

11261 10
2c)

PRODUCCION DE CITOTOXINAS Y ENTEROTOXINAS POR CEPAS DE *Salmonella*
Y *Shigella* AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE.

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

M. C. MARIA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ASESOR ACADEMICO: DR. JAVIER TORRES LOPEZ



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

En estudios hechos en paises en desarrollo, se ha encontrado que la diarrea aguda ocurre por arriba de 10 episodios por año por niño durante los primeros años de vida (7,24). En México la diarrea aguda representa la segunda causa de morbilidad en la población (23). Los factores contribuyentes a la alta incidencia de diarrea incluyen hacinamiento, niveles de saneamiento bajo, agua contaminada e higiene inadecuada en la preparación de alimentos. Entre los microorganismos más asociados a diarrea aguda están *Rotavirus*, *Campylobacter* spp., *E. coli* enterotóxigena, *E. coli* enteropatogénica, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. (6,7,9) encontrándose diferencias en la frecuencia de aislamiento según grupos de edad estudiados.

Afortunadamente, en la actualidad el buen manejo de la diarrea acuosa con la hidratación oral, disminuye considerablemente la mortalidad y el daño nutricional asociados a la alteración de los sistemas de absorción de agua y electrólitos (1).

En estudios previos se ha encontrado que aproximadamente, el 10% de los casos de diarrea aguda se presentan con sangre (23). La presencia de sangre y leucocitos en heces es una indicación de enfermedad diarreica con invasión y/o daño a la mucosa, este síndrome puede ser causado por microorganismos invasivos como: *Shigella* spp. *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp. *Pleisomonas shigelloides*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Entamoeba histolytica* (20,45,46,55).

Estudios realizados en nuestro país y otras áreas geográficas,

revelan que Shigella es el agente etiológico que más frecuentemente se asocia a cuadros de diarrea con sangre o disenteria, en un 35 a 50% (12,27,52,59,60), encontrando su mayor incidencia en niños preescolares. Salmonella se ha aislado en aproximadamente un 10%, con mayor frecuencia en niños menores de un año (55,60), Campylobacter en aproximadamente 16% presentándose en niños entre 1 a 4 años (55,60). En nuestro país E. coli enteroinvasiva y E. coli citotóxica se le asocia a diarrea aguda con sangre en porcentajes menores de 0.5% (27,60,65).

FISIOPATOGENIA DE LA DIARREA AGUDA CON SANGRE. Avances recientes en el conocimiento de diarreas bacterianas, permiten clasificar ahora a los patógenos entéricos de acuerdo a sus mecanismos de patogenicidad (figura 1). Los factores de virulencia involucrados en estos son: adhesinas, exotoxinas, citotoxinas e invasión a la mucosa, algunas bacterias pueden tener mecanismos de virulencia múltiple (20).

La diarrea infecciosa ocurre cuando un número crítico de microorganismos (o en algunas ocasiones toxinas microbianas preformadas) es ingerido, sobrevive el paso a través de la acidez gástrica y llega al tracto gastrointestinal; una vez ahí, los microorganismos deben adherirse al moco o directamente a las células epiteliales y colonizar el lumen o invadir las células de la pared intestinal. El primer caso ocurre generalmente en la parte alta del intestino delgado, donde una enterotoxina microbiana (ej: toxina termolábil y termoestable producidas por E. coli) o el microorganismo mismo (ej: Rotavirus o Giardia

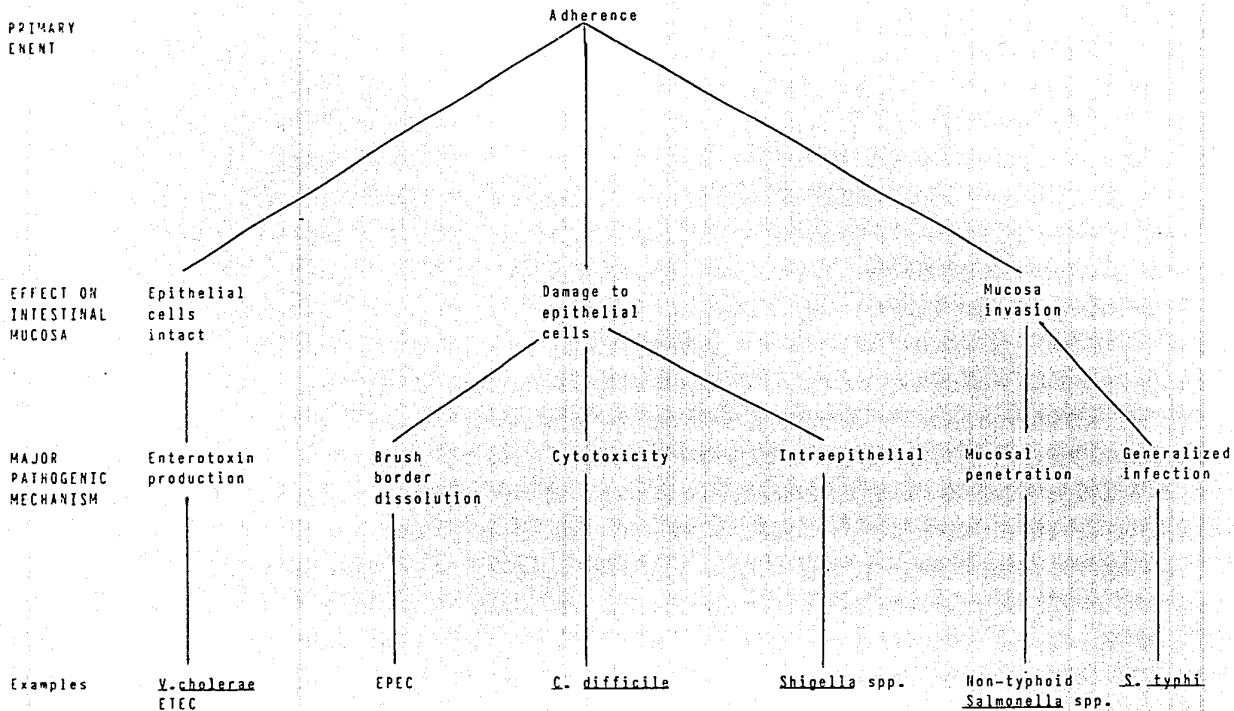


Figura 1. Some examples of mechanisms by which bacteria cause diarrhea.
 (Textbook of Gastroenterology and Nutrition in infancy. Second
 Edition, edited by E. Lebenthal. Raven Press Ltd. New York 6 1989.)

lamblia) provocan hipersecreción que se manifiesta como diarrea acuosa. En el segundo caso el microorganismo o sus citotoxinas (ej: *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* o *Salmonella* spp.) causan un proceso invasivo, normalmente en el colon que se manifiesta como disentería, con evacuaciones con sangre, moco o pus, con células polimorfonucleares en heces. *Entamoeba histolytica* causa una colitis invasiva, pero a diferencia de los otros microorganismos, ésta lisa a los polimorfonucleares, que en heces se observan picnóticos o ausentes (61).

En *Shigella* la capacidad de invadir células es una parte esencial del proceso patogénico. Esta característica puede ser demostrada por métodos en cultivos de tejidos o por la producción de queratoconjuntivitis en cobayo (prueba de Sereny). Hay por lo menos tres factores de virulencia necesarios para que *Shigella* cause enfermedad: a) La presencia de un antígeno lipopolisacárido en su pared celular, b) capacidad para invadir y proliferar en células epiteliales y c) producción de su toxina después de la invasión celular (16,20).

Se conocen cuatro especies de *Shigella*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*; con *S. dysenteriae* el daño a la pared intestinal es más severo, y los síntomas son más serios. A su vez, *S. flexneri* causa síntomas más severos que *S. boydii* y que *S. sonnei*.

Shigella dysenteriae es el prototipo de las bacterias invasivas; para realizar la invasión y colonización en el epitelio, ésta requiere la presencia de distintas propiedades microbianas, bajo control genético separado, incluyendo la capacidad de invadir células epiteliales, escapar de la vesícula fagocítica para

desarrollarse intracelularmente e invadir células adyacentes(18,20). Este proceso conduce a la muerte de la célula epitelial intestinal y causa úlceras focales, inflamación de la mucosa y exudado mucoso sanguíneo en el lumen. La infección es usualmente confinada a la capa de células epiteliales. *Shigella* entra a las células por un proceso de endocitosis (18,41), es internalizada dentro de una inclusión de la membrana de la célula. La membrana cubriendo a la bacteria es lisada y el organismo es liberado dentro del citoplasma de la célula. El escape de la vacuola endocítica es mediado por un producto codificado por un plásmido, la hemolisina de contacto, la cual presumiblemente lisa la membrana del huésped. La liberación de la vacuola endocítica es un proceso esencial para la virulencia de *Shigella*, ya que sin éste, la replicación intracelular no ocurre. Una vez libre en el citoplasma, *Shigella* inhibe la síntesis de proteínas del huésped por medio de la toxina de Shiga y se multiplica rápidamente (18,54). Aproximadamente 6 horas después de la infección, la bacteria lisa la célula huésped e infecta a otras células epiteliales.

Los genes requeridos para la invasión, multiplicación intracelular y distribución de célula a célula están presentes tanto en cromosoma como en plásmidos. Un plásmido de 120 a 140 MDal está presente en todas las *Shigellas* virulentas (y en las *E. coli* biológicamente similares) y codifica para proteínas de membrana externa. Han sido identificados varios locus, incluyendo *ipa* (antígeno plásmidico de invasión) el cual codifica para proteínas de membrana externa presumiblemente involucradas en

reconocer a la célula epitelial; inv (invasión) el cual parece regular la inserción de los productos del gen ipa dentro de la membrana externa, vir F que regula los cambios de superficie y vir G que participa en el escape de la bacteria de los fagosomas a el citoplasma y la diseminación de célula a célula (16,54).

Otro factor en la patogénesis es la toxina Shiga, producida por *S. dysenteriae* 1 ; ésta es una proteína de peso molecular de 74 000 compuesta de dos subunidades distintas que no están unidas covalentemente (11,41). La subunidad A es la más grande con un peso molecular de 32 000, es una enzima que separa la subunidad 28S ribosomal de la subunidad 60S ribosomal de células eucarióticas en un sitio altamente específico (base adenina 4324) (14,16). Esta actividad resulta en inhibición irreversible de síntesis de proteínas y muerte celular. La subunidad A está unida a 5 monómeros de la subunidad B (peso molecular 7791) (11,41), la cual media la unión de la toxina a el receptor de la célula, el glicolípido globotriaosilceramida (5,25,40,45). Se ha visto que este receptor aparece en las microvellosidades de la membrana de células epiteliales de yeyuno de conejo a los 16 días de edad, cuando esta especie empieza a ser susceptible a los efectos enterotóxicos de la toxina (32). Más específicamente, este glicolípido se encuentra en las vellosidades de yeyuno de conejo, pero no en las células de las criptas y por lo tanto la toxina solo puede unirse a las vellosidades. El resultado es la inhibición de la absorción de sodio en las vellosidades por las vías neutra o facilitada por glucosa, sin afectar la secreción de cloro por las células de las criptas. La disminución en la absorción de sodio y agua, lleva a una acumulación neta de

agua y electrólitos en el lumen intestinal.

A la toxina de Shiga se le atribuyen tres actividades biológicas: neurotóxica, citotóxica y enterotóxica; la acción neurotóxica fue la primera en describirse cuando se inyectó en conejo por vía intravenosa causando parálisis, y colapso con muerte en 48 hrs. Wiley y col. reportan recientemente, que la toxina de Shiga puede ser transportada axonalmente a las neuronas sensitivas del nervio vago de rata matando a éstas. Vicari en 1960 demostró otra de las actividades, reportando que la toxina tiene propiedades citotóxicas para células de carcinoma epidermoide (KB), células de riñón de mono y células de hígado humano en cultivo. El mecanismo de entrada de la toxina a la célula es por un proceso endocítico mediado por receptor (Keusch 1981) y su mecanismo de acción es por la inhibición de la síntesis de proteínas. Por último Keusch en 1972 (30,39) reporta que *S. dysenteriae* produce una toxina termolábil que causa acumulación de líquido en el lumen de segmentos ligados de ileo de conejo. El líquido fue mayor en contenido de potasio, cloro y proteínas que el producido en respuesta a la toxina de cholera, pero sin dejar de ser isotónico. La toxina causa además anormalidades histológicas en mucosa intestinal (8,17,30).

Aunque algunas cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* (31) producen niveles muy bajos de toxina Shiga y son neutralizables con antitoxina de Shiga; la toxina no ha sido obtenida en forma pura en estas especies. Aun se desconoce si la toxina que producen algunas cepas de *S. flexneri*, *S. sonnei* o *S. boydii* es idéntica a la que produce *S. dysenteriae*. Keusch y col (31) han reportado

la producción in vitro de citotoxinas por cepas de S. flexneri y de S. sonnei utilizando una subclase de células HeLa.

Observaron además, que anticuerpos de pacientes infectados con S. flexneri y S. sonnei inhibían la actividad de la toxina de Shiga. O'Brien y col. (43) reportaron la producción de una toxina de S. flexneri 2a cuya actividad fue neutralizable por antisuero contra la toxina de Shiga. En este estudio hacen notar que las cepas de S. flexneri 2a producen por lo menos 10^3 veces menos actividad tóxica que S. dysenteriae. Bartlett y col. (4) miden la actividad citotóxica de cepas de S. dysenteriae tipo 1, 2 y 3, de cepas de S. sonnei, de S. flexneri y de S. boydii, encontrando que la citotóxicidad de las cepas diferentes a S. dysenteriae tipo 1 fue significativamente más baja (1/1000). La neutralización de la citotóxicidad de estas cepas usando antisuero contra toxina de Shiga, revela que en todas las cepas de S. dysenteriae 1, la actividad citotóxica fue atribuible a la toxina de Shiga, mientras que las otras cepas de Shigella produjeron actividad citotóxica no neutralizable ó actividad que fue parcialmente neutralizable. Prado y col (51) analizaron la relación entre la producción de citotoxina in vitro por cepas de Shigella y el cuadro clínico, ellos estudiarón 25 cepas de S. sonnei, 8 cepas de S. flexneri y una cepa de S. boydii y S. dysenteriae, el 86% de las cepas, produjeron citotoxina no neutralizable con anti-Shiga, el 14% de las cepas fueron parcialmente neutralizables. Cuando solamente la citotoxina no neutralizable fue considerada, la presencia de leucocitos fecales, sangre oculta en heces y la fiebre correlacionaron con la cantidad de la toxina.

Eiklid y otros investigadores (13) estudiaron la sensibilidad de

diferentes líneas celulares de origen epitelial, a la toxina de Shiga purificada, como son las células HeLa S₃, células HT-29 y células VERO reportando muerte celular en estas líneas celulares, con concentraciones de toxina que van de picomolar a femtomolar; la toxina actuó inhibiendo la síntesis de proteínas. Otras líneas celulares fueron moderadamente sensibles como son las células HEp-2, mientras que las células CHO, las células WI38, las células BHK, las células adrenal Y-1, las células L y otras fueron completamente refractarias a la toxina.

Otro microorganismo invasivo es *Salmonella* y en contraste a las especies de *Shigella*, *Salmonella* atraviesa la capa de células epiteliales intestinales hacia tejidos profundos y frecuentemente entra a células del sistema reticuloendotelial. La bacteria entra a las células epiteliales y reside dentro de vesículas de la membrana similares a aquellas vistas en la entrada de *Shigella*; sin embargo *Salmonella* permanece dentro de la inclusión membranal (16,62). Aunque cada organismo invasor entra dentro de una vacuola separada, estas coalescen y al final la mayoría de los microorganismos son encontrados dentro de una sola y gran vacuola intracelular. Tanto *Salmonella* como *Shigella* requieren microfilamentos funcionales del huésped para entrar (16) y la bacteria invasora es rodeada por actina polimerizada durante la internalización (16). *Salmonella* prefiere las células del íleo terminal, donde presumiblemente entra, tanto a las células epiteliales como a las células especializadas M.

Después de entrar a la célula *Salmonella* penetra hasta el lado

opuesto de la capa epitelial (18,58), llegando a la lámina propia donde es liberada. Una vez aquí, la bacteria se multiplica e induce una fuerte respuesta inflamatoria, cuyos mediadores aumentan el daño a la pared intestinal y algunos de ellos como las prostaglandinas pueden provocar hipersecreción, contribuyendo a la pérdida de líquidos. Algunas cepas producen una enterotoxina similar a la colérica, que puede ser responsable de los cuadros de diarrea acuosa sin sangre. Esta toxina se ha purificado parcialmente, su peso molecular es de aproximadamente 110 000 (53) es termolábil perdiendo toda su actividad cuando se calienta a 85°C por 30 minutos; no es afectada por lisozima pero es sensible a proteasas y a pH de 4 y 10 y disminuye ligeramente su actividad a pH de 5 y 9 (3,53,57). Existen reportes contradictorios acerca de la similitud que tiene con la toxina de colera y la toxina termolábil de *E. coli*. Sandefur & Peterson (53) encuentran que cepas de *S. typhimurium* elaboran una toxina que causa elongación de células CHO y es positiva a la prueba de permeabilidad en piel de conejo: tales efectos fueron neutralizados con antitoxina de cólera y con el gangliósido GM1. Mientras Baloda y col (3) encuentran efecto en células CHO, en piel de conejo y asa ligada de conejo, pero no tiene reacción cruzada con la toxina de colera ni termolábil de *E. coli* aún a títulos altos y su actividad no es inhibida por GM1. También existen trabajos en los cuales se reportan que ciertas cepas de *Salmonella*, producen una citotoxina parecida a la que produce *S. dysenteriae* 1, que produce lisis de células VERO por inhibición de la síntesis de proteínas; también se encontró inhibición de

síntesis de proteínas en células epiteliales de íleo de conejo, tanto in vivo como in vitro (2,35,36) y sus efectos fueron neutralizados por anti-toxina de Shiga.

S. typhi y S. paratyphi son mucho más invasivas que las otras salmonelas; penetran a la mucosa del íleon, proliferan en las placas de Peyer y viajan al torrente sanguíneo, causando la fiebre tifoidea. El microorganismo se multiplica en el sistema reticuloendotelial, permanece en el tracto biliar y reinfecta las placas de Peyer donde los folículos linfoides se agrandan, se necrosan y pueden sangrar o aun perforarse.

El control genético de la invasión por Salmonella no está tan bien definido como lo está en Shigella. Muchas especies de Salmonella altamente patogénicas con la excepción notable de S. typhi contienen un plásmido que es necesario para la virulencia (16); este elemento extracromosomal no es necesario para que Salmonella entre a la célula epitelial pero se ha visto que se requiere para prolongar la sobrevivencia de la bacteria dentro del huésped.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aproximadamente el 10% de los casos de diarrea aguda se presentan con sangre, donde es importante identificar el agente causal, para decidir el tratamiento. La producción de diarrea asociada a Salmonella y Shigella se acompaña generalmente de sangre y moco en las heces. Sin embargo ocurren cuadros clínicos donde las evacuaciones son líquidas y no presentan estos signos clínicos, y se piensa que la producción de toxina (s) están jugando un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

Se desconoce los mecanismos patofisiológicos por los que estas bacterias causan pérdida de líquidos, pero se sugiere la participación de toxinas. No se ha descartado la posibilidad de que algunas toxinas (citotoxinas) también participen en el daño a la pared intestinal.

La elucidación de la posible participación de toxinas en los mecanismos de patogenicidad permitirá diseñar medidas preventivas y de tratamiento, específicamente dirigidas contra éstos.

OBJETIVOS

1.- Conocer la frecuencia relativa de los enteropatógenos que más se asocian a diarrea aguda con sangre y a disentería, en pacientes que acuden a unidades de atención primaria.

2.- Determinar la capacidad de producción de citotoxinas por las cepas aisladas de E. coli, Salmonella Shigella, así como determinar la capacidad de producción de enterotoxinas por las cepas aisladas de Salmonella y Shigella.

3.- Determinar la posible asociación entre la citotoxicidad sobre células en cultivo y la enterotoxicidad en intestino delgado de rata de las cepas de Shigella y Salmonella.

HIPOTESIS

1.- Los casos de diarrea aguda con sangre o disenteria en pacientes que acuden a unidades de atención primaria, estarán más asociados a Shigella, seguidas de Salmonella, Campylobacter y E. coli citotóxica.

2.- De las cepas aisladas de pacientes con diarrea con sangre, las de Shigella producirán citotoxinas con más frecuencia que las de Salmonella y las de E. coli. La producción de enterotoxinas por cepas de Shigella y de Salmonella será significativamente menos frecuente que la de citotoxinas.

3.- La capacidad de provocar elongación en células CHO estará significativamente asociada a la capacidad de inducir acumulación de fluido en asa intestinal de rata. No existirá esta asociación entre actividad en células VERO y HT-29 y actividad en intestino.

MATERIAL Y METODOS

POBLACION ESTUDIADA. Se estudiaron las muestras de heces de 119 pacientes con diarrea aguda con sangre, que acudieron a consulta a centros de atención primaria de salud (IMSS ó SS) de la delegación Coyoacan, México, D.F. Se incluyeron a pacientes que tuvieron diarrea aguda con sangre, indistintamente de la edad y el sexo, con menos de 7 días de evolución y que no hubieran recibido tratamiento antimicrobiano cuando menos dos semanas previas al ingreso del estudio.

A los pacientes se les tomo una muestra de heces, que fue inoculada en medios de transporte y que posteriormente fueron procesadas en el laboratorio de bacteriología de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (CHN Siglo XXI).

El aislamiento e identificación de los enteropatógenos se hizo como se describe en la figura 1, de acuerdo a esquemas ya establecidos en el " Manual para Laboratorio en Investigaciones en Infecciones Entéricas Agudas " (67). Las cepas de *E. coli* (5 colonias por paciente) *Shigella* y *Salmonella* aisladas de los casos de diarrea aguda con sangre se guardaron en viales con gelosa especial (19) y se almacenaron a temperatura ambiente para estudios posteriores.

MANTENIMIENTO Y PROPAGACION DE CULTIVOS CELULARES. Las células se crecieron a confluencia, en botellas para cultivo de 25 cm², las

células de Ovario de Hamster Chino (CHO), se crecieron en medio F12 (In Vitro, Méx.), las células de Riñón de Mono Verde Africano (VKRO) y las Células de Carcinoma de colon Humano (HT-29) en Medio Minimo Esencial (MEM, In Vitro, Méx.), ambos medios fueron suplementados con glutamina al 10mM, penicilina-estreptomicina (In Vitro, Méx.) a una concentración final de 1000 U ó ug/ml y 10% de suero fetal bovino (Gibco, EU). Una vez confluentes, las células se desprendieron con tripsina-EDTA (In Vitro, Méx.) y se resuspendieron en 1 ml del medio correspondiente. Una tercera parte de la suspensión se diluyó en 20 ml de medio y se distribuyó en microplacas de 96 pozos (Nunc, Dinamarca), agregandose 200 ul por pozo. En el caso de las células CHO, la microplaca fue incubada en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C por una hora, y el medio de cultivo se cambio sustituyendo la concentración del suero fetal bovino del 10 al 1%, justo antes de ser inoculadas con las muestras. Las placas con células VERO y HT-29 se incubaron 48 hrs cambiando también el medio con suero al 1% antes de ser inoculadas.

Los sobrenadantes de las cepas de *E. coli* fueron inoculados en microplacas con células CHO y con VERO. Los sobrenadantes de las cepas de *Shigella* y *Salmonella* fueron inoculados en microplacas con células CHO, con VERO Y con HT-29. Las microplacas se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C por 48 hrs. El efecto citotóxico se observó a las 24 y 48 hrs, buscando encontrar alteración morfológica como: arredondamiento, elongación o lisis, se considero como efecto citotóxico positivo cuando se observó alteración morfológica en más del 50% de la población celular.

PRODUCCION DE CITOTOXINAS POR CEPAS DE *E. coli*, *Shigella* Y *Salmonella*. Las cepas mantenidas en gelosa especial se sembraron en 3 ml. de caldo soya tripticaseína (Difco, EU) incubandose en agitación a 37° C por 4 hrs; de éste cultivo se tomo 0.1 ml para inocular un segundo tubo con 3 ml del mismo caldo, dejandose incubar en agitación a 37 °C por 18 hrs. Después de éste tiempo se obtuvo el sobrenadante libre de células centrifugando a 10,000 RPM a 4°C durante 30 min (Sorvall RC-5B, rotor SM-24 Dupont Instruments, EU), filtrandose despues a traves de una membrana de 0.45 um de diámetro (millipore, EU). Del sobrenadante obtenido se inocularon 20 ul por pozo en microplacas con células en cultivo. Se emplearón como control negativo la cepa de *E. coli* K12 otorgada por el cepario de UICEIP,IMSS., y como controles positivos las cepas *E. coli* 933J (productoras de toxina Shiga-like 1), *E. coli* 933W (productora de toxina Shiga-like 2) otorgadas por el cepario de la ENCB,IPN. y la cepa de *E. coli* O157: H7 (productora de toxinas Shiga-like 1 y 2) donada por el cepario de la Universidad de Gotemburgo, Suecia. Además se usó toxina de *Vibrio cholerae* (List, USA) como control de elongación en células CHO y toxina B de *Clostridium difficile* (purificada por J.Torres y G. González en el laboratorio) como control de arredondamiento en células CHO, H^T-29 y VERO.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION. Para determinar si existia relación antigénica entre las actividades citotóxicas de *Shigella* y *Salmonella* con toxinas de cólera y B de *Clostridium difficile* se

hicieron ensayos de neutralización, utilizando anticuerpos contra toxinas puras de cólera (anti-CT) y B de C. difficile (anti-TB) producidas en el laboratorio (64).

Se mezclaron 10 ul de anti-CT ó anti-TB (suero de conejo sin diluir) con 90 ul de cada uno de los sobrenadantes de las cepas y las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 45 min . Posteriormente se inocularon 20 ul de cada mezcla por pozo, en microplacas con células CHO, VERO y HT-29 preparadas como se describio antes, las microplacas se incubaron en atmósfera de CO₂ a 37°C y se leyó actividad citotóxica a las 24 y 48 hrs.

PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS POR CEPAS DE Salmonella y Shigella

Para determinar la producción de enterotoxinas, se utilizaron los mismos sobrenadantes del cultivo de las cepas que se probaron en células. Como control positivo de actividad enterotóxica, se utilizo la toxina de cólera, a una concentración de 3 ug /ml en solución reguladora con NaCl al 0.1M, KH₂HPO₄ al 0.001M y Na₂HPO₄. 12H₂O al 0.008M, a pH de 7.4 (PBS).

Ensayo en Asa ligada de Rata.- Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad, mantenidas en ayuno por 24 hrs (37). Las ratas se anestesiaron con éter, se les práctico una incisión en la línea media del abdomen de manera que el intestino quedara expuesto. En seguida se localizó el yeyuno en su porción terminal, ligandose 2 asas de prueba de aproximadamente 10 cm cada una, con una asa intermedia como testigo por rata. A cada asa se le inoculó 1 ml del sobrenadante obtenido de los cultivos

de Salmonella y Shigella; cada sobrenadante se ensayó en dos ratas. Posteriormente se acomodaron los intestinos dentro de la cavidad y se suturó la pared abdominal. Transcurridas 7 hrs se sacrificaron las ratas, se extrajeron las asas inoculadas para medirse y pesarse y la acumulación de líquido se estimó a partir de la razón peso/longitud (mg/cm) en las asas de prueba después de restar la razón obtenida en las asas testigo inyectadas unicamente con PBS. El resultado para cada sobrenadante se expresó como el promedio del resultado obtenido en los dos animales inoculados por muestra. Se consideraron como enterotóxicos aquellos sobrenadantes que indujeron acumulación de líquido con una razón mg/cm mayor o igual a 50 mg/cm (37). Se observó además la apariencia macroscópica de la pared intestinal, para lesiones hemorrágicas y el contenido del asa para viscosidad y sangre.

ANALISIS DE DATOS. Se analizó la posible diferencia en la frecuencia de producción de toxinas por diferentes cepas de Shigella y Salmonella utilizando la prueba estadística de Chi cuadrada. Se buscó una posible asociación en la actividad citotóxica que las cepas de Shigella y Salmonella ejercían sobre diferentes líneas celulares haciendo un análisis de datos empleando la prueba de CHI cuadrada. Para estudiar si hubo asociación entre la actividad citotóxica en cada una de las líneas celulares y la actividad enterotóxica en intestino delgado se utilizó la prueba estadística de McNemar.

hicieron ensayos de neutralización, utilizando anticuerpos contra toxinas puras de cólera (anti-CT) y B de *C. difficile* (anti-TB) producidas en el laboratorio (64).

Se mezclaron 10 ul de anti-CT ó anti-TB (suero de conejo sin diluir) con 90 ul de cada uno de los sobrenadantes de las cepas y las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Posteriormente se inocularón 20 ul de cada mezcla por pozo, en microplacas con células CHO, VERO y HT-29 preparadas como se describió antes, las microplacas se incubaron en atmósfera de CO₂ a 37°C y se leyó actividad citotóxica a las 24 y 48 hrs.

PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS POR CEPAS DE Salmonella y Shigella

Para determinar la producción de enterotoxinas, se utilizarón los mismos sobrenadantes del cultivo de las cepas que se probarón en células. Como control positivo de actividad enterotóxica, se utilizo la toxina de cólera, a una concentración de 3 ug /ml en solución reguladora con NaCl al 0.1M, KH₂HPO₄ al 0.001M y Na₂HPO₄. 12H₂O al 0.008M, a pH de 7.4 (PBS).

Ensayo en Asa Ligada de Rata.- Se utilizarón ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad, mantenidas en ayuno por 24 hrs (37). Las ratas se anestesiaron con éter, se les práctico una incisión en la línea media del abdomen de manera que el intestino quedara expuesto. En seguida se localizó el yeyuno en su porción terminal, ligandose 2 asas de prueba de aproximadamente 10 cm cada una, con una asa intermedia como testigo por rata. A cada asa se le inoculó 1 ml del sobrenadante obtenido de los cultivos

RESULTADOS

Se estudiaron 119 pacientes con diarrea aguda con sangre y de éstos, 83 fueron menores de 5 años (70%), 16 estuvieron entre 5 a 15 años (13%) y 20 fueron mayores de 15 años (17%) (Tabla 1).

La frecuencia de aislamiento de los diferentes enteropatógenos se describe en la figura 1, *Shigella* spp. se aisló en 26 de los 119 pacientes (22%) la frecuencia fue mayor en el grupo de 1 a 5 años (33%), seguido por el grupo de mayores de 5 años y por el de menores de 1 año con el 22 y 14% respectivamente. *Campylobacter* spp. se aisló en 17 de los pacientes (14%) predominando en menores de 1 año (26%), seguido por el grupo de 1 a 5 años (9%) y encontrándose solo un aislamiento en mayores de 5 años (3%). *Salmonella* spp. se aisló en 25 pacientes (21%) predominando en niños mayores de 5 años (31%), seguido por el grupo de menores de 1 año (24%) y por el de 1 a 5 años (6%). *Escherichia coli* citotóxica (VTEC) se aisló en 13 pacientes (11%), predominando en el grupo de 1 a 5 años (15%) seguido por el grupo de mayores de 5 años (14%) y por el de menores de 1 año (6%). *Entamoeba histolytica* se encontró solo en 3 pacientes entre el grupo de mayores de 5 años (19%). En 7 casos hubo infecciones mixtas (6%), donde hubo la asociación de VTEC con otro enteropatógeno.

La frecuencia de aislamiento de las diferentes especies se describe en la tabla 2. *Shigella flexneri* fue la especie que más frecuentemente se aisló (13%), predominando entre el grupo de 1 a 5 años (18%) seguido por el de menores de 1 años (12%) y por último el de mayores de 5 años (8%). *Shigella sonnei* y *Shigella boydii* se aislaron en un 4 y 5 %, predominando ambas

en el grupo de edad de 1 a 5 años. Campylobacter jejuni fue la especie más frecuentemente aislada (10%) predominando entre el grupo de edad de menores de 1 año (22 %), hubo 5 aislamientos de Campylobacter coli (29%) con predominio en menores de 5 años. Salmonella enteritidis fue la especie más frecuentemente aislada (15%) predominando en niños mayores de 5 años (22%); Salmonella choleraesuis se aisló en 5 % predominando en el grupo de menores de 1 año (8%) y Salmonella typhi solo se aisló en un caso (4%) en el grupo de mayores de 5 años.

Las 25 cepas de Shigella y las 24 de Salmonella aisladas de estos pacientes, se estudiarán para producción de toxinas en medio TSB: En Shigella, 14 cepas fueron citotóxicas para células CHO (56%), 11 para células HT-29 (44%) y 13 para células VERO (52%). De los sobrenadantes de las 24 cepas de Salmonella probadas, 15 causarón efecto citotóxico en células CHO (63%), 5 en células HT-29 (21%) y 18 en VERO (75%).

En la tabla 3 se describe la capacidad de las 25 cepas de Shigella para causar arredondamiento en las diferentes líneas celulares, donde observamos que en las células CHO, indujeron este efecto; 5 Shigella flexneri (38%), 1 S. sonnei (17%) y 1 S. boydii (17%). En las células HT-29, 7 S. flexneri (54%), 3 S. sonnei (50%) y 1 S. boydii (17%). En células VERO, 4 S. flexneri (31%), 3 S. sonnei (50%) y 3 S. boydii (50%).

En la tabla 4 se describe la capacidad de las cepas de Shigella de causar elongación o lisis sobre las células CHO y las células VERO. Se encontró que en células CHO, causarón elongación 2

cepas de S. flexneri (15%), 4 de S. boydii (67%), y ninguna cepa de S. sonnei; solo se observo lisis por una cepa de S. flexneri (8%). En células VERO causó elongación solo una cepa de S. sonnei (17%) y lisis una cepa de S. flexneri (8%) y una de S. boydii (17%).

En la tabla 5 se describe la capacidad de 24 cepas de Salmonella de causar arredondamiento en las diferentes líneas celulares. Observamos que en células CHO producen este efecto, 2 cepas S. enteritidis (11%), pero ninguna cepa de S. choleraesuis; en células HT-29 tres cepas de S. enteritidis (17%) y 2 de S. choleraesuis (33%) y en células VERO 12 cepas de S. enteritidis (67%) y 3 de S. choleraesuis (50%).

En la tabla 6 se describe la capacidad de las 24 cepas de Salmonella de causar elongación sobre células CHO y lisis sobre células VERO. Se observó que 10 cepas de S. enteritidis (56%) y 3 de S. choleraesuis (50%) produjeron elongación en CHO y 2 cepas de S. enteritidis (11%) y una de S. choleraesuis (17%) produjeron lisis en VERO.

En la figura 2 se muestra algunos efectos de cepas sobre células HT-29; en (a) se puede apreciar la morfología normal de la monocapa de las células HT-29; en (b) se observa el efecto de una cepa de S. flexneri que causó arredondamiento de las células y lisis de la mayoría de ellas; en (c) se observa el efecto de una cepa de S. flexneri que provoca pérdida de la confluencia de la monocapa con agrupación y arredondamiento de las células; y en (d) se muestra el efecto de una cepa de S. enteritidis observando ruptura de la monocapa, con agrupación y arredondamiento de las células, pero en menor grado que lo observado para Shigella.

En la figura 3 se muestran algunos efectos de cepas sobre células CHO; en (a) se observa la morfología normal de la monocapa de células CHO; en (b) se muestra el efecto de una cepa de *S. flexneri* que causó lisis en esta línea celular; en (c) se aprecia el efecto de una cepa de *S. flexneri* que causó pérdida de la confluencia de la monocapa celular con arredondamiento de las células; en (d) se observa el efecto de una cepa de *S. enteritidis* que causó pérdida de la monocapa celular con arredondamiento de las células; en (e) se aprecia el efecto de una cepa de *S. sonnei* que causó elongación en estas células; y en (f) se observa el efecto de una cepa de *S. enteritidis* que causó elongación.

En la figura 4 se muestra algunos efectos de cepas sobre células VERO; en (a) se observa la morfología normal de la monocapa de células VERO; en (b) vemos el efecto de una cepa de *S. flexneri* que causó lisis; en (c) se aprecia el efecto de una cepa de *S. flexneri* que causó arredondamiento; y en (d) se ve el efecto de una cepa de *S. enteritidis* que causa arredondamiento de estas células.

En la figura 5 se compara la citotoxicidad de las cepas de *Shigella* y *Salmonella* sobre las diferentes líneas celulares. En las células HT-29 tanto *Shigella* como *Salmonella* causaron arredondamiento, pero encontrando que la frecuencia de cepas citotóxicas de *Shigella* fue significativamente mayor que las de *Salmonella* (CHI cuadrada $P < 0.05$). Ninguno de los dos géneros causaron elongación ni lisis en esta línea celular. En células CHO algunas cepas de *Shigella* causarón arredondamiento, otras

elongación y otras lisis, a diferencia de las cepas de Salmonella que solo causaron arredondamiento o elongación pero no lisis sobre estas células. El número de cepas de Salmonella que causaron elongación en CHO fue significativamente mayor que el de Shigella (Fisher, $P < 0.005$). Por último, en células VERO algunas cepas de Shigella causaron arredondamiento, otras elongación y otras lisis, mientras que cepas de Salmonella causaron arredondamiento ó lisis pero no elongación . El número de cepas de Salmonella que causaron arredondamiento fue significativamente mayor que en Shigella (Fisher, $P < 0.05$).

Se analizó la posible asociación entre la actividad citotóxica de las cepas de Shigella y Salmonella en las diferentes líneas celulares (tabla 7), y se encontro que de las 29 cepas tanto de Salmonella como de Shigella positivas sobre la línea celular CHO; 8 fueron citotóxicas también para células HT-29 (28%) y 17 para células VERO (59%). De las 16 cepas positivas sobre células HT-29; 8 de estas mismas fueron positivas para células CHO (50%) y 7 para células VERO (44%). De las 31 cepas con efecto citotóxico en células VERO; 17 de estos sobrenadantes fueron citotóxicos en células CHO (55%) y 7 en células HT-29 (23%). Al hacer el análisis estadístico de los datos, empleando Chi cuadrada, se encontró que no hay diferencia significativa entre las líneas celulares CHO y VERO para detectar efecto citotóxico por las cepas de Shigella y Salmonella, pero si se encontró esta diferencia ($P < 0.005$) entre las células HT-29 y a las otras líneas celulares. De las 8 cepas citotóxicas para células CHO y HT-29,

tres fueron S. flexneri, una S. boydii, tres S. enteritidis, y una S. choleraesuis. De las 17 cepas citotóxicas para células CHO y VERO, tres fueron S. flexneri, tres S. boydii, nueve de S. enteritidis y dos S. choleraesuis. De las 7 cepas citotóxicas para células HT-29 y VERO, una fue de S. flexneri, dos de S. sonnei, dos de S. enteritidis y dos de S. choleraesuis.

Dos cepas de S. enteritidis fueron citotóxicas para las tres líneas celulares, produciendo elongación en CHO y arredondamiento en HT-29 y VERO.

Se estudio la capacidad de neutralización de anticuerpos contra toxinas colérica y B de Clostridium difficile, contra las diferentes citotoxinas de Shigella y Salmonella (tabla 8). Se analizarón 15 cepas que provocaron arredondamiento en las células HT-29; cuatro de ellas fueron neutralizadas por anti-CT (dos Shigellas y dos Salmonellas) y siete fueron inhibidas por anti-TB (cuatro Shigella y tres Salmonella). Se estudiarón 15 cepas que tuvieron efecto citotóxico sobre células VERO ; nueve de ellas fueron neutralizadas con anti-CT (seis Shigella y tres Salmonella) y ninguna fue neutralizada por anti-TB. Se analizarón ocho cepas que causarón efecto sobre células CHO; seis de ellas fueron neutralizadas con anti-CT (tres Shigella y tres Salmonella) y ninguna fue neutralizada con anti-TB.

Las 25 cepas de Shigella y las 24 de Salmonella se estudiaron también para determinar su capacidad de inducir acumulación de fluido en asa yeyunal ligada de rata. Se encontró que 19 cepas de Shigella (76%) y 17 cepas de Salmonella (68%) produjeron acumulación de líquido, (tabla 9). El 50% de las cepas de

Shigella indujeron una acumulación de líquido menor a 100 mg/cm. De cuatro cepas de S. sonnei que causaron acumulación de líquido, tres de ellas (75%) fueron altas inductoras de acumulación de líquido (más de 100 mg/cm). Cepas de cada una de las tres especies de Shigella y de las dos especies de Salmonella estudiadas, fueron productoras de actividad enterotóxica.

Se comparó la magnitud de la respuesta causada por cepas de Shigella y de Salmonella (figura 6) y se encontró que no hay diferencia en la respuesta inducida por Shigella o Salmonella en asa intestinal de rata. Shigella tuvo una media de 102 mg/cm con límites entre 51 y 185 y Salmonella tuvo una media de 87 mg/cm con límites entre 52 y 179.

No se aprecian diferencias en el aspecto macroscópico del líquido acumulado en asa intestinal de rata (Tabla 10), inoculada con cepas de Shigella y Salmonella, vemos que la mayoría de las cepas de ambos géneros causaron acumulación de líquido de aspecto viscoso y un número mínimo de cepas de Shigella y de Salmonella causaron acumulo de líquido de aspecto acuoso.

Se analizó la posible relación entre la actividad enterotóxica y la actividad citotóxica de las cepas, para lo que se hizo un análisis de asociación usando la prueba de McNemar. De las 19 cepas de Shigella que fueron positivas para inducir la acumulación de líquido en asa intestinal de rata; 10 de éstas fueron citotóxicas para células CHO (53%), 6 en células HT-29 (32%) y 11 en células VERO (58%). De las 17 cepas de Salmonella que fueron positivas para inducir acumulación de líquido; 11

fuerón citotóxicas sobre células CHO (65%), 3 sobre células HT-29 (29%) y 12 sobre VERO (71%) (tabla 10). El análisis estadístico de los datos nos indica que no existe diferencia, entre la actividad citotóxica sobre células CHO y VERO y la actividad enterotóxica observada en asa ligada de rata, para detectar algún efecto tóxico presente en los sobrenadantes de las cepas de Shigella y Salmonella ; pero si hay diferencia ($P < 0.05$) entre la actividad citotóxica detectada sobre células HT-29 y la actividad enterotóxica en intestino delgado de rata producida, por la misma cepa.

TABLA 1.

DISTRIBUCION DE 119 PACIENTES CON DIARREA AGUDA CON SANGRE POR GRUPOS DE EDAD.

Edad, años	No. estudiado	(%)
Menores de 5	83	70
Entre 5 a 15	16	13
Mayores de 15	20	17

Figura 1. Frecuencia de enteropatógenos aislados en heces de 119 pacientes con diarrea con sangre

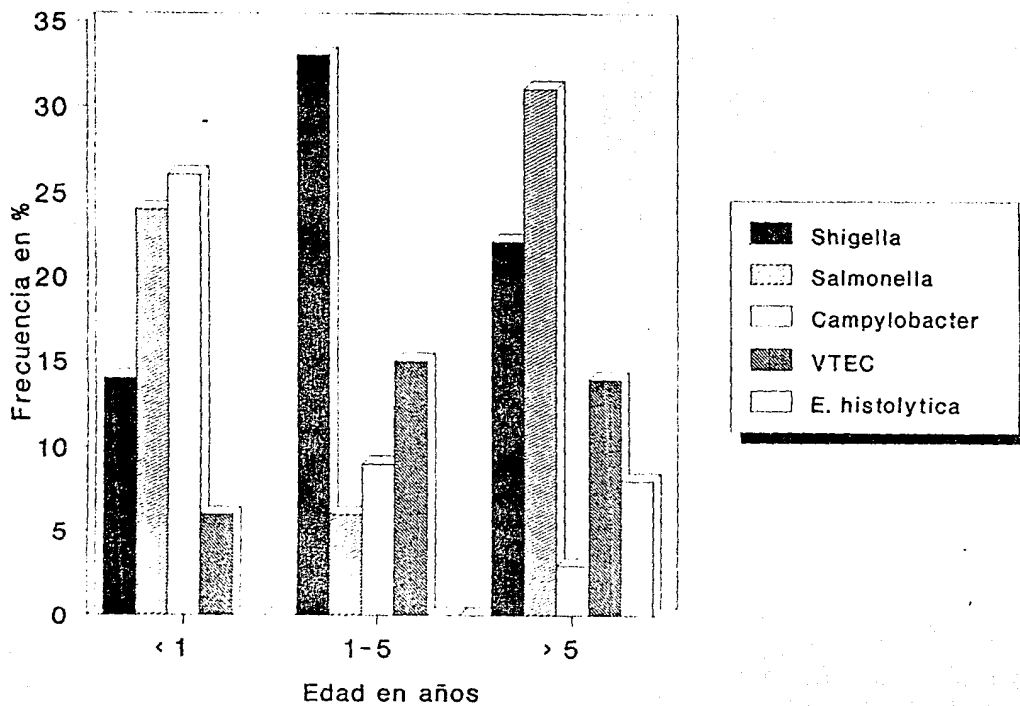


TABLA 2.

FRECUENCIA DE ESPECIES DE ENTEROPATOGENOS AISLADOS
DE HECES DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE.

Especie	No. + (%), aislados en:					
	< 1 año		1 - 5 años		> 5 años	
	n	+ 50	n	= 33	n	= 36
<u>Shigella flexneri</u>	6	(12)	6	(18)	3	(8)
<u>Shigella sonnei</u>	1	(2)	2	(6)	2	(6)
<u>Shigella boydii</u>	0		3	(9)	3	(8)
<u>Salmonella enteritidis</u>	8	(16)	2	(6)	8	(22)
<u>Salmonella choleraesuis</u>	4	(8)	0		2	(6)
<u>Salmonella typhi</u>	0		0		1	(3)
<u>Campylobacter jejuni</u>	11	(22)	1	(3)	0	
<u>Campylobacter coli</u>	2	(4)	2	(6)	1	(3)

TABLA 3.
 CAPACIDAD DE 25 CEPAS DE Shigella AISLADAS DE PACIENTES
 CON DIARREA CON SANGRE, DE CAUSAR ARREDONDAMIENTO EN DIFERENTES LINEAS CELULARES

Especie	No. de cepas probadas	No. de cepas citotóxicas (%) sobre:		
		CHO	HT-29	VERO
<u>Shigella flexneri</u>	13	5 (38)	7 (54)	4 (31)
<u>Shigella sonnei</u>	6	1 (17)	3 (50)	3 (50)
<u>Shigella boydii</u>	6	1 (17)	1 (17)	3 (50)
<u>Shigella spp</u>	25	7 (28)	11 (44)	10 (40)

TABLA 4.

CAPACIDAD DE 25 CEPAS DE Shigella AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE DE CAUSAR ELONGACION O LISIS SOBRE CELULAS CHO Y VERO.

Especie	No. de cepas probadas	No. de cepas citotóxicas (%) sobre:			
		Células CHO		Células VERO	
		elongación	lisis	elongación	lisis
<u>S. flexneri</u>	13	2 (15)	1 (8)	---	1 (8)
<u>S. sonnei</u>	6	--	--	1 (17)	--
<u>S. boydii</u>	6	4 (67)	--	--	1 (17)
<u>Shigella spp</u>	25	6 (24)	1 (4)	1 (4)	2 (8)

TABLA 5.

CAPACIDAD DE 24 CEPAS DE Salmonella AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE
DE CAUSAR ARREDONDAMIENTO EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.

Especie	No. de cepas probadas	No. de cepas citotóxica (%) sobre:		
		CHO	HT-29	VERO
<u>S. enteritidis</u>	18	2 (11)	3 (17)	12 (67)
<u>S. choleraesuis</u>	6	-	2 (33)	3 (50)
<u>Salmonella spp</u>	24	2 (8)	5 (21)	15 (63)

Figura 2. Efecto de cepas de Shigella y Salmonella sobre células HT-29. a) monocapa de células HT-29 normales. b) y c) células inoculadas con sobrenadantes de diferentes cepas de - Shigella flexneri. d) células inoculadas con sobrenadante de Salmonella enteritidis. Las células se incubaron con los sobrenadantes por 48 hs.

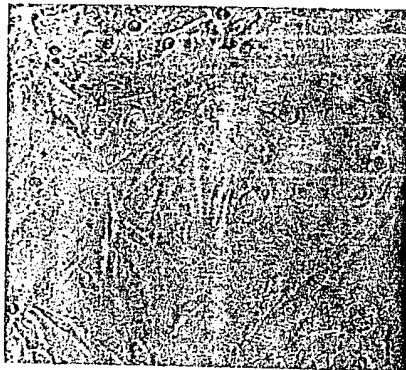
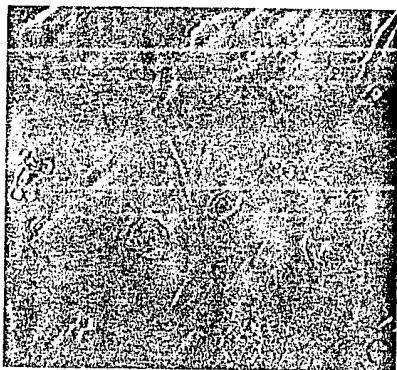
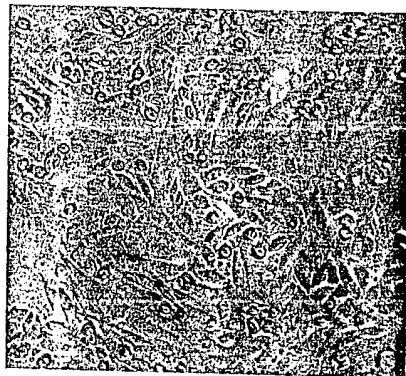
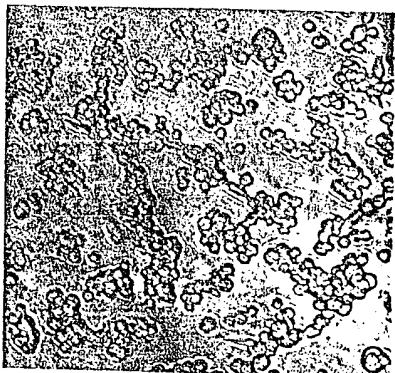
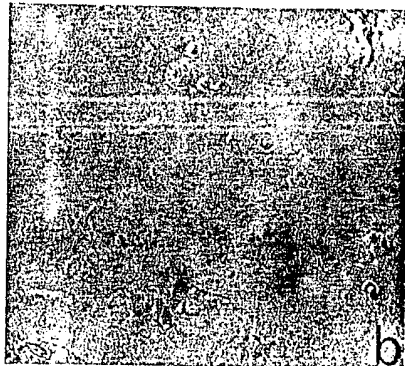
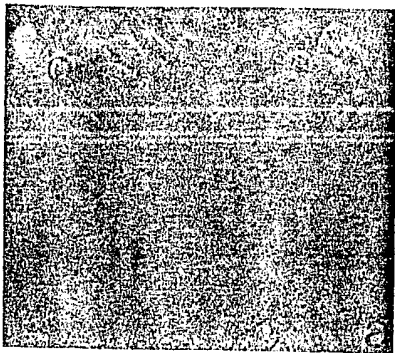


Figura 3. Efecto de cepas de Shigella y Salmonella sobre células CHO. a) monocapa de células CHO normales. b) y c) células inoculadas con sobrenadantes de diferentes cepas de Shigella flexneri. d) y f) células inoculadas con sobrenadantes de diferentes cepas de Salmonella enteritidis. e) células -- inoculadas con sobrenadante de Shigella sonnei. Las células se incubaron con los sobrenadantes por 48 hs.

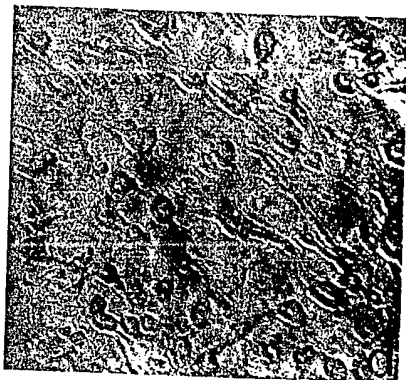
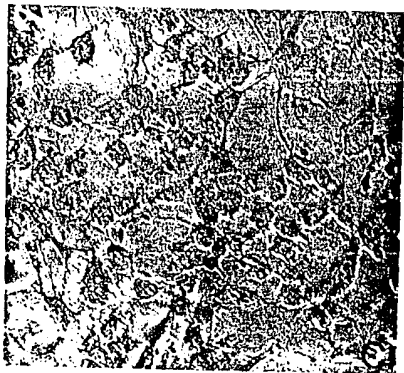
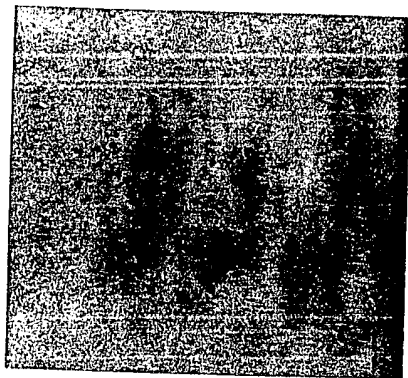
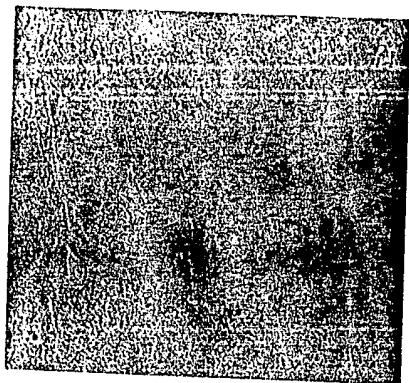
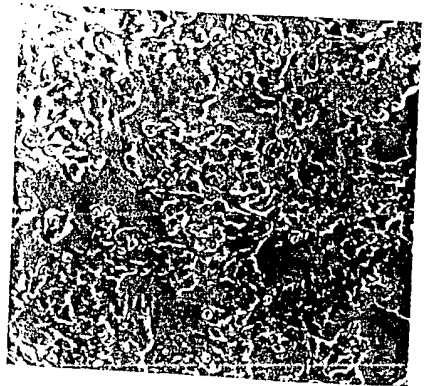
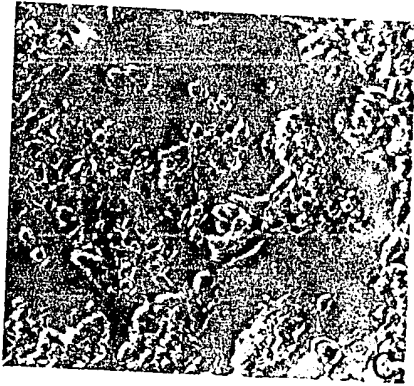
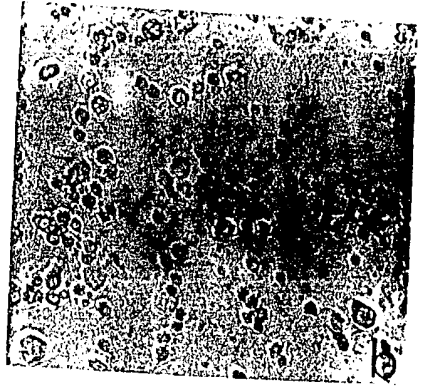
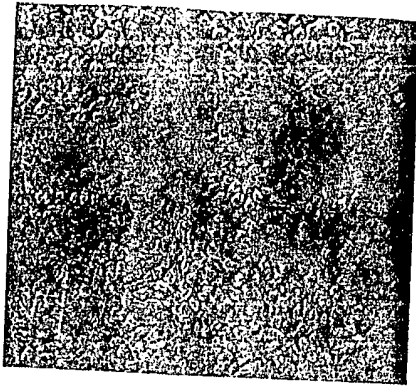


Figura 4. Efecto de cepas de Shigella y Salmonella sobre células VERO. a) monocapa de células VERO normal. b) y c) células inoculadas con sobrenadantes de diferentes cepas de Shigella flexneri. d) células inoculadas con sobrenadante de Salmonella enteritidis. Las células se incubaron con los sobrenadantes - por 48 hs.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 5 Citotoxicidad de cepas de *Shigella* y *Salmonella* sobre células HT-29, CHO y VERO.

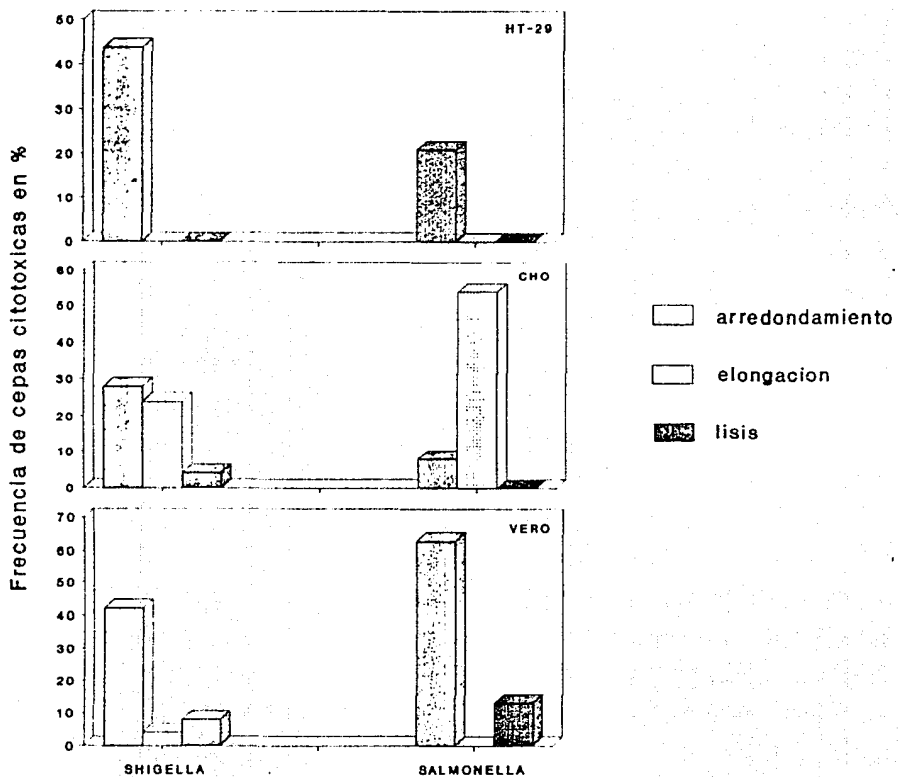


TABLA 6

CAPACIDAD DE 24 CEPAS DE Salmonella AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE
DE CAUSAR ELONGACION SOBRE CELULAS CHO Y LISIS SOBRE VERO.

<u>Especies</u>	No de cepas probadas	No. de cepas citotóxicas (%) sobre: CHO (elongación)	sobre: VERO (lisis)
<u>S. enteritidis</u>	18	10 (56)	2 (11)
<u>S. choleraesuis</u>	6	3 (50)	1 (17)
<u>Salmonella spp</u>	24	13 (54)	3 (13)

TABLA 7.

ASOCIACION ENTRE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE CEPAS DE
Salmonella Y Shigella EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.

Línea celular	No. de cepas citotóxicas	No. de cepas que también fueron citotóxicas sobre:		
		CHO	HT-29	VERO
CHO	29	---	8 (28)	17 (59)
HT-29	16	8 (50)	---	7 (44)
VERO	31	17 (55)	7 (23)	---

TABLA 8.

NEUTRALIZACION DE CITOTOXINAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE Shigella y Salmonella CON ANTITOXINAS CONTRA TOXINAS DE COLERA Y B DE C. difficile.

Anticuerpo	Neutralización del efecto en células, No. inhibidas/No. probadas (%):		
	HT-29	VERO	CHO
Anti - CT	4/15 (27)	9/15 (60)	6/8 (75)
Anti - TB	7/15 (47)	0/15 (---)	0/8 (---)

TABLA 9

CAPACIDAD DE INDUCCION DE ACUMULACION DE FLUIDO EN JEJUNO, POR CEPAS DE Shigella y Salmonella AISLADAS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE

Especie	No. de cepas probadas	No. de cepas que causaron acumulación de fluido(*):
<u>S. flexneri</u>	13	10
<u>S. sonnei</u>	6	4
<u>S. boydii</u>	6	5
<u>Shigella spp</u>	25	19 (76%)
<u>S. enteritidis</u>	21	16
<u>S. choleraesuis</u>	4	1
<u>Salmonella spp</u>	24	17 (68%)

(*) La acumulación de fluido se consideró positiva cuando la relación peso/volumen del asa fue > 50 mg/cm.

TABLA 10.

ASPECTO MACROSCOPICO DEL LIQUIDO ACUMULADO EN ASA INTESTINAL
DE RATA, INOCULADA CON CEPAS DE Shigella Y Salmonella.

<u>Enteropat6geno</u>	No. + asas	ASPECTO MACROSCOPICO	
		Acuoso No. + (%)	Viscoso No. + (%)
<u>Shigella</u>	18	4 (22)	14 (78)
<u>Salmonella</u>	17	3 (18)	14 (82)

TABLA 11.

ASOCIACION ENTRE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXICA Y LA CITOTOXICA
DE CEPAS DE Shigella spp Y Salmonella spp.

Género	No. de cepas enterotóxicas	No. de cepas enterotóxicas con efecto citotóxicas sobre No. + (%)		
		CHO	HT-29	VERO
<u>Shigella spp</u>	19	10 (53)	6 (32)	11 (58)
<u>Salmonella spp</u>	17	11 (65)	5 (29)	12 (71)
TOTAL	36	21 (58)	11 (31)	23 (64)

DISCUSION

Shigella es el agente etiológico que con más frecuencia se ha asociado a diarrea con sangre, se han reportado porcentajes de aislamiento de alrededor de 40% (12,27,52,59,60). En este estudio, en niños menores de un año *Shigella* fue poco frecuente (45%) y fue más cercano a lo reportado en niños de 1 a 5 años (33%). Semejante a otros estudios, *S. flexneri* fue la especie más frecuentemente aislada; aunque a diferencia de reportes anteriores, la frecuencia de aislamiento de *S. sonnei* y de *S. boydii* fue similar. *Salmonella* y *Campylobacter* fueron identificados en más del 20% de los casos en niños menores de un año de edad y con mucho menos frecuencia en niños de 1 a 5 años coincidiendo con otros estudios. Como era esperado, *S. enteritidis* y *C. jejuni* fueron las especies más frecuentemente aisladas.

Es interesante el que *Entamoeba histolytica* no se identificó en ningún caso en niños menores de cinco años, lo que sugiere que en niños en nuestra población es un patógeno con menor importancia de la que hasta ahora se le da (23,24). La frecuencia de aislamiento de VTEC incrementó con la edad, siendo más importante en niños mayores de 5 años; los estudios de aislamiento de VTEC en diferentes grupos de edad son escasos, aunque la importancia de este patógeno en diarrea con sangre varía considerablemente de una población a otra (48).

Los resultados anteriores señalan la importancia que tiene la edad del paciente en la sensibilidad a infección sintomática por

uno u otro enteropatógeno. Indican además que la edad es un dato clave, que el médico debe considerar para decidir el tratamiento cuando no cuenta con el auxilio diagnóstico del laboratorio.

Ahora que el uso de soluciones de hidratación oral ha disminuido considerablemente la morbilidad y mortalidad asociados a diarrea aguda acuosa, la diarrea con sangre ha adquirido mayor importancia. El diseño de medidas preventivas y de tratamiento requiere de un conocimiento adecuado de los mecanismos de patogenicidad responsables del daño observado en el huésped.

Se sabe que Shigella y Salmonella son bacterias invasivas y que esta propiedad es un factor de virulencia importante en la patogenicidad de la enfermedad diarreica. Se conocen las bases genéticas (16,54) para la invasividad de Shigella, así como su diseminación de célula a célula.

La invasión a células epiteliales provoca una respuesta inflamatoria y se sugiere que mediadores de ésta, puedan aumentar el daño a la mucosa y actuar como secretagogos (como la histamina y la prostaglandina E₂) para inducir acumulación de líquidos. Cuando Keusch y col (30) describieron secreción de líquidos (8,28,38,39) y cambios inflamatorios en asa intestinal de conejo, se sospechó que la toxina jugaba un papel importante en la diarrea observada en humanos (27,28,40). Sin embargo el posible papel de la toxina de Shiga en la patogénesis de shigelosis continua discutiendose.

Existen pocos trabajos que valoren la producción de la toxina de Shiga en un buen número de cepas de Shigella de las diferentes especies aisladas de humanos con enfermedad diarreica. Hay

evidencias que sugieren que Shigella produce toxinas diferentes a la toxina de Shiga; sin embargo estas no se han caracterizado y poco se conoce de la frecuencia con que diferentes especies de Shigella las producen.

En este trabajo se estudió la actividad de diferentes especies de Shigella y de Salmonella sobre las siguientes líneas celulares; VERO, por ser un modelo donde se tiene bien caracterizada la actividad citotóxica de otras toxinas bacterianas como la toxina Shiga-like producida por algunas cepas de E. coli (10,33,34,42,55). A las células HT-29 por ser una línea celular derivada de carcinoma de colon humano, siendo un modelo celular que más se acerca a la realidad (49), y a las células CHO porque es donde se tiene bien caracterizado el efecto producido por las enterotoxinas clásicas como de Vibrio cholerae y E. coli (22,51). Se encontró que cepas de las tres especies de Shigella probadas, causaron efecto citotóxico en las tres líneas celulares. Por los antecedentes con que se cuenta, esperabamos que la mayoría de las cepas de Shigella causaran lisis sobre células VERO por la producción de la toxina de Shiga-like, que se conoce actua inhibiendo la síntesis de proteínas (41,42). A diferencia de lo esperado, encontramos que la mayoría de las cepas de Shigella producen arredondamiento en esta línea celular, lo que sugiere que no producen toxina Shiga, pero si una actividad que arredonda las células. La toxina Shiga inhibe síntesis de proteínas y las células se lisan; la actividad detectada por nosotros es un efecto similar al de toxinas que alteran el citoesqueleto como, Toxina B de C. difficile (62)

usada como control en este estudio. Sin embargo al realizar los ensayos de neutralización de 8 cepas de Shigella que causaron efecto citotóxico en estas células, con antitoxina B de C. difficile ninguna cepa se neutralizó, por el contrario si hubo neutralización de 6 de estas cepas con antitoxina de cólera, lo que nos sugiere que existe relación antigénica de una toxina producida por Shigella y la toxina de cólera. Bartlett (4) al igual que Prado (50) estudiaron la actividad citotóxica de diferentes especies de Shigella en células HeLa; y encontraron una actividad que inhibía la síntesis de proteínas, y esta no fue neutralizada con antitoxina de Shiga, lo que indica que produce toxina(s) diferente(s). El efecto que se observó fue diferente al nuestro.

Hasta ahora no se ha documentado el efecto tóxico de Shigella sobre células CHO. Eiklid y col. (13,44) probaron la sensibilidad de diferentes líneas celulares a la toxina de Shiga, reportando a las células CHO refractarias a esta toxina. Sin embargo en el presente trabajo se encontró que el 56% de las cepas de Shigella causaron efecto tóxico sobre células CHO, lo que nos indica la producción de una toxina diferente a la toxina de Shiga; esta actividad fue producida con mayor frecuencia por cepas de S. flexneri. Nosotros encontramos, que al hacer el ensayo de neutralización de 8 cepas de Shigella que causaron arredondamiento en estas células, 3 fueron neutralizadas con antitoxina de cólera, y 2 de ellas fueron S. flexneri, lo que nos sugiere que estas cepas producen una toxina que tiene alguna relación antigénica con la toxina de cólera.

En el mismo trabajo realizado por Eiklid y col, se reportó la

sensibilidad de las células HT-29 a la toxina de Shiga y encuentran que se inhibe la síntesis de proteínas, pero no indican si hubo cambios morfológicos. Hasta ahora, no se han documentado cambios morfológicos en HT-29 causados por toxina(s) de Shigella. En este trabajo se encontró que el 44% de las cepas de Shigella provocaron arredondamiento de las células, lo que nos sugiere que Shigella esta produciendo una citotoxina que a semejanza de toxina B de C. difficile es capaz de arredondar células HT-29. Nosotros encontramos que de 6 cepas de Shigella con efecto en estas células, 2 se neutralizaron con antitoxina de cólera y 4 fueron neutralizadas con antitoxina B de C. difficile, sugiriendo que las células HT-29 nos detectaron una citotoxina producida por estas cepas que tienen relación antigénica con la toxina B y otra con la toxina de cólera.

Para Salmonella se esperaba que la mayoría de las cepas, produjeran una toxina cholera-like como se ha reportado por varios autores (3,15,52,56) y esto se corroboró ya que el 54% de las cepas de Salmonella causaron elongación sobre células CHO. Baloda y col. (3) documentaron la existencia de otros factores citotóxicos que no son neutralizados por anti-CT ni por anti-LT y que no se unen a GM1 y son producidos por S. enteritidis y S. typhimurium que elongaron, lisaron o causaron alteración morfológica sobre células CHO. Nosotros encontramos que dos cepas de S. enteritidis causaron arredondamiento. Sin embargo los ensayos de neutralización de 8 cepas de Salmonella con efecto citotóxico en estas células, nos demuestran que tres cepas son neutralizadas con antitoxina de cólera lo que nos habla de la

producción de una toxina semejante a la colérica.

El efecto de lisis que se observó en células VERO nos hace suponer que el 13% de las cepas de Salmonella producen una citotoxina semejante a la de Shiga-like u otras citotoxinas como las descritas previamente en S. typhimurium (42) y S. enteritidis (2,3,26,35,36) que inhibieron la síntesis de proteínas en células eucarióticas, como lo hace la toxina de Shiga, y cuya actividad se inhibió con antitoxina de Shiga. Sin embargo existen reportes contradictorios como el de Ashkenazi y col. (2) que estudiaron la actividad citotóxica de 94 cepas de S. enteritidis, 12 cepas de S. typhi y 25 cepas de S. choleraesuis, encontrando que todas las cepas de Salmonella mostrarán algún grado de citotoxicidad, sus estudios de neutralización mostrarán que la actividad fue inmunológicamente distinta de la toxina de Shiga y de las toxinas Shiga-like producidas por E. coli en todas las cepas estudiadas. Los estudios de hibridización con DNA para las toxinas Shiga-like tipo I y tipo II no mostrarán hibridización.

En nuestro estudio se observó que el 63% de las cepas de Salmonella produjeron arredondamiento sobre VERO, lo que nos hace suponer que Salmonella produce otras toxinas, de las que desconocemos su mecanismo de acción, pero que quizás pudieran directa o indirectamente alterar citoesqueleto. Al hacer los ensayos de neutralización con antitoxina de cólera y antitoxina B de C. difficile de 7 cepas de Salmonella que causaron citotóxicidad sobre células VERO, encontramos que tres de estas cepas fueron neutralizadas con antitoxina de cólera lo que apoya que Salmonella produce una toxina que tiene relación antigénica con la toxina de cólera.

La alteración morfológica causada sobre células HT-29 por cepas de Salmonella nos indica que aproximadamente el 21% de estas producen una citotoxina que provoca este efecto sobre células HT-29, aunque el efecto no es detectado tan frecuentemente como cuando se probaron las cepas de Shigella. Lo que nos sugiere que los dos géneros producen toxinas semejantes que pueden ser detectada por esta línea celular; aunque Shigella las produce más frecuentemente. Torres y col. (62) probarón el efecto de las toxinas A y B de C. difficile sobre células HT-29, y encontraron que ambas producen un arredondamiento sobre esta línea celular, que fue similar al efecto que nosotros observamos con cepas de Shigella y Salmonella, lo que sugiere que estas últimas tengan un mecanismo de acción similar. Estos resultados se ven apoyados con los ensayos de neutralización de 9 cepas de Shigella que tuvieron efecto sobre las células HT-29, encontrando que 3 de estas cepas fueron neutralizadas con antitoxina B de C. difficile lo que nos sugiere que Shigella produce una toxina que tiene relación antigénica con la toxina B, que hasta donde sabemos no se ha documentado, sobre esta línea celular también se encuentra el efecto de una toxina producida por 2 cepas de Salmonella que fue neutralizada con antitoxina de cólera.

Comparando los resultados obtenidos con cepas de Shigella y de Salmonella, observamos que Salmonella produce una toxina que causa elongación sobre CHO más frecuentemente que Shigella; mientras que Shigella produce más frecuentemente una toxina que provoca arredondamiento sobre esta línea celular. Contrario a lo esperado, sobre células VERO , muy pocas cepas tanto de

Shigella como de Salmonella produjeron una toxina Shiga-like, y presentaron con mayor frecuencia, sobre todo Salmonella, una toxina que provoca arredondamiento sobre estas células.

Cuando se analizó la posible asociación entre la actividad citotóxica de una misma cepa en las tres líneas celulares se encontró que las células HT-29 están detectando, una citotoxina producida tanto por Shigella como por Salmonella que no es detectada por las células CHO y VERO y es una actividad no descrita hasta ahora; (neutralizada con antitoxina B de C. difficile). La actividad observada sobre células CHO muestra asociación significativa con la observada en VERO, lo que sugiere que puede tratarse de la misma actividad (neutralizada con antitoxina de cólera).

Con respecto a su capacidad enterotóxica en intestino, todas las especies de Shigella y Salmonella produjeron acumulación de líquido en asa ligada de rata, lo que nos indica que ambos géneros producen una toxina con actividad enterotóxica. El 76% de las cepas de Shigella causaron acumulación de fluido en intestino mientras que solo el 8% causaron lisis en células VERO, lo que sugiere que esta actividad enterotóxica no es debida a la toxina de Shiga; una proporción importante de la actividad de estas cepas sobre células CHO ó VERO fue neutralizada con antitoxina de cólera por lo que quizá la actividad en intestino sea inducida por una toxina semejante a toxina de cólera.

En Salmonella sigue habiendo contradicción en la producción de enterotoxina(s) por sus diferentes especies, siendo difícil de detectar y de reproducir en un solo modelo, posiblemente porque

Salmonella produce niveles bajos de enterotoxina(s), cuando es cultivada en caldo por medios convencionales (3). No es sorprendente además notar que los reportes por los diferentes laboratorios sobre la detección de enterotoxina(s) por Salmonella no correlacionan (3), habiendo controversia entre los resultados obtenidos por cepas de una misma especie donde se tiene bien documentada su virulencia y la capacidad de inducir secreción de líquido cuando son inoculadas en asa ileal de conejo. Wallis y col (66) probaron 6 cepas de S. typhimurium, inocularon el microorganismo completo en diferentes asas ileales de conejos y encontraron resultados variables para inducir acumulación de líquido por una misma cepa, de estas observaciones concluyeron que la ocurrencia de resultados negativos con algunas asas y conejos, indican la variabilidad de la prueba de asa ileal de conejo para los ensayos de enterotoxina. No es claro si tal variabilidad es debida a: 1) que la cantidad de enterotoxina esta cerca de el umbral de dectección en asa ligada de rata. 2) que la prueba tiene variación biológica inherente y 3) que ciertos conejos son inmunes a los efectos secretorios de la enterotoxina por virtud de previas exposiciones a S. typhimurium. Nuestro modelo empleado de asa intestinal de rata para medir el efecto enterotóxico de las cepas de Salmonella y Shigella fue sensible y reproducible, para el número de cepas que se estudiarón (25 de Shigella y 24 de Salmonella), probandose cada cepa por duplicado empleando diferentes asas y diferentes ratas, obteniendose resultados muy similares.

Aunque no realizamos estudios histológicos, el aspecto

macroscópico del fluido acumulado en las asas, indirectamente nos dice si hubo daño o no a pared intestinal. El aspecto viscoso del contenido y la presencia de moco en el líquido acumulado en las asas intestinales provocado por la mayoría de las cepas de *Shigella* y de *Salmonella* nos sugiere que la(s) toxina(s) produce(n) daño a la mucosa intestinal.

Esta bién documentado que la toxina de Shiga es una proteína localizada en el espacio periplásmico y es liberada al medio de cultivo después de que la célula muere (21). La toxina es producida durante la fase de desarrollo logarítmico, motivo por el cual en la mayoría de los trabajos, prueban filtrados de extractos sonicos o concentrados de los cultivos bacterianos para ver la actividad citotóxica de *Shigella* y *Salmonella* con el fin de obtener la mayor cantidad de toxina asociada a la bacteria. En este trabajo probamos los sobrenadantes de los cultivos bacterianos obtenidos por centrifugación y filtración con la intención de valorar principalmente productos tóxicos que la bacteria exporta (exotoxinas). Las actividades citotóxicas y enterotóxicas descritas en este trabajo estuvieron presentes en sobrenadante, observando que produjeron efecto en las tres líneas celulares aquí empleadas, lo cual nos sugiere que hubo toxina(s) excretada(s) por la bacteria, y producida en suficientes cantidades como para detectar su efecto.

Hasta ahora son pocos los estudios que nos correlacionan la actividad citotóxica y la enterotóxica provocada por una misma cepa. Wallis y col (66) no encontraron correlación entre la

toxicidad in vitro y la capacidad del microorganismo completo para inducir acumulación de líquido en asa intestinal de conejo. Los resultados observados en células CHO y células VERO y asa intestinal de rata, nos dicen que existe asociación entre la actividad citotóxica y la actividad enterotóxica producida por las cepas de Shigella y de Salmonella. Pero esta asociación no se encuentra cuando se prueban las cepas sobre células HT-29, lo que nos hace suponer que: estas células nos están detectando una toxina diferente a la detectada por CHO y VERO y que la actividad detectada en HT-29 no tiene efecto en asa ligada de rata. No podemos descartar la posibilidad de que esta citotóxina también cause hipersecreción en intestino, pero que se necesite una concentración mayor a la utilizada para la que se manifieste.

BIBLIOGRAFIA

1. A Manual for the treatment of acute diarrhoea: for use physicians and other senior health workers. (1984), Geneva. SW. Tzerland: World Health Organization Publication No. WHO/CDD/SER/80. 2 Re. 1.
2. Ashkenazi S, Cleary G, Murray BE, Wanger A and Pickering LK. 1988. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect Immun.* 56: 3089-3094.
3. Baloda SB, Faris A, Krovacek K and Wadstrom T. 1983. Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Toxicon.* 21: 785-796.
4. Bartlett III AV, Prado D, Cleary TG and Pickering LK. 1986. Production of Shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *J Infect Dis.* 154: 996-1002.
5. Brown JE, Echeverria P and Linberd A. 1991. Digalactosyl-containing glycolipids as cell surfaces receptors for shiga toxin of *Shigella dysenteriae* 1 and related cytotoxins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis.* 13 (suppl 4): S298-303.
6. Bryant HE, Athar MA and Pai CH. 1989. Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infection in an urban community. *J Infect Dis.* 160: 858-864.
7. Black RE, Lopez de Romaña G, Brown KH, Bravo N, Granados OB and Creed HK. 1989. Incidence and ethiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. *Am J Epidem.* 129: 785-799.
8. Butler T, Speelman P, Kabir I and Banwell J. 1986. Colonic dysfunction during shigellosis. *J Infect Dis.* 154: 817-824.
9. Cravioto A, Reyes ER, Ortega R, Fernández G, Hernández R and López D. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of live. *Epidem Inf.* 101: 123-134.
10. Chart H, Scotland SM and Rowe B. 1987. Production of Vero cytotoxin by strains of *Escherichia coli* as related to the availability of iron. *FEMS Microbiol.* 48: 385-390.
11. Donohue-Rolfe A, Acheson DWK and Keuch GT. 1991. Shiga Toxin: Purification, structure, and function. *Rev Infect Dis.* 13: (suppl 4): S293-297.
12. Echeverria P, Sethabutr O and Pitarangsi C. 1991.

Microbiology and diagnosis of infections with *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Rev Infect Dis. 13 (suppl 4): S220-225.

13. Eicklid K and Olsnes S. 1980. Interaction of *Shigella shigae* cytotoxin with receptors on sensitive and insensitive cells. J Recept Research. 1: 199-213.

14. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T and Igarashi K. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. Eur J Biochem. 171: 45-50.

15. Finkelstein RA, Marchlewics BA, McDonald RJ and Boesman-Finkelstein M. 1983. Isolation and characterization of a cholera-related enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. FRMS Microbiol Lett. 17: 239-241.

16. Finlay BB and Falkow S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol Rev. 53: 210-230.

17. Flores J, Grady GF, McIver J, Witkum P, Beckman and Sharp GW. 1974. Comparison of the effects of enterotoxins of *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* on the adenylate cyclase system of the rabbit intestine. J Infect Dis. 130: 374-379.

18. Giannella RA, Formal SB, Damin GJ and Collins H. 1973. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum. J Clin Invest. 52: 441-453.

19. Giono S. 1979. Conservación y mantenimiento de microorganismos. Bioquim. II (14): 379-382.

20. Gracey M. 1989. Bacterial causes of acute and chronic diarrhea in infants and children. En Leberthal E (ed) Textbook of Gastroenterology and Nutrition in infancy. 2a. Raven Press Ltd., New York.

21. Griffin DE and Genski P. 1983. Release of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 by Polymixin B. Infect Immun. 40: 425-428.

22. Guerrant RL, Brunton LL, Schmitman TC, Rebhun LI and Gilman AG. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect Immun. 10: 320-327.

23. Guiscafre H, González S, Parra R, Lemus H, Alvarez T, Guiscafre J and Muñoz O. 1988. III Etiology and clinical picture of the cases studied. Arch Invest Med. 19: 361.

24. Instituto Mexicano del Seguro Social: Informe estadístico anual, 1986. Departamento de Medicina Preventiva. (1987), México.

25. Jacewicz M, Feldman HA, Donohue-Rolfe A, Balasubramanian K and Keusch GT. 1989. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XIV. Analysis of Shiga toxin receptors on cloned HeLa cells. J Infect Dis. 159: 881-889.
26. Ketyi I, Pacsa S, Emody L, Vertenyi A, Kocsis B and Kush B. 1979. *Shigella dysenteriae* 1-like cytotoxic enterotoxins produced by *Salmonella* strains. Acta Microbiol Academ Sci Hung. 26: 217-223.
27. Keusch GT, Bennish ML. 1989. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. Pediatr Infect Dis. 8: 713-719.
28. Keusch GT, Donohue-Rolfe A and Jacewicz M. 1982. *Shigella* toxin(s): Description and role in diarrhea and dysentery. Pharmac Ther. 15: 403-438.
29. Keusch GT, Donohue-Rolfe A and Jacewicz M. 1985. *Shigella* toxin and the pathogenesis of shigellosis. Microbial toxins and diarrhoeal disease. Pitman, London Ciba Foundation Symposium 112. pp 193-214.
30. Keusch GT, Grady GF, Takeuchi A and Sprinz H. 1972. The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. II. Enterotoxin-induced acute enteritis in the rabbit ileum. J Infect Dis. 126: 92-95.
31. Keusch GT and Jacewicz M. 1977. The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. VI. Toxins and antitoxins in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* infections in humans. J Infect Dis. 153: 552-556.
32. Keusch GT, Jacewicz M, Mobassaleh M and Donohue-Rolfe A. 1991. Shiga toxin: Intestinal cells receptors and pathophysiology of enterotoxic effects. Rev Infect Dis. 13 (suppl 4): S304-310.
33. Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S and Speirs JI. 1978. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. Infect Immun. 20: 575-577.
34. Konowalchuk J, Speirs JI and Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 18: 775-779.
35. Koo FC and Peterson JW. 1983. Cell free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells. Toxicol. 21: 309-320.
36. Koo FC, Peterson JW, Houston CW and Molina NC. 1984. Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. Infect Immun. 43. 93-100.
37. Lange S. 1982. A rat model for an *in vivo* assay of enterotoxic diarrhea. FEMS Microbiol. 15: 239-242.

38. Mathan M and Mathan VI. 1991. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. Rev Infect Dis. 13 (suppl 4): S314-318.
39. McIver J, Grady GF and Keusch GT. 1975. Production and characterization of exotoxin(s) of *Shigella dysenteriae* type 1. J Infect Dis. 131: 559-566.
40. Mobassaleh M, Donohue-Rolfe A, Jacewicz M, Grand RJ and Keusch GT. 1988. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: Evidence for a developmentally Regulated glycolipid receptor for *Shigella* toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. J Infect Dis. 157: 1023-1031.
41. O'Brien AD and Holmes RK. 1987. Shiga and shiga-like toxins. Microbiol Rev. 51: 206-220.
42. O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR and Formal SB. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis. 146: 763-769.
43. O'Brien AD, Thompson HR, Genski P, Doctor BP, Formal SB. 1977. Biological properties of *Shigella flexneri* 2A toxin and its serological relationships to *Shigella dysenteriae* 1 toxin. Infect Immun. 15: 796-798.
44. Olsnes S, Riklid K and Jonsen J. *Shigella shigae* cytotoxin. isolation, characterization and interaction with cells. J Biol Chem.
45. Pai CH. 1988. Epidemiology of sporadic diarrhea to Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. J Infect Dis. 157: 1054-1057.
46. Pai CH, Gordon R, Sims HV, Bryan LE. 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Clinical epidemiological and bacteriologic features. Ann Intern Med. 101: 738-742.
47. Pal T and Hale TL. 1989. Plasmid-associated adherence of *Shigella flexneri* in a HeLa cell model. Infect Immun. 57: 2580-2582.
48. Parra R, Torres LJ, Camorlinga PM, Giono S, González AS, Muñoz O. 1991. Frequency of identification of cytotoxic strains of *Escherichia coli* in cases of diarrhea from rural and urban communities. Arch Inv Med. 22: (in press).
49. Pinto M, Appay MD, Simmon-Assman P, Drachopoli N, Fogh J and Ziweibaum A. 1991. Enterocytic differens. 13 (suppl 4): S285-292.
50. Prado D, Cleary TG, Pickering LK, Ericsson CD, Bartlett III AV, Dupont, HL and Johnson PC. 1986. The relation between

- production cytotoxin and clinical features in shigellosis. J Infect Dis. 154: 149-155.
51. Robertson DC, McDonel JL and Dorner F. 1985. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Pharmac Ther. 28: 303-339.
52. Ronsmans C, Bennish ML and Wierzba T. 1988. Diagnosis and management of dysentery by community health workers. Lancet. 3: 552-555.
53. Sandefur PD and Peterson JW. 1977. Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. Infect Immun. 15: 988-992.
54. Sansonetti PJ. 1991. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. Rev Infect Dis. 13 (suppl 4): S285-292.
55. Skirrow MB. 1987. A demographic survey of *Campylobacter Salmonella* and *Shigella*-infections in England. Epidem Inf. 99: 647-657.
56. Speirs JI, Stavric S and Konowalchuk J. 1977. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. Infect Immun. 16: 617-622.
57. Stephen J, Wallis TS, Starkey WS and Candy DC. 1985. Salmonellosis: in retrospect and prospect. Microbial toxins and diarrhoeal disease. Pitman, London (Ciba Foundation Symposium 112) pp 175-192.
58. Takeuchi A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. Am J Pathol. 50: 109-136.
59. Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, Pitarangsi C, Leksomboon U, Blacklow NR, Rowe B, Gross R and Cross J. 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J Clin Microbiol 26: 1362-1366.
60. Taylor DN, Echeverria P, Pal T, Sethabutr O, Saiborisuth S, Sricharnorn S, Rowe B and Cross J. 1986. The role of *Shigella* spp., enteroinvasive *Escherichia coli*, and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. J Infect Dis. 153: 1132-1138.
61. Torres LJ. 1991. Fisiopatogenia de la diarrea aguda infecciosa. En: Games Eternod y Solorzano SF (ed). Guia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Méndez & Méndez. México. pp. 216-221.
62. Torres LJ, Camorlinga PM and Muñoz O. 1992. Sensitivity in culture of epithelial cells from rhesus monkey kidney and human colon carcinoma to toxins A and B from *Clostridium difficile*. Toxicon: (in press).

63. Torres LJ, Jennische E, Lange S and Lonbroth I. 1990. Enterotoxins from Clostridium difficile diarrheogenic potency and morphological effects in the rat intestine. Gut: 31: 781-785.

64. Torres LJ and Lonbroth I. 1988. Purification and characterization of two forms of toxin B produced by Clostridium difficile. FEB. 223: 417-420.

65. Vásquez V, Arredondo M, Trujillo F y Cravioto A. 1987. Relación entre aislamiento de cepas de Escherichia coli O157:H7 y presencia de colitis hemorrágica en niños. Bol Med Hosp Inf Mex. 44: 442-447.

66. Wallis TS, Starkey WG, Stephen J, Haddon SJ, Osborne MP and Candy DC. 1986. Enterotoxin production by Salmonella typhimurium strains of different virulence. J Med Microbiol. 21: 19-23.

67. World Health Organization: Manual for Laboratory investigations of acute enteric infections. Documento WHO/CDD/83. 3, rev 1. (1987), Geneve.