

170
2^a Ley



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



Factores Enterotóxicos de Cepas Enteroagregativas
de Escherichia coli en Líneas Celulares

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a
Diana Trujillo Cabrera



México, D. F.

Julio de 1995

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FALLA DE ORIGEN TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

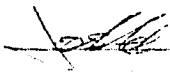
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
FACTORES ENTEROTOXICOS DE CEFAS ENTEROAGREGATIVAS DE
Escherichia coli EN LINEAS CELULARES.

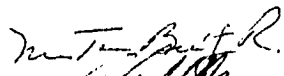
realizado por DIANA TRUJILLO CABRERA.

con número de cuenta 8724924-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M.C. JOSE MOLINA LOPEZ. 

Propietario M. en C. MARIA TERESA BENITEZ RODRIGUEZ. 

Propietario BIÓL. CARLOS ALBERTO CASTILLO POMPEYO. 

Suplente M. en C. ROSAURA MAYEN ESTRADA. 

Suplente BIÓL. ELVA BAZAN MORA.


COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría de M. en C. José Molina López en el Departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

DEDICATORIA:

A MIS PADRES POR EL APOYO QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.

A MIS HERMANOS: CECILIA, JULIO CESAR, ROSALBA Y VIRGINIA, POR
TODO SU APOYO Y AYUDA INCONDICIONAL, GRACIAS.

DE MANERA MUY ESPECIAL:

A TI MADRE POR TODO EL AMOR Y COMPRENSION QUE ME HAS BRINDADO,
GRACIAS POR SER COMO ERES.

AGRADECIMIENTOS:

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, POR SU VALIOSA COLABORACION Y AYUDA DESINTERESADA EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

DE MANERA ESPECIAL:

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO, DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, POR HABER PERMITIDO REALIZAR MI TRABAJO DE TESIS EN SUS INSTALACIONES.

M. en C. JOSE MOLINA LOPEZ POR SU ASESORIA Y TIEMPO BRINDADO, GRACIAS.

I N D I C E

I.- INTRODUCCION	1
1) FAMILIA ENTEROBACTERIACEA	2
2) <u>Escherichia coli</u>	7
3) <u>Escherichia coli</u> DIARROGENICA	8
i) <u>Escherichia coli</u> enteropat6gena (EPEC)	9
ii) <u>Escherichia coli</u> enterotoxig6nica (ETEC)	12
iii) <u>Escherichia coli</u> enteroinvasiva (EIEC)	14
iv) <u>Escherichia coli</u> enterohemorr6gica (EHEC)	15
II.- ANTECEDENTES	17
a) <u>Escherichia coli</u> enteroagregativa (EAggEC)	18
III.-HIPOTESIS	23
IV.- OBJETIVOS GENERALES	24
V.- MATERIAL Y METODO	25
A) CEPAS EN ESTUDIO	25

B) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA.....	25
C) ESTUDIO SEROLOGICO.....	26
D) ENSAYO DE ADHERENCIA EN CELULAS HEP-2.....	26
E) ENSAYO DE ENTEROTOXICIDAD DE <u>E. coli</u>	28
F) HEMOLISIS.....	29
G) ANALISIS ESTADISTICO.....	29
VI. -RESULTADOS.....	30
VII. -DISCUSION.....	42
VIII. -CONCLUSIONES.....	46
IX. -APENDICE.....	47
X. - REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	50

RESUMEN

Escherichia coli es uno de los agentes causales de diarrea severa en niños menores de cinco años. Entre los mecanismos de virulencia que tienen las cepas de E. coli para causar diarrea en humanos se encuentra la adherencia a células epiteliales, la invasión y multiplicación en el citoplasma de la célula infectada, producción de enterotoxinas termolábiles y/o termoestables y la síntesis de citotoxinas similares a la producida por Shigella dysenteriae tipo 1. Dentro del grupo de E. coli asociada con diarrea en humanos se han encontrado tres tipos de adherencia a células HEP-2: localizada, difusa y agregativa. La importancia clínica de E. coli enteroagregativa (EAggEC) está plenamente establecida, sin embargo sus mecanismos de patogenicidad no se han definido.

En este trabajo se estudiaron 69 cepas de E. coli aisladas de muestras fecales de niños menores de cinco años con diarrea con y sin sangre. El objetivo fue determinar el daño producido en diferentes líneas celulares (HEP-2, HeLa, Vero y CHO) por el sobrenadante filtrado de estas cepas de E. coli con un patrón de adherencia agregativo a células HEP-2 y cepas que desprenden la monocapa de células HEP-2 en el ensayo de adherencia a 3 hrs. Las cepas se identificaron por pruebas bioquímicas y se tipificaron serológicamente con antisueros somáticos y flagelares específicos, además se investigó la presencia de hemolisinas en diferentes especies de animales.

Los resultados muestran que, con respecto al daño celular se presentó elongación en el 53% de HEP-2, 17% en HeLa, y un menor porcentaje para las líneas Vero y CHO. Hubo redondeo en un 37% en HEP-2, 71% en HeLa, 45% en Vero y 59% en CHO. Para la lisis celular fue en un bajo porcentaje con respecto a HEP-2, HeLa y CHO, siendo la línea Vero la más afectada en un 48%.

La hemólisis alfa fue de un 48% en humano, para caballo un 40% y para carnero sólo 20%. La hemólisis beta sólo se presentó en eritrocitos de caballo en un 47%, con respecto a los eritrocitos de conejo ésta fue negativa en un 97%. Se concluye que en el sobrenadante filtrado de cepas enteroagregativas (EAggEC) de E. coli existe un factor enterotóxico con actividad citotónica y citotóxica, que afecta a las líneas celulares probadas.

I. INTRODUCCION.

Hace algún tiempo, el mundo de los seres vivos se subdividía en reino vegetal y animal. Sin embargo, gracias al desarrollo del microscopio, se descubrió la existencia de organismos no detectables a simple vista. Se observó rápidamente, que estos microorganismos no eran plantas ni animales, de ahí que Haeckel propusiera en 1866 un nuevo reino, el de los Protistas, que abarcaba a las bacterias, los hongos, los protozoos y las algas (33).

El grupo más numeroso entre los protistas son las bacterias, de taxonomía compleja y sometidas a cambios frecuentes a medida que van aumentando los conocimientos sobre sus propiedades fisiológicas y genéticas. A pesar de este problema, las bacterias se subdividen según sus propiedades de tinción con la técnica de Gram y según su morfología (33).

Con el desarrollo de métodos más sofisticados para estudiar la biología de los protistas, se apreció que estos microorganismos se subdividían en dos grupos en función de su estructura celular: los eucariotas y los procariotas. Las células eucariotas muestran una estructura más compleja que las procariotas y contienen diversos orgánulos cerrados por una membrana. Las células procariotas son de menor tamaño y estructura algo menos compleja (33).

Actualmente la clasificación de los seres vivos se basa en lo propuesto por Margulis, donde agrupa a los seres vivos en dos superreinos que son Procariote y Eucariote y después establece cinco reinos: Animaliae, Plantae, Protozoae, Fungi, que caen dentro de los eucariotes y el quinto reino Monera que incluye a las bacterias y pertenecen al superreino Procariote (31).

1) FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

La familia **Enterobacteriaceae** constituye el conjunto mayor y más heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia médica. Se han descrito al menos 27 géneros con más de 110 especies. Estos géneros se han clasificado en función de la homología del ADN, las propiedades bioquímicas, las reacciones serológicas, la susceptibilidad a bacteriófagos específicos y los patrones de sensibilidad a antibióticos. A pesar de la complejidad de esta familia, más del 95 % de los aislados de importancia médica corresponden a 10 géneros (33).

Las enterobacterias son organismos procariontes de distribución mundial, ya que se encuentran en el suelo, agua, vegetación y formando parte de la biota bacteriana normal de casi todos los animales, incluido el hombre. Algunos miembros de esta

familia (Shigella, Salmonella, Yersinia pestis) siempre se asocian a enfermedad cuando se aislan en el hombre, mientras que otros como Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis son miembros de la biota sapróbia normal que produce infecciones oportunistas, pero bajo ciertas condiciones, ambos se comportan como agentes patógenos. Estas infecciones se transmiten a través de un reservorio animal, un portador humano o por la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente susceptible (33).

Los miembros de esta familia son bacilos de tamaño medio (0.5-5.0 μm) inmóviles ó móviles por medio de flagelos peritricos , pero no esporuladores, crecen en una atmósfera anaerobia (anaerobios facultativos), y suelen ser necesarias de 18-24 horas de incubación para su crecimiento en diversos medios selectivos y no selectivos (33).

Las enterobacterias tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa, reducen los nitratos a nitritos y son oxidasa-negativas. La ausencia de citocromo oxidasa en ellas es una característica importante, ya que permite diferenciarlas de muchos bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores (33).

La capacidad para fermentar la lactosa se emplea como característica para diferenciar a la mayoría de las cepas de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter que

presentan esta capacidad, de aquellas que no la poseen como es el caso de Salmonella y Shigella. En el primer caso, el crecimiento de las colonias en el agar MacConkey se caracteriza por poseer una coloración roja, en tanto que las segundas no evidencian coloración alguna (33).

Algunos miembros de la familia tienen cápsulas prominentes en tanto que las demás cepas están rodeadas en su mayoría, por una capa de limo débilmente fijada y difusible (33).

En el organismo, las superficies mucosas y endoteliales están constantemente bañadas por secreciones (saliva, sangre, orina y moco) que son ricas en sustancias con actividad bactericida que junto con los productos metabólicos y las funciones mecánicas como el estornudo, la tos, el movimiento ciliar, la descamación y la peristalsis, limpian las superficies eliminando bacterias patógenas (3), por tanto, es lógico que los organismos de la biota normal así como los patógenos deben de adherirse a las células del huésped para contrarrestar estos mecanismos normales que los eliminan.

La adherencia a células que presentan estos microorganismos es de importancia fundamental en sistemas biológicos y ha recibido gran atención en microbiología médica por la aplicación de este proceso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas, ya que constituye el evento inicial en el

establecimiento de la colonización de los tejidos epiteliales del huésped y dicho proceso conduce a la formación de verdaderos habitats ecológicos distintivos que juegan un papel importante en la fisiología y defensa de las mucosas por parte del huésped ante el agente extraño (3).

El fenómeno de la adherencia no es un proceso dañino por sí mismo, pero favorece la integración de factores de patogenicidad con sitios blancos en el huésped; las toxinas que producen las bacterias patógenas del tracto intestinal pueden interactuar más fácilmente con su receptor cuando previamente existe una interacción entre la bacteria y la superficie de la célula intestinal. Así también, los microorganismos capaces de invadir y multiplicarse dentro de los tejidos, deben de adherirse inicialmente a un sitio específico de la célula y posteriormente penetrar mediante diversos mecanismos.

Las bacterias patógenas no colonizan ni dañan los tejidos del huésped indiscriminadamente. De hecho, existe una marcada especificidad hospedatoria de especie por: el huésped, edad del mismo, tejido, células blanco, etc. Se ha propuesto que esta selectividad está determinada por el reconocimiento específico de moléculas presentes en la membrana de las células del huésped que actúan como RECEPTORES para moléculas complementarias presentes en la superficie bacteriana con actividad de lectinas llamadas LIGANDOS o ADHESINAS, que permiten la unión de la bacteria a la

célula mediante interacciones hidrofóbicas.

Inicialmente, existe una interacción de tipo reversible que culmina en la unión irreversible de las células en contacto. Esta interacción está regida por factores fisicoquímicos que a su vez están determinados por la naturaleza química de la membrana celular y la pared bacteriana en interacción, y por la composición química del ambiente. Los mecanismos por los cuales las células se unen a otras, son muchos y variados; incluyendo interacciones semejantes a las de lectinas y diversos sacáridos, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, así como fuerzas de Van der Waals (38).

Las hemaglutininas son aquellas adhesinas con el atributo funcional de aglutinar eritrocitos de una o varias especies animales. De hecho, las propiedades adherentes de E. coli fueron inicialmente descritas por Guyot en 1908 (12), quien observó la capacidad de ciertas cepas de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies animales. En años posteriores esta propiedad fue correlacionada con la presencia de fimbrias, sin embargo, no todas las fimbrias tienen la capacidad de hemaglutinar.

2) Escherichia coli.

E. coli fue originalmente descrito como un parásito del intestino denominado enteropatógeno por Bray en 1945 (40,46) tras demostrar que una cepa antigénicamente distintiva de E. coli era responsable de producir diarrea en nosocomios durante el verano causando brotes de diarrea infantil. Varela y col. en 1946 (47) reportaron el aislamiento de E. coli de un caso mortal de diarrea.

En el caso de las bacterias como E. coli la clasificación serológica se basa en tres grupos principales de antígenos: polisacárido somático "O", capsulares "K" y flagelares proteicos "H".

El polisacárido termoestable "O" es el principal antígeno de la pared celular, éste junto con el lípido "A" y el oligosacárido del core o núcleo forman el lipopolisacárido (LPS). El LPS, denominado también endotoxina, lo tienen solo las bacterias gramnegativas. Gran parte de las manifestaciones tóxicas de las infecciones por bacilos gramnegativos son producidas por el lípido "A" que es un componente lipídico del lipopolisacárido asociado a la membrana externa que se libera con la lisis celular (33). Los antígenos específicos "O" se asocian a cada género, aunque se observan reacciones cruzadas entre géneros estrechamente relacionados como Escherichia y Shigella. Los antígenos se detectan por aglutinación

con los antisueros específicos.

Los antígenos "K" de naturaleza polisacárida pueden interferir en la detección de los antígenos "O" por lo que es necesario eliminarlos hirviendo la suspensión bacteriana (33). El antígeno "K" es compartido por diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Los organismos con antígenos "K" específicos se asocian a mayor virulencia (*Escherichia coli* K1 produce meningitis neonatal). Los antígenos "H" son proteínas flagelares termolábiles.

3) *Escherichia coli* DIARROGENICA.

Las infecciones intestinales figuran como una de las causas de mortalidad considerable en niños, especialmente en países en desarrollo (23,25), en donde las bacterias juegan un papel preponderante. Actualmente, *E. coli* es reconocido como una causa importante del síndrome diarreico. A la fecha se acepta que existen cuatro grupos bien definidos de cepas de *E. coli* capaces de causar diarrea en humanos: enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC) y enterohemorrágicas (EHEC) (25).

En 1987 Levine (25) propuso la existencia de un quinto grupo, al cual denominó como enteroadherente (EAEC), basándose en la capacidad de cepas de *E. coli* para adherirse con diferentes

patrones a células en cultivo de tejidos. Este término fue poco aceptado por diferentes grupos de investigación, por considerar que la adherencia era un mecanismo de patogenicidad indispensable que compartían todas las cepas de E. coli capaces de producir diarrea en humanos, y no sólo aquellas que tenían la capacidad para adherirse a algún tipo de células cultivadas en el laboratorio.

La clasificación de cepas de E. coli asociadas a diarrea en humanos se hace con base a los mecanismos de patogenicidad y sus diferentes interacciones con la mucosa intestinal, los distintos síndromes clínicos, las diferencias en la epidemiología y los distintos serotipos O:H (25,46).

i) Escherichia coli ENTEROPATOGENA (EPEC).

Los primeros reportes sobre la capacidad de algunas cepas de E. coli para causar diarrea severa en niños, aparecieron en la literatura médica a mediados de los años 40s. Bray en 1945 (7) en Inglaterra y Varela y col. (47) en México describieron, en forma independiente, la presencia de cepas de E. coli como agente patógeno único en coprocultivos obtenidos de niños pequeños con diarreas severas. La aglutinación de estas bacterias por el suero de los niños enfermos o por suero de conejos vacunados contra Salmonella adalaida demostró que cepas de E. coli obtenidas de heces de niños enfermos tenían características serológicas

diferentes, a pesar de pertenecer a la misma especie (7,47). Neter y col. en 1950 (36) utilizaron el término de E. coli enteropatógena (EPEC) para referirse a estos serogrupos. Los serogrupos clásicos de EPEC comprenden los siguientes: O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142 y menos frecuentemente O18, O44, O112 y O114.

Casi al mismo tiempo que Levine y col. en 1978 (26) restablecieron la virulencia de cepas de EPEC, a través de sus estudios en voluntarios humanos, Cravioto y col. en 1979 (8) describieron que, a diferencia de otras cepas de E. coli, las EPEC presentaban la capacidad de adherirse en forma de microcolonias a células epiteliales mantenidas en cultivo. La formación de estas microcolonias fue denominada como adherencia localizada por Scaletsky y col. (42).

Esta capacidad para adherirse en forma localizada la compartían todas las cepas EPEC, independientemente de su serotipo, y se relacionó con la presencia de un plásmido que presenta un peso molecular de 50 a 70 MDa (1). Aunque la adherencia localizada es una característica de cepas EPEC, Cravioto y col. (11) y Scotland y col. (43) han demostrado que existen otras cepas no pertenecientes a serotipos enteropatógenos capaces también de adherirse en forma localizada a células HEP-2.

Más recientemente, Knutton y col. en 1987 (22) observaron que el proceso descrito anteriormente, se produce tanto en enterocitos humanos como en cultivos celulares utilizando células HEp-2 . Estos autores sugirieron que el proceso consiste de dos etapas:

1) Adherencia: inicialmente, las bacterias se adhieren a las microvellosidades, quizá mediante estructuras fimbriales de superficie o adhesinas codificadas por plásmidos y posteriormente...

2) Formación de Pedestal: estos microorganismos aparecen íntimamente asociados a la membrana celular, en áreas del enterocito literalmente libres de microvellosidades, como resultado quizá de un producto tóxico, la cual se proyecta hacia el organismo envolviéndolo parcialmente, dando así la apariencia de que el organismo descansa sobre un pedestal bajo el cual se observa una región densa de actina polimerizada.

La segunda etapa puede ocurrir independientemente de la primera. Esto se demostró al observar que una cepa curada del plásmido (60 MDa) que le confiere propiedades de adherencia todavía es capaz de causar la formación característica del pedestal y no impide la destrucción de las microvellosidades, lo que sugiere la existencia de otras moléculas cuya síntesis está codificada en genes del cromosoma que también sintetiza las proteínas que posiblemente

están involucradas en la segunda etapa.

Scaletsky y col. en 1985 (42) describieron que algunas cepas de EPEC se adhieren a células HeLa o HEp-2 siguiendo dos patrones diferentes, llamados: adherencia localizada (AL) y adherencia difusa (AD). Las bacterias que se adhieren en forma localizada forman microcolonias definidas en ciertas áreas de la célula, mientras que las que muestran la difusa, se adhieren a toda la superficie celular. En 1985, Nataro y col. (35) demostraron que dichos patrones de adherencia estaban mediados por plásmidos.

ii) Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA (ETEC).

Las cepas de ETEC causantes de diarrea en humanos y animales se caracterizan por la producción de una o dos enterotoxinas codificadas en plásmidos llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (25,46). La LT se asemeja antigénicamente a la toxina colérica. La toxina ST es un polipéptido, rico en cisteína y activa la guanidilciclasa de las células epiteliales intestinales promoviendo el flujo de agua hacia el lumen intestinal (21). Las manifestaciones clínicas de la infección por ETEC son diarrea acuosa, náusea, dolor abdominal, y fiebre de bajo grado (25).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en diferentes regiones

geográficas del mundo revelan la prevalencia de un número limitado de serotipos O:H de ETEC, de los cuales algunos grupos elaboran tanto la toxina LT como la ST y usualmente poseen factores de colonización. Sin embargo, para que una cepa enterotoxigénica sea patógena, es necesaria la presencia de factores de colonización que permiten a ETEC adherirse a la mucosa del íleo, en donde las enterotoxinas secretadas entran en proximidad con sitios blancos en las células epiteliales. Evans y col. reportaron en 1975 (15) y más tarde en 1978 (14) la presencia de fimbrias en ETEC serotipo O78:H11, las cuales fueron denominadas: FACTORES DE COLONIZACION I y II (CFA/I y CFA/II), respectivamente. Años más tarde se demostró que la presencia de antígenos fimbriales en ETEC no se limitaba a los CFA/I y CFA/II.

Cravioto y col. (1982) y Smith (1982) demostraron que las cepas de ETEC que eran identificadas como CFA/II con base al patrón de hemaglutinación, eran en realidad combinaciones elaboradas de tres antígenos distintos denominados CS1 (6.3 KDa), CS2 (15.3 KDa) y CS3 (14.7 KDa), los cuales son codificados en un sólo plásmido (10,45). Dependiendo del serotipo y del biotipo, se han encontrado cepas que expresan los antígenos CS1 y CS3, CS2 y CS3 o sólo con CS3. No se han observado cepas con CS1 y CS2 simultáneamente. El CFA/I, CS1 y CS2 son adhesinas que corresponden a fimbrias rígidas de 6-7nm de diámetro, mientras que el CS3 posee una estructura delgada y flexible de 2-3nm de diámetro. Los antígenos CS1, CS2 y CS3 se encontraron solamente en un número limitado de serogrupos. Las

características de CS3 se asemejan a las de las fimbrias de cepas porcinas de ETEC que posee antígenos fimbriales K88 y F41 (25).

iii) Escherichia coli ENTEROINVASIVA (EIEC).

Las cepas de EIEC pertenecen a grupos serológicamente diferentes a los de ETEC o EPEC, sin embargo, están antigénicamente relacionados a los serogrupos "O" de Shigella (25,46). EIEC se caracteriza por la capacidad de invadir y proliferar dentro de las células epiteliales intestinales, de causar muerte celular y de acumular leucocitos polimorfonucleares (PMNs), produciendo disentería bacilar semejante a la producida por Shigella. La capacidad de invasividad está asociada a la presencia de plásmidos de 140 MDa que codifican para la producción de varias proteínas de membrana externa involucradas en la invasividad (25).

Estos organismos pueden ser inmóviles, no fermentadores o fermentadores lentos de la lactosa y anaerobios facultativos (46). Nicoletti y col. en 1987 (37) reportaron que algunos organismos de E. coli lactosa-negativos son capaces de presentar factores asociados a la virulencia como son la capacidad de producir hemolisinas y la hemaglutinación. La mayoría de los estudios epidemiológicos prestan más atención a los organismos fermentadores de la lactosa, menospreciando el potencial patogénico de los no fermentadores de este azúcar. Por otro lado, debido a la proximidad genética entre EIEC y Shigella, y a la similitud del cuadro clínico

que presentan ambos organismos, las infecciones por EIEC pueden ser confundidas fácilmente con las infecciones causadas por Shigella. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, dolores abdominales, toxemia, diarrea acuosa seguida de evacuaciones sanguinolentas y mucosas, y a la presencia de abundantes PMNs (25).

iv) Escherichia coli ENTEROHEMORRAGICA (EHEC).

Estas cepas fueron descritas inicialmente en 1982 por Riley y col. (39), en un brote de colitis hemorrágica en los Estados Unidos de Norteamérica. El síndrome clínico se caracteriza por la producción de una diarrea abundante acompañada de sangre, sin leucocitos fecales en pacientes sin fiebre. Estas características distinguen este cuadro del causado por EIEC o Shigella, que son caracterizados por la presencia de fiebre y moco conteniendo leucocitos fecales. El serotipo O157:H7 fue el organismo causal de este brote y también se le ha involucrado en el síndrome urémico hemolítico, en diarrea en guarderías infantiles, escuelas y centros de salud. Recientemente, se ha propuesto que otro serotipo (O26:H11) reconocido anteriormente como EPEC se incluya dentro de la categoría EHEC debido a que comparte características patogénicas (25).

En las cepas O157:H7 de EHEC, se ha reportado la presencia de dos citotoxinas potentes que son codificadas por fagos cuya actividad se ha demostrado en células HeLa y Vero (39). Una de estas toxinas, la toxina I semejante a Shiga o también llamada toxina Vero (VTI), es aparentemente idéntica a la citotoxina/neurotoxina/enterotoxina producida por Shigella dysenteriae tipo I (toxina de Shiga) y su actividad citotóxica en células Vero es neutralizada por anticuerpos anti-toxina de Shiga. La segunda citotoxina, toxina II semejante a Shiga o toxina Vero II (VT II) no es neutralizable por este antisuero. La capacidad de adherencia a células intestinales Henle 407 del serotipo O157:H7 está relacionada con la presencia de un plásmido de 60 MDa, que codifica para la expresión de una estructura fimbrial. En el intestino, la infección por EHEC está confinada solamente al ciego y al colon a diferencia de EPEC cuya infección involucra el intestino entero (24,25).

II. ANTECEDENTES

En 1987, Nataro y col. (34) propusieron una quinta categoría de cepas diarrogénicas de E. coli denominada E. coli enteroadherente agregativa (EAAEC), basados en datos epidemiológicos y en la observación de un tercer patrón de adherencia agregativa a células HEp-2 de cepas de E. coli EAF-negativas asociadas con gastroenteritis infantil en Chile . Este patrón difiere de los patrones reportados por Scaletsky y col. (42) (AL y AD) en el cual los organismos se asocian a las células HEp-2 y se apilan formando agregados también sobre la superficie del vidrio. Nataro y col. (34) sugirieron que algunas de las cepas enteroadherentes (EAEC) estudiadas por Mathewson y col. (28,29) son en realidad cepas que presentan el patrón de adherencia agregativa en células HEp-2 y por lo tanto deben incluirse en la categoría de enteroadherente agregativas (EAAEC) (34).

Aparentemente, las diferencias en la interpretación microscópica del patrón de adherencia de E. coli a las células HEp-2 debe haber contribuido a la controversia concerniente a la ubicación de estas cepas diarrogénicas EAF (-), no pertenecientes a los serogrupos clásicos de EPEC, dentro de las categorías reconocidas hasta ahora y asociadas al potencial patógeno de cepas que presentan adherencia difusa en la diarrea infantil.

Recientemente, Bhan y col. (5) reportaron la asociación de cepas de E. coli que presentan el patrón de adherencia agregativa con diarrea persistente en India y las clasificaron dentro de la categoría de Escherichia coli enteroagregativa (EAggEC).

a) Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA (EAggEC).

Las cepas EAggEC constituyen el grupo descrito más recientemente de cepas de E. coli causantes de diarrea. Estas bacterias, dañan las vellosidades del colon produciendo una necrosis hemorrágica, aunque los mecanismos patogénicos de estos microorganismos aún no están totalmente esclarecidos. Epidemiológicamente se considera como una causa importante de diarrea persistente en niños. En un estudio de cohorte realizado por Cravioto y col. en 1991 (11), se reportó una frecuencia de 636 casos diarreicos durante los dos años que duró el estudio, de los cuales el 9% tuvo una duración mayor a 14 días, encontrándose cepas EAggEC en el 51% de éstos y con menor frecuencia en casos de diarrea aguda o en la heces de niños sin diarrea. Adicionalmente, en los 78 cuadros de diarrea en los que se aislaron cepas EAggEC, en 25 de ellos se observaron heces con sangre, siendo estas bacterias el patógeno aislado con mayor frecuencia de un total de 71 eventos de diarrea con sangre. Los serotipos de EAggEC identificados en cuadros de diarrea con sangre y en casos de diarrea persistente fueron similares.

Estudios sobre la capacidad adherente de cepas de E. coli a células HEp-2 han mostrado que además de la adherencia de tipo localizado existen cuando menos otros dos patrones, uno denominado difuso, cuando las bacterias se adhieren a todo el citoplasma celular y, otro llamado agregativo, cuando las bacterias forman acúmulos en forma de palizadas, tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación (42,48).

A diferencia de lo observado en cepas con adherencia localizada, fuera de un estudio realizado en niños en el Estado de Chiapas (17), las cepas con adherencia difusa se han aislado con frecuencia similar en niños con diarrea y en controles apareados por sexo y edad (5,18). En relación con las cepas que presentan adherencia agregativa, estudios en la India, México y Brasil, han mostrado que su aislamiento se relaciona significativamente con la presencia de diarrea persistente en niños (5,11,18).

Los mecanismos por medio de los cuales las cepas EA_gEC causan diarrea con duración superior a los 14 días no se conocen aún. Tanto cepas con adherencia difusa como con adherencia agregativa presentan fimbrias cuya codificación genética se encuentra presente en plásmidos (1,34,48). Se desconoce cual es la participación de las fimbrias en el proceso patogénico de estas cepas en el humano, pero de manera general en textos se hace

mención a su función. De la misma forma se ha reportado que las cepas EAggEC son capaces de producir cuando menos dos tipos de toxinas, una responsable de inducir secreción intestinal en modelos experimentales y otra que favorece la expresión de proteínas fosforilantes responsables del movimiento de calcio extracelular (2,41).

Una primera aportación en este sentido ha sido realizada por Eslava y col. en 1993 (13), al reportar que el suero de niños infectados en forma natural por cepas EAggEC, reconocen una toxina de 108 kDa secretada y liberada al medio de cultivo por estas bacterias. Dicha proteína pudiera ser similar a la descrita con actividad fosforilante por Baldwin y col. (2). La capacidad de cepas EAggEC para sobrevivir por tiempo prolongado en el intestino humano y la producción constante de una o varias de las toxinas descritas (41), pudiera ayudar a explicar la persistencia de la diarrea en individuos infectados por estos microorganismos.

Se han aislado también cepas EAggEC de niños con evacuaciones diarreicas con sangre (4). Se desconoce aún si existen diferentes tipos de cepas agregativas, unas relacionadas con diarrea persistente y otras con diarrea con sangre. El estudio realizado por Eslava y col. (13) muestra que la toxina encontrada es capaz de producir lesiones hemorrágicas severas cuando se inyecta en

forma purificada en asas ligadas de intestino de ratas. Estos resultados pudieran apoyar la hipótesis de la capacidad de cepas EAggEC para causar diarrea con sangre en humanos.

El papel de las toxinas en la patogénesis de la diarrea con sangre causada por Shigella y Salmonella aisladas de niños con diarrea con sangre fue estudiado mediante la producción de toxinas activas y probadas en células en cultivo y en asas intestinales de rata. Células epiteliales humanas de carcinoma de colon (HT-29), células de ovario de hamster chino (CHO) y fibroblastos de mono rhesus (Vero) fueron usadas para detectar citotoxinas (32).

Se observó que en células HT-29 se obtuvo que cepas de Shigella causaban en un 50% redondeo celular y en un 20% cepas de Salmonella; respecto a las células CHO se observó que cepas de Salmonella causaban elongación en un 50% mientras que cepas de Shigella causaban el mismo efecto pero sólo en un 20%. En células Vero el redondeo celular obtenido fue de un 60% utilizando cepas de Salmonella y de un 40% con cepas de Shigella (32).

La actividad citotóxica en células CHO y redondeo en células Vero pueden observarse como un modelo apropiado para detectar una reacción cruzada de toxinas con la toxina colérica. Ambas especies, Shigella y Salmonella, producen citotoxinas y enterotoxinas que podrían jugar un papel en esta enfermedad intestinal (32).

Se han reportado dos formas de hemolisinas llamadas alfa y beta producidas por E. coli. Los resultados iniciales utilizando los antisueros indican que las dos hemolisinas pueden ser diferentes, pero esto todavía no está bien sustentado, además ambas son producidas simultáneamente por E. coli durante su ciclo de crecimiento (30).

Las cepas hemolíticas de Escherichia coli causan una hemólisis característica (zona clara de lisis) alrededor de las colonias bacterianas crecidas durante la noche en placas de agar conteniendo, por ejemplo, sangre de carnero (30). Algunos estudios previos indican que la hemolisina producida por Escherichia coli puede tener efectos citotóxicos en una variedad de tipos celulares incluyendo células fibroblásticas de ratón (3T3), leucocitos, neutrófilos y granulocitos humanos (30). La hemolisina ha sido implicada como un factor importante de patogenicidad en cepas de E. coli (30).

III. H I P O T E S I S

- Las cepas de E. coli obtenidas de muestras fecales de niños con diarrea que muestran adherencia agregativa a células HEp-2, liberan un factor enterotóxico que probablemente daña diferentes líneas celulares cultivadas .

V. O B J E T I V O S

-Determinar la propiedad de adherencia de cepas de E. coli aisladas de muestras fecales de niños con diarrea a células HEP-2.

-Identificar un probable efecto enterotóxico de un factor presente en sobrenadantes bacterianos de cepas EAggEC en diferentes líneas celulares (HEp-2, HeLa, Vero y CHO) .

-Investigar la capacidad hemolítica de cepas EAggEC en eritrocitos de diferentes especies de animales.

V. MATERIAL Y METODO

A) Cepas en estudio.

Se estudiaron 69 cepas de Escherichia coli obtenidas de Enero de 1990 a Enero de 1992 de evacuaciones diarreicas con y sin sangre de heces fecales de niños menores de 5 años, de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Sglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

B) Aislamiento y Caracterización Bioquímica.

A partir de la muestra de materia fecal se sembró un inóculo en cajas con agar MacConkey (Merck), Tergitol 7 (Merck) y Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Merck). Las muestras se enriquecieron con caldo tetracionato (Merck) y selenito (Merck) y se incubaron a 37°C por 18 hrs. También el caldo de enriquecimiento se sembró en agar MacConkey, verde brillante (Merck), xilosa-lisina-desoxicolato y agar Salmonella-Shigella (Merck) incubándose a 37°C por 18 hrs. Todas las colonias diferentes que crecieron en los medios directos y de enriquecimiento se identificaron por medios bioquímicos (16). Para la búsqueda de cepas de E. coli se seleccionaron un mínimo de cinco colonias lactosa positivas de cada caja y se caracterizaron bioquímicamente con un juego de 20 medios diferenciales (6).

C) Estudio Serológico.

Para la tipificación serológica las cepas de E. coli se aglutinaron con antisueros contra los 175 antígenos somáticos conocidos. Todos los que resultaron positivos a la aglutinación en laminilla fueron confirmados por aglutinación en tubo usando cultivos hervidos. Los antígenos flagelares se identificaron usando los 56 antisueros monovalentes, después de haber desarrollado el crecimiento en agar semisólido en tubos de Craig (9).

Las cepas puras y serotipificadas se conservan en medio especial a temperatura ambiente a partir del cual se sembró un tubo de TSA (agar soya-tripticosa de Merck) con agar inclinado. De este último tubo se tomó una asada para cada ensayo realizado (de adherencia, enterotoxigenidad y hemolisinas).

D) Ensayo de Adherencia en células HEp-2.

Como controles positivos a la adherencia se utilizaron para el patrón localizado: la cepa EPEC E2348/69, serotipo O127:H7; para adherencia difusa la cepa 52MC1 serotipo O91:H6 y para la adherencia agregativa la cepa O42 serotipo O44:H18. El control negativo utilizado para la adherencia fué la cepa K12 serotipo OR:H11 (obtenidos de la colección del cepario del laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina de la U.N.A.M.).

La prueba se desarrolló colocando una lenteja de vidrio de 1 cm de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno a los cuales se les agregó una suspensión de células HEp-2 a una concentración de 2.5×10^6 células por ml aproximadamente. Posteriormente la placa se incubó durante un lapso de 18-24 hrs. a 37°C y con 5% de CO_2 , para formar una monocapa con 80% de confluencia. Después de este tiempo se eliminó el medio de cultivo de los pozos y se lavaron con un amortiguador de fosfatos pH 7.2, agregándose entonces 1 ml de una suspensión de la cepa en estudio previamente crecida por 18 hrs en caldo triptona con 1% de D-manosa, la concentración final de bacterias fué de 1.5×10^8 UFC/ml. Las placas se incubaron durante tres horas, transcurrido el tiempo, se eliminó el medio y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos; se elaboraron preparaciones las cuales fueron fijadas con metanol y teñidas con colorante Giemsa durante 20 minutos, para quitar el exceso de colorante se lavaron con agua desionizada. La lenteja con células se deshidrató con acetona, acetona-xileno y xileno. Posteriormente se realizó el montaje directo de las lentejas en un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá y permitiendo su secado durante 24 hrs. Se empleó la técnica descrita por Cravioto y col. (8). La observación se hizo en un microscopio óptico (Carl Zeiss) en campo claro en un aumento de 100x con aceite de inmersión. En los casos pertinentes se realizó un registro microfotográfico. Para considerar una cepa positiva, ésta debía presentar bacterias adheridas al 40% o más de las células de la preparación.

E) Ensayo de enterotoxicidad de E. coli .

Como cepas controles se utilizarón las siguientes: K12 (negativa), serotipo OR:H11, H19 (citotoxina), serotipo O26:H11, 933J (citotoxina), serotipo O57:H7, 933W (citotoxina), serotipo O157:H7, 89242 (STH), serotipo O128:H12, 89391 (LT), serotipo O159:H21, 89244 (STP), serotipo O27:H26, (obtenidas de la colección del cepario del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.).

Se dejó crecer la cepa bacteriana en 3 ml de caldo triptona al 1% durante 18 hrs, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por un lapso de 15 minutos. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 μ m de poro y se hicieron diluciones 1:1 con medio mínimo esencial (In Vitro) a una concentración final del 10% de suero fetal bovino. Se colocó 1 ml de esta muestra en cada uno de los 24 pozos de la placa de polipropileno conteniendo una lenteja con células a una confluencia del 80%. Se incubó a 37°C con 5% CO₂ en aire durante 24 hrs. Después de este tiempo se desechó el contenido de cada uno de los pozos de la placa, se lavó con un amortiguador de fosfatos pH 7.2, se fijó con metanol absoluto y se tiñó con colorante de Giemsa durante 20 minutos , eliminando el exceso con agua desionizada. Las lentejas con células se deshidrataron con acetona, acetona-xileno y xileno.

La observación se realizó de la misma manera referida en el inciso (D). Las cepas con capacidad citotónica se consideraron cuando causaron un redondeo en células CHO ó elongación de células HeLa y el efecto citotóxico cuando había un desprendimiento de la monocapa de células Vero en un 40% o más.

F) Hemólisis.

Para la investigación del efecto hemolítico para muestras de sangre de diferentes especies de animales, se procedió a sembrar las cepas en agar sangre de carnero, caballo, conejo y humano al 5%. Se incubaron durante 24 hrs a 37°C. Los resultados obtenidos se clasificaron como hemólisis alfa, beta y negativa.

G) ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Ji-cuadrada en la búsqueda de significancia entre el daño a la célula y el tipo de línea celular, así como para la asociación entre algún tipo de hemólisis específico y un daño celular. Se utilizó el software EPIINFO 5.0.

VI. RESULTADOS.

De las 69 cepas seleccionadas y caracterizadas por serología 26 (38%) pertenecieron a alguno de los serogrupos "O" patógenos descritos y 43 (62%) pertenecieron a otros serogrupos. El grupo ETEC fue el más predominante de los serogrupos patógenos con 23 (33%) de las cepas (Cuadro 1).

En relación al patrón de adherencia agregativo, 53 (77%) cepas lo presentaron en células HEP-2 y 16 (23%) desprendieron la monocapa celular en el ensayo de adherencia a 3 hrs (Figura 1).

En las figuras 2 y 3 se muestran células de origen epitelial y fibroblasto con una morfología normal, las cuales son pertenecientes a los controles de los ensayos de enterotoxicidad.

Respecto al daño causado por el sobrenadante filtrado de las cepas en estudio encontramos que 36 (53%) cepas en células Hep-2 mostraron elongación, 25(37%) causaron redondeo celular y 5 (7%) ocasionaron lisis. Al hacer la asociación entre elongación y lisis con células HEP-2 se encontró una significancia estadística con un valor de P menor de 0.05, pero no así cuando se asoció redondeo con HEP-2, ya que mostró un valor de P mayor a 0.05. En células HeLa 12 cepas (17%) causaron elongación, 49 (70%) produjeron redondeo y solamente 2 (3%) causaron lisis celular . En células Vero predominó

el redondeo ya que se encontraron 31 (45%) cepas con este efecto y la lisis en 33 (48%) de las cepas ensayadas. En las células CHO predominó el redondeo en 41 (59%) de las cepas y un gran porcentaje fueron negativas al daño (Cuadro 2, figuras 4-7).

La actividad hemolítica de tipo alfa fue mayor para los eritrocitos de humano en 33 cepas (48%), seguida por eritrocitos de caballo en 28 (40%), y por último para el carnero, que fué de 14 (20%). Sólo los eritrocitos de caballo fueron afectados por la hemólisis beta en 32 cepas (47%). Por otro lado los eritrocitos de conejo no fueron susceptibles a algún tipo de hemólisis (Cuadro 3, figura 8).

Al relacionar la actividad hemolítica del tipo alfa o beta con el daño celular, observamos que 42 (37%) de las cepas con alfa hemólisis en humano estuvieron asociadas a elongación celular. 45 (40%) se asociaron con redondeo y 25 (23%) con lisis celular.

De las cepas con alfa hemólisis en eritrocitos de caballo 27 (29%) se relacionaron con elongación celular, 50 (54%) con redondeo y sólo 15 (17%) se asoció con lisis de la monocapa celular. Con respecto a la hemólisis alfa en eritrocitos de carnero se tiene que 15 (35%) estuvieron relacionadas con elongación celular, 19 (44%)

con redondeo y sólo 9 (30%) con lisis celular. La hemólisis beta sólo se presentó en eritrocitos de caballo en las que 34 cepas (31%) se asociaron con elongación, 56 (51%) con redondeo y 20 (18%) con lisis celular (Cuadro 4).

No hubo significancia estadística al asociar hemólisis alfa con elongación, redondeo y lisis ya que el valor de P fué mayor de 0.05.



FIG. 1.- Microfotografía en campo claro, en un aumento de 100 X. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli, teñida con Giemsa. Se observa la adherencia agregativa, en la cual se aprecian las bacterias adheridas en empalizada tanto a la célula como al vidrio de la preparación.

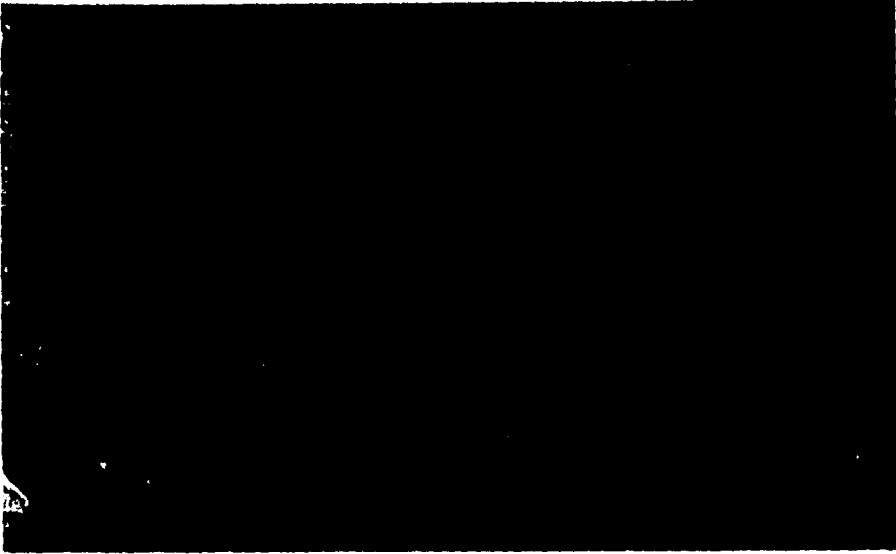


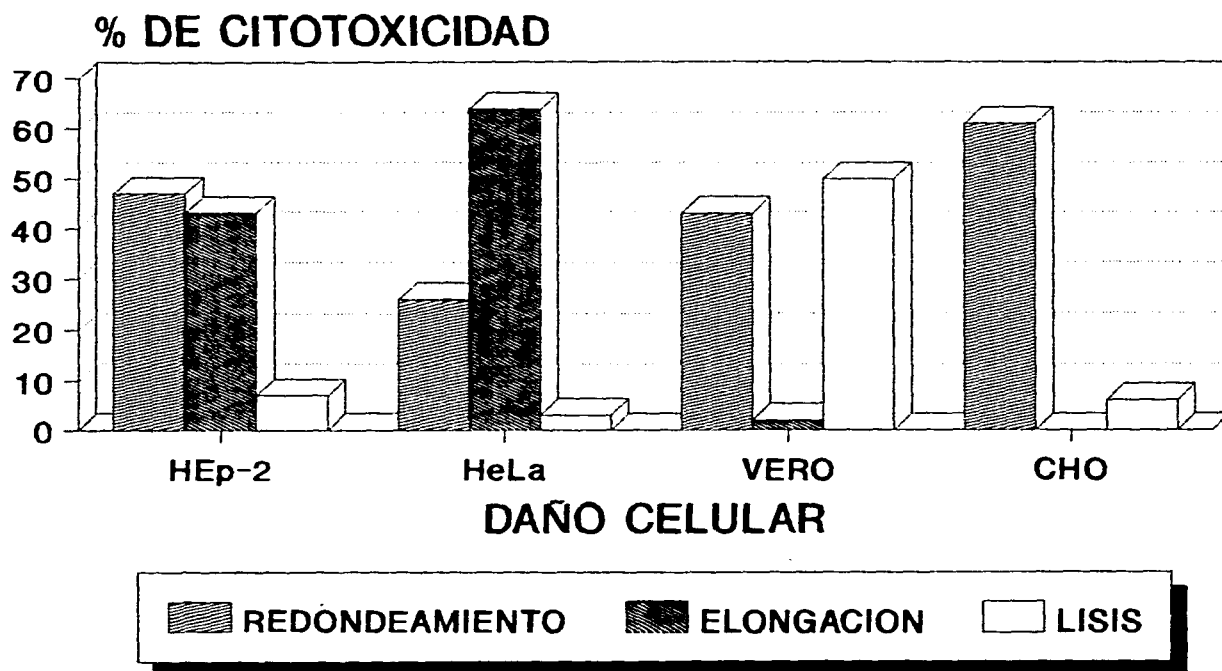
FIG. 2.- Microfotografía en campo claro, en un aumento de 100 X. Monocapa de células de tipo epitelial (tales como HEP-2 y HeLa) mostrando una morfología normal, teñidas con Giemsa.



FIG. 3.- Microfotografía en campo claro, en un aumento de 100 X. Monocapa de células de tipo fibroblasto (tales como Vero y CHO) mostrando una morfología normal, teñidas con Giemsa.

FIGURA 4

ACTIVIDAD ENTEROTOXICA DE CEPAS DE Escherichia coli



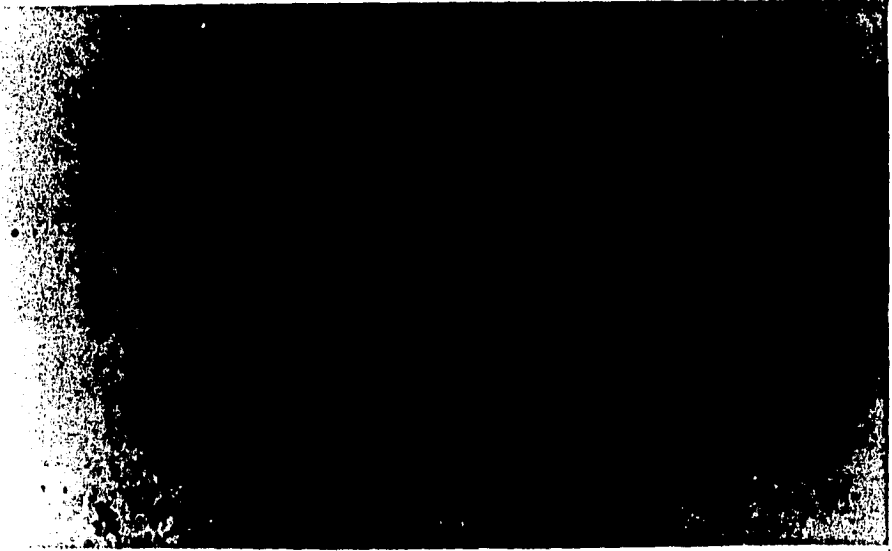


FIG. 5.- Microfotografía en campo claro, en un aumento de 100 X y teñida con Giemsa. Monocapa de células HEP-2, tratada con sobrenadante filtrado de E. coli, donde se observa redondeo celular.

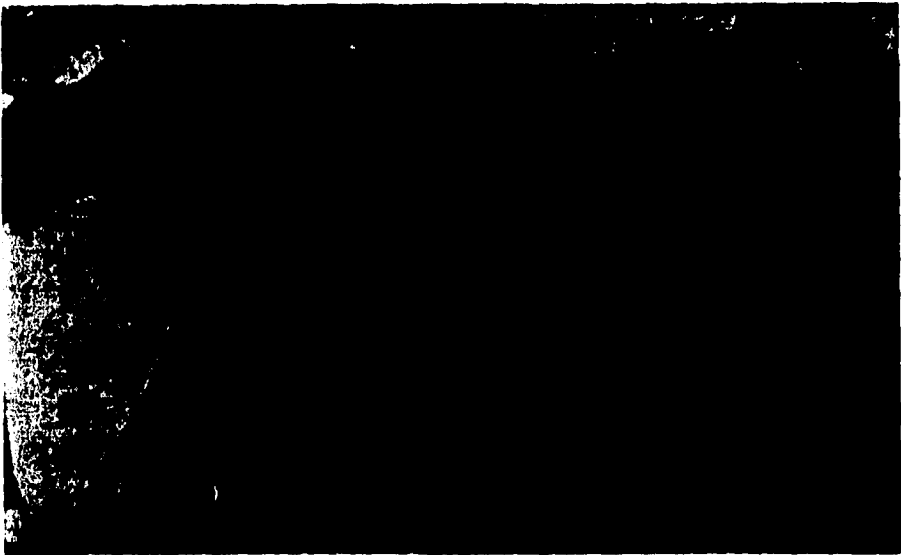


FIG. 6.- Microfotografía en campo claro en un aumento de 100 X, teñida con Giemsa. Monocapa de células HeLa, tratada con sobrenadante filtrado de E. coli donde se observa elongación celular.

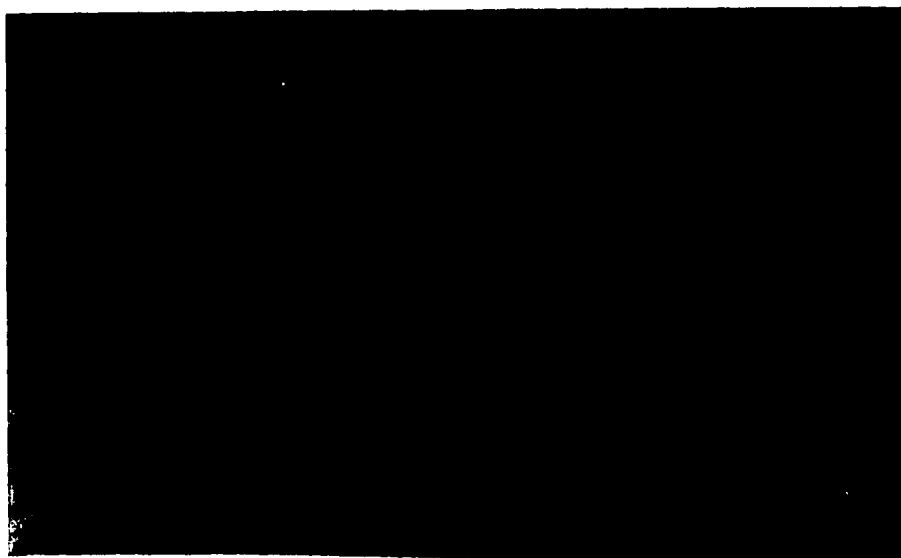


FIG. 7.- Microfotografía de campo claro en un aumento de 100 X , teñida con Giemsa. Monocapa de células Vero, tratada con sobrenadante filtrado de E. coli donde se observa lisis celular.

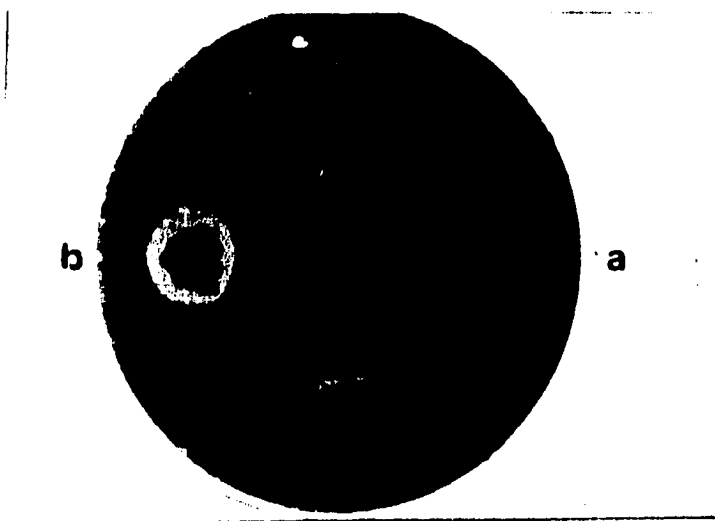


FIG. 8.- Placa de agar-sangre en la cual se aprecia la hemólisis O (a) y B (b).

CUADRO 1
SEROGRUPOS DE Escherichia coli
(N=69)

SEROGRUPOS CLASIFICADOS			OTROS SEROGRUPOS	
ETEC (33.3%)	O6	(2)	O?	(13)
	O8	(5)	OR	(10)
	O11	(1)	O1	(1)
	O15	(6)	O3	(1)
	O25	(2)	O7	(5)
	O78	(5)	O40	(1)
	O159	(1)	O44	(3)
EPEC (3%)	O127	(1)	O59	(1)
	O111	(1)	O84	(2)
EIEC (1.4%)			O92	(1)
	O28	(1)	O107	(1)
			O113	(1)
			O130	(1)
EHEC (1.4%)			O132	(1)
	O11	(1)		
			(61%)	

CUADRO 2
CITOTOXICIDAD DE 69 CEPAS DE Escherichia coli
EN LINEAS CELULARES.

DAÑO CELULAR	LINEA CELULAR			
	HEp-2	HeLa	Vero	CHO
ELONGACION	29(43%)	44(64%)	1 (2%)	0
REDONDEO	32(47%)	18(26%)	30(43%)	42(61%)
LISIS	5 (7%)	2 (3%)	34(50%)	4 (6%)
NEGATIVAS	2 (3%)	5 (7%)	4 (5%)	23(33%)
TOTAL	68	69	69	69

CUADRO 3
ACTIVIDAD HEMOLITICA DE CEPAS DE Escherichia coli
EN DIFERENTES ESPECIES DE ANIMALES.

ESPECIE DE ERITROCITOS	TIPO DE HEMOLISIS			TOTAL
	ALFA	BETA	NEGATIVAS	
HUMANO	33 (48%)	0	36 (52%)	69
CABALLO	28 (40%)	32 (47%)	9 (13%)	69
CARNERO	14 (20%)	0	56 (80%)	69
CONEJO	0	0	67 (97%)	67

CUADRO 4
DAÑO CELULAR ASOCIADO A HEMOLISIS EN
DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS.

HEMOLISIS EN ERITROCITOS DE
DIFERENTES MAMIFEROS.

DAÑO CELULAR	HUMANO		CABALLO		CARNERO	
	ALFA	BETA	ALFA	BETA	ALFA	BETA
ELONGACION	42(36%)	0	27(29%)	33(30%)	15(35%)	0
REDONDEO	46(39%)	0	51(54%)	57(52%)	20(45%)	0
LISIS	29(25%)	0	16(17%)	20(18%)	9 (20%)	0
TOTAL	117	0	94	110	44	0

CEPAS DE Escherichia coli ASOCIADAS A DIARREA.

VII. D I S C U S I O N.

Escherichia coli es uno de los agentes causales de diarrea con mayor frecuencia en niños menores de cinco años . Entre los mecanismos de patogenicidad que desarrolla esta bacteria se encuentran la adherencia e invasividad a las células del tracto digestivo del huésped, así como la producción de toxinas con efecto citotónico o citotóxico.

Entre los serogrupos encontrados dentro de estas 69 cepas de E. coli estudiadas, se tiene que el 30% de ellas pertenecen al grupo ETEC, el 61% a otros serogrupos no conocidos y el porcentaje restante se divide en los tres grupos clasificados como EPEC, EIEC y EHEC según Levine y col. (25).

De un estudio realizado por Vial y col. (48) en 1988 donde analizaron 42 cepas de E. coli procedentes de muestras fecales de niños con diarrea, utilizando el ensayo de adherencia a células HEp-2 encontró que las cepas con adherencia agregativa tienen serogrupos "R" (rugosos) y "O" no tipificables con mayor frecuencia y O11, O130, O44, O78, lo cual concuerda con los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo.

Con respecto al antígeno flagelar, Vial y col. (48) encontraron con mayor frecuencia el H33, H10 y H2, presentándose una similitud con lo obtenido en este trabajo ya que los antígenos flagelares más frecuentes fueron H10 y H2, aunque además se encontraron H9 y H19, no reportado por otros autores.

Smith y col. en 1994 (44) estudiando cepas de E. coli de diferentes países mostraron que de 113 aislamientos de serotipo O44:H18, 85 cepas mostraron adherencia agregativa a células HEp-2, lo cual contrasta con el porcentaje tan bajo observado en este caso, en el cual, de 69 cepas estudiadas solo el 3% mostraron este serotipo.

Vial y col. (48) estudiaron 42 aislamientos de E. coli que no pertenecen a los cinco serogrupos clásicos diarrogénicos. Al inocular la bacteria viva en asa intestinal de rata y conejo, causaron lesiones características como fue parálisis de extremidades y muerte, efecto parecido al producido por Shiga-like, aunque los estudios para Shiga-like fueron negativos y sugieren que las cepas EAggEC secretan probablemente un factor tóxico semejante al producido por Shiga. Los resultados apoyan la idea de la existencia de un factor tóxico en dichas cepas ya que, al poner en contacto el sobrenadante filtrado de cepas EAggEC en células HEp-2, HeLa, Vero y CHO se produjo daño que va desde redondeo en HEp-2 y CHO, elongación en HeLa, hasta lisis en células Vero.

Otras evidencias que apoyan el daño citotóxico o/y citotónico que se observó en las diferentes líneas celulares es lo reportado por Savarino y col. en 1991 (41), al tratar con asa ileal de conejo montada en cámara de Ussing con sobrenadante filtrado de cepas EAggEC, ocasionando un aumento en la diferencia de potencial de membrana, efecto que están asociado con daño celular, proponiendo que el daño está asociado a una enterotoxina termoestable.

Otras observaciones fueron hechas por Baldwin y col. en 1991 (2) al estudiar cepas EAggEC y sugieren que éstas secretan una proteína lábil al calor, antigénicamente relacionada con una hemolisina de E. coli.

Sin embargo no está reportado el efecto que tiene el sobrenadante filtrado de cepas EAggEC en células cultivadas. No obstante Morales-Espinosa y col. reportaron en 1993 (32) alteraciones citotóxicas y citotónicas causadas por el sobrenadante filtrado de Shigella y Salmonella aisladas de muestras de niños con diarrea con sangre en células HT-29, CHO y Vero, siendo el efecto de elongación y redondeo celular el observado en células HT-29, redondeo en CHO y en células Vero. Los resultados con respecto a redondeo de células CHO es similar al reportado por estos autores, pero el daño más importante presentado en células Vero fue lisis.

Haque y col. en 1994 (20) estudiaron la producción de una hemolisina en 41 cepas EAggEC aisladas de muestras fecales de niños con diarrea, utilizaron eritrocitos de cobayo, conejo, rata, carnero y humano, empleando diferentes medios de cultivo líquido para observar la hemólisis. En este trabajo se estudiaron eritrocitos provenientes de diferentes especies de animales utilizando agar base sangre al 5% , por lo cual no se puede correlacionar con lo establecido porque se empleó diferente metodología.

En este estudio se encontraron 16 cepas de E. coli que desprendieron la monocapa celular en el ensayo de HEp-2 a 3 horas, los serotipos encontrados más frecuentemente en estas cepas fueron O7:H2, O7:NM, O6:NM, O8:H19 y OR:H2. Resultados similares no están reportados en la literatura, sólo Gunzburg y col. en 1993 (19) publicaron en un estudio realizado en la India con cepas aisladas de muestras fecales de niños con diarrea, que algunas cepas desprenden las células y le llamaron "desprendimiento celular", pero a diferencia de la serotipificación realizada en esta investigación, no mencionan los serotipos asociados a estas cepas.

VIII. CONCLUSIONES.

- Tanto las cepas de Escherichia coli pertenecientes al grupo denominado EAggEC, como las cepas que desprenden células en el ensayo de adherencia a 3 hrs, dañan a las líneas celulares HEp-2, HeLa, Vero y CHO tanto citotóxica como citotónicamente.

- Este factor patogénico se encuentra presente en el sobrenadante filtrado de dichas cepas bacterianas.

- El daño producido depende de la línea en la cual se realice el ensayo. Teniendo así que las líneas celulares de origen epitelial (HEp-2 y HeLa) van a presentar un efecto citotónico representado por la elongación y redondeo celular y con respecto a las líneas de origen fibroblasto (CHO y Vero) se va a presentar tanto un efecto citotónico representado por el redondeo celular principalmente (CHO) como un efecto citotóxico representado por la lisis celular (Vero).

-Respecto a la asociación del daño producido en las líneas celulares con el efecto hemolítico no se encontró significancia estadística.

IX. A P E N D I C E.

Preparación de medios para las diferentes líneas celulares:

Medio Mínimo Esencial (para células HEP-2 y HeLa):

- MEM al 10%
- Suero fetal bovino al 10%
- Glutamina (2 mM) al 1%
- Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% , concentración final al 1%
- HEPES (10 mM) al 1%
- Antibiótico (estreptomomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y penicilina 100 000 UI/ml)
al 1%

Medio M-199 (para células VERO):

- M-199 al 10%
- Suero fetal bovino al 10%
- Glutamina (2 mM) al 1%
- Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% con una concentración final
al 1%
- HEPES (10 mM) al 1%
- Antibiótico (estreptomomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y penicilina 100 000 UI/ml)
al 1%

Medio F-12 (para células CHO):

-F-12 al 10%

-Suero fetal bovino al 10%

-Glutamina (2 mM) al 1%

-Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% con una concentración final del 2%

Preparación de caldo triptona:

Se prepara la triptona a una concentración final de 1% en tubos de 13x100 colocando 3ml en cada tubo y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 15lb y se guardan en refrigeración hasta el momento de usarlos.

Preparación de PBS pH 7.2:

-8 gr de cloruro de sodio.

-0.2 gr de cloruro de potasio.

-1.15 gr de fosfato de sodio dibásico.

-0.2 gr de fosfato de potasio monobásico.

Se diluyen todos los componentes en un litro de agua desionizada, antes de aforar a 1lt, se ajusta el pH a 7.2 y después se esteriliza a 15lb por 15 minutos.

Preparación de medios para el ensayo de toxinas:

Para las células HEp-2 y HeLa:

- MEM al 10%
- Suero fetal bovino al 10%
- Glutamina (2 mM) al 1%
- Bicarbonato de sodio al 7.5% con una concentración final 1%
- HEPES al 1%

Para las células VERO:

- M-199 al 10%
- Suero fetal bovino al 10%
- Glutamina (2 mM) al 1%
- Bicarbonato de sodio al 7.5% con una concentración final al 1%
- HEPES al 1%

Para células CHO:

- F-12 al 10%
- Suero fetal bovino al 10%
- Glutamina (2 mM) al 1%
- Bicarbonato de sodio al 7.5% con una concentración final del 2%

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

X. REFERENCIAS.

- 1.- Baldini, M., Kaper, J., Levine, M., Candy, C., and Moon, H. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2:534-538.
- 2.- Baldwin, T., Knutton, S., Sellers, L., Manjarrez-Hernández, H., Aitken, A. and Williams, P. 1991. Enteroaggregative Escherichia coli strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. Infect Immun. 60:2092-2095.
- 3.- Beachey, E. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 143: 325-345.
- 4.- Benitez, O., Uribe, F., Navarro, A., Hernández, D., Ruiz, J. and Cravioto, A. 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 48:65-70.
- 5.- Bhan, M., Raj, P., Levine, M., Kaper, J., Bhandari, N., Srivastava, R., Kumar, R. and Sazawal, S. 1989. Enteroaggregative Escherichia coli associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis. 156:1061-1064.

- 6.- Black, R., Merson, M. and Rahaman, A.S.M.M. J. 1980. Infect. Dis. 141: 660.
- 7.- Bray, J. 1945. Isolation of antigenically homogenous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. J. Pathol Bacteriol. 57:239-247.
- 8.- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S. and Rowe, B. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3:95-99.
- 9.- Cravioto, A., Reyes, R., Ortega, R., Fernández, G., Hernández, R. and López. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in cohort of rural mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidem. Inf. 101:123-134.
- 10.- Cravioto, A., Scotland, S. and Rowe, B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I y II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. Infect. Immun. 36:189-197.

- 11.- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J. and Villafan, H. 1991. Association of Escherichia coli HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. 337:262-264.
- 12.- Duguid, J. and Old, D. 1980. Adhesive properties of enterobacteriaceae. In: Beachey, E. (Ed). Bacterial adherence. Chapman and Hall Publish., Londres. pp. 187-217.
- 13.- Eslava, C., Villaseca, J., Morales, R., Navarro, A. and Cravioto, A. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative Escherichia coli. Abstract B105. Abstracts 93rd. General Meeting. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 14.- Evans, D., Evans Jr., D., Tjoa, W. and Dupont, H. 1978. Detection and characterization of a colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. 19: 727-736.
- 15.- Evans, D., Silver, R., Evans Jr., D., Chase, D. and Gorbach, S. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 12: 656-667.

- 16.- Ewing, W. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co.
- 17.- Girón, J., Jores, T., Millan-Velasco, F., Castro-Muñoz, E., Zarate, L., Fry, J., Frankel, G., Moseley, S., Baudry, B., Kaper, J. 1991. Diffuse adhering Escherichia coli (DAEC) as a putative cause of diarrhea in mayan children in Mexico. J. Infect. Dis. 163:507-513.
- 18.- Gomes, T.A.T., Blake, P., Trabulsi, L. 1989. Prevalence of Escherichia coli strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J. Clin. Microbiol. 27:266-269.
- 19.- Gunzburg, S., Chang, B., Elliott, S., Burke, V. and Gracey, M. 1993. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric Escherichia coli isolated from aboriginal children from the Kimberley region of western Australia. J. Infect. Dis. 167:755-8.
- 20.- Haque, M., Ohki, K., Masako, K. and Osamu, K. 1994. Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative Escherichia coli isolated from children with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 32(4):1109-1111.

- 21.- Holmgren, J. 1985. Toxins affecting intestinal transport processes. In: Sussman, M. (Ed). The virulence of Escherichia coli. Academic Press, New York. pp. 177-191.
- 22.- Knutton, S., Lloyd, D. and McNeish, A. 1987. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to human mucosal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun. 55:69-77.
- 23.- Kumate, J. and Isibasi, A. 1986. Pediatric diarrheal disease: a global perspective. Pediatr. Infect. Dis. 5: S21-s28.
- 24.- Law, D. 1989. Virulence factors of enteropathogenic Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 26: 1-26.
- 25.- Levine, M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
- 26.- Levine, M., Bergquist, E., Nalin, D. 1978 . Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. 1:1119-1122.

- 27.- Levine, M. and Edelman, R. 1984. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol. Rev. 6:31-51.
- 28.- Mathewson, J., Johnson, P., Dupont, H., Morgan, D., Thornton, S., Wood, L. and Ericsson, C. 1985. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent Escherichia coli. J. Infect. Dis. 151:471-475.
- 29.- Mathewson, J., Oberhelman, R., Dupont, H., De la Cabada, F. and Garibay, E. 1987. Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico. J. Clin. Microbiol. 25:1917-1919.
- 30.- Mackman, N., Nicaud, J., Gray, L. and Holland, I. 1986. Secretion of haemolysin by Escherichia coli. Curr. Top. Microbiol. Immun. 125:159-181.
- 31.- Margulis, L. and Schwartz, K. 1988. Five Kingdoms. Freeman, New York, 2nd Ed., p.42.
- 32.- Morales, R., González-Valencia, G., Muñoz, O. and Torres, J. 1993. Production of cytotoxins and enterotoxins by strains of Shigella and Salmonella isolated from children with bloody diarrhea. Arch. Med. Res. 24(1):13-21.

- 33.- Murray, P., Drew, W., Kobayashi, G. and Thompson, J.
1993. Microbiología Médica. Mosby Year Book. Barcelona. pp.
103-118.
- 34.- Nataro, J., Kaper, J., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P.
and Levine, M. 1987. Patterns of adherence of diarrheogenic
Escherichia coli to HEp-2 cells. Pediatr. Infect. Dis.
6:829-831.
- 35.- Nataro, J., Scaletsky, I., Kaper, J., Levine, M. and
Trabulsi, L. 1985. Plasmid-mediated factors conferring
diffuse and localized adherence of enteropathogenic
Escherichia coli. Infect. Immun. 48:378-383.
- 36.- Neter, E. and Shumway, C. 1950. Escherichia coli D433:
occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural
characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics.
Proc. Soc. Expe. Biol. Med. 75:504-507.
- 37.- Nicoletti, M., Superti, F., Conti, C., Calconi, A. and
Zagaglia, C. 1988. Virulence factors of lactose-negative
Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea
in Somalia. J. Clin. Microbiol. 26: 524-529.

- 38.- Ofek, I. and Beachey, B. 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: Beachey, B. (Ed) Bacterial adherence. Chapman and Hall Publish., Londres. pp: 3-29.
- 39.- Riley, L., Remis, R., Helgerson, S., Mcgee, H., Wells, J., Davis, B., Hebert, J., Olcott, E., Johnson, L., Hargrett, N., Blake, P. and Cohen, M. 1982. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.
- 40.- Robins-Browne, R. 1987. Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea. Rev. Infect. Dis. 9: 28-53.
- 41.- Savarino, S., Fasano, A., Robertson, D. and Levine, M. 1991. Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. J. Clin. Invest. 87:1450-1455.
- 42.- Scaletsky, I., Silva, M. and Trabulsi, L. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. Infect. Immun. 45:534-536.

- 43.- Scotland, S., Smith, H., Said, B., Willshaw, G., Cheasty, T. and Row, B. 1991. Identification of enteropathogenic Escherichia coli isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and-effacing E. coli not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. J. Med. Microbiol. 35:278-283.
- 44.- Smith, H., Scotland, S., Willshaw, G., Rowe, B., Cravioto, A. and Eslava, C. 1994. Isolates of Escherichia coli O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. J. Infect. Dis. 170:1610-3.
- 45.- Smith, C. 1982. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic Escherichia coli of serotype O6:K15:H16 or H- isolated from travellers and infantile diarrhoea. J. Gen. Microbiol. 128:2081-2096.
- 46.- Sussman, M. 1985. Escherichia coli in human and animal disease. In: Sussman, M. (Ed). The virulence of Escherichia coli. Academic Press, New York. pp: 7-45.
- 47.- Varela, G., Aguirre, A. y Carrillo, J. 1946. Escherichia coli "Gómez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 3: 623-627.

48.- Vial, P., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.,
Nataro, J., Maneval, D., Elsayed, A. and Levine, M. 1988.
Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia
coli, a putative agent of diarrheal disease.
J. Infect. Dis. 155:377-389.