

82  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VALIDACION DEL MICROMETODO INNSZ\* PARA  
IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGENA (EPEC).

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A I

MIRIAM GUADALUPE GONZALEZ VARELA

\* INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN



México, D. F.

1992

TESIS CON  
FALLA DE ORDEN



## **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

	Pág.
RESUMEN .....	i
ABREVIATURAS .....	iii
I. LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE: GENERALIDADES.....	1
II. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	
A) CLASIFICACION.....	3
B) CARACTERISTICAS FISICAS.....	4
1. ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA.	
2. FACTORES DE VIRULENCIA.	
C) CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.....	11
D) MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	13
III. <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGENA (EPEC).	
A) GENERALIDADES.....	15
B) METODOS DE IDENTIFICACION.....	18
1. SEROLOGICOS.	
2. PRUEBAS BIOQUIMICAS.	
a) METODO CONVENCIONAL.	
b) MICROMETODOS.	
IV. MICROMETODO INNSZ.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
VI. MATERIAL Y METODO.....	26
VII. RESULTADOS.....	33
VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	50
IX. APENDICE.....	58
X. BIBLIOGRAFIA.....	71

## R E S U M E N

En la actualidad en algunos laboratorios clínicos mexicanos utilizan equipos miniaturizados para la identificación de algunos microorganismos patógenos diarréicos. EPEC es un enteropatógeno asociado con las primeras enfermedades diarréicas y continúa siendo un importante agente causal de la gastroenteritis infantil principalmente en los países en desarrollo. Sus mecanismos de patogenicidad están relacionados a la adherencia a la mucosa del intestino, importante en la inducción de la enfermedad. Estos microorganismos son clásicamente identificados por pruebas serológicas por sus antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K); sin embargo, su patrón bioquímico parece ser que no ha sido evaluado en la clasificación de este grupo, lo que fue motivo de este estudio, el utilizar un grupo de bioquímicas en un ensayo miniaturizado de un amplio espectro de información que determine las características propias de esta bacteria. Con la validación del Micrométodo se pretende: Biotipificar a EPEC en base a la utilización de los diferentes carbohidratos y el determinar la aplicación y reproducibilidad del mismo.

El Micrométodo está formado por un total de 28 sustratos de los cuales 5 fueron incluidos en esta modificación\*: Adonitol, Arabinosa, Glucosa, Inositol, Manitol, Rafinosa, Ramnosa, Sacarosa, Sorbitol, Arginina, Lisina, Ornitina, Fenilalanina, Indol, Esculina, H<sub>2</sub>S, Urea, ONPG, Voges Proskauer, Citrato, Malonato, Nitrato, Celobiosa\*, Dulcitol\*, Lactosa\*, Salicina\*, Sorbosa\* y Xilosa\*; todos se prepararon con la optimización a la técnica reportada por Giraud en 1987, en microplacas de 96 pozos; posteriormente los sustratos se liofilizaron y se almacenaron en condiciones de desecación a -4°C.

Se estudió con un total de 140 cepas de *E. coli* obtenidas en el Depto. de Infectología, pertenecientes a una cohorte de niños menores de 2 años de edad. Cada cepa fué cultivada en agar Soya-Triptícase y se incubó a 37°C / 24h. Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril para obtener una turbidez equivalente a  $2 \times 10^8$  UFC/ml (Ajustando al estandar de Mc Farland). Los sustratos se rehidrataron con la suspensión bacteriana adicionando 100  $\mu$ l en cada pozo y con repetición por sustrato-placa. Se incubaron a 37°C durante 24h. y posteriormente se realizó dos veces de manera independiente la lectura de las microplacas. Los datos obtenidos fueron registrados en la computadora empleando, la prueba de  $\chi^2$  y el programa de Cluster de SPSS para el análisis de los datos; los biogrupos fueron finalmente definidos de acuerdo a la utilización de 15 sustratos: 12 carbohidratos y 3 aminoácidos.

La identificación por el micrométodo INNSE modificado y el macrométodo fué casi idéntica, con un alto índice de correlación ( $r = 0.96$ ) al ser comparados. La reproducibilidad del micrométodo, fué alta en los diferentes ensayos realizados; en la preparación de los sustratos y en la interpretación de las reacciones bioquímicas.

En el análisis de grupos, las cepas de EPEC, ETEC y No EPEC, no ETEC conformaron 4,2 y 3 biogrupos respectivamente, algunos además presentaron sub-biogrupos. En los que predominó el patrón de adherencia difusa en células HEp-2; sin embargo, en los biogrupos IV de EPEC y II del grupo no EPEC, no ETEC la adherencia localizada se presentó con una mayor frecuencia.

El micrométodo modificado encontró diferentes patrones bioquímicos para *E. coli*, los cuales permitieron la biotipificación mediante el análisis de Cluster y la asociación con la adherencia; además, se identificaron cuatro sustratos: rafinosa, sacarosa, sorbitol y ornitina, que favorecieron la diferenciación entre los grupos de EPEC y ETEC.

**Abreviaturas más empleadas.**

ABT: azul de bromotimol  
Ac: Anticuerpo  
AD: Adherencia Difusa  
ADH: Arginina deshidrolasa  
ADON: Adonitol  
Ag: Antígeno  
Ag H: antígeno flagelar  
Ag K: antígeno capsular  
Ag O: antígeno somático  
ARA: Arabinosa  
Biog: Biogrupos  
Sub-biog: Sub-biogrupos  
CFA: Factores antigénicos de colonización  
CEL: Celobiosa  
CIT: Citrato  
DUL: Dulcitol  
e<sup>-</sup>: electrones  
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica  
EIEC: *E.coli* enteroinvasiva  
ELISA: Ensayo de inmunoadherencia  
EPEC: *E.coli* enteropatógena  
ESC: Esculina  
ETEC: *E.coli* enterotoxigénica  
FEN: Fenilalanina desaminasa  
GLU: Glucosa  
HeLa: Línea celular derivada de carcinoma de cervix  
HEp-2: Línea celular derivada de carcinoma epidermoide de laringe

IND: Indol  
INOS: Inositol  
LAC: Lactosa  
LDC: Lisina descarboxilasa  
LT: Toxina termo-lábil  
Macro: macrométodo ó Bioquímica convencional  
MAL: Malonato  
MAN: Manitol  
Micro: micrométodo  
NIT: Nitrato  
RAF: Rafinosa  
RAMN: Ramnosa  
SAC: Sacarosa  
SALI: Salicina  
SOR: Sorbitol  
SORB: Sorbosa  
ST: toxina termo-estable  
VP: Voges-Proskauer  
X<sup>2</sup>: Prueba de Chi cuadrada  
XIL: D-Kilosa  
UFC: unidades formadoras de colonia  
(+): prueba positiva  
(-): prueba negativa

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

### I. LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

*Escherichia coli* pertenece a la Familia Enterobacteriaceae, la cual comprende un grupo heterogeneo de bacterias, que presenta las siguientes características: en su mayoría son bacilos Gram negativos que miden aproximadamente 1.0 a 2.0 x 0.5µm; hay especies móviles y no móviles; crecen en medios con peptona o extracto de carne sin la adición de cloruro de sodio u otros suplementos; son organismos aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas; presentan la prueba de catalasa positiva y oxidasa negativa y reducen los nitratos a nitritos (14,17,29).

Los miembros de esta familia presentan una amplia distribución, pues se les encuentra en las plantas, el suelo, el agua, y como colonizadores del tracto intestinal del hombre y animales (14,17,31). Algunos son de importancia médica como: *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.* y algunos tipos de *Escherichia coli* que son considerados patógenos entéricos (16,17); entre los no patógenos, generalmente se menciona a *Citrobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.* y *Proteus sp.*, los cuales ocasionalmente pueden estar asociados con casos o brotes de enfermedad y naturalmente pueden desempeñar un papel patógeno mas activo cuando se localizan fuera del tracto gastrointestinal. Estas bacterias estan asociadas con muchos tipos de infecciones en el hombre, incluyendo abscesos, pneumonia, meningitis, septicemia e infecciones gastrointestinales y del sistema genitourinario.

La clasificación de las Enterobacterias está basada inicialmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del

cromosoma bacteriano. Estas enzimas involucradas en el metabolismo, pueden ser evidenciadas en medios especiales usando técnicas de cultivo *in vitro*, en los que al sustrato sobre el cual actúan las enzimas se le incorpora un sistema indicador para manifiestar la degradación del sustrato o la presencia de un metabolito específico (16,28,31,37,48).

En la actualidad han ocurrido cambios en la nomenclatura y clasificación de la familia, basados en estudios genéticos por hibridación de DNA y características fenotípicas, incluyendo características bioquímicas y de susceptibilidad antimicrobiana. Se conocen 20 géneros y más de 100 especies conformando la familia (16,17,28,48).

La familia Enterobacteriaceae está conformada por dos grupos de bacilos: no coliformes y coliformes. Estos últimos fueron descritos por Escherich en 1885 como *Bacterium coli commune* y *Bac. lactis aerogenes*. Estudios posteriores mostraron que mediante vías fermentativas se podían observar otros patrones de metabolismo. Así, las *Bacterias coli communior fermentaban la sacarosa* y las *Bacterias coli communis (o commune)* no lo hacían; por otro lado otro tipo de *Bacterias coli anaerogenes fermentaban varios carbohidratos y producían gas*. Dentro de este grupo, se clasificaban los microorganismos de acuerdo a la reacción que presentaban ante cuatro pruebas bioquímicas: Formación de Indol, Reacción en caldo Rojo de Metilo y Voges Proskauer, y habilidad de utilizar el Citrato como única fuente de Carbón; pruebas cuyo orden y denominación es "IMViC". Estas reacciones dan 16 posibles combinaciones; donde el clásico bacilo del colon, *Escherichia (Bacterium) coli*, presenta un patrón: I(+), M (+), V (-), iC (-); a dichas pruebas (6,40).

## II. ESCHERICHIA COLI

### A) CLASIFICACION (Deacuerdo Bebergey, 1957 (28):

Reino : Procaryotae  
División: Bacteriae  
Familia : Enterobacteriaceae  
Tribu : Escherichiaceae  
Género : *Escherichia*  
Especie : *E. coli*.

La Tribu Escherichiaceae incluye también al género *Shigella*; debido a que bioquímicamente son muy parecidos. Para diferenciarlos se pueden utilizar medios de cultivo diferenciales tales como: Mac Conkey y Azul de Metileno Eosina entre otros. Sin embargo, hay cepas de *E.coli* fermentadoras lentas de la lactosa y no móviles que pueden confundirse con *Shigella*.

*Shigella* es un género con cuatro especies bien definidas (*Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* y *Sh. boydii*) y un número importante de serotipos, este género fué denominado por K. Shiga quien lo descubrió en 1898. Incluye organismos que causan la disenteria bacilar caracterizada por cólicos, dolor abdominal y diarrea con moco y sangre (32,40); tienen la capacidad de invadir células de la mucosa gástrica, causando su muerte y destrucción en el intestino. La especie *Sh. dysenteriae*, es la responsable de los cuadros clínicos diarréicos con alto riesgo de gravedad.

El género *Escherichia* tiene una sola especie *E.coli*, originalmente denominado *Bacillus coli commune* por Escherich en el año de 1885 (6).

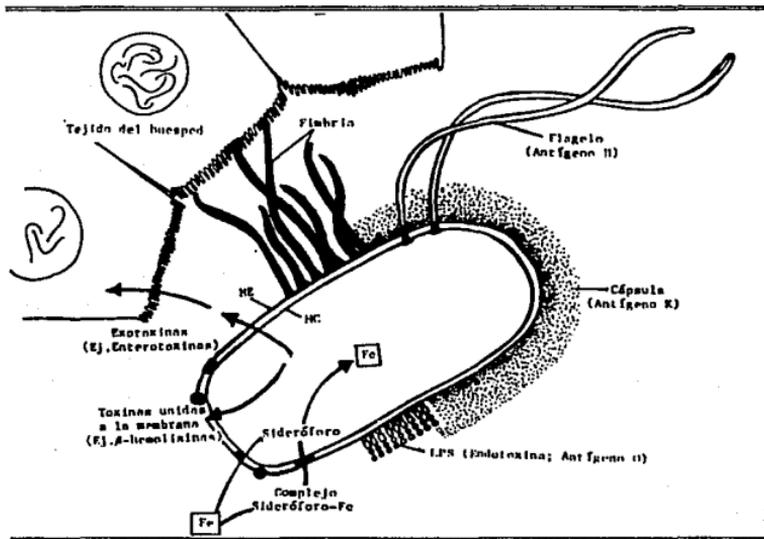
*E. coli* es una bacteria gram negativa aerobia o anaerobia facultativa, habitualmente inocuo habitante del tracto gastrointestinal del hombre, colonizado poco despues de su

nacimiento y persistiendo en él durante toda la vida, como parte de la flora normal. Es el procariota estudiado con más intensidad y, probablemente, la mejor comprendida de cualquier clase de células. Es importante como indicador de contaminación fecal en aguas residuales porque es abundante en heces y resistente a condiciones ambientales extremas, además de que puede ser detectada fácilmente con métodos rutinarios.

#### **B) CARACTERISTICAS FISICAS.**

Las células de *E. coli* tienen forma de bacilo, midiendo alrededor de 2µm de longitud y algo menos de 1µm de diámetro. Se reproducen asexualmente, dividiéndose cada 20 a 30 min. a 37°C en condiciones óptimas. Poseen pared celular protectora, una membrana en el interior de la pared que circunda al citoplasma y un cuerpo nuclear que contiene una sola molécula de ADN de doble cadena circular. En *E. coli* el material genético no está rodeado por ninguna membrana, característica presente en todas las procariotas. Además de la porción principal de ADN en el nucleóide, el citoplasma de la mayoría de las bacterias contiene segmentos circulares de DNA muy pequeños (Plásmidos), los cuales en la actualidad son de gran importancia en estudios bioquímicos, de ingeniería genética y patogenicidad (33).

La Pared celular de *E. coli* está recubierta por una capa o capsula de una sustancia viscosa, a través de la cual exponen estructuras pilosas cortas (fimbrias o pili), importantes como adhesinas o sitios de unión de la bacteria a sitios específicos de la célula huésped; los pili sexuales participan en la conjugación en bacterias que contienen plásmidos conjugativos. Las variedades de *E. coli* y de otras bacterias móviles, poseen uno o varios flagelos largos que funcionan como impulsores de ésta a través de su entorno acuoso.



**Fig.1. Representación esquemática de la interacción entre *E.coli* y el tejido hospedero. Estructuras bacterianas que son consideradas importantes en la patogenicidad. Fe: hierro; ME: membrana externa; MC: membrana citoplasmática; LPS: lipopolisacáridos. (De Eisentein y col,1989)**

## 1. ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA.

*E. coli* presenta una estructura antigénica similar al de las enterobacterias en general. La clasificación de estas cepas por sus perfiles antigénicos en serotipos, se realiza mediante el uso de antisueros que reaccionan con los Antígenos (Ags) de dicha bacteria.

Existen tres clases de Antígenos: 1) Flagelar (Ag H), 2) Capsular (Ag K) y 3) Somático (Ag O). En *E.coli*, la combinación de éstos determina los diferentes serotipos que la especie presenta.

El Ag H es termolábil y esta formado de proteínas, se encuentra en el flagelo bacterial y es serológicamente distinto en varias cepas, aún en aquellas que presentan una sola especie. Se considera como dominante sobre el Ag O, por lo que tiene que ser desnaturalizado para detectar a este último.

Las reacciones de Aglutinación vistas con el Ag H son más rápidas en revelar que con el Ag O. Una particular propiedad del anticuerpo (Ac) específico anti-H, es que inmovilizan el flagelo bacterial al que los Acs son directos. Esta reacción inmunológica es probablemente importante en atenuar la virulencia de las bacterias no móviles, particularmente en tracto gastrointestinal y urinario.

El Ag K es sólo parcialmente de estable a térmico, generalmente esta compuesto de polisacaridos y ocasionalmente puede estar envuelto por proteínas o fimbrias. Su presencia puede inhibir la reacción del Ag O. En *E.coli* los antígenos K son agrupados en tres categorías: L, A y B.

El Ag O es absolutamente termoestable, esta compuesto por lipopolisacaridos constituyendo una parte integral de la pared celular. La clásica reacción para demostrar su presencia, es la aglutinación con el antisuero tipo específico posterior a una

desnaturalización de los Ags H y K. Sin embargo, los tipos antigénicos O presentan reacciones cruzadas entre varios géneros de la familia Enterobacteriaceae. Así, muchos serogrupos de *E. coli* muestran una reacción cruzada con miembros de *Shigella* (14). Se sabe también que algunos Ags O de *E. coli* tienen reacción cruzada con *Vibrio* en algunos grupos sanguíneos humanos, y con otros Ags de superficie celular en tejidos de mamíferos.

Estudios realizados muestran que varios, si no es que todos los serogrupos O representan distintas clonas de la bacteria. Esta relación ha sido bien estudiada en *E. coli*, donde algunas cepas con un serogrupo conocido comparten otras numerosas propiedades bioquímicas también. Estudios epidemiológicos han demostrado sorprendentes asociaciones entre ciertos serotipos O e infecciones clínicas; ésto sugiere que los serogrupos O pueden servir como un marcador para un agrupamiento específico de propiedades de virulencia necesitadas para unos ciertos procesos infecciosos. Así, algunos serogrupos poseen factores de Adherencia, mientras que otros poseen factores de colonización y producen toxinas .

## 2. FACTORES DE VIRULENCIA

Desde el punto de vista clínico, en una enfermedad infecciosa, la virulencia de los microorganismos puede ser definida en términos de la naturaleza y severidad de la enfermedad que éstos producen. Para los microbiólogos, hay una perspectiva diferente, que se enfoca en la habilidad del organismo para crecer y multiplicarse en un determinado ambiente; complementando ambos puntos de vista, la Patogenicidad puede ser definida como la capacidad de un gérmen de producir cambios patológicos y, el grado en que esta se presenta determinará la virulencia. Así, la bacteria patógena ocupa un lugar específico (nicho) en el cuerpo humano y por definición, produce enfermedad; de esta manera para definir un microorganismo como patógeno es preciso considerar dos clases de factores específicos hacia el hospedero: Una clase que promueve

inspecciones en el hospedero sin dañarlo asociada a bacterias no patógenas que ocupan el mismo nicho que las patógenas (Ej. Tracto gastrointestinal), y es considerada como factor secundario o auxiliar de los factores de virulencia. Una segunda clase, específicamente relacionada con la enfermedad, asociada con bacterias patógenas y es considerada como factor de virulencia primario. Ambos factores son complementarios para producir la enfermedad, permitiendo al agente patógeno ideal la oportunidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas.

Se conocen como factores auxiliares de virulencia: Las adhesinas en la bacteria, que le permiten adherirse y colonizar la superficie mucosa del intestino; el flagelo como organelo de locomoción; receptores, como el sistema sideroforo que permite la adquisición de nutrientes limitados y por último las cápsulas que bloquean la opsonofagocitosis y por lo tanto el mecanismo inmunológico del hospedero (13,14).

En *E.coli* las adhesinas son organelos indispensables en promover la adherencia de la bacteria a la superficie mucosa, que es el primer paso esencial en la colonización del huésped. Estas se han caracterizado de acuerdo a su patrón antigénico y funcional. Como los Factores Antigénicos de Colonización que principalmente se han estudiado (CFA) I y CFA II que están asociados con gastroenteritis. Recientes estudios sugieren que los CFAs se unen a una sialoglicoproteína. En contraste, otras adhesinas: las fimbrias tipo 1, P y S fueron inicialmente identificadas en base a su habilidad de unirse específicamente a receptores de manosa, digalactosa o sialilgalactosido respectivamente. Epidemiológicamente, las fimbrias P están frecuentemente asociadas con cepas de *E. coli* capaces de producir infección en el tracto urinario, particularmente pielonefritis (10,14) y las fimbrias S se asocian con cepas de *E.coli* recuperadas de neonatos con meningitis.

La Cápsula o Ag K de *E.coli* constituida de polisacaridos y ocasionalmente envuelta con proteínas, actúa de manera protectora y favorece la virulencia bacterial, disminuyendo la habilidad del Anticuerpo (Ac) para unirse a la bacteria y de las células blanco a la bacteria fagocítica. Las propiedades de protección dependen de dos características de la cápsula: 1) Su composición polisacarida las hace más hidrofílicas, lo cual, inhibe fuertemente la fagocitosis por la superficie hidrofóbica de la célula huésped. 2) En su mayoría son relativamente malos inmunogenos y activadores de complemento (14).

Los factores de virulencia tales como las toxinas, pueden producir enfermedad con apoyo de los factores auxiliares de virulencia. Las toxinas en su forma pura interactúan con algunas vías específicas en el hospedero, produciendo una respuesta determinada por una alteración en la viabilidad o fisiología del sistema blanco celular (13).

Las Citotoxinas destruyen a las células, mientras que otras toxinas dañan a todo el organismo en ausencia de muerte celular individual. Se han descrito varias moléculas de citotoxinas de *E.coli*:  $\alpha$ -hemolisinas, que son proteínas de alto peso molecular que pueden ser excretadas y  $\beta$ -hemolisinas que son restos de las uniones celulares. La citotoxicidad de las hemolisinas afecta eritrocitos y aún a los linfocitos, debido a la producción de poros transmembranales. Existe una relativa especificidad al tejido por esas toxinas: las  $\alpha$ -hemolisinas son efectivas citotoxinas de linfocitos, mientras que las  $\beta$ -hemolisinas son capaces de inhibir la fagocitosis y quimiotaxis de neutrófilos.

Una clase diferente de citotoxinas, son aquellas producidas por *E.coli* Enteropatógena, que son muy similares a las producidas por *Shigella dysenteriae* (14).

Las enterotoxinas producidas por *E.coli* Enterotoxigénica actúan a cortas distancias y están asociadas a un determinado tipo celular dado que muestran una conspícua especificidad tisular. Se conocen dos clases de ellas:

a) La endotoxina termo-estable (ST) es una molécula pequeña que pertenece a una familia de polipeptidos de bajo peso molecular (PM: aprox. 1,500 a 2,000 KDa)(20), regulada por el control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos; presenta mayor especificidad al tejido que la toxina termolábil (LT). Causa diarrea leve particularmente en niños, quizá por un mecanismo semejante al de ésta y no es considerada como antigénica ni se han encontrado Ac neutralizantes contra ella.

b) La exotoxina termo-lábil (LT) es una molécula grande (PM: 82,000 KDa.) cuya estructura ASB está dada por una subunidad A y cinco subunidades B (50); se encuentra bajo el control genético de un plásmido transmisible y es adsorbida en los gangliosidos en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado. Es considerada como antigénica que estimula a los AcS neutralizantes en el suero de pacientes infectados con cepas de *E.coli* que la producían; es una toxina virtualmente idéntica a la producida por *Vibrio cholerae*, razón por la cual puede ser neutralizada con los AcS contra ésta.

A diferencia de las citotoxinas, las enterotoxinas se encuentran por lo general en cepas patógenas y están conformadas por lipopolisacáridos (LPS) situados en la membrana externa.

Los plásmidos que portan los genes para la producción de enterotoxina en *E.coli*, pueden portar también genes para la síntesis de Acs específicos de superficie (Ej. K88) que son esenciales para la inserción a las células del epitelio intestinal, lo que constituye una característica importante en la patogénesis potencial de tales microorganismos. Por otro lado, la producción de

enterotoxinas no esta asociada con algún serotipo específico ni con la capacidad de invasión celular; sin embargo, algunos serotipos sí han sido asociados más frecuentemente con la producción de enterotoxinas que los demás.

### C) CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.

*E. coli* es un organismo comúnmente aislado en los laboratorios de microbiología, capaz de crecer y reproducirse en 20 min. dado que sus requerimientos nutricionales son simples bajo condiciones ideales en un medio mínimo con glucosa y sales, en medios enriquecidos (Ej. Agar sangre y Azul de Metileno-eosina) y en algunos medios diferenciales o selectivos. Es un anaerobio facultativo, que fermenta la glucosa, lactosa y otros carbohidratos produciendo ácido o ácido y gas. Algunas cepas son muy similares en su patrón bioquímico a las *Shigellas*, éstas no fermentan lactosa pero pueden ser diferenciadas mediante el uso de otras pruebas (tabla I). Sin embargo, las colonias de *E. coli* parecen ser idénticas entre sí, no distinguiéndose las patógenas de las de flora normal en medios conteniendo lactosa; por lo que se requieren otras técnicas como serotipificación y ensayos de inmunoadherencia (ELISA) para diferenciarlas (17,35). Esto dió pauta a dividir el gran grupo de *E. coli* en base a sus características bioquímicas en Biotipos (Biotipificación), serológicas en serotipos (Serotipificación de los los Ags O, K y H), en base a los Ags de las fimbrias F1-6, a la susceptibilidad a bacteriofagos (fagotipos), a la producción de colicinas y en base a los mecanismos de patogenicidad (34).

Para identificar y diferenciar a *E. coli* de otras Enterobacterias, las pruebas bioquímicas han sido y son una gran herramienta de apoyo en los laboratorios de microbiología. Dichas pruebas comprenden la detección de una gran variedad de enzimas y vías bioquímicas (Ej. el sistema de transporte de electrones y aquellos que participan en el metabolismo de compuestos con carbono

y nitrógeno). Así, las pruebas Reacción Rojo de Metilo (+) y Voges-Proskauer (-), Actividad de Ureasa (-) y Fenilalanina desaminasa (ausente), Producción de ácido sulfhídrico(H<sub>2</sub>S) (-), Citrato como única fuente de carbono (-) y crecimiento en KCN (-) son las más usuales en rutina para su identificación.

Tabla I. Pruebas Bioquímicas que permiten distinguir el grupo *Escherichia-Shigella*, basado en Farmer III y Michael (1991).

Prueba	<i>E.coli</i> Activa	<i>E.coli</i> Inactiva	<i>Shigella</i> . Gpo:A,B,C.	<i>Sh.sonnei</i>
INDOL	98	80	50	0
LISINA	90	40	0	0
ARGININA	17	3	5	2
ORNITINA	65	20	1	98
MOVILIDAD	95	5	0	0
D-GLUCOSA, Gas.	95	5	2	0
LACTOSA	95	25	0	2
SACAROSA	50	15	0	1
DULCITOL	60	40	2	0
SALICINA	40	10	0	0
ADONITOL	5	3	0	0
SORBITOL	94	75	30	2
RAFINOSA	50	15	50	3
L-RANNOZA	80	65	5	75
MALTOSA	95	80	30	90
D-XILOSA	95	70	2	2
ESCULINA	35	5	0	0
CELIBIOSA	75	40	50	25
GLICEROL	75	65	10	15
MUCATO	95	30	0	10
ACETATO	90	40	2	0
ONPG	95	45	2	90

Cada valor representa el porcentaje (%) de la reacción positiva al término de 2 días de incubación a 36°C; la mayoría de estas reacciones positivas ocurre a las 24 hrs. Reacciones positivas después de 2 días no son consideradas.

En la actualidad, las técnicas de fluorescencia de Acs son útiles como pruebas presuntivas para evidenciar cepas enteropatógenas y la aglutinación comprobaría la identificación final. Así, la tipificación serológica es empleada para identificar serotipos en cada uno de los géneros; mientras que la biotipificación nos ayuda a identificar biotipos (Biogrupos) que pertenezcan a un patrón de metabolismo bioquímico común.

#### D) MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Estudios realizados de la patogenicidad de *E.coli* que causa diarrea y colitis, han guiado a la conclusión de que estas cepas pueden causar enfermedad por diferentes mecanismos: Mediante la producción de enterotoxinas, resultando un síndrome similar a cólera en el huésped y, mediante la capacidad de invadir y/o penetrar las células epiteliales, produciendo una disentería similar a Shigelosis (18,29).

Algunos datos sugieren que un cambio de ambiente por el huésped, permite el establecimiento de una nueva flora intestinal, con una predominancia de serotipos (Ej. de *E.coli*) comunes en el nuevo ambiente o lugar, lo cual podría explicar de los muchos casos de diarrea en turistas (29).

*E.coli* fue la primera reportada como agente etiológico de diarrea infantil en los 1920s. En la última década, ésta ha sido reconocida como una de las mayores causas de gastroenteritis asociada con turistas (14).

La infección entérica causada por *E.coli* puede ser debida a una o más de las diferentes variedades o grupos de la bacteria, que operan a través de diferentes mecanismos (34). Estudios realizados en diferentes ciudades muestran que ciertos serotipos (asociados a los Ags O y H) están asociados con esos grupos. Originalmente se

conocen cuatro de estos grupos, los cuales se distinguen por sus características patogénicas (12,34), clínicas y epidemiológicas; además de que cada uno está asociado a un grupo diferente de serotipos O:H.

1. *E.coli* Enteropatógena (EPEC): Grupo comprendido por un número limitado de serotipos específicos, algunos producen toxina similar a la Shiga y otros se asocian con la adherencia a células epiteliales. Este grupo es considerado como la principal causa de diarrea infantil, cuyos mecanismos de patogenicidad son desconocidos (12,17).
2. *E.coli* Enterotoxigénica (ETEC): Grupo pequeño de serotipos que produce enterotoxinas (LT y ST) y coloniza el intestino delgado. Es considerado como agente causal de diarrea en niños y turistas. Se presenta comunmente en ciudades en desarrollo y es raro en lugares industrializados.
3. *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC): Grupo comprendido por cepas que producen una toxina (Verotoxina) semejante a la Shiga de *Shigella dysenteriae*. Han sido asociadas con el síndrome hemolítico-urémico en niños y causa colitis hemorrágica en adultos, recientemente reconocida como infección entérica debida al serotipo específico O157:H7; estas cepas causan diarrea aguda, caracterizada por evacuaciones con abundante sangre producido por la toxina que destruye las células del endotelio vascular del lúmen del intestino (17).
4. *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC): Fué uno de los primeros grupos aislados durante la Segunda Guerra Mundial, cuyos mecanismos de patogenicidad fueron descubiertos varios años más tarde. Estas cepas pertenecen a pocos serotipos y usualmente causan una disentería similar a la

infección por *Shigella*; por su habilidad de invadir y multiplicarse en las células epiteliales, causando la muerte celular y la acumulación de leucocitos Polimorfonucleares, produciéndose así la disentería.

EIEC es un grupo poco común, que puede ser identificado mediante la prueba de Sereny, ELISA y ensayos de DNA, dado la reciente asociación de plásmidos de alto peso molecular con invasividad pueden proveer un marcador útil para la detección de estos organismos.

### III. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENA (EPEC).

#### A) GENERALIDADES.

EPEC fué definida como *E.coli* diarreagénica perteneciente a ciertos serogrupos O y serotipos (O:H tipos) asociados con diarrea infantil (34,49); que usualmente no producen enterotoxinas, ni son de carácter invasivo.

Fué a fines del año de 1940 cuando se encontraron aislamientos de EPEC, enteropatógeno que ha sido reconocido en todo el mundo como agente importante de diarrea infantil epidémica y endémica en los primeros meses de vida (49). Más tarde, disminuye la enfermedad por EPEC en Ciudades desarrolladas y con el descubrimiento de *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *E.coli* Enterotoxigénica (ETEC), se crean considerables dudas acerca del papel que juega EPEC en infecciones entéricas. Posteriormente, se reporta la evidencia de virulencia que EPEC produce y la existencia de algunos serotipos que pueden estar asociados a brotes de diarrea infantil. A principios de 1950, los serogrupos de EPEC: O55, O111 y O127 fueron reportados como productores de diarrea. Más tarde, la lista de serogrupos

epidemiológicamente asociada con enteritis creció, incluyendo aproximadamente 15 miembros del serogrupo O, de los cuales: 26, 55, 111, 119, 125, 126, 127, 128 y 142; eran los más prevalentes.

EPEC es una bacteria patógena más comunmente aislada durante el primer año de vida, mientras que *Shigella sp.* es la más identificada en niños mayores (12,15,35). Estudios realizados en el INNSZ (1990) muestran que EPEC ocupa el tercer lugar entre los principales agentes etiológicos de diarrea aguda en niños menores de cinco años (Tabla II). Sin embargo, en diferentes ciudades de Sudamérica EPEC ocupa un primer o segundo lugar (34,49).

---

Tabla II. PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE DIARREA AGUDA EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS.

---

PATOGENO	FRECUENCIA %
<i>Campylobacter jejuni</i>	16.21
Rotavirus	12.38
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	11.48
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	10.53
<i>Shigella spp.</i>	1.76
<i>Salmonella spp.</i>	0.53
<i>E.histolytica.</i>	1.59
<i>Giardia lamblia</i>	0.17
No identificado	45.65

---

Datos de la clínica de Diarrea del INNSZ (Marzo de 1990).

A pesar de los progresos considerables en la comprensión del síndrome diarréico por *E.coli*, la patogénesis de infección por EPEC no está definida, dado que la infección producida puede atribuirse a otras vías diferentes a la producción de toxinas (LT y ST) o invasividad. Sin embargo, se conocen algunos mecanismos de su patogenicidad (12,34), como son:

1. La adherencia a células HEP-2 y/o HeLa en cultivos *in vitro*, que puede ser de tres tipos:

- a) Adherencia difusa (DA): La bacteria se adhiere a toda la superficie celular (serogrupos O: 18, 44, 114, 125, 126 y 158).
- b) Adherencia localizada (LA): La bacteria se adhiere en áreas bien circunscritas de la superficie celular (Serogrupos O: 55, 86, 111, 119, 127, 128 ab y 142).
- c) Autoagregativa: Las bacterias forman pequeñas agrupaciones sin adherirse a la superficie celular.

El Dr. Scotlan ha realizado estudios sobre los mecanismos de adherencia de EPEC a célula HEP-2 en presencia de D-manosa, lo que no ocurre con cepas de ETEC; él concluye que esta prueba parece detectar un factor adhesivo preferentemente encontrado en los serotipos de EPEC. Este atributo, factor de adherencia de EPEC (EAF) es mediado por un plásmido (aprox.60 MDa.de tamaño) y está asociado con virulencia.

El Dr. Cravioto y col.(1979) observaron que aproximadamente el 80% de las cepas de EPEC de un brote epidémico en el pasado, se adhieren a células HEP-2 en cultivo celular, propiedad rara en ETEC y EIEC o cepas de flora normal. Mas tarde, Scaletsky y col.(1984) y Nataro et.al (1985), distinguieron claramente la adherencia localizada a células HEP-2 y la Adherencia difusa a células HeLa, las cuales estan mediadas por un plásmido.

Estudios realizados en cepas EAF+, muestran la existencia de un plásmido que codifica para una proteína de 94 KDa., la cual, ha sido encontrada en todos los serotipos importantes de EPEC: O:55,

111, 119, 127 y 142. En contraste, ésta no ha sido encontrada en ETEC, EIEC, EHEC o en cepas de *E.coli* que causan meningitis o pielonefritis.

Los serotipos que no poseen el plásmido EAF (EAF-) no muestran adherencia localizada, han sido asociados con estudios epidemiológicos y se ha visto que causan diarrea, aún cuando su patogénesis a nivel molecular no es tan precisamente conocido como para las cepas de EPEC (EAF+). Sin embargo, al menos por el presente, esas cepas son consideradas como una segunda clase (Clase II) en la categoría de EPEC.

2. La producción de una citotoxina similar a la Shiga, producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1; la cual no induce queratoconjuntivitis como EIEC (detectada por la prueba de Sereny). Esto demarca la importancia de la toxina en la patogénesis de diarrea por EPEC.

#### B) METODOS DE IDENTIFICACION.

El desarrollo de varios métodos para identificar cepas con un potencial de causar diarrea y diferenciar cepas patogénicas de *E.coli*, ha sido de gran importancia; sin embargo, la mayoría son demasiado complicados para su amplio uso en laboratorios de microbiología clínica.

Entre los métodos de detección de cepas de EPEC, el serológico es altamente específico, sin embargo, requiere un mínimo de 72 hr para establecer que se trata de una cepa de EPEC. Métodos alternativos tempranos son las pruebas bioquímicas, las cuales se

basan en las características metabólicas del organismo mediante la utilización de carbohidratos y de otros sustratos.

## **1. PRUEBAS SEROLOGICAS.**

La serotipificación ha sido una herramienta extensivamente usada para la clasificación de EPEC. Para este tipo de pruebas, se han realizado varios estudios, en uno de ellos, el Dr. Blake (E.E.U.U.) reportó que de pacientes con enfermedad esporádica se aislaron cepas de EPEC y EIEC, las cuales presentaban un número limitado de Ags H y se asociaban con la producción de toxina e invasividad; por lo que él sugiere que para evitar una confusión en la serotipificación de EPEC con ETEC y EIEC, la determinación del Ag H es tan importante como la del Ag O complementando la identificación con una examinación de características fenotípicas y genotípicas asociadas a los serotipos y/o virulencia, para obtener en el laboratorio un mejor diagnóstico de infección aguda o esporádica por EPEC.

El Dr. Orskov, considera la tipificación del Ag H necesaria para estudios epidemiológicos, el cual, junto con los serogrupos O de EPEC, serán posteriormente posibles predecir correctamente, mediante sencillas pruebas bioquímicas de fermentación, logrando diferenciar por patrones de fermentación los serotipos importantes de EPEC (12,52).

## **2. PRUEBAS BIOQUIMICAS.**

En relación a las pruebas bioquímicas, una contribución de la Industria a laboratorios de Microbiología fué el desarrollo e introducción de sistemas enfocados en la identificación microbiana. Un sistema de identificación consiste de una serie de pruebas previamente seleccionadas y formuladas para identificar microorganismos a nivel deseado, complementado con esquemas y en ocasiones con una base de datos en computadora. Dichos sistemas pueden ser manuales, mecánicos o automatizados y, debido a sus niveles de sofisticación pueden emplearse para identificar un grupo

de microorganismos en particular, incluyendo Enterobacterias, no fermentadores y fermentadores con oxidasa positiva, anaerobios y del grupo de los streptococos entre otros (8,19).

La naturaleza de las pruebas usadas en los sistemas de identificación, depende de numerosos factores tales como: el nivel de selectividad (habilidad de diferenciación), reproducibilidad, tiempo para leer la reacción y el saber interpretarla (visualmente, fotométricamente), manejo sencillo y costo. La mayoría de estas pruebas son básicamente modificaciones de los métodos clásicos como: pruebas de fermentación, oxidación, asimilación, degradación e hidrólisis; su incorporación en sistemas comerciales, se basa en la tradición y su habilidad para discriminar entre géneros y especies en periodos más cortos de tiempo.

Las reacciones de fermentación y oxidación son entre las pruebas, las más comunmente usadas en sistemas de identificación. Las pruebas de fermentación se basan en la habilidad del microorganismo para metabolizar carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico; en este tipo de reacciones, el sustrato no es completamente metabolizado, formando como producto final ácidos orgánicos, los cuales sirven como donadores y aceptores de electrones ( $e^-$ ). Las pruebas de Oxidación muestran la habilidad de un microorganismo para metabolizar los sustratos antes mencionados con oxígeno como el final aceptor de  $e^-$ . Ambas reacciones son usualmente detectadas por el uso de indicadores de pH incorporados al sustrato probado.

Las pruebas de Asimilación (Utilización) favorecen la identificación particularmente con levaduras y ciertas bacterias gram negativas no fermentadoras. Esta prueba se basa en la capacidad del microorganismo de utilizar el carbono y el nitrógeno como fuentes para su crecimiento. Su determinación se realiza mediante la incorporación de dichas fuentes a un medio basal que contenga todas las sustancias requeridas para el crecimiento.

Algunas pruebas de identificación presentan compuestos que inhiben selectivamente vías metabólicas, lo que favorece la división de grupos bacterianos en categorías que puedan ser clasificadas en base a la actividad bioquímica en otras pruebas (ver Apéndice "Principios de las Pruebas Bioquímicas") (37). La clasificación bacteriana puede complementarse mediante la comparación de los genes según su razón genotípica y niveles fenotípicos, y a través de la hibridación de DNA de cada microorganismo; este tipo de clasificación que refleja en gran medida las relaciones naturales existente entre cada uno de ellos, nos permite definir grupos con características comunes, cuyos miembros a su vez difieran un poco y formen subgrupos, los cuales también presenten subdivisiones.

La formación de grupos entéricos es la agrupación de cepas con reacción bioquímica similar. Así, una especie esta integrada por organismos altamente relacionados por hibridación de ADN y son usualmente similares bioquímicamente, aunque pueden diferir en este último patrón de otras especies en el mismo género. En consecuencia, un Biogrupo (Biovar) definido como un grupo de cepas con un patrón de reacción bioquímico común, es frecuentemente poco usual para las especies en particular; sin embargo, es también definidos para auxiliar en la identificación. El análisis de los Biotipos de algunas especies bacterianas, permite hacer una mejor interpretación acerca de la variación de las características de identificación que pueden relacionarse con diferencias conocidas en cuanto a la virulencia de varias cepas (21,48).

Stenderup y Orskov (1983) biotipificaron varias cepas de EPEC aisladas en hombres y encontraron que éstas pertenecían a un número limitado de clonas. Una relación similar fue buscada para las cepas parecidas a EPEC aisladas en conejos y biotipificadas mediante fermentación de carbohidratos, lo que creo un gran interés para establecer la relación existente entre los diferentes biotipos con diferentes propiedades de patogenicidad y virulencia (3,5,43).

#### a) METODOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACION.

En los Métodos convencionales, las pruebas de diferenciación y degradación, se basan en el uso de aminoácidos (a.a) como: Lisina, Arginina, Ornitina y Fenilalanina que son muy útiles para la identificación; la habilidad diferencial de la bacteria de producir enzimas capaces de decarboxilar la lisina u ornitina o de hidrolizar arginina formando productos finales alcalinos, puede ser detectada en un medio basal suplementado con a.a , glucosa y un indicador de pH; en este caso, la glucosa permite el crecimiento bacteriano con la producción de ácido. La degradación de la fenilalanina es detectada por un color verde-azul en presencia de iones férricos. La producción de Indol a partir el triptófano por medio de triptofanasas, se detecta por la adición del Reactivo de Ehrlich o Kovac's al medio. En las pruebas de hidrólisis, la Urea es hidrolizada a amonio causando cambios en el pH al rango alcalino. Este tipo de pruebas, toman gran interés en la investigación por lo que son adaptadas a sistemas miniaturizados de identificación bacteriana (8,9).

En la fase transitoria de la metodología clásica a contemporánea usada para la identificación microbiana, se ha cambiado de métodos múltiples a procedimientos sencillos con énfasis sobre estandarización, rapidez, reproducibilidad, miniaturización, mecanización y automatización; llegandose a establecer en muchos laboratorios el uso de uno o mas sistemas disponibles para la identificación de ciertos grupos de microorganismos, proporcionando así, una herramienta especial para obtener resultados más exactos que reducen el costo y el tiempo de estancia de un paciente hospitalizado (17). La introducción de estos sistemas miniaturizados representa un importante avance tecnológico en la bacteriología clínica.

## **b) SISTEMAS MINIATURIZADOS DE IDENTIFICACION.**

Los Microsistemas han sido ideados para la determinación de un grupo variado de microorganismos de importancia médica y veterinaria tales como los bacilos gram negativos fermentadores (Especialmente las Enterobacterias), bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores con oxidasa positiva, aeróbicos y anaeróbicos, cocos gram positivos, levaduras etc. (9,31,37). De hecho, la identificación de los bacilos gram negativos patógenos y la determinación de su susceptibilidad para agentes antimicrobianos, se ha realizado frecuentemente con microtécnicas en algunos laboratorios. Estos Microsistemas son tan eficientes como los sistemas completamente automatizados, en comparación, ellos podrían ser más económicos, pueden leerse manualmente o en forma automatizada, la visualización de las reacciones químicas es clara, requieren poco espacio en almacen e incubación, presentan larga vida de conservación (de 6 meses a 1 año a 4-6°C), incluyen selección de pruebas bioquímicas diferenciales estandarizadas que mejoran la exactitud de la identificación, los tiempos de incubación son generalmente cortos lo que permite una rápida identificación del germen facilitada además por un registro computarizado, donde el control de calidad se lleva a cabo por el fabricante. Todo esto ofrece grandes ventajas para los laboratorios de microbiología, especialmente para aquellos de espacio reducido, donde el tiempo es escaso o no se cuenta con el personal capacitado para la identificación de los microorganismos y, donde el control de calidad es mucho más difícil de conservar.

Existen en el comercio extranjero una variedad de estos equipos miniaturizados con diferentes procedimientos para la identificación bacteriana, un ejemplo de ellos son: API20 E, Enteric Tek, Enterotube II, Entero Set, Micro ID, Minitex (Para identificar Enterobacterias); Rapid E, Quantum II, Autobac IDX, MS-2 (para Enterobacterias y otros bacilos gram negativos); N/F Oxi-Ferm, Rapid NFT, Titertek NF (para gram negativos fermentadores y

no fermentadores con oxidasa positiva); API 20A, Anaerobe Tek, ODS Rapid ANA, (para anaeróbios); API 20S, Rapid Strep, Staph Ident, Staph-TRac (para estreptococos y estafilococos); API 20C y Uni-Yeast-Tek (para levaduras). Sistemas evaluados favorablemente en otros Países; que emplean microtubos de plástico conteniendo los sustratos deshidratados, los cuales son reconstituídos agregando una suspensión bacteriana. Su precisión ha demostrado ser comparable a la de los sistemas convencionales de identificación (1,2,11,22,26,31,39,45).

Con el uso de los micrométodos, existe la posibilidad de realizar numerosas pruebas que permitan determinar un patrón bioquímico que correlacione con factores de virulencia bacteriana, como podría ser el caso de *E.coli* enteropatógena, que es una de las principales causas de diarrea en la población infantil; misma que en la actualidad es reconocida por aglutinación con antisueros específicos de importación y en la cual, uno de los marcadores para cepas patógenas es el ensayo de adherencia a células HEp-2 (21).

#### IV. MICROMETODO INNSZ.

En la actualidad el elevado porcentaje de aislamientos de enterobacterias en especímenes clínicos y el requerimiento de su identificación confiable originó la idea de crear un sistema de identificación similar a los anteriormente mencionados, pero de manufactura nacional. Esto es debido a que la existencia de dichos sistemas no está al alcance de la mayoría de los laboratorios de microbiología, por lo que se considera necesaria la importación de éstos y como consecuencia se elevan los costos.

El Micrométodo INNSZ, fue desarrollado en 1988 en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, con el objeto de identificar a las

Enterobacterias; permitiendo de esta manera una estandarización en la identificación, así como una disminución en el tiempo y costo de su realización.

Para el desarrollo de dicho sistema, se seleccionaron pruebas bioquímicas usadas en la estandarización del sistema convencional. Se determinó la concentración óptima del sustrato, el volúmen adecuado y el sistema de secado de cada una de las pruebas, utilizando cepas de referencia del ATCC (American Type Culture Collection). Las cepas se identificaron por tres métodos: Sistemas Convencional, API 20E y el micrométodo desarrollado; en base a los resultados obtenidos se hicieron algunas modificaciones de las pruebas bioquímicas (21).

Este Micrométodo puede ser usado para caracterizar bacterias a nivel de género y especie, por lo que se considera importante el validarlo y compararlo con el sistema convencional en una población abierta de niños de la Comunidad de San. Pedro Martir de la cual se obtuvo un grupo de enterobacterias , lo que permitió realizar el presente trabajo.

#### V. OBJETIVOS.

1. Validar el Micrométodo INNSE para la identificación bioquímica de cepas de EPEC.
2. Biotipificar cepas de EPEC en base a su capacidad de fermentar diversos carbohidratos, para establecer un patrón bioquímico que nos permita diferenciarlas de otros grupos de *E.coli*.

## VI. MATERIAL Y METODO.

### Material biológico:

Se utilizaron 11 cepas de referencia, de las cuales 9\* fueron proporcionadas por el Dr. A. Cravioto del Instituto Nacional de Salud Pública del Estado de Morelos. De las dos cepas restantes, una fué identificada en el INNSSE y la otra se obtuvo del ATCC (American Type Culture Collection).

CEPA	CLAVE
EPEC (O111)	47152 *
EPEC (O111)	42414 *
E.coli N (normal)	47084 *
Salmonella sp	2183 *
Enterobacter cloacae	23553 *
Proteus mirabilis	2C1 *
P.vulgaris	13315 ATCC.
Klebsiella pneumoniae	11X *
Shigella sonnei	IMM
Sh. flexneri	B1 *
Yersinia enterocolitica	11994 *

### Cepas en estudio

Se estudiaron 140 cepas de *E. coli* obtenidas en el INNSZ de un estudio de incidencia de enteropatógenos, aisladas de una población infantil de la Comunidad de San Pedro Martir en la Ciudad de México. Los aislamientos fueron identificados por pruebas bioquímicas (Bioquímica convencional) y serotipificados por el método de aglutinación en placa con los sueros comerciales Bacto *E.coli* O:K antisera (Difco Laboratories Detroit Mich.). También se les determinó la presencia de toxinas: LT y ST mediante el ensayo ELISA. De esta manera, clasificar la población en tres grupos: EPEC, ETEC y un tercer grupo de *E.coli* cuyos miembros no pertenecían a los anteriores (no EPEC, no ETEC) ni fueron considerados como normales, dado que presentaban un patrón bioquímico similar al de *Shigella sp.* y por serotipificación se confirmó que no lo eran. Posteriormente las cepas se almacenaron en papel a -70°C hasta su uso.

El estudio se realizó a doble ciego es decir, de manera independiente se trabajaron las mismas cepas para diferentes estudios: la determinación de patrones de adherencia en células HEp-2 y la biotipificación, éste último, correspondiente al presente trabajo, por lo que se le asignó a cada cepa un número o clave para su manejo.

En la biotipificación dichos aislamientos fueron probados por la bioquímica convencional (Macrométodo) y el micrométodo por validar en forma paralela; procurando mantener en estricto control las condiciones de asepsia del material y su manejo durante el desarrollo del trabajo.

#### SUBSTRATOS EMPLEADOS EN LOS DIFERENTES METODOS.

EL MICROMETODO INNSZ está formado por una serie de 23 sustratos en los que se determinan las siguientes reacciones:

1. FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS: Adonitol (ADON), Arabinosa (ARA), Celobiosa (CEL)\*, Dulcitol (DUL)\*, Glucosa (GLU), Inositol (INOS), Lactosa (LAC)\*, Manitol (MAN), Rafinosa (RAF), Ramnosa (RAMN), Sacarosa (SAC), Salicina (SALIC), Sorbitol (SOR), Sorbosa (SORBS)\*, D-Xilosa (XIL)\*.
2. HIDROLISIS: Esculina (ESC), Urea(UREA).
3. DESCARBOXILACION O DESAMINACION DE AMINOACIDOS: Arginina (ADH), Lisina (LDC), Ornitina (ODC) y Fenilalanina (FDA).
4. FUENTES DE CARBONO: Citrato (CIT) y Malonato (MAL).
5. PRODUCCION DE: Indol (IND),Acido sulfhidrico (H<sub>2</sub>S).
6. REDUCCION DE: Nitratos (NIT).
7. PRODUCCION DE ACETOINA Y ACIDIFICACION: Voges-Proskauer (VP).
8. PRESENCIA DE: β-Galactosidasa e Hidrólisis de ONPG.

\*Carbohidratos adicionales al micrométodo INNSZ.

La serie de pruebas o sustratos elegidos, se fundamenta en las características bioquímicas de géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae descritos por Farmer et al. (16). así como

eficacia en la determinación, disponibilidad, toxicidad y costo del material. La preparación de cada sustrato y reactivos para las reacciones de los mismos se muestra en el apéndice anexo.

Una vez preparados los sustratos, se utilizaron como soporte microplacas estériles de vinilo de 96 pozos (Nunc, Demark), a las que se les adicionó 10µl/pozo de cada sustrato con una micropipeta multicanal ajustable (8 canales) de 5-50 µl (Dynatech Lab., INC. Chantly, VA.); el vaciado se realizó en forma alternada para evitar contaminación por productos volátiles de un pozo a otro. Las microplacas con los sustratos fueron cubiertas con papel filtro o su tapa respectivamente, posteriormente se congelaron a -70°C/2 hrs. en un Forma Scientific (Mo. 8359 20Cu. Ft.; -85°C.) y después se deshidrataron al vacío en una liofilizadora (Labconco Corporation. Kansas City; Mo.4451F PT.No.A34X 694) a -60 °C y 25 micrones (0.025 Torr) de presión, durante 150 mín. Finalmente se guardaron todas las microplacas en paquetes de 6 en bolsas de polietileno con un paquetito de desecador (CaSO<sub>4</sub>), y se sellaron herméticamente y almacenaron a 4°C hasta su utilización.

EL MACROMETODO esta formado por 7 pruebas convencionales, a las que se anexaron 2\* pruebas para la fase comparativa.

1. TSI (Agar Hierro Triple Azúcar): Prueba de fermentación de Glucosa y Lactosa, producción de H<sub>2</sub>S y gas.  
Indicador del pH, rojo de fenol.
2. LIA (Agar Hierro Lisina): Prueba de descarboxilación y desaminación de la lisina, producción de H<sub>2</sub>S.  
Indicador del pH, púrpura de bromocresol.
3. CIT (Citrato de Simmons): Prueba de utilización de Citrato como única fuente de Carbon.  
Indicador del pH, azul de bromotimol.
4. FDA (Fenilalanina desaminasa): Prueba de desaminación de la fenilalanina. La prueba se revela con FeCl<sub>3</sub>.

5. MIO (Agar Movilidad-Indol-Ornitina) medio semisólido:  
Prueba de movilidad, producción de Indol y descarboxilación de la Ornitina. La producción de Indol se revela con el reactivo de Kovac's.
6. Caldo UREA-SACAROSA: Prueba de fermentación de sacarosa e hidrólisis de la urea.  
Indicador de pH, rojo de fenol.
7. Caldo ROJO DE METILO/VOGES-PROSKAUER: Prueba de producción de acetoina y/o acidez a partir de glucosa.
- 8\*.Caldo ONPG: Hidrólisis del sustrato y Presencia de  $\beta$ -galactosidasa.
- 9\*.Caldo Aminoácidos:  
Lisina (descarboxilación).  
Ornitina(descarboxilación).  
Arginina(desaminación).

#### Estandarización del Micrométodo.

Los sustratos se probaron con diferentes cepas de microorganismos certificadas como referencia, con el objeto de observar si las reacciones de estos, correspondían a la actividad bioquímica esperada para cada género.

Para la fase comparativa, en forma paralela se realizó el Macrométodo y el Micrométodo por validar para la población de cepas en estudio. Los ensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera: Las cepas fueron crecidas en agar Mc Conkey y Soya-tripticosa y se incubaron a 37°C durante 24h. para verificar su pureza. A partir del cultivo puro de cada una, se tomó inóculo para realizar los diferentes métodos (Macro y Micro).

1. Macrométodo: a) Se tomó una colonia con una asa bacteriológica recta para realizar la Bioquímica convencional por la técnica ya establecida: Estría y picadura (37).

2. Micrométodo: a) Se tomaron de cinco a seis colonias de una cepa con una asa bacteriológica estéril (calibrada de 10µl) y se llevaron a un tubo de ensaye con 10 ml de solución salina estéril (pH 7) preparando una suspensión bacteriana con una concentración equivalente a  $2 \times 10^8$  UFC/ml (semejante al tubo estandard 0.5 de Mc Farland).

b) Los sustratos fueron rehidratados con la suspensión bacteriana por duplicado colocando 100 µl/pozo, igualmente para los tubos de la prueba ONPG, excepto para la prueba de Citrato y Voges-Proskauer con 200 µl/pozo cada uno.

c) A los sustratos : ADH, LDC, ODC, UREA y H<sub>2</sub>S se les adicionó una o dos gotas de aceite mineral o nujol esteril (Condiciones anaerobias).

d) Las microplacas fueron cubiertas con sus respectivas tapas o papel filtro, mientras que los pequeños tubos (prueba ONPG) se taparon con algodón y se ajustaron a una pequeña base de vinil. Posteriormente se colocaron en una cámara húmeda (recipiente hermético con una gasa un poco más que húmeda).

e) Una vez montados ambos ensayos, se incubaron a 37°C/24 h.

La lectura e interpretación de las reacciones de cada una de las pruebas bioquímicas (ver Tabla de lectura en el anexo) fue realizada por dos observadores de manera independiente, para posteriormente analizar la variabilidad interobservador en la interpretación de cada prueba.

Para revelar las reacciones del Micrométodo, se añadieron 2 gotas de Reactivo de Kovac's a cada pozo de la prueba de Indol; 1 gota de hidróxido de potasio (KOH) mas una gota de reactivo α-naftol al pozo de Voges-Proskauer, tomando datos de 10-15 min. Finalmente 2 gotas de Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 40% para el pozo de Fenilalanina-deaminasa.

Una vez probadas todas las cepas, se reveló la identidad de cada una de ellas, es decir, el grupo y cuadro clínico al que pertenecían.

#### **REGISTRO DE DATOS**

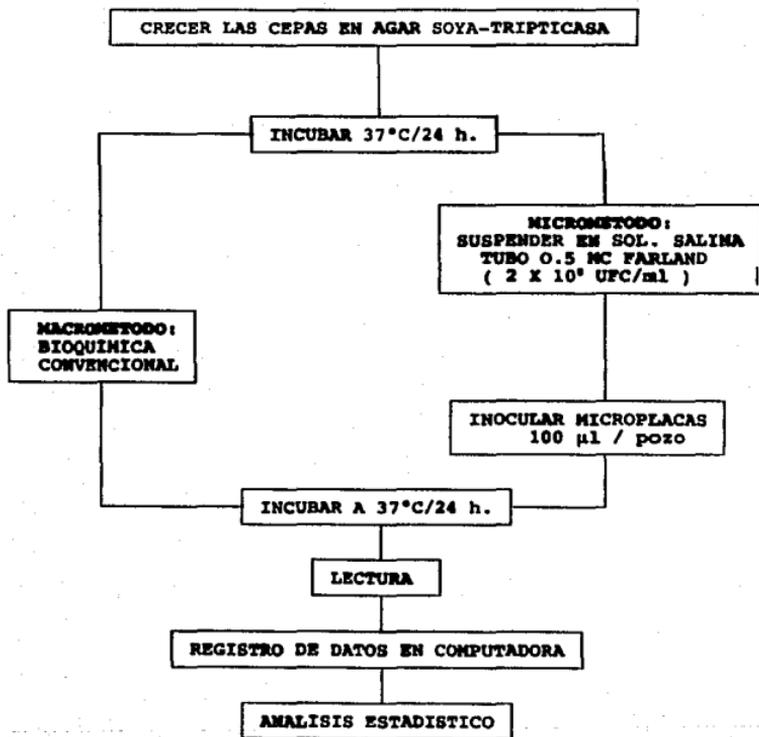
La información recolectada fue registrada en una base de datos "PARADOX 3" en la computadora ZEOS 386SX, tanto para el Micrométodo como para el Macrométodo, incluyendo las lecturas de 24 hrs. realizadas por ambos lectores.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROGRAMAS DE COMPUTADORA.**

Para evaluar la Reproducibilidad del Micrométodo, el ensayo se realizó 3 veces en diferentes tiempos, trabajando con las cepas de referencia (25)

En el análisis de correlación entre los métodos de identificación se utilizó la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) e Índice de correlación (51). Para el análisis existente entre los grupos de E. coli con sustratos, sólo se empleó la prueba de  $\chi^2$  (49) como una prueba de independencia.

La clasificación de los biotipos se llevó a cabo por computadora mediante el programa de agrupamiento (Cluster) de SPSS+PC utilizando los cuadrados de la distancia Euclidiana como medida de discriminación, con el criterio de Complete Linkage, dado que presenta mejor asociación (7, 43, 44). Se consideraron 27 variables representando los resultados de las pruebas bioquímicas codificadas 1 como negativo y 3 como positivo; el patrón de Adherencia: 1.Difusa (D) y 2.Localizada (L). Finalmente para el tipo de muestra 1.Asintomática y 2.Sintomática.



Diseño del trabajo. Identificación de las cepas de *E. coli*  
por los diferentes métodos.

## VII. RESULTADOS.

Posterior a la revelación de la fuente de origen de cada cepa, se obtuvo que la población bacteriana quedó conformada en tres grupos: EPEC, ETEC y un tercer grupo No EPEC, No ETEC que finalmente se le denominó "Otro grupo de *E.coli*", dicha clasificación se basó en el grupo y cuadro clínico al que pertenecían cada una de las cepas (Tabla 1.).

Tabla.1. CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE *E.coli* EN ESTUDIO.

GRUPO	CUADRO CLINICO		
	SINTOMATICAS	ASINTOMATICA	No.
EPEC	39 (100)	0	39 (100)
ETEC	19 (45.24)	23 (54.76)	42 (100)
NO ET,EPEC	19 (32.2)	40 (67.8)	59 (100)
TOTAL	77	63	140

Frecuencia porcentual (%).

Antes de realizar las evaluaciones de comparación del Macrométodo con el Micrométodo en la fase de estandarización, éste último fué modificado en algunos componentes de los sustratos así como el material de soporte de los mismos. Se utilizaron microplacas de ELISA y unos microtubos similares a los diseñados por Giraud y col.(Fig.A ; tabla 2).

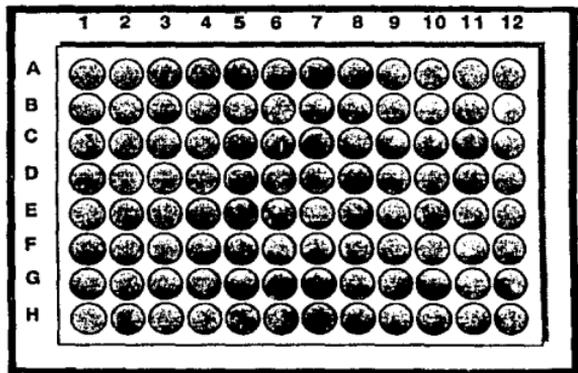
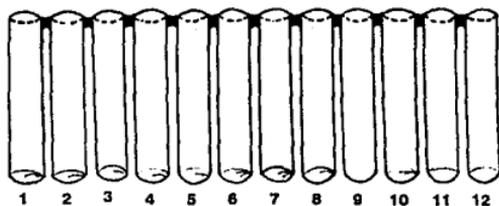


Fig. A. Modelo de microtubos y microplacas empleado en el micrométodo.

**Tabla.2. SUSTRATOS MODIFICADOS EN EL MICROMETODO**

SUSTRATO	COMPONENTE	CONCENTRACION (gr/ml).	
		ANTERIOR	ACTUAL
ADH	Rojo de fenol	0.00006	0.00024
LDC	" "	0.00006	0.00012
UREA	" "	0.00006	0.00024
ONPG	Peptona	0.05	0.1
MAL	Malonato de sodio	0.03	0.04
	Indicador ABT	0.00025	0.0003

De las modificaciones realizadas al micrométodo fueron el aumento de la concentración de algunos componentes de los sustratos como la peptona y el malonato de sodio; así como el del sistema indicador empleado (rojo de fenol y azul de bromotimol), dado que es muy importante para detectar la presencia o ausencia de las enzimas en la bacteria.

Los resultados de las reacciones bioquímicas para el Macro y Micrométodo dadas por 140 cepas de *E. coli*, se presenta en la Tabla 3. Se compararon ambos métodos utilizándose los sustratos iguales con el que se obtuvo el Índice de Correlación de 0.96, valor próximo a la unidad, lo cual nos indica que ambos métodos dan una respuesta casi idéntica. Este hallazgo fué confirmado mediante la prueba de  $\chi^2$ , dado que no existió una diferencia significativa a un nivel de alfa 0.05 ( $P > 0.05$ ) en el uso de ambos métodos; ésto significa que la identificación de la bacteria por el método convencional y/o el micrométodo es la misma.

**Tabla.3. FRECUENCIA DE LAS CEPAS DE E.coli SEGUN EL SUSTRATO  
UTILIZADO MEDIANTE EL MICRO Y MACROMETODO.**

SUSTRATO	MACROMETODO	MICROMETODO
GLUC.	140	140
LDC	97	96
CITRATO	0	0
FDA	0	0
INDOL	128	140
ODC	38	37
VP	0	0
UREA	0	0
ADH	2	4
ONPG	131	131

Datos de frecuencia.

Correlación de métodos

$X^2 = 1.09$

$\alpha = 0.05$

$P > 0.05$

No hay diferencia significativa.

Índice de Correlación  $r=0.96$

En la estandarización de los sustratos probados en el Micrométodo con cepas control se obtuvo una buena reproducibilidad, dado que al realizar los ensayos en diferentes tiempos con la misma cepa, mostraron el mismo patrón bioquímico; como se observa en la tabla 4., los resultados de las cepas probadas correlacionan con el patrón bioquímico reportado por Farmer y Michael 1991.

Tabla.4. REPRODUCIBILIDAD INTER-ENSAYO DEL MICRO SISTEMA INHSE  
EN LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

S U S T R A T O S

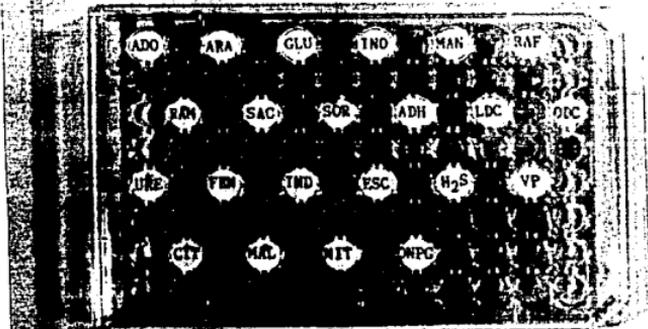
CEPAS	A D O N	R L O A	G L A U S	I N A O N S	M R A A F M N	R R A A M C	S S A O R E	A L D D E C	L O U D D E C	O U R E N D E A	F I E N D C	E H O V P S	H 2 N P G	O V P I T L	C M N I L T	N I E L L	C D U A L C	L S A L I B	S K O I R L	
EPEC (O111) 47152		3	3		3	3	3	3	1	3	3					3		3		3
E.coli N 47084		3	3		3	3	3	2	3	3		3				3		3		3
K.pneumoniae 11X	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2		3	3	3	3	3	3	3	3	3
Y.enterocolitica 11994		3	3		3	3			1	3	3		2			3	3		3	3
Proteus mirabilis 2C <sub>1</sub>			3						1	3	3	3	1	1	1	3				3
P.vulgaris 13315			3						1	3	3	3	1		1	3			2	3
Salmonella sp.2183	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1			3		3	3	2			3
Sh.sonnei INN	2	3		3						3					3					

La Reproducibilidad fue medida mediante tres ensayos en días diferentes.  
Se muestra el número de ensayos que resultaron positivos para cada sustrato,  
en las diferentes bacterias.



II.

PARA *Proteus mirabilis*



III.

PARA *Klebsiella pneumoniae*



IV.

PARA *Salmonella sp*



El género de *E.coli* se clasifica en base a su patogenicidad. Con la finalidad de poder identificarlo por el micrométodo ya estandarizado, se obtuvo que dicha identificación requiere al menos 15 sustratos, mismo que es apoyado mediante la prueba de  $\chi^2$  con un valor de  $P < 0.05$  (tabla 5.).

**TABLA.5. NUMERO DE CEPAS DE *E.coli* CAPACES DE UTILIZAR LOS SUSTRATOS EN EL MICROMETODO PARA SU DIFERENCIACION.**

SUSTRATO	EPEC	ETEC	OTRO GRUPO <i>E.coli</i> .
ADON	3 (7.7)	6 (14.3)	7 (11.9)
RAF	18 (46.2)	16 (38.1)	5 (8.5)
RAMN	29 (74.4)	37 (88.1)	51 (86.4)
ONPG	38 (97.4)	42 (100)	51 (86.4)
SAC	13 (33.3)	16 (38.1)	4 (6.8)
SOR	25 (62.8)	38 (90.5)	25 (43.2)
ADH	2 (5.1)	6 (14.3)	2 (3.4)
LDC	33 (84.6)	39 (92.9)	24 (40.7)
ODC	8 (20.5)	17 (40.5)	12 (20.3)
CEL	1 (2.6)	0	1 (1.7)
DUL	16 (41)	13 (30.9)	10 (16.9)
LAC	33 (84.6)	40 (95.2)	24 (40.7)
SALIC	1 (2.6)	3 (7.1)	1 (1.7)
SORB	16 (41)	13 (30.9)	18 (30.5)
XIL	36 (86.4)	42 (100)	51 (98.3)

Datos de frecuencias (%).

Correlación de grupos *E.coli* con sustratos bioquímicos.

$\chi^2 = 43.48$

$\alpha = 0.05$

$P < 0.05$  Existe una diferencia significativa.

Con la finalidad de detectar los sustratos que permitan la identificación entre los grupos EPEC y ETEC. Se realizó un análisis comparativo de los valores de  $\chi^2$  para ambos grupos y se encontró que los sustratos RAF, SAC, SOR y ODC presentaron una diferencia significativa\* ( $P < 0.05$ ), lo cual nos permite definir que la identificación de estos grupos depende del empleo de dichos sustratos (tabla 6.).

**Tabla.6. DETECCION DE LOS SUSTRATOS UTILES EN LA IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS EPEC Y ETEC POR LA PRUEBA  $\chi^2$ .**

SUSTRATO	Valores de $\chi^2$	
	EPEC	ETEC
ADON	0.32	0.165
RAF	7.79	2.44 *
RAMN	2.48	0.49
CNPG	0.60	1.38
SAC	2.16	5.92 *
SOR	$3 \times 10^{-1}$	17.95 *
ADH	0.04	3.21
LDC	5.46	14.85
ODC	0.60	5.10 *
CEL	0.01	No positivos
DUL	3.80	0.11
LAC	5.01	17.53
SALI	0.012	0.99
SORB	0.92	0.06
XIL	0.09	3.74

Se presentan los valores de  $\chi^2$  calculados, el valor en tablas es de  $\chi^2 = 3.84$ , comparable para todos los datos.

En el establecimiento de los Biogrupos mediante el uso de los 28 sustratos reportados, se encontró que sólo 15 fueron necesarios en la diferenciación de los biogrupos, dado que la información de los sustratos restantes fué constante. El análisis y agrupamiento

(formación de Clusters) de cepas se realizó de manera independiente para los tres grupos estudiados (EPEC, ETEC y Otro Grupo de E.coli) y se representó la información obtenida através de fenogramas usando el criterio de Complete Linkage.

El análisis de las asociaciones de las cepas y sustratos se basó en la similitud y disimilitud encontrada, que consistió en clasificar las cepas en base a su patrón bioquímico y los sustratos como fuente metabólica.

Los resultados obtenidos para los miembros del grupo de EPEC (Fig.1), se observa la formación de dos grandes grupos, en los que a su vez, se aprecia la presencia de cuatro asociaciones bien definidas: en el primer grupo se asociaron las cepas 61, 125, 87, 92, 69, 75, 112, 50, 108, 72, 122, 10, 53 y 81; en el segundo grupo las cepas 99.2, 103, 65, 42, 84, 6, 99.1, 105, 113.2 y 30; en el tercer grupo las cepas 120, 126, 34, 38, 26 y 46; y en el cuarto grupo las cepas 14, 114, 2, 91, 57, 113.1, 22, 106 y 18. Como se observa, las cepas 46 y 18 son ligeramente diferentes en relación al grupo III y IV respectivamente (Fig.1).

En el análisis de similitud para el grupo de ETEC (Fig.2), se encontraron dos grandes grupos de cepas (I, II), divididos a su vez en dos (Ia, Ib) y tres (IIa, IIb, IIc) subgrupos en relación a sus características metabólicas.

Las cepas 77, 86, 5, 83, 63, 21, 45, 55, 9, 60, 52, 59 y 24 conforman el subgrupo Ia.; el subgrupo Ib con asociación lo forman las cepas 44, 94, 1, 33, 71 y 138. En el grupo II, el subgrupo IIa está constituido por las cepas 56, 80, 25, 29, 48, 67, 13, 36, 41, 32, 37 y 28; el subgrupo IIb las cepas 64, 74, 16, 20 y 68; y el IIc presenta la asociación de las cepas 8, 49, 12, 17, 4 y 40. Las cepas 138 y 40 son ligeramente diferentes en relación al grupo que pertenecen Ib y IIc respectivamente.

En el análisis de similitud para el tercer grupo de *E.coli* (no EPEC, no ETEC) basado en las distancias Euclidianas (Fig.3), se presentan dos grandes grupos y un tercero mas pequeño. Las cepas 119, 135.2, 121, 85, 123, 127, 115, 124, 129, 133, 11, 90, 110, 23, 136, 97,116, 137, 89, 135.1, 95, 101, 73, 98 y 100 conforman el primer grupo con una alta asociación. El segundo grupo lo constituyen las cepas 7, 66, 128, 70, 107, 102, 104, 88, 93, 15, 82, 131, 111, 47, 79,51, 76, 43, 54, 19, 117, 118, 35, 39, 58, 62 y 27; y el tercer grupo, en el que se asocian las cepas 96, 134, 31, 109, 3, 78 y 130.

El 1er. grupo a su vez esta conformado por cuatro pequeños subgrupos, mientras que el 2o. grupo solo por dos subgrupos.

En la fig.4 se observa el resultado de las asociaciones de los sustratos, mediante la agrupación de éstos en base a la presencia o ausencia de su metabolización por la bacteria. De manera general, se aprecia la formación de dos grupos bien definidos: el primero conformado por los sustratos SORB, SALI, DUL, ODC, ADH, SAC y RAF; sin descartar a la CEL que aunque se encuentra un poco aislada se integra al mismo grupo. El segundo grupo lo constituyen los sustratos LAC, SOR, LDC, RANM, XIL y ONPG. El ADOM no presenta ninguna asociación dado que su presencia en el gráfico es muy aislada.

COEFICIENTE DE AGRUPAMIENTO

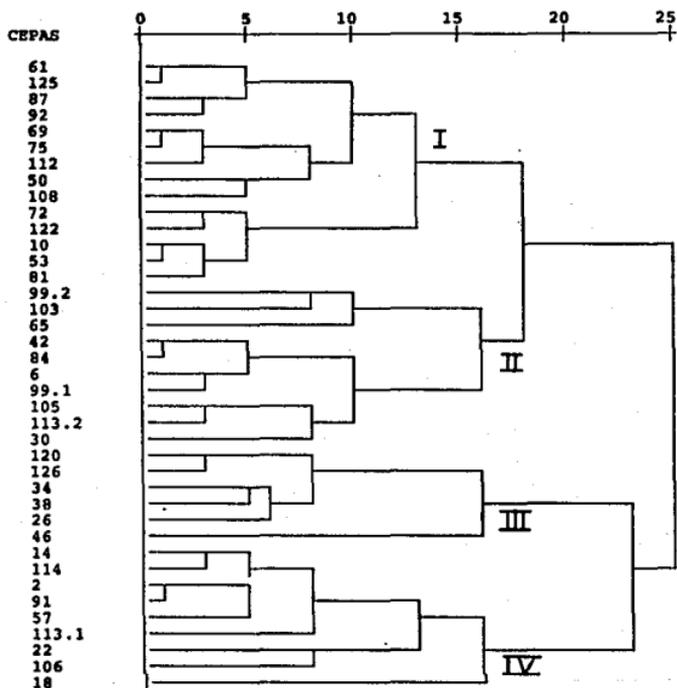
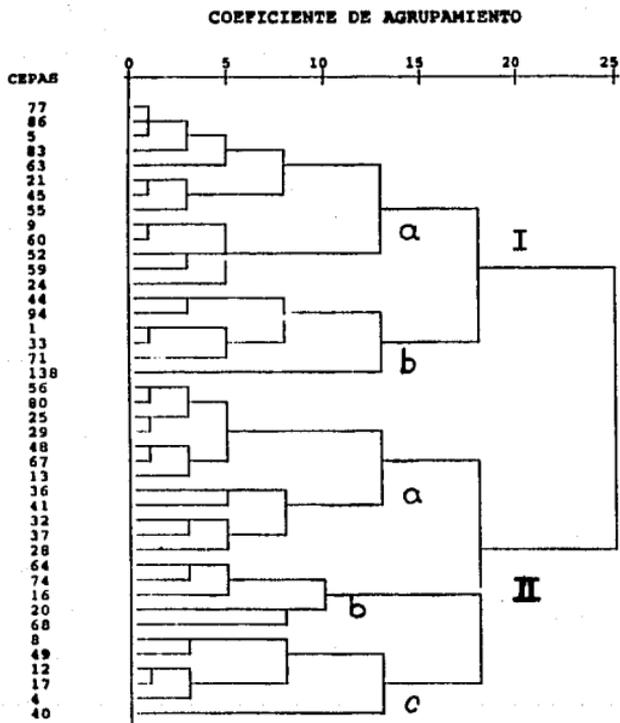
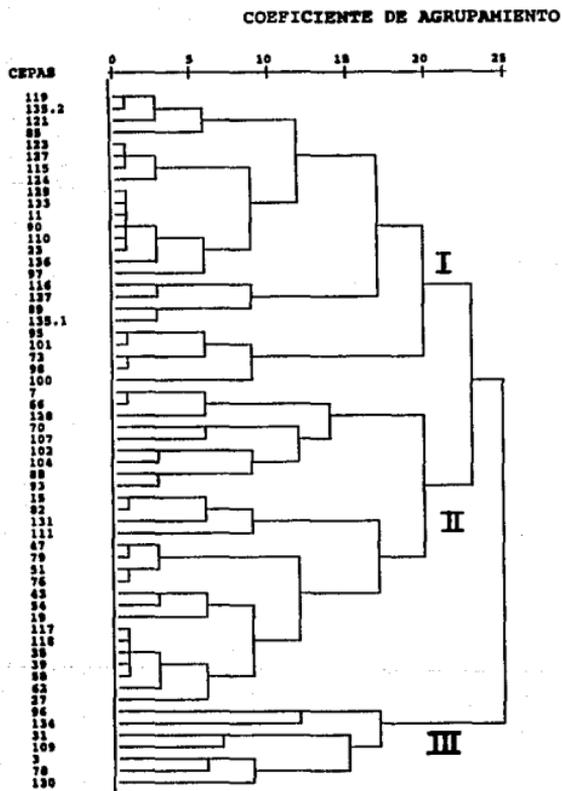


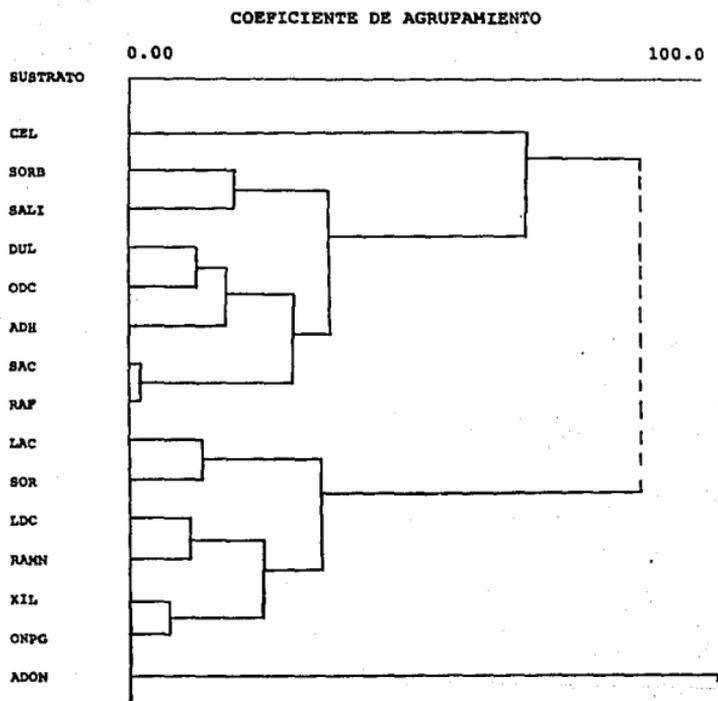
Fig.1. ANALISIS DE SIMILITUD DE LAS CEPAS DEL GRUPO DE EPEC.  
(FENOGRAMA USANDO EL CRITERIO DE COMPLETE LINKAGE)



**Fig.2. ANALISIS DE SIMILITUD DE LAS CEPAS DEL GRUPO DE ETEC.**



**Fig.3. ANALISIS DE SIMILITUD DE LAS CEPAS DE OTRO GRUPO DE *E.coli*.**



**Fig.4. ANALISIS DE SIMILITUD DE LOS SUSTRATOS BIOQUIMICOS  
EN TODAS LAS CEPAS ESTUDIADAS.**

Finalmente en la tabla 7. observamos los biogrupos (Biog) formados para cada uno de los grupos iniciales de la población de *E.coli*. Cada uno de ellos fué denominado por número progresivo (I-IV), mientras que los sub-biogrupos (sub-biog) por letras (a, b, c y d). Además se muestra el patrón de adherencia que predomina en cada uno de los biogrupos formados.

El grupo de EPEC esta constituido por cuatro biogrupos, de los cuales el I y II quedaron conformados por los sub-biogrupos Ia, Ib, Ic y IIa, IIb respectivamente. El patrón de adherencia que dominó en la población de EPEC fué el Difuso (64.1%) a el Localizado (35.9%); en los tres primeros biog. predominó la AD sobre AL y el patrón fué inverso para el biog IV.

El grupo de ETEC se formó por 2 biog, los cuales a su vez quedaron conformados por los sub-biog: Ia, Ib y IIa, IIb, IIc. El tipo de adherencia que dominó en ETEC fué la difusa (71.43%) a la localizada (28.57%).

El tercer grupo de *E.coli* (Otro grupo), quedó formado por tres biogrupos; el biog I como: Ia- Id y el II como: IIa, IIb. El tipo de adherencia que predominó en todo el grupo fué la difusa (62.71%) a la localizada (37.29%). Sin embargo, el patrón fué variante entre los biogrupos: En el biog I dominó AD sobre AL mientras que en el biog III sólo AD; para el sub-biog IIb dominó AL sobre AD y en el IIa el patrón fué inverso al último señalado.

Tabla.7. BIOGRUPOS DE *Escherichia coli*

BIOGRUPOS	<u>BIOMERITORES</u>															
	A D O N	R A F	R A M	S A C	S O R	A S E	L D C	O D C	O M F G	C H L	D U L	L A C	S A L I	S O R B	X I L	A d h.
<b>BTBC</b>	<hr/>															
I	-	-/+	+/-	-	-/+	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+/-	+/-	D/L
Ia	-	+	+	-	+/-	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+	+	
Ib	-	-	-	-	-/+	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+/-	+/-	
Ic	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	+	-	-/+	+	
II	-/+	-	+	-	+/-	-	+/-	-/+	+/-	-/+	-/+	+/-	-	-/+	+	D/L
IIa	-	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-/+	+	-	+/-	+	
IIb	-/+	-	+	-	+/-	-	-/+	-	+/-	-	-/+	+	-	-	+	
III	-	+	+/-	+/-	+	-/+	+	+/-	+	-	+	+	-	-/+	+	D/L
IV	-/+	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-/+	+	-	-	+/-	-	-/+	+	L/D
<b>BTBC</b>	<hr/>															
I	-/+	-/+	+/-	-/+	+/-	-	+	-	+	-	-/+	+/-	-/+	-/+	+	D/L
Ia	-/+	-	+/-	-/+	+/-	-	+	-	+	-	-	+/-	-/+	-/+	+	
Ib	-/+	-/+	+/-	-/+	+/-	-	+	-	+	-	+	+	-/+	+/-	+	
II	-/+	+/-	+/-	+/-	+/-	-/+	+/-	+/-	+	-	-/+	+/-	-/+	-/+	+	D/L
IIa	-	+/-	+	+/-	+	-/+	+	+/-	+	-	+/-	+	-/+	-	+	
IIb	-	-	+	-	+/-	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+	-	-/+	+	
IIc	-/+	-/+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+	

continuación de la tabla.

**SUBGRUPOS**

BIOGRUPOS	A D O N	R A F	R A M	S A C	S O B	A R B	L D C	O D C	O M P G	C H E L	D U L	L A C	S A L I	S O B	I R L	A d h.
<b>OTRO GRUPO</b>	<hr/>															
I	-/+	-	+/-	-	-/+	-	+/-	-/+	+/-	-	-/+	-/+	-	-/+	+/-	D/L
Ia	+/-	-	+	-	-/+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
Ib	-/+	-	+	-	-/+	-	-/+	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+	
Ic	-	-	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-/+	-/+	-	-	+	
II	-/+	-	+/-	-	+/-	-/+	-/+	-/+	+	-	-/+	+/-	-/+	-/+	+/-	L/D
IIa	-/+	-	+	-	-/+	-	-/+	-	+	-	-/+	+/-	-	+	+/-	D/L
IIb	-/+	-	+/-	-	+/-	-/+	-/+	-/+	+	-/+	-/+	+/-	-/+	-	+/-	L/D
III	-	+/-	+/-	+/-	-/+	-/+	+	+/-	+	-	-/+	+/-	-	+/-	+	D

ADON=Adonitol

RAF=Rafinosa

RAM=Ramnosa

SAC=Sacarosa

SOR=Sorbitol

ARG=Arginina

LDC=Lisina

ODC=Ornitina

OMP

CEL=Celobiosa

DUL=Dulcitol

LAC=Lactosa

SALI=Salicina

SORB=Sorbose

XIL=Xilosa.

El tipo de Adherencia Difusa (D) y/o Localizada (L) dominante en los biogrupos principales dentro de cada Grupo.

## VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El diagnóstico de la infección causado por EPEC, ha sido costoso y tardado, lo cual ha estimulado al estudio de métodos bioquímicos para su detección. Esto ha llegado a ser posible mediante el micrométodo bioquímico, a través del cual se han identificado diferentes biotipos de EPEC (21). En adición, Okerman y col. (45) en un estudio realizado con cepas de EPEC aisladas de conejos, mostró una correlación entre el biotipo, serotipo y cepas patógenas. De ahí la importancia de la estandarización de este micrométodo para la identificación de EPEC, dado que la infección que esta produce es muy frecuente en niños menores de cinco años de edad (12, 15, 35).

El Micrométodo INNSZ fué diseñado para la identificación de aislamientos de Enterobacterias, con el objeto de sustituir a la bioquímica convencional; sin embargo, fué precisa su validación para usarlo como herramienta de rutina en la identificación de especies de importancia médica. Posteriormente este micrométodo fué establecido para el reconocimiento de cepas de EPEC que se asociaran a cuadros diarréicos. La validación del micrométodo hizo necesaria su estandarización más precisa, dado que las pruebas y condiciones de trabajo para su realización diferían a las ya anteriormente establecidas (tabla 2.)

El material de soporte para los sustratos fué modificado (Fig. A). Se emplearon microplacas de 96 pozos para ELISA y sólo para la prueba de ONPG unos microtubos similares a los diseñados por Giraud y col.(21); esto debido a que el producto final de dicho sustrato es volátil al ser metabolizado, lo que permitía la contaminación de los otros sustratos adyacentes cuando éste se encontraba en la misma microplaca, evitando de esta manera una buena reproducibilidad en la interpretación de los resultados.

Farmer et al., Koneman y Mac Faddin (16, 31, 37) reportan que la identificación bacteriana depende en gran parte de su metabolismo y la presencia de algunas enzimas que puedan ser detectadas en medios especiales cuando actúan hidrolizando el sustrato, lo cual es evidenciado por la presencia del cambio del sistema indicador. Esto sugirió que las condiciones del medio deben ser favorables para el desarrollo de la bacteria, lo que ocasionó la realización de algunas modificaciones en la concentración de componentes de algunos sustratos (ADH, LDC, UREA, ONPG y MAL); obteniéndose de esta manera una reacción bioquímica más evidente a diferencia de la débil previamente descrita, y una mejor visualización e interpretación de los resultados en estas pruebas.

De las modificaciones realizadas al Micrométodo INNSZ, se implementaron algunos carbohidratos que son: Celobiosa, Dulcitol, Lactosa, Salicina, Sorbosa y D-Xilosa, con el propósito de tener un mayor número de pruebas presuntivas que permitieran la biotipificación precisa del grupo de *E.coli*.

La validación del Micrométodo INNSZ, se refiere a la capacidad de éste en evaluar las diferentes pruebas que permitan clasificar los diferentes grupos de *E.coli*, con mayor énfasis las del grupo de EPEC. Por ello se procedió a comparar el "Estandar de Oro" bioquímica convencional o Macrométodo versus Micrométodo, obteniéndose una alta reproducibilidad, sólo para los sustratos comparables (tabla 3.); sin embargo, en el caso de la prueba de indol se presentó una desventaja, debido a que en el macrométodo en el tubo para la prueba se detecta además la descarboxilación de la ornitina, lo que produce acidificación en el medio y probablemente influya en la detección y visualización del indol; en comparación con el micrométodo, éste sólo detecta la producción de indol y no así la descarboxilación de la ornitina, lo que permite que esta prueba sea altamente específica. Es importante considerar que las pruebas del Micrométodo ofrecen resultados más rápidos que el Macrométodo, es decir, la mayoría de los sustratos son

metabolizados en menor tiempo, dando resultados falsos positivos si la lectura se realiza después de 48 hrs de incubación (8, 9, 16, 17, 37). Mac Faddin (1984) y Farmer III et al. (1991), reportaron que en la bioquímica convencional las reacciones de descarboxilación de aminoácidos pueden presentarse a las 48 hrs o más de incubación en algunas especies, lo cual crea una gran ventaja del micrométodo al macrométodo en cuanto al tiempo para la interpretación e identificación del microorganismo.

La Reproducibilidad según Guerrero 1990 (25), se refiere a la tendencia de producir resultados idénticos en el mismo sujeto o en las mismas condiciones. Así, la reproducibilidad del micrométodo INNSZ modificado con las pruebas adicionales fué evaluada mediante la realización de tres ensayos con cepas prototipo en días diferentes y se obtuvo una alta reproducibilidad (Ej. EPEC, *E.coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica*. tabla 4.). Se observó en las cepas un patrón bioquímico constante propio de su género y especie de acuerdo a lo reportado por Farmer III et al.(16,17); sin embargo, las cepas de *Proteus sp.* presentaron una variación mínima en su patrón bioquímico, lo cual puede atribuirse a que en una misma especie puede variar la reacción metabólica ante un determinado sustrato basado en lo reportado por Farmer III et al.(16,17); además, es preciso considerar los diferentes subcultivos de la cepa, se sabe que pueden influir en su metabolismo. En las fotografías I, II, III y IV, se observa la claridad de las reacciones y el patrón metabólico que presentaron las cepas prototipo anteriormente mencionadas.

La variabilidad interobservador para la interpretación de las pruebas fué mínima, se obtuvo de un 0.30% de lecturas discordantes en comparación con un 99.7% de concordantes; lo cual indica que el Micrométodo INNSZ modificado es altamente reproducible en su interpretación en la utilización de los sustratos.

Es importante considerar que para la identificación del género de *E. coli* con el micrométodo INNSZ ya estandarizado y modificado, se establece que sólo 15 sustratos fueron los necesarios, ya que permitieron la diferenciación entre los grupos de *E. coli* estudiados (tabla 1.); ésto fué confirmado mediante la prueba de X<sup>2</sup>, la cual muestra que la identificación de los grupos depende del sustrato empleado (tabla 5.). De esta manera se confirma que la biotipificación, agrupación de cepas con un patrón bioquímico similar, y su análisis permite establecer una mejor interpretación de la variación de las características de la identificación que puedan asociarse con los mecanismos de virulencia de las cepas, tales como adherencia y/o la producción de toxinas (21, 48, 52).

De los sustratos útiles en la diferenciación de grupos de *E. coli*, la rafinosa, sacarosa, sorbitol y ornitina presentaron una diferencia significativa (tabla 6.), ya que permitieron la diferenciación de los grupos EPEC y ETEC no así con el otro grupo de *E. coli*. Estos sustratos coinciden con los reportados por Giraud (1988), quien estudió la biotipificación con cepas de EPEC; sin embargo, la información es también aplicable para cepas de ETEC dado que pertenecen al mismo género y especie; pero se diferencian en su biogrupo y sus diferentes mecanismos de patogenicidad.

Las asociaciones de las cepas mediante el análisis de similitud representado por fenogramas fué una herramienta complementaria para la biotipificación, debido a que se establecieron los biogrupos y sub-biogrupos formados en los grupos *E. coli*, inicialmente estudiados (ver fig. 1, 2, 3); lo cual nos permitió asociarlos con el tipo de adherencia presentado para cada uno de ellos.

En el análisis de asociación de los sustratos de mayor utilización por la población de *E. coli* (fig. 4), se muestra que existe una estrecha asociación de la rafinosa con la sacarosa, que

a su vez ambas se asocian con la ornitina y la arginina; los tres primeros sustratos son los que permiten diferenciar el grupo de EPEC y ETEC, mientras que el sorbitol se encuentra conformando otro grupo. El adonitol no se asocia a ningún grupo específico, por lo que puede ser considerado de importancia limitada para la identificación del género estudiado.

Finalmente se determinaron algunos patrones metabólicos para los diferentes biogrupos y sub-biogrupos formados (tabla 7.), basándonos en los estudios realizados por Giraud en el establecimiento de biotipos (21). De los 15 sustratos utilizados para la formación de los biog., 8 (RAF, RAM, SAC, SOR, ODC, CEL, DUL y SORB) fueron 100% iguales a los establecidos por Giraud; al igual que 8 (ADON, CEL, DUL, RAF, RAM, SALI, SAC y XII) utilizados por Wing Cheong Yang et al. (1988) en un estudio que realizaron biotipificando cepas de ETEC asociándolos con virulencia (52).

La capacidad de adherencia a un tejido orgánico particular favorece a las bacterias que colonizan los tejidos animales o vegetales, dado que las células hospederas suministran los nutrientes orgánicos y presentan las condiciones físicas necesarias para el crecimiento bacteriano, de aquí, la importancia de la adherencia en el éxito biológico de las bacterias patógenas, cuya prevención podría constituir un modo eficaz de combatir las infecciones bacterianas. Estudios realizados por algunos investigadores han mostrado que la adhesión de la bacteria a la mucosa es un factor importante en la patogénesis de EPEC. Así, los únicos marcadores de virulencia de estas cepas demostrados son la producción de citotoxinas (similar a la Shiga y la toxina Vero) y la adherencia a células HEP-2. La asociación de los biotipos relacionados con cepas aisladas de muestras sintomáticas y asintomáticas, y ensayos de adherencia a células HEP-2, de una forma apoya el concepto propuesto por Kauffman y Orskov desde hace muchos años, que las cepas de *E. coli* enteropatógena corresponden

a biotipos. Más tarde, Orskov quien ha estudiado a EPEC y sus antígenos H y O, propuso la posibilidad de predecir estas cepas mediante sencillas pruebas de fermentación, y de esta manera lograr diferenciar por patrones de fermentación los serotipos de EPEC.

En base a los estudios realizados, cada uno de los biog. y sub-biog. fueron asociados con el tipo de adherencia que presentaron, obteniéndose el dominio de la adherencia difusa a la localizada en toda la población estudiada.

En los biog. de EPEC, el tipo de adherencia que predomina es la difusa a la localizada, sin embargo, en el sub-biog. IV predomina la adherencia localizada. En el grupo de ETEC la AD se presenta con mayor frecuencia y en el grupo no EPEC no ETEC existe una variabilidad en los patrones de adherencia, dado que en los biog. I y III predomina AD, y en el biog. II la AL sobre AD como el sub-biog. IIb, y el IIA con un patrón inverso. Lo anterior sugiere que posiblemente los diferentes patrones de adherencia se asocian a un biog. como lo ha reportado Giraud (21) o con algunos serotipos de EPEC como lo propuso Orskov (12,52), lo que nos induce a pensar que el metabolismo de dicha bacteria presenta asociación a estructuras superficiales que ésta presenta involucradas en la adherencia.

### CONCLUSIONES.

1. LA IDENTIFICACION BACTERIANA POR EL MICROMETODO INNSE Y EL MACROMETODO FUE LA MISMA.
2. EL MICROMETODO INNSE PRESENTO UNA ALTA REPRODUCIBILIDAD EN TODOS LOS ENSAYOS REALIZADOS.
3. EL MICROMETODO INNSE MODIFICADO PRESENTO VENTAJAS AL COMPARARSE CON EL MACROMETODO COMO SON:
  - a) EL NUMERO DE SUSTRATOS QUE SE PRUEBAN ES MAYOR
  - b) LA CANTIDAD DE SUSTRATO EMPLEADO ES MINIMA
  - c) LOS SUSTRATOS PUEDEN MANTENERSE EN ALMACENAMIENTO POR PERIODOS DE 6-12 MESES, EN ESPACIOS REDUCIDOS.
4. POR EL MICROMETODO INNSE MODIFICADO SE REQUIEREN DE 15 SUSTRATOS PARA LA IDENTIFICACION DEL GENERO DE *E.coli.*:  
Mannitol, Celobiosa, Dulcitol, Lactosa, Rafinosa, Ramnosa, Sacarosa, Salicina, Sorbitol, Sorbosa, Xilosa, Arginina, Lisina, Ornitina y ONPG.

5. EL RESULTADO DE SOLO 4 SUTRATOS PUEDE AYUDAR EN LA DIFERENCIACION ENTRE LOS GRUPOS DE EPEC Y ETEC, ESTOS SON: Rafinosa, Sacarosa, Sorbitol y Ornitina.
6. EL METODO DE CLUSTER EMPLEADO PARA AGRUPAR LAS CEPAS DE E.coli. PERMITIO FORMAR DOS GRANDES GRUPOS EN EPEC, DOS EN ETEC Y TRES EN NO EPEC, NO ETEC.
7. LA PRESENCIA DEL PATRON DE ADHERENCIA DIFUSO EN LAS CEPAS DE EPEC PERMITIO UNA CORRELACION IMPORTANTE CON SUS BIOGRUPOS I, II Y III.
8. LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE EPEC UTILIZANDOSE EL MICROMETODO INNSE MODIFICADO NECESITA SER COMPARADO CON LA SEROTIPIFICACION.

## IX. APENDICE .

### COMPOSICION Y PREPARACION DE LOS SUSTRATOS BIOQUIMICOS DEL MICROMETODO INHBS.

La preparación de los sustratos se realiza en condiciones asépticas, usando material previamente esterilizado.

**FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS (ADON, ARA, CEL, DUL, GLU, INOS, LAC, MAN, RAF, RAMN, SALIC, SAC, SOR, SORBS, XIL).**

#### Componentes:

Peptona (Difco Laboratories)	1.0 gr.
Cloruro de Sodio (NaCl)(J.T.Baker)	0.5 gr.
Fosfato dibásico de Potasio (J.T.Baker) (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.003gr.
Carbohidrato (Sigma Chemical Company)	2.0 gr.
Azul de Bromotimol (SIGMA)	0.008gr(0.53ml).
PBS ( Buffer de Fosfatos)	10 ml.

#### Interpretación:

Reacción (+):color amarillo canario.  
(-):color original azul-verde.

#### Preparación:

- Pesar correctamente cada componente de la base y disolverlo en el PBS , sin el indicador.
- Calentar suavemente hasta ebullición.
- Fría la base, añadir el carbohidrato deseado, agitando hasta disolución.
- Ajustar a pH 6.9- 7.1.
- Adicionar el indicador a la solución y homogeneizar completamente.
- Esterilizar por Filtración.

Nota: El Dulcitol hay que disolverlo junto con la base en baño de agua a 100°C. En caso de no disolverse, aplicar fuego directo sin exceder el tiempo de exposición.

-Vaciar 10 µl/pozo de la solución en las microplacas estériles lo más pronto posible para evitar la precipitación del indicador.

**DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS:**

**Lisina Descarboxilasa (LDC).**

**Componentes:**

Peptona	0.5 gr.
Extracto de Levadura (Difco Laboratories)	0.5 gr.
Fosfato Piridoxal (SIGMA)	0.0005gr
Glucosa (SIGMA)	0.5 gr.
Rojo de Fenol (SIGMA)	0.0012gr
L-Lisina (SIGMA)	2.0 gr.
PBS	10 ml.

**Ornitina Descarboxilasa (ODC).**

**Componentes:**

Peptona	0.5 gr.
Extracto de Levadura	0.5 gr.
Fosfato Piridoxal	0.0005gr
Glucosa	0.5 gr.
Rojo de Fenol	0.006gr.
L-Ornitina (SIGMA)	2.0 gr.
PBS	10 ml.

**Arginina Deshidrolasa (ADH).**

**Componentes:**

Peptona	0.5 gr.
Extracto de Levadura	0.5 gr.
Fosfato dibásico de Sodio (J.T.Baker) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.0 gr.
Glucosa	0.05 gr.
Rojo de Fenol	0.0024gr
PBS	10 ml.

**Interpretación para las tres pruebas con aminoácido:**

Reacción (+): presenta un color naranja intenso a violeta.  
(-): color original, amarillo canario.

### Preparación:

- El procedimiento se realiza para cada aminoácido:
- Disolver en PBS la base por calentamiento suave.
  - Fría la solución, agregar el aminoácido y la glucosa agitando continuamente.
  - Ajustar a pH 6.8 la solución con Arginina y la de Lisina; y a pH 6 la solución con Ornitina.
  - Esterilizar por Filtración.
  - Vaciar 10µl/pozo de cada solución en sus respectivas microplacas estériles.

### FENILALANINA-Deaminasa (FDA).

#### Componentes:

Fenilalanina (SIGMA)	0.2 gr.
Extracto de levadura	0.3 gr.
NaCl	0.5 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 gr.
PBS	10 ml.

#### Interpretación:

Para revelar la reacción se añadirán 1 ó 2 gotas de Cloruro Férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 40% en el micropozo.

Reacción (+): precipitado verde oscuro.  
(-): no cambia el color del reactivo (amarillo).

#### Preparación:

- Disolver todos los componentes en PBS por calentamiento suave.
- Ajustar a pH 7.3.
- Esterilizar en Autoclave a 121°C/ 15 Lb de presión/ 15 mín.
- Vaciar 10µl/pozo de la solución en las microplacas.

### PRODUCCION DE INDOL (IND).

#### Componentes:

Triptofano (SIGMA)	0.4 gr.
NaCl	0.5 gr.
Peptona	0.5 gr.
PBS	10 ml.

#### Interpretación:

- Para revelar la reacción se añadirán 1 ó 2 gotas del reactivo de Kovac's al micropozo.

Reacción (+):el reactivo vira de verde-amarillo a violeta.  
(-):sin cambio.

#### Preparación:

- Disolver los componentes en PBS calentando suavemente, en caso de no disolverse completamente, poner a fuego directo no excediendo la exposición, para evitar se evapore la solución.
- Ajustar a pH 7.4
- Esterilizar en Autoclave a 121°C/15 Lb/15 mín.
- Vaciar en las microplacas, 10 µl/pozo, manteniendo caliente la solución en baño maría.

#### HIDROLISIS DE ESCULINA (ESC):

##### Componentes:

Esculina	0.5 gr.
Citrato Férrico (J.T.Baker)	0.025gr.
Citrato de Amonio (J.T.Baker)	0.025gr.
NaCl	0.8 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01 gr.
Fosfato monobásico de Potasio (J.T.Baker)	0.01 gr.
(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
PBS	10 ml.

#### Interpretación:

Reacción (+):Enegrecimiento del medio.  
(-):sin cambio (verde claro).

#### Preparación:

- Pesar los componentes exactamente.
- Disolver en PBS calentando suavemente hasta ebullición.
- Ajustar a pH 7.
- Esterilizar por Filtración.
- Vaciar 10µl/pozo de la solución en las microplacas, manteniendo caliente la solución en baño maría.

#### PRODUCCION DE ACIDO SULFIDRICO (H<sub>2</sub>S).

##### Componentes:

Peptona	2.0 gr.
Citrato Férrico	0.025gr.
Citrato de Amonio	0.025gr.
Tiosulfato de Sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)(J.T.Baker)	0.08 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01 gr.
PBS	10 ml.

##### Interpretación:

Reacción (+): Se observa un precipitado negro en el medio.  
(-): sin cambio (incoloro).

##### Preparación:

- Disolver los componentes en el PBS por calentamiento.
- Ajustar a pH 6.7- 7.
- Esterilizar en Autoclave 121°C/ 15 Lb/ 15 min.
- Vaciar 10µl/pozo en las microplacas

#### REACCION DE UREASA (UREA):

##### Componentes:

Glucosa	0.1 gr.
Urea (Merk)	2.0 gr.
NaCl	0.5 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 gr.
Rojo de Fenol	0.0024 gr.
PBS	10 ml.

##### Interpretación:

Reacción (+): presenta un color rojo a violeta.  
(-): color original , amarillo canario.

##### Preparación:

- Disolver los componentes de la base en PBS, calentando suavemente hasta ebullición.
- Fría la solución, adicionar la urea, la glucosa y disolverlas completamente.
- Ajustar a pH 6.8.
- Esterilizar por Filtración y vaciar en las microplacas 10µl/pozo.

### REACCION DE VOGES-PROSKAUER (VP).

#### Componentes:

Peptona	0.7 gr.
Glucosa	2.0 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 gr.
PBS	10 ml.

#### Interpretación de prueba VP:

Para revelar la reacción se añadirá 1 gota de KOH al 40% y 1 de  $\alpha$ -naftol al 5%. Esperar 15-20 min.

Reacción (+): color rojo en la superficie del medio (presencia de acetoina)  
(-): superficie del medio incolora.

#### Preparación:

- Pesar y rehidratar con PBS la base.
- Calentar suavemente hasta disolución.
- Adicionar la glucosa y disolver.
- Ajustar a pH 6.9
- Esterilizar por filtración y vaciar en microplacas 10  $\mu$ l/pozo.

### UTILIZACION DE CITRATO (CIT).

#### Componentes:

Citrato de Sodio (J.T.Baker)	0.8 gr.
Glucosa	0.02 gr.
Extracto de Levadura	0.05 gr.
Cisteína (monoclorhidratada)	0.01 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 gr.
NaCl	0.5 gr.
Sulfato de Magnesio (J.T.Baker) (MgSO <sub>4</sub> )	0.02 gr.
Azúl de Bromotímol	0.02 gr (1.3ml).
PBS.	10 ml.

#### Interpretación:

Reacción de alcalinidad (+): color azul prusia intenso.  
de acidez (-): color verde.

### Preparación de CIT.

- Disolver los componentes sin el indicador en el PBS, por calentamiento suave hasta disolución.
- Ajustar a pH 6.
- Adicionar el indicador y homogeneizar la solución.
- Esterilizar en Autoclave a 121°C/ 15Lb/ 15min.
- Manteniendo caliente la solución, vaciar de ésta 10µl/pozo en las microplacas.

### UTILIZACION DE MALONATO (MAL).

#### Componentes:

Malonato de Sodio (SIGMA)	0.4 gr.
Glucosa	0.25 gr.
Extracto de Levadura	0.1 gr.
Sulfato de Amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (J.T.Baker)	0.2 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.06 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04 gr.
NaCl	0.2 gr.
Azúl de Bromotimol	0.003gr(0.20ml)
PBS	10 ml.

#### Interpretación:

Reacción de alcalinidad (+): color azul claro a intenso.  
de acidez (-): color verde claro a amarillo.

#### Preparación:

- Disolver los componentes sin el indicador en el PBS, calentando suavemente.
- Ajustar a pH 6.6
- Adicionar el indicador y homogeneizar la solución.
- Esterilizar en Autoclave a 121°C/ 15Lb/ 15min.
- Vaciar 10µl/pozo de la solución en las microplacas, lo más pronto posible para evitar se precipite el indicador.

### REDUCCION DE NITRATO (NIT).

#### Componentes:

Extracto de carne (GIBCO Lab.)	0.3 gr.
Peptona	0.5 gr.
Nitrato de Potasio (K <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> ) (J.T.Baker).	0.1 gr.
PBS	10 ml.

### Interpretación:

Para revelar la reacción , se añadirán 1 gota del reactivo A y 1 de B para NIT a cada micropozo.

Reacción (+): coloración de rojo a cobrizo.  
(-): no cambio de color.

### Preparación:

- Pesar todos los componentes y disolverlos en el PBS por un suave calentamiento.
- Ajustar a pH 7.
- Esterilizar en Autoclave 121°C/ 15Lb/ 15min.
- Vaciar 10µl/pozo de la solución en las microplacas.

### PRESENCIA DE β-GALACTOSIDASA (ONPG).

#### Componentes:

A) Solución ONPG	
O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG)	0.6 gr.
Isopropylthiogalactopiranosido (ITPG)	0.008gr.
PBS.	10 ml.
B) Agua peptonada	
Peptona	1.0 gr
NaCl	0.5 gr.
PBS.	10 ml.

### Interpretación:

Reacción (+): color amarillo  
(-): incoloro.

### Preparación de ONPG.

#### Preparación de la base o agua peptonada:

- Disolver por calentamiento los componentes en el PBS.
- Ajustar a pH 8 -8.4
- Hervir durante 10 min "suavemente", evitando evaporación excesiva.
- Dejar enfriar la solución y ajustar el pH a 7.2- 7.4

#### Preparación de la solución ONPG:

- Disolver el ONPG en 7.5ml de PBS, calentando a baño maría y agitando constantemente, en caso de no ceder, calentar a fuego directo con precaución hasta aclarar la solución.

- Es recomendable no exceda la estancia a fuego directo, ni usar ácidos o bases para su disolución.
- Agregar el ITPG previamente disuelto en el PBS restante.
  - Estando aún caliente la solución ONPG, mezclarla inmediatamente con la solución peptonada 3 partes por 1:

ONPG	2.5 ml
Sol. Peptonada	7.5 ml.

- y ajustar a un pH final de 7.0
- Esterilizar por Filtración.
  - Manteniendo caliente la solución en baño maría, vaciar rápidamente 10µl de ésta en tubos de ensaye de 1ml, para evitar se precipite la solución.

**NOTA:**

Todos los sustratos vaciados en las microplacas y en los tubos pequeños, deberán quedar en el fondo del pozo, evitando la impregnación del sustrato en las paredes.

**Solución Salina reguladora de Fosfatos (PBS) utilizada para la preparación de cada sustrato.**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.9386 gr.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.9272 gr.
ó NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4.5264 gr.
Agua desionizada cbp.	1 lt.
Concentración: 0.1 M.	
pH: 7.0	

**REACTIVOS PARA REVELAR LAS REACCIONES.**  
(Preparación según Mac Faddin y Gerhard, 1981).

Reactivo de Kovac's para la prueba de INDOL.

**Componentes:**

p-Dimetilaminobenzaldehído (Merck)	3.0 gr.
Alcohol Isoamílico (J.T Baker)	75 ml.
Acido clorhídrico (HCl)(J.T Baker)	25 ml.

**Preparación:**

-Disolver el aldehído en el alcohol a 50 - 55°C. Adicionar lentamente el ácido. Finalmente vaciar en un frasco ambar rotulado, y conservar en refrigeración.

Reactivos para la prueba de NITRATOS.

Solución A:

$\alpha$ -naftilamina (Merck)	0.5 gr.
Ac. Acético 5N (J.T Baker)	100 ml.

Preparación:

Disolver el  $\alpha$ -naftilamina en menos de 100ml de ácido por medio de un suave calentamiento, ya disuelto, adicionar el restante ácido. Filtrar la solución y guardarla en un frasco ambar previamente rotulado.

Solución B:

Ac. Sulfanílico (J.T Baker)	0.8 gr.
Ac. Acético 5N	100 ml.

Preparación:

Disolver el Ac. sulfanílico en menos de 100ml de ácido acético, ya disuelto, adicionar el ácido sobrante y vaciar en un frasco ambar previamente rotulado.

Reactivo para la prueba FDA: Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 10 %.

Componentes:

$\text{FeCl}_3$ (J.T Baker)	12 gr.
HCl	2.5 ml.
H <sub>2</sub> O destilada c.b.p.	100 ml.

Preparación:

Disolver el  $\text{FeCl}_3$  en el agua destilada, adicionar lentamente el ácido. Vaciar en un frasco ambar rotulado y guardar en refrigeración.

NOTA:

Las reacciones deben interpretarse inmediatamente después de agregar el respectivo reactivo de la prueba (excepto para VP, esperar 10 mín.); dado que el color producido es inestable y se desvanece rápidamente.

### INDICADORES.

a)Azúl de Bromotimol (ABT)(SIGMA).

Solución stock al 1.5%. Se disuelven 0.15 gr. de ABT en 10 ml de alcohol etílico absoluto o al 96% y se esteriliza por filtración. Guardar la solución en refrigeración.

b)Rojo de Fenol(Merck). Este se disuelve en el PBS de la solución.

Tabla.I. Características de los indicadores.

COLOR			
INDICADOR	RANGO DE pH.	ACIDO	ALCALINO
ABT	6.0 - 7.6	Amarillo	Azúl
ROJO DE FENOL	6.8 - 8.2	Amarillo	Rojo-violeta

Los Métodos de esterilización utilizados para los sustratos y el material empleado fueron:

a) Esterilización por filtración: se utilizaron filtros de plástico (swinex de 25mm. tipo EA; Bedford MA) estériles con membranas (millipore) cuyo poro era de 45  $\mu$ m de diámetro. En condiciones asépticas se filtraron cada uno de los sustratos.

b) Esterilización en Autoclave: Escape lento a 121 °C, 15 Libras de presión, durante 15 minutos.

Las microplacas y las puntas para vaciar el sustrato y la suspensión bacteriana, se esterilizaron por gas (óxido de etileno).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA DE LECTURA .

PRUEBAS	REACCIONES	INTERPRETACION	
		POSITIVO	NEGATIVO
CARBOHIDRATOS	FERMENTACION	Amarillo	Azúl
ADH	DESCARBOXILACION	Rojo o Naranja	Amarillo
LDC	DESCARBOXILACION	Rojo	Amarillo
ODC	DESCARBOXILACION	Rojo	Amarillo
UREA	HIDROLISIS	Rojo	Amarillo
FDA + Reac.	DESAMINACION	Verde obscuro	Amarillo
IND	PRODUCCION DE	Anillo Rojo	A. Amarillo
ESC	HIDROLISIS	Negro	Verde claro
H <sub>2</sub> S	PRODUCCION DE	Negro	Incoloro
VP + Reac.	ACIDIFICACION	Rosa- Rojo	Incoloro
CIT	ASIMILACION	Azúl	Verde
MAL	ASIMILACION	Azúl claro	Amarillo
NIT + Reac.	REDUCCION DE	Rojo- Café	Amarillo
ONPG	HIDROLISIS	Amarillo	Incoloro

## PRINCIPIOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS.

- Pruebas de Fermentación de los hidratos de carbono:** Determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible con la consecuente caída de pH.
- Pruebas de Descarboxilasas: Arginina, Lisina y Ornitina:** Medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la consiguiente alcalinidad.
- Prueba de la Fenilalanina-desaminasa:** Determinar la capacidad de un organismo de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico por su actividad enzimática, con la consiguiente acidez resultante.
- Prueba de Indol:** Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.
- Prueba de Esculina:** Determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucosido esculina en esculetina y glucosa.
- Prueba de producción de ácido sulfhídrico:** Determinar si se ha liberado H<sub>2</sub>S por acción enzimática en los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible color negro.
- Reacción de la Ureasa:** Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.
- Prueba de la β-galactosidasa:** Demostrar la presencia o la ausencia de la enzima β-galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG).
- Reacción de Voges-Proskauer:** Determinar la capacidad de algunos organismos de producir a partir de la fermentación de la glucosa un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetofina).
- Prueba del Citrato:** Determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.
- Prueba del Malonato:** Determinar la capacidad de un organismo de utilizar malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad.
- Prueba de Reducción de Nitratos:** Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato a nitrito o nitrógeno libre.

## **X. BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Albridge KE, Gardner BB., Clark SJ. and Matsen SM. Comparison of Micro-ID, API 20E and Conventional Media Systems in Identification of Enterobacteriaceae. *J.Clin.Microbiol.* 1988;7(6):507-513.
- 2.- Aldridge DE, Hodges RL. Correlation Studies of Entero-Set 20, API 20E, and Conventional Media Systems for Enterobacteriaceae Identification. *J.Clin.Microbiol.* 1981;13: 120-125.
- 3.- Alterthum F. and Ingram LO. Efficient Ethanol Production from Glucose, Lactose and Xylose by Recombinant *Escherichia coli*. *Appl.Envir.Microbiol.* 1989;55(8):1943-48.
- 4.- Baldwin TJ, Brook SF, Knutton S. et al. Protein Phosphorylation by Protein Kinase C in HEP-2 Cells Infected with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 1990; 58(3):761-65.
- 5.- Beverley A. et al. Comparison of Carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. *FEMSLE.* 1991;84:151-56.
- 6.- Burrow, W.(1964). *Text of Microbiology.* 18<sup>a</sup> Edic. Philadelphia. 1155p.
- 7.- Crisci JV. (1987). *Introducción a la Teoría practica de la Taxonomía numérica.* OEA. México, 136pp.
- 8.- D'Amato RF., Bottone EJ., Amsterdam T. Substrate Profile Systems for the Identification of Bacteria and Yeast by Rapid and Automated Approaches. Cap.18 In: Balows et al. *Manual of clinical Microbiology.* Washington. ASM, 1991: p 128- 136.
- 9.- D'Amato RF., McLaughlin CJ. and Ferraro MS. Rapid Manual and Mechanized/Automated Methods for Detection and Identification of Bacteria and Yeast. Cap.6 In: Balows et al. *Manual of Clinical Microbiology.* Washintong. ASM, 1991: p 52- 65.
- 10.- Donnenberg MS, Donohoe-Rolfs A, Kausch GT. Epithelial Cell Invasion: An Overlooked Property of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Associated with the EPEC Adherence Factor. *J.Infect.Dis.* 1989;160(3):452-459.

- 11.- Edberg S., Atkinson B. et al. Clinical Evaluation of the Micro-ID, API 20E and Conventional Media System for Identification of Enterobacteriaceae. J.Clin.Microbiol. 1979;10(2):161-67.
- 12.- Edelman R, Levine MM. Summary of NIAID workshop on Enteropathogenic *E.coli* (EPEC). J.Infect.Dis.1983;147 (6): 1108-1118.
- 13.- Eidels L., Proia RL, Harty DA. Membrane receptors for bacterial toxins. Microbipol Rev. 1983;47:596-620.
- 14.- Eisenstein Barry I. Enterobacteriaceae. Parte III, Subtit.195 In:Lennette EH. et al. Manual of Clinical Microbiology. Washington. ASM, 1989: p 1658- 1673.
- 15.- Errol VR. and Matches JR. Temperature Range for Growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected Coliforms in *E.coli* Medium. J.Clin.Microbiol. 1990;4(28):803-805.
- 16.- Farmer III JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FN, et al. Biochemical Identification of New species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical specimens. J. Clin.Microbiol. 1985;21(1):46-76.
- 17.- Farmer III JJ, Kelly Michael T. Enterobacteriaceae. Cap.36 In: Balows A. et al. Manual of Clinical Microbiology. Washington. ASM, 1991: p 360- 386.
- 18.- Gangarosa EJ. Epidemiology of *Escherichia coli* in the United States. J. Infect. Dis. 1978;137(5):634-638.
- 19.- Gerhardt, Murray, Costilow, et al. (1981). Manual of Methods for General Bacteriology. 2ed. ASM, Washington DC, 524 pp.
- 20.- Giannella RA, Luttrell M. and M. Thompson. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. Am. J. Physiol. 1983;245:492.
- 21.- Giraud R. Ma. del Carmen. Desarrollo de un Sistema Miniaturizado para la Identificación de Bacterias Gram negativas. Tesis de Maestría en Biotecnología. UNAM. 1988;91p.
- 22.- Gooch III, WA. and Hill GA. Comparison of Micro-ID and API Ir in Rapid Identification on Enterobacteriaceae. J.Clin. Microbiol. 1982;15(5): 885-90.
- 23.- Gray CT, Wimpenny WT. et. al. I. Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria. II Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs Cycle enzymes in *Escherichia coli*. Biochim., Biophys. Act. 1966; 117:33-41.

- 24.- Gubash SM, Anand M. and Stokman M. Inhibition of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 by Bromthymol Blue. *J. Clin. Microbiol.* 1988 26 (11):2248- 49.
- 25.- Guerrero R., González C. y Medina E. (1990). *Epidemiología. Eddison Wesley Iber. México.* 218 pp.
- 26.- Hayek LJ. and Willis GW. A Comparison of two Comercial Methods for the Identification of Enterobacteriaceae -API 20E and the Enterotube- with Conventional methods. *J.Clin.Microbiol.* 1976;29:158-61.
- 27.- Heizman W., Gutbrod D., Doller PC. and Werner H. Rapid Identification of *Escherichia coli* Flourocult Media and Positive Indole Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(12):2682-84.
- 28.- IPN (Acad.Profrs.Lab.Bact.Méd.)1983. Manual de Laboratorio de Bacteriología Médica.4a.Edic.México; p 30-35.
- 29.- Jawetz E., Melnick J.(1981). Manual de Microbiología Médica. Edit. Manual Moderno, México;595p.
- 30.- Jensen KJ. and Pedersen S. Metabolic Growth Rate Control in *Escherichia coli* May Be a Consequence of Subsaturaton of the Macromolecular Biosynthetic Apparatus with Substrates and Catalytic Components. *Microbiol.Rev.* 1990;54(2):89-100.
- 31.- Koneman WE, et al.(1988).Diagnostic Microbiology. 3ed. JB Lippincott Company, Philadelphia.
- 32.- Kopecko DJ. Baron LS. Genetic Determinants of virulence in *Shigella* sp. and dysenteric strains of *E. coli* :their involmente in the pathogenesis of dysentery. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* 1985;118:71-95.
- 33.- Lehninger AL.(1982). Bioquímica. Edit.OMEGA,Barcelona,1117pp.
- 34.- Levine MM, *Escherichia coli* that cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent.*J.Infect.Dis.*1987;155 (3):377-388.
- 35.- Levine MM, and Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and Pathogenesis. *Epidemiol.Rev.*1984;6:31-51.
- 36.- Mandell L, Douglas G, Bennett J.(1990).Principles and Practice of Infectious Diseases. 3ed. Churchill Livingstone, N.Y. p 837-851.

- 37.- Mac Paddin J. (1984) Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana, México; 301p.
- 38.- Marr AG. Growth Rate of *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 1991;55(2):316-333.
- 39.- Martin R., Siavoshi F. and Mc Dougal DL. Comparison of Rapid NPT System and Conventional Methods for Identification of nonsaccharolytic Gram-Negative Bacteria. J. Clin. Microbiol. 1986;24(6):1089-92.
- 40.- Myrvik et al. (1974). Fundamentals of Medical Bacteriology and Micology. FEBIGER. Philadelphia; 501p.
- 41.- Nagy B., Casey TA. and Moon WH. Phenotype and Genotype of *E. coli*. isolated from Pigs with Postweaning Diarrhea in Hungary. 1990;28(4):651-53.
- 42.- Nicoletti M. and Superti F. Virulence Factors of Lactose negative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Somalia. J. Clin. Microbiol. 1986;26:524-29.
- 43.- Okerman L. and Devriese L. Biotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from Rabbits. J. Clin. Microbiol. 1985; 22(6): 955-958.
- 44.- Olvera BA. Evaluación Bacteriológica en la Bahía de Mansanillo y Santiago en el Estado de Colima, Méx. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. 1990, 63 pp.
- 45.- O'Donnell ED., Koufman FJ. et al. Evaluation of the R-B System for the Identification of Enterobacteriaceae. 1970, Vol 53; New York. 1970;53:p ?
- 46.- Patman S, March S, Ahmed R; et al. Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H57. J. Clin. Microbiol. 1988;26(10):2006-2012.
- 47.- Sajjan SU. and Forstner JF. Characteristics of Binding of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 Strain CL-49 to Purified Intestinal Mucin. Infection and Immunity. 1990;58(4):860-867.
- 48.- Smith PB., Tomfohrde KM. et al. API System: A Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol. 1972; 24(3):449-52.
- 49.- Toledo RF, Alvariza M, Murahovschi J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes and Endemic Diarrhea in Infants. Infection and Immunity. 1983;39(2):586-589.

- 50.- Vinal A. and Dallas W. Partition of Heat-labile-Enterotoxin Genes between Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. *Inf. Immun.* 1987;6(5):1329-31.
- 51.- Wayne WD. (1985). *Bioestadística*. Limusa Edit., México;485 pp.
- 52.- Wing Cheong Yan et al. Clonal Origin, Restricted Natural Distribution, and Conservation of Virulence Factors in Isolates of Enterotoxigenic *E.coli* Serogroup O126. *J.Clin. Microbiol.* 1988;26(8):1477-1481.