 DE ACUERDO AL TIPO DE ADHERENCIA



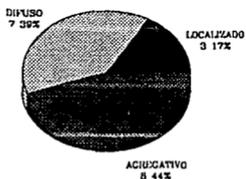
A

DISTRIBUCION DE 31 CEPAS ADHERENTES DE
 ECEP A CELULAS HEp-2 DE ACUERDO A TIPOS
 DE ADHERENCIA



B

DISTRIBUCION DE LAS 18 CEPAS ADHERENTES
 A CELULAS HEp-2 DE ETEC DE ACUERDO A LOS
 TIPOS DE ADHERENCIA



C

Figura 2

Cuadro 5: Relación entre la capacidad de adherencia a las células HEp-2 y los diferentes patrones de adherencia observados en los grupos de *E.coli* (ECET, ECEP y no ECET no ECEP).

GRUPO	Cepas adherentes	Tipo de adherencia (%)		
		L	D	A
ECET (n=42)	18	3 (17)	7 (39)	8 (44)
ECEP (n=40)	31	5 (16)	18 (58)	8 (26)
no ECEP no ECET (n=62)	44	11 (25)	17 (39)	16 (36)

Prueba de Chi cuadrada

Chi cuadrada (exp.) = 3.812 ; Chi cuadrada (teo.) = 9.488 ; P = 0.432; gl = 4

p = Probabilidad; gl = Grados de libertad.

DISCUSION

Los resultados aportados por el ensayo de adherencia modificado permitieron al visualizar cualitativamente lo acertado de éste por la lectura microscopica realizada a las placas, aunque no se observó en ambos métodos disminución en la especificidad y sensibilidad que tienen con respecto al grupo de las ECEP, lo anterior se evidenció con el uso de cepas prototipo de éste grupo que permitieron validarlo. Hay estudios revelan que este método no es el adecuado para evaluar la capacidad de adherencia del grupo ECET, pues este grupo de bacterias requieren de un medio de cultivo diferente que les permita expresar bien sus factores de virulencia, se sabe ahora que el modelo más adecuado para el estudio de la adherencia de ECET utiliza en lugar de la línea celular HEP-2, la línea celular CaCo-2 (células de carcinoma colónico) la cual exhibe patrones estructurales y de diferenciación característicos para ECET(9); sin embargo aunque ECET no fue el grupo más adherente se pudo observar que la capacidad de adherencia que describieron las cepas de este grupo es un importante factor de riesgo para producción de diarrea ($p=0.028$), sin descartarse aquí el papel que tiene sus enterotoxinas, las cuales probablemente con su presencia evidenciaron la presencia de efectos citopáticos tales como la vacuolización y el desprendimiento celular que caracterizaron a las placas celulares infectadas con ECET, esto indica que probablemente éste modelo de adherencia deba realizarse para el grupo mencionado utilizando un tiempo de infección y/o incubación menor, de tal

manera que permita visualizar el mecanismo de adherencia y no otros factores de virulencia subsecuentes que enmascaren la observación del proceso de adherencia tal cual.

No se observó igual comportamiento en adherencia por las cepas pertenecientes al grupo de las no ECET no ECEP, quienes mostraron un porcentaje de adherencia del 71 %, que indica de manera general que la metodología utilizada puede ser un buen modelo de estudio para la patogenicidad de éste grupo, aunque el análisis estadístico no indicó que sea la adherencia un factor de riesgo importante para la producción de diarrea en el grupo, ya que tal relación fue analizada por la prueba exacta de Fisher que indicó que la asociación no fue estadísticamente significativa ($p=0.554$). El grupo ECEP según un estudio realizado anteriormente en el Departamento de Infectología (14), señaló que los biotipos más comúnmente aislados de muestras diarreicas presentaron al ensayo de adherencia a células HEp-2, una mayor capacidad de adherencia que aquellos otros biotipos con frecuencia aislados en pacientes asintomáticos. Casi todos los estudios anteriormente realizados para determinar los mecanismos de patogenicidad en éste grupo han utilizado a cepas de ECEP prototipos, lo cual ha traído repercusiones tales como la idea errónea de considerar que sólo las cepas de éste grupo describen una gran capacidad de adherencia, un patrón de adherencia localizado y posteriormente la característica lesión histopatológica de formación del pedestal; ahora se sabe que no todas las cepas de ECEP describen un patrón de adherencia localizado, también que no todas las cepas son adherentes ($\geq 40\%$),

no todas llevan a cabo la producción del pedestal con la subsecuente alteración a nivel del citoesqueleto (acumulación de actina y miosina polimerizada) y la recientemente descubierta capacidad de invasión, tales eventos ni son generales para el grupo, ni necesariamente van ligados. Lo anterior podría en parte justificar la poca similitud entre los resultados obtenidos y los publicados en cuanto a capacidad de adherencia y tipo de adherencia, si únicamente se toma la relación de los serotipos trabajados, sólo 4 de 40 cepas pertenecieron a serotipos clásicos y por tanto sólo muy pocas cepas además de adherirse presentaron un tipo de adherencia localizado que probablemente iba acompañado de la formación del pedestal e invasión; si bien el patrón de adherencia más comúnmente observado fue el difuso, cabría entonces preguntarse que tan involucrados pudieran estar éste y otros patrones diferentes al localizado en la patogenicidad del resto de los serotipos que comprendieron al grupo de ECEP en éste trabajo, para futura aplicación en una población abierta que pudiera proveer de cepas provenientes de cuadros clínicos diarreicos y asintomáticos.

CONCLUSIONES

- 1.- En relación a la observación microscópica, el ensayo de adherencia estandarizado mejoró cualitativamente al modelo ya establecido.
- 2.- Este método mostró ser útil para definir la patogenicidad en el grupo ECEP y ECET.
- 3.- En los grupos ECEP y ECET se demostró que la capacidad de adherencia es un factor de riesgo para la producción de diarreas.
- 4.- En los grupos ECEP, ECET y no ECEP no ECET no hay ningún patrón de adherencia que permita caracterizar su patogenicidad.
- 5.- Este modelo fue útil para caracterizar la patogénesis en el grupo de ECET.

ANEXO : PREPARACION DE REACTIVOS

PREPARACION DE SOLUCIONES

- Solución amortiguadora de fosfatos salinos (SSAF) 0.15 M a pH 7.2

Fosfato monobásico de sodio	0.69 g
Fosfato dibásico de sodio	0.71 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua desionizada c.b.p.	1000.0 ml

Se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 3 M y se esteriliza por autoclave.

Solución de bicarbonato de sodio al 7.5 %

Bicarbonato de sodio	7.5 g
Agua desionizada	100.0 ml

Solución Salina Balanceada de Hanks (SSBH)

SSAF para ensayo celular estéril	90.0 ml
SSBH (Microlab 10x)	10.0 ml

Solución de ácido etilendiaminotetracético (AEDT)

SSAF para ensayo celular	100.0 ml
AEDT (Sigma)	0.03 g

Se esteriliza por autoclave.

Solución de tripsina al 1%

SSAF para ensayo celular	100.0 ml
Tripsina (Difco)	1.0 g

La solución se esteriliza por filtración.

Solución de AEDT / Tripsina al 1% dilución 1: 40

Tripsina 1% estéril 2.5 ml

AEDT 0.03 % estéril 97.5 ml

Solución de azul de tripano 0.05 %

Azul de tripano (Sigma) 0.05 g

SSAF para ensayo celular estéril 100.0 ml

Solución de formaldehído al 10 %

Formaldehído (40%) 10.0 ml

SSAF para ensayo celular 30.0 ml

Solución madre de Giemsa

Colorante de Giemsa (Sigma) 1.0 g

Glicerina QP 66.0 ml

Alcohol metílico absoluto 66.0 ml

Se mezcla el polvo con la glicerina, disolviéndola lentamente en baño María de 55 a 66°C, se deja enfriar y se añade el alcohol metílico, se deja madurar la solución de 2 a 3 semanas, al término de las cuales se filtra y guarda bien tapado y protegido de la luz.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Caldo de soya tripticaseína (CST) con D-manosa 1%

CST estéril 100.0 ml

D-manosa (Sigma) 1.0 gr

La D-manosa se esteriliza por filtración y se añade al medio.

Medio mínimo esencial (MME) para el crecimiento celular

MME liofilizado (Gibco) 1 sobre

Agua desionizada 1000.0 ml

Suero de ternera	50.0 ml
L-Glutamina	10.0 ml
Sulfato de Gentamicina	1.0 ml
Solución de bicarbonatos	5.0 ml

Se disuelve el medio liofilizado en el agua desionizada y se coloca en frascos para su esterilización por autoclave, al medio tibio se le ajusta el pH con la solución de bicarbonatos gota a gota y con agitación constante hasta que vire el color del medio y alcance un pH de 7 verificándolo al colocar 1 gota de medio en papel pH; se agrega la glutamina, el suero de ternera y el antibiótico. Se pone el medio a controlar por 24 h a 37°C antes de utilizarse.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arredondo, J.L. 1987. Diarrea en el Recien Nacido. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 44:360-363.
- 2.- Balows, A., W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy. 1991. Manual of Clinical Microbiology. Enterobacteriaceae. Fifth Edition. pp. 360-383.
- 3.- Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 143:325-345.
- 4.- Bhan, M.K., P. Raj, M.M. Levine, J.B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis. 156:1061-1064.
- 5.- Black, R.E. 1986. The epidemiology of cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrheal disease In: Development of vaccines and drugs against diarrhea. 11th Nobel Conference, Stockholm (Holmgren J., Lindberg A. and Möllby R. eds.), Studentlitteratur, Lund, pp 23-32.
- 6.- Cleary, T.G., J.J. Mathewson, E. Faris, and L.K. Pickering. 1985. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. Infect. Immun. 47:337-337.
- 7.- Cravioto, A., Scotland, S.M., Rowe, B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor I and II in enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immun. 36:189-197.

- 8.- Cravioto, A., R.J.Gross, S.M. Scotland and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:75-99.
- 9.- Darfeuille-Michaud, A., D. Aubel, G. Chauviere, Ch. Rich, M.Bourges, A. Servin y B. Joly. 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinomacell line Caco-2 culture. *Infect. Immun.* 58:893-902.
- 10.- Darfeville, A., B. Lafeuille, B. Joly, R. Cluzel. 1983. A new colonization factor antigen (CFA/III) produced by enteropathogenic *Escherichia coli* O128:B12. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).* 134A:53-64.
- 11.- Evans, D.G., D.J. Evans Jr., W.S. Tjoa and H.L. Dupont. 1978. Detection and characterization of a colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 19:727-736.
- 12.- Francis, L.C., A.E. Jerse, J.B. Kaper, and S. Falkow. 1991. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells in vitro. *J. Infect. Dis.* 164:693-703.
- 13.- Frantz, J.C., Robertson, D.C. 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. *Infect. Immun.* 33:193-198.
- 14.- Giraud, R. M.C. 1987. Desarrollo de un sistema miniaturizado para la identificación de bacterias Gram-negativas.

Biotipificación por micrométodo para la identificación de cepas de *Escherichia coli* (EPEC) asociadas a diarrea y correlación con el ensayo de adherencia a células HEp-2. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina. Universidad de San Luis Potosí. 90 p.

- 15.- Giron, O.J.A.1989. Estudio de adherencia a células HeLa de la cepa B171 de *Escherichia coli* enteropatogénica serotipo O111:NM. Tesis Doc. I.P.N. 1-189 p.
- 16.- Guerrant, R.L.1985 Microbial toxins and diarrhoeal disease: introduction and overview. In: Microbial toxins and diarrhoeal disease. Ciba Foundation Symposium 112, Pitman, London, pp 1-13.
- 17.- Gutiérrez, G. 1991. Información estadística de enfermedades transmisibles. Boletín Mensual de Epidemiología, Sistema Nacional de Salud. 6: 57-79.
- 18.- Holmgren, J., Svennerholm A.M., Lönnroth I., Fall-Persson M., Markman B., Lundbäck H. 1977. Development of improved cholera vaccine based on subunit toxoid. *Nature* 269:602-604
- 19.- Klipstein F.A., B. Rowe, R.F. Engert, H.B. Short, R.J. Gross.1978. Enterotoxigenicity of enteropathogenic types of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. *Infect. Immun.* 21:171-178.
- 20.- Knutton, S., M.M. Baldini, J.B. Kaper and S. McNeish.1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 55:78-85.
- 21.- Knutton, S., D.R. Lloyd and A.S. McNeish. 1987. Adhesion of

- enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55:69-77.
- 22.- Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, H.M. Somers.1983. Diagnóstico microbiológico. In: Enterobacteriaceae. Panamericana, México.152-199 pp.
- 23.- Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
- 24.- Levine, M.M. and R. Edelman.1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 6:31-51.
- 25.- Logan, S.M. and T.S. Trust. 1982. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 38:898-906.
- 26.- Mandel, L.E., R.G. Douglas, E.J. Bennette.1990. Principles and practice of infectious diseases. In: Enterobacteriaceae. Churchill Livingstone, New York, U.S.A. p.1659-1673.
- 27.- Mathewson, J.J.,H.L. Dupont, D.R. Morgan, S.A. Thornton, and C.D. Ericsson. 1983. Enteroadherent *Escherichia coli* associated with travellers diarrhoea. *Lancet*(letter). 1:1048.
- 28.- Mathewson, J.J., R.A. Oberhelman, H.L. Dupont, F.J. de la Cabada, and E.V. Garibay.1987. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in México. *J.Clin. Microbiol.*25:1917-1919.

- 29.- Millany, R., A.M. Field, M.M. McConnell, S.M. Scotland, H.R. Smith and, B. Rowe. 1983. Expression of plasmids coding for colonization factor antigen II (CFA/II) and enterotoxin production in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 129:3591- 3601.
- 30.- Nataro, J.P., J.B. Kapper, R. Robins-Brown, V. Prado, P. Vial, and M.M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis.* 6:829-831.
- 31.- O'Brien, A.D., G.D. LaVeck, M.R. Thompson, and S.M. Formal. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type-I like cytotoxin produced by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146:763-769.
- 32.- Ofek, I. and E.H. Beachey. 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animal and man. In: *Bacterial Adherence*. E.H. Beachey (ed.) Chapman and Hall Publish., London. p.3-29.
- 33.- Ryley, L.W., L.N. Junio, L.B. Libaek, and G.K. Schoolnik. 1987. Plasmid-encoded expression of lipopolisaccharide O-antigenic polysaccharide in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55:2052-2056.
- 34.- Sánchez, J., A.M. Svennerholm, and J. Holmgren. 1988. Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. *FEBS Lett.* 241:110
- 35.- Scaletsky, I.C.A., M.L.M. Silva, and R. Trabulsi. 1984.

- Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45:534-536.
- 36.- Scotland, S.M., N.P. Day, A. Cravioto, L.V. Thomas, and B. Rowe.1981. Production of heat-labile and heat-stable enterotoxins by strains of *Escherichia coli* belonging to serogroups O44, O144 and O128. *Infect. Immun.* 31:500-503.
- 37.- Sharon, N., Y. Eshdat, F.J. Silverblatt, and I. Ofek. 1981. Bacterial adherence to cell surface sugars. In: Adhesion and microorganism pathogenicity. Pitman Medical, Tunbridge Wells (Ciba Foundation Symposium 80). p. 119-141.
- 38.- Smith, H.R., S.M. Scotland, B. Rowe.1983. Plasmids that code for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:1236-1239.
- 39.- Smyth, C.S.1982. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O:6:H16 or H⁻ isolated from travellers and infantile diarrhea. *J. Gen. Microbiol.*128:2081-2096.
- 40.- Smyth, C.S.1984. Serologically distinct fimbriae on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H⁻. *FEMS Microbiol Lett.* 21:51-57.
- 41.- Sussman, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease In: The virulence of *Escherichia coli*. M. Sussman (ed.). Academic Press, N.Y. p.7-45.
- 42.- Svennerholm, A.M., M. Wikström, M. Lindbland, and J. Holmgren.1986. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli*

heat-stable toxin (TE) and their use in a diagnostic TE ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 24:585-590.

- 43.- Thomas, L.V., B. Rowe, and M.M. McConnell. 1987. In strains of *Escherichia coli* O167 a single plasmid encodes for the coli surface antigens CS5 y CS6 of putative colonization factor PCF8775, heat-stable enterotoxin and colicin Ia. Infect. Immun. 55:1929-1931.
- 44.- Thomas, L.V., M.M. McConnell, B. Rowe, and A.M. Field. 1982. The possession of three novel coli, surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF8775. J. Gen. Microbiol. Immunol. 171:85-90.
- 45.- Varela, G., A. Aguirre y J. Carrillo. 1946. *Escherichia coli* "Gómez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 3:623-627.