

12  
209



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**" CARACTERIZACION DE CEPAS DE  
Escherichia coli ENTEROINVASIVA AISLADAS  
EN LA CIUDAD DE MEXICO. POR INVASI-  
VIDAD EN CELULAS HEP-2. CAPTACION  
DEL COLORANTE ROJO CONGO, PRUEBA  
DE SERENY. PATRON DE HEMAGLUTINA-  
CION Y PERFIL DE PLASMIDOS "**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A**

**ILIANA ALEJANDRA CORTES ORTIZ**

**ASESORES: DRA. SILVIA GIONO CEREZO**

**DR. GERARDO APARICIO OZORES**

**DRA. GILDA FLORES ROSALES**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

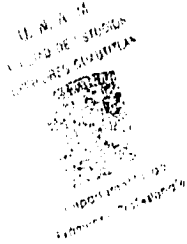
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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  
AVANZA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva aisladas en la Ciudad de México, por invasividad en células HEp-2, captación del colorante rojo Congo, prueba de Sereny, patrón de hemaglutinación y perfil de plásmidos.

que presenta la pasante: Iliana Alejandra Cortés Ortiz con número de cuenta: 8318874-1 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 29 de Marzo de 1996

PRESIDENTE	<u>M. en C. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andres Becerril Osaya</u>	
SECRETARIO	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Stella María Reginanni Rivera</u>	

**A mi hijo Carlos Omar Bonilla Cortés y a mi esposo Juan Carlos por su paciencia y amor.**

**A mis padres Rosa María Ortiz López y Maximino Cortés Ramírez por su apoyo incondicional.**

**A mi tía Elena Ortiz López, a mi hermana Reyna María Cortés Ortiz y a mi cuñado Pedro Gomez Flores Verdad por su ayuda invaluable.**

**A la Dra. Nora Arcelia Espinosa y Lara, a la Dra. Gilda Flores Rosales y a la Dra. Silvia Giono Cerezo por ser guías y amigas.**

**A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Bacteriología Molecular por su apoyo incondicional.**

**Mi eterno agradecimiento.**

## CONTENIDO

Indice de figuras	1
Indice de tablas	2
Glosario	3
Resumen	5
<b>I. ASPECTOS GENERALES.</b>	<b>6</b>
1.0 ANTECEDENTES.	6
2.0 PATOGENICIDAD POR <i>Shigella</i> Y <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA.	7
3.0 MARCADORES ASOCIADOS EN <i>Escherichia coli</i> ENTEROINVASIVA.	14
3.1 Metabólicos.	14
3.2 Antígeno somático.	18
3.3 Producción de queratoconjuntivitis en cobayo o prueba de Sereny.	19
3.4 Invasión a la línea celular HEP-2.	20
3.5 Captación del colorante rojo Congo.	22
3.6 Plásmido de 120-140 MDa.	25
3.7 Hemaglutinina manosa-resistente.	28
<b>II. JUSTIFICACION.</b>	<b>29</b>
<b>III. OBJETIVOS.</b>	<b>30</b>
OBJETIVO GENERAL.	
OBJETIVOS PARTICULARES.	
<b>IV. MATERIAL Y METODOS.</b>	<b>31</b>
1.0 CEPAS BACTERIANAS.	31
2.0 BIOVARES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD EN <i>Escherichia coli</i> .	32
2.1 Pruebas bioquímicas ensayadas.	32
2.2 Preparación del inóculo e interpretación.	32
3.0 DETECCIÓN DEL ANTIGENO SOMÁTICO EN <i>Escherichia coli</i> .	33
3.1 Preparación del antígeno.	33
3.2 Preparación del antisuero.	34
3.3 Prueba serológica en tubo (reacción antígeno-anticuerpo).	34

<b>4.0 INVASIVIDAD EN CULTIVO CELULAR: HEp-2.</b>	<b>36</b>
4.1 Determinación del patrón de susceptibilidad a kanamicina y amikacina.	36
4.2 Preparación del inóculo bacteriano.	37
4.3 Preparación del cultivo celular en microplaca.	37
4.4 Infección de la monocapa celular.	38
4.5 Cuenta viable de las bacterias invasivas e interpretación.	39
<b>5.0 PRUEBA DE SERENY.</b>	<b>39</b>
5.1 En ratón.	39
5.1.1 Preparación del inóculo.	40
5.1.2 Manejo de animales.	40
5.1.3 Inoculación.	41
5.2 En cobayo.	41
5.2.1 Preparación del inóculo.	41
5.2.2 Manejo de animales.	41
5.2.3 Inoculación.	42
<b>6.0 CAPTACION DE ROJO CONGO.</b>	<b>42</b>
6.1 Inóculo.	42
6.2 Captación del rojo Congo.	42
<b>7.0 PERFIL DE PLASMIDOS.</b>	<b>43</b>
7.1 Perfil de plásmidos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> invasivas.	43
<b>8.0 HEMAGLUTINACION.</b>	<b>44</b>
8.1 Ensayo de Hemaglutinación.	44
<b>V. RESULTADOS.</b>	<b>46</b>
<b>VI. DISCUSION.</b>	<b>60</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.</b>	<b>68</b>
<b>Referencias.</b>	<b>70</b>

## INDICE DE FIGURAS.

Figura #1.	Genes involucrados en la invasividad por <i>Escherichia coli</i> y sus diferentes niveles de regulación.	10
Figura #2.	Proceso de invasividad por <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva en el epitelio intestinal.	12
Figura #3	Perfil de plásmidos de cepas de <i>Escherichia coli</i> con características invasivas.	56
Figura #4	Perfil de plásmidos de cepas de <i>Escherichia coli</i> con características invasivas.	57

## INDICE DE TABLAS.

Tabla #1	Biotipos de <i>E. coli</i> propuestos por Crichton.	17
Tabla #2	Antisueros utilizados para la tipificación somática de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	35
Tabla #3	Biovares de las 39 cepas de <i>E. coli</i> .	47
Tabla #4	Biotipos de las 39 cepas de <i>E. coli</i> de acuerdo a Crichton.	48
Tabla #5	Descarboxilación de aminoácidos de acuerdo a Edwards y Ewing para las 39 cepas de <i>Escherichia coli</i> .	49
Tabla #6	Antígenos somáticos encontrados en las cepas de <i>E. coli</i>	51
Tabla #7	Cepas de <i>Escherichia coli</i> con capacidad invasiva en cultivo celular (HEp-2).	53
Tabla #8	Cepas de <i>E. coli</i> captadoras del colorante rojo Congo al 0.01%.	54
Tabla #9	Hemaglutinación de 13/39 cepas de <i>Escherichia coli</i> en presencia o ausencia de manosa al 1%.	59



## GLOSARIO.

Antígeno O	Antígeno de la pared celular.
BAB	Base de agar sangre.
Caco-2	Línea celular proveniente de un carcinoma de colon humano.
ccc	Cadena cerrada covalentemente.
CDC	Centro del Control de las Enfermedades.
CEC	<i>Escherichia coli</i> citotóxica.
Crb	Fenotipo de captación del rojo Congo.
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroadherente.
<i>Eco</i> R I	Enzima de restricción.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.
EMB	Agar eosina-azul de metileno.
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.
<i>gal</i> U	Gene que codifica la glucosa 1 fosfatouridiltransferasa.
Genóforo	Genoma bacteriano.
HA	Hemaglutinina.
HeLa	Línea celular proveniente de un carcinoma cervico uterino.
HEp-2	Línea celular proveniente de un laringocarcinoma humano.
<i>Hind</i> III	Enzima de restricción.
<i>ics</i>	Fenotipo de diseminación intra/intercelular.
<i>ipa</i>	Genes que codifican la síntesis de los péptidos Ipa.
Ipa	Antígenos plasmídicos de invasión.
<i>iuc</i>	Gene que codifica la síntesis de aerobactina.

<i>kcp A</i>	Gene responsable de la producción de queratoconjuntivitis.
KDa	Kilodaltones.
LT	Toxina termolábil.
MDa	Megadaltones.
MR-HA	Hemaglutinina manosa-resistente.
OK	Antígenos de pared celular y cápsula.
Olm	Fenotipo de movimiento semejante a organelo.
<i>omp</i>	Genes que se encargan de la modulación de los genes <i>vir</i> .
PBS	Regulador de fosfatos (pH 7.2).
pINV	Plásmido de 120-140 MDa.
PMN	Proteínas de membrana externa.
<i>SaI I</i>	Enzima de restricción.
SDS	Sodio dodecil sulfato.
ST	Toxina termoestable.
Tn	Transposon.
<i>trp</i>	Gene que codifica la producción de la triptofano sintetasa.
TSB	Caldo soya tripticaseína.
<i>vir</i>	Gene regulador de virulencia.

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) produce un síndrome disentérico similar al de *Shigella* caracterizado por evacuaciones con moco y sangre. Para caracterizar las cepas de *E. coli* invasivas aisladas de cuadros diarreicos se probaron 39 cepas de *E. coli* presumiblemente invasivas en cultivos celulares HeLa, realizando su perfil de plásmidos, la prueba de Sereny, invasividad en células HEP-2, rojo Congo, serología y bioquímica. De las 39 cepas ensayadas, 6 fueron invasivas en la línea celular, 9 capturaron el colorante rojo Congo y solo 2 cepas fueron Sereny positivas que coincidieron con la presencia del plásmido de 102-140 MDa asociado a la invasividad. Estas dos últimas fueron lisina positiva y móviles al igual que las cuatro cepas invasivas en HEP-2. La hemaglutinina manosa-resistente no se encontró involucrada en el mecanismo de patogenicidad de EIEC. Serológicamente no reconocieron los antisueros atribuidos al grupo invasivo. Es probable que se trate de un nuevo grupo de EIEC no descrito aún, ya que bioquímica y serológicamente este grupo parece distinto a las cepas EIEC reportadas hasta ahora.

## I. ASPECTOS GENERALES.

### 1.0 ANTECEDENTES.

*Escherichia* es el género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y *E. coli* es la especie dentro del género *Escherichia*, junto con otras cuatro especies: *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. hermanni* y *E. vulneris*<sup>(8)</sup>.

Según su mecanismo de patogenicidad, epidemiología y presentación clínica se clasifica en cinco grupos: enteropatogénico clásico (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC) y el enteroagregativo (EAaggEC).<sup>(30)</sup> *E. coli* adherente difusa (DAEC) también se ha propuesto como patógena. En humanos, este grupo se ha asociado con diarrea, disenteria, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico<sup>(39)</sup>.

EIEC, a diferencia de los demás grupos, puede producir daño por su capacidad de penetrar e invadir la mucosa colónica del intestino grueso además de que aparentemente no penetra la superficie del intestino delgado<sup>(4)</sup>, y en su incapacidad toxigénica (producción de toxinas LT y ST)<sup>(10)</sup>.

EIEC produce un síndrome disentérico similar al causado por *Shigella*, caracterizado por dolor abdominal severo y diarrea con moco y sangre. Aunque los signos clínicos de ésta enfermedad varían en cada paciente se le atribuye fiebre, dolor de cabeza, mialgia y diarrea, hasta disenteria y en casos severos, hipotensión<sup>(26)</sup>.

La toxina Shiga, citotoxina producida en altas concentraciones por *Shigella dysenteriae* tipo 1, parece no estar involucrada en la muerte de las células infectadas, ya que según los estudios hechos con mutantes incapaces de producir la toxina, eliminan a las células infectadas con igual eficacia que las cepas productoras de ella<sup>(10)</sup>. Lo que se ha observado con la secreción de la toxina Shiga es una marcada alteración de los capilares en la mucosa de la lámina propia colónica, responsable de la colitis isquémica y hemorrágica observada durante la infección con *S. flexneri*<sup>(12)</sup>.

## 2.0 PATOGENICIDAD POR *Shigella* Y *E. coli* ENTEROINVASIVA.

El mecanismo de invasividad producido por *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) a las células epiteliales de la mucosa colónica es multifactorial, por lo tanto es muy difícil establecer al mismo tiempo todos los fenómenos que participan durante el evento, pues existen múltiples interrelaciones entre los genes y las proteínas reguladas por el genóforo bacteriano y el plásmido, lo que da lugar al fenotipo que se expresa durante el proceso invasivo.

Los trabajos realizados con *Shigella* constituyen la vanguardia en el estudio de la invasividad y a través del conocimiento obtenido de éstos se especula y se prueba cuales son los genes o proteínas que actúan en EIEC de manera similar que en *Shigella*<sup>(47)</sup>, ya que por sus múltiples similitudes feno-genotípicas es muy probable que ambas presenten la misma regulación genética<sup>(51)</sup>.

La información genética en *Shigella* que codifica a todos los factores involucrados en el proceso de invasividad se encuentra localizada en el genóforo bacteriano y en un plásmido de 220 Kb (ó 140 MDa)<sup>(4)</sup>.

La regulación genómica está mediada por el gene *vir R*, *vir F*, *vir B* y por el gene *kcp A*. El primero se encuentra localizado entre la región *trp* y *gal U* a los 27 minutos en el genóforo de *Shigella*. Este gene ejerce control negativo dependiente de la temperatura hacia los genes de invasión plasmídicos, ya que cuando se cultiva a 30 °C es no invasiva y a 37 °C si lo es<sup>(5)</sup>. Se ha demostrado que la región *vir* de *Shigella* es idéntica a EIEC <sup>(41)</sup>.

El gene *kcp A* se encuentra a 12 minutos en el genóforo de *S. flexneri*, es necesario para la producción de queratoconjuntivitis en cobayos, aparentemente promoviendo la regulación positiva de la expresión del gene *ics A* (*vir G*)<sup>(6)</sup>.

El gene *vir F*, que se encuentra en el plásmido de virulencia, codifica para la síntesis de una proteína de 30 KDa que regula positivamente la expresión de los genes *ipa* en el nivel trascricional. Esta proteína, a nivel citoplasmático, también tiene control positivo sobre la expresión de una proteína de membrana externa de 120 KDa codificada por los genes del mismo plásmido (gen *ics A*, región *virG*) relacionada con el movimiento de la bacteria dentro de la célula infectada<sup>(6)</sup>.

Los genes *ipa* codifican a nivel plasmídico la producción de los polipéptidos Ipa. Estos péptidos son referidos como IpaA (78KDa), IpaB

(62 KDa), IpaC (43 KDa), e IpaD (38 KDa) que están involucrados en el proceso de entrada a la célula y son considerados como "invasinas"<sup>(22)</sup>.

El gene *vir B*, se encuentra en el plásmido de invasión, codifica para una proteína de 33 KDa que regula, a nivel transcripcional, la expresión de los antígenos de invasión Ipa A, B, C, D. Este gene se controla positivamente, a su vez, por el gene *vir F* y su transcripción es dependiente de temperatura de manera semejante a la descrita para *vir F*<sup>(23)</sup>.

La región *vir G* (*ics A*) se localiza en el plásmido de virulencia dentro de una región de 4 Kb que codifica una proteína de 130 KDa que es regulada a su vez por una proteína de 30 KDa codificada por el gene *vir F*, y se requiere para la diseminación de la bacteria de una célula a otra <sup>(24)</sup>.

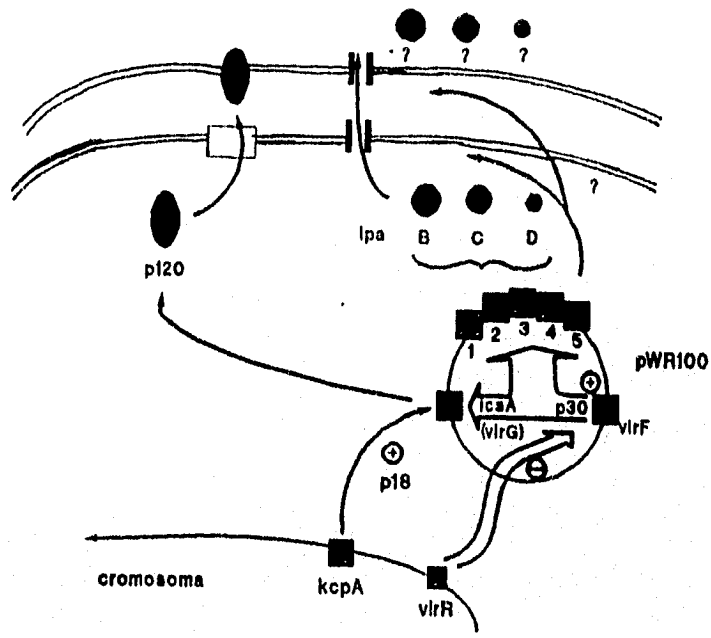
El locus *ics B* está en el plásmido de 120-140 MDa y es responsable de la diseminación intercelular por la lisis de la membrana celular en la protrusión que se forma cuando la bacteria está diseminándose <sup>(24)</sup>.

La figura # 1 presenta un esquema que muestra los genes involucrados en invasividad y sus diferentes niveles de regulación<sup>(25)</sup>.

#### Invasividad:

La invasividad es una cualidad de la patogenicidad relacionada con la entrada a la célula o tejidos del hospedero. Al contacto con el epitelio celular de la mucosa colónica, la bacteria probablemente se adhiere a la mucosa a través de las 3

Fig.#1. Genes involucrados en la invasividad de *Escherichia coli* y sus diferentes niveles de regulación.

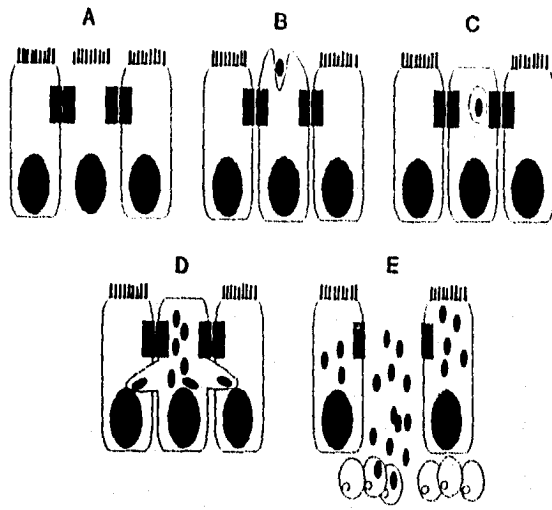




proteínas de membrana externa (OMP) codificadas por el plásmido de 120-140 MDa, e histológicamente, se observa la primera alteración: una degeneración localizada del "borde de cepillo" de la célula epitelial intestinal<sup>(7)</sup>. Después que el microorganismo ha alcanzado la membrana celular epitelial, el gen *vir F* que codifica para la síntesis de una proteína de 30 KDa se dice que regula positivamente la expresión de los genes *ipa* dando lugar a los polipéptidos Ipa A, B, C y D para penetrar así la membrana celular del enterocito<sup>(8)</sup>. En el citoplasma celular, se observa que se empieza a polimerizar la actina junto con la acumulación de la miosina directamente en el sitio por donde va a penetrar la bacteria. La célula se encuentra metabólicamente activa y por ello va a fagocitar al microorganismo quedando éste atrapado dentro de una vacuola fagocítica. No se sabe con exactitud si la bacteria escapa rápidamente del fagosoma a través de exoenzimas hidrolíticas como fosfolipasas, lipasas o/y lecitinasas<sup>(9)</sup>, ó por medio de un estallido respiratorio involucrando el incremento en la acidez de la vacuola por liberación de radicales de oxígeno<sup>(10)</sup>, ó por la actividad hemolítica por contacto mediada por el plásmido pINV, ya que estudios hechos con mutantes incapaces de realizar el proceso de entrada a la célula tampoco presentan actividad hemolítica por contacto<sup>(11)</sup>. La bacteria induce la lisis de la membrana fagocítica poco tiempo después de la entrada a la célula, ya que *in vitro* se ha visto que a los treinta minutos siguientes todas las bacterias invasivas se encuentran libres en el citoplasma de las células hospederas en la línea celular Caco-2<sup>(12)</sup>. La figura # 2 presenta un esquema de lo descrito<sup>(13)</sup>.

Cuando el microorganismo se encuentra libre en el

Fig#2. Proceso de invasividad por *Escherichia coli* enteroinvasiva en el epitelio intestinal.



citoplasma, el gen *ics A*, que está controlado positivamente por los genes *vir F* y *kcp A*, que codifica para una proteína de membrana externa de 120 KDa que permite a la bacteria moverse dentro de la célula, y reinfectar a las células vecinas. Así, exhibe dos movimientos: el primero se ha designado fenotipo *ics* (diseminación intra e intercelular) caracterizado en células HeLa. Este es rápido y azarosamente orientado, y conjuntamente con la multiplicación bacteriana en el interior de la célula, el microorganismo es capaz de atravesar el citoplasma en 4 a 5 h. Este movimiento, da lugar a la formación de protrusiones que se dan para infectar a las células adyacentes. Se observan así múltiples focos de nucleación en la célula y la formación de pequeños filamentos de actina, cerca de la superficie bacteriana. Estos filamentos forman un saco polarizado en la superficie de la bacteria que promueve su locomoción por un proceso todavía no bien explicado<sup>(4)</sup>.

Las mutantes *icsA* (*virG*) que pierden la capacidad de polimerizar la actina, pueden adherirse, entrar a la célula y lisar a la membrana fagosomal formando microcolonias cerca del núcleo de la célula infectada, pero son incapaces de formar placas en células HeLa con crecimiento confluyente y no dan la prueba de Sereny positiva<sup>(5)</sup>.

El fenotipo *Olm* (organelle like movement), se ha caracterizado en fibroblastos de embrión de pollo. La bacteria durante colonización de la célula infectada se desliza a lo largo del "haz de actina" moviéndose suave y unidireccionalmente a través de éstos filamentos. Esto también se ha observado en células HeLa, lo que explica la acumulación de las bacterias mutantes *ics A* cerca del núcleo celular<sup>(6)</sup>.

Utilizando la línea celular Caco-2 proveniente de un carcinoma de colon humano, se observa que la infección inicial se produce en las células periféricas y la colonización de las células centrales se da por el movimiento intracelular o por la diseminación entre célula a célula en la monocapa epitelial. La presencia de un antibiótico en el medio de cultivo previene la reinfección por bacterias extracelulares, por lo tanto, el proceso de colonización es exclusivamente intra e intercelular<sup>(4)</sup>. Las mutantes Ics A, solo entran y se diseminan en las células adyacentes de las "isletas" pero no llegan a colonizar a las que se encuentran centralmente. Esto sugiere, que la expresión del fenotipo Ics es necesaria para que se efectue la colonización completa del epitelio celular. Por lo tanto en este modelo se demostro que éste fenotipo era necesario para observar el pasaje de una célula a otra, mientras que el fenotipo Oim fue responsable de la colonización intracelular<sup>(4)</sup>.

La capacidad de la bacteria de diseminarse intracelularmente e infectar a las células adyacentes se refleja en la formación de placas en cultivo celular, donde el microorganismo invasivo que pasa de una célula a otra causa efecto citopático inmediato<sup>(4)</sup>.

### **3.0 MARCADORES ASOCIADOS EN *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.**

#### **3.1 METABOLICOS**

Se han desarrollado numerosos estudios en la búsqueda de un marcador metabólico que esté relacionado con la invasividad en *E. coli*, pues se ha observado que el plásmido de 120-140 MDa pudiera acarrear algún gen metabólico que codifique para la síntesis de alguna (s) proteína (s) especial (es) que pudieran determinarse mediante la fermentación de algún carbohidrato ó por la utilización de un aminoácido; lógicamente esto podría utilizarse como un recurso útil para la identificación de los microorganismos invasivos, ya que podría orientar rápida y eficazmente la presencia de una cepa invasiva de *E. coli* a partir de una colonia obtenida de un coprocultivo evitándose así el uso de animales de laboratorio ó de técnicas más especializadas que necesitan una infraestructura de laboratorio muy cara.

En Brasil, Toledo y cols. (1983), observaron que había una correlación muy estrecha entre las características bioquímicas y serológicas de *E. coli* con las cepas Sereny positivas, destacando que cuando la descarboxilación de la lisina era negativa y además las cepas eran inmóviles, se trataba de una cepa invasiva de *E. coli*.

Silva y cols. (1980), están de acuerdo con Toledo y cols. (1983), en que hay cierta relación fenotípica entre la lisina negativa y la movilidad negativa con la invasividad en *E. coli*, y proponen además, la utilización de la L-ramnosa como un posible marcador metabólico de virulencia, ya que encontraron que las cepas de *Escherichia coli* invasiva en su estudio carecen de la enzima necesaria para la incorporación metabólica del carbohidrato.

Toledo y cols. (1980) proponen además la fermentación de la lactosa, la utilización del mucato y del acetato de sodio como pruebas adicionales para la identificación de EIEC.

Crichton y Old (1980), proponen un esquema bioquímico de diferenciación de *E. coli* por medio de la fermentación de la rafinosa, dulcitol, sorbitol, ramnosa y la descarboxilación de la ornitina como pruebas con las que se puede determinar el biotipo. Tabla # 1.

En Tailandia, Taylor y cols. (1986), examinaron varias cepas de *E. coli* lactosa positiva y negativa provenientes de niños con disentería a los que se les evaluó movilidad, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, descarboxilación de la lisina y mucato. Las cepas que fueron incapaces de descarboxilar la lisina presentaron el plásmido de 120-140 MDa asociado a la invasividad de la mucosa intestinal del colon, y además fermentaron la lactosa. En contraste, los resultados encontrados en Japón y Brasil señalan que la mayoría de las EIEC fermentan débilmente ó no a la lactosa.

Faundez y cols. (1988), analizaron la fermentación de carbohidratos, la resistencia a antibióticos y el perfil de plásmidos de unas cepas de origen chileno, encontrando, a diferencia de los demás investigadores, gran variabilidad entre ellas, solo las *E. coli* O:143 presentaron biotipos y resistotipos similares con alta

Tabla # 1. BIOTIPOS DE *E. coli* PROPUESTOS POR CRICHTON.

Rafinosa	Sorbitol	Orritina	Dulcitol	Biotipo
+	+	+	+	1
+	+	+	-	2
+	+	-	+	3
+	+	-	-	4
+	-	+	+	5
+	-	+	-	6
+	-	-	+	7
+	-	-	-	8
-	-	+	+	9
-	-	+	-	10
-	-	-	+	11
-	-	-	-	12
-	-	+	+	13
-	-	+	-	14
-	-	-	+	15
-	-	-	-	16

correlación con el perfil de plásmidos. Ellos mencionan que las pruebas con carbohidratos y aminoácidos no son útiles en la clasificación de EIEC.

### 3.2 ANTIGENO SOMÁTICO.

La tipificación serológica del antígeno somático de la pared celular en el estudio de EIEC se han encontrado 12 serogrupos: O:28ac, O:29, O:112ac, O:115, O:124, O:135, O:136, O:143, O:144, O:152, y O:164<sup>(7)</sup>.

Toledo y cols. (1979), propusieron el grupo O:29, como el tipo serológico de una bacteria inmóvil, Sereny positiva e incapaz de descarboxilar a la lisina. Esta cepa se aisló en Sao Paulo, Brasil, de un niño de tres años con diarrea semillíquida y con cuenta de leucocitos elevada.

Toledo y cols. (1980), encontraron un nuevo serogrupo de *E. coli* enteroinvasiva aislada de niños con diarrea y vómito, heces semillíquidas y con gran cantidad de moco. Los aislados bacterianos correspondieron a *E. coli*, que fueron inaglutinables con los antisueros OK preparados contra los grupos de *E. coli* invasivos descritos hasta ahora. Estas cepas fueron Sereny positivas, inmóviles, lactosa positivas y con incapacidad de descarboxilar a la lisina. Además, su antígeno O cruzó con *S. boydii* 3. Ellos propusieron la designación de *E. coli* Sao Paulo hasta que su antígeno O sea determinado.

En Chile, Faundez y cols. (1988), encontraron que las cepas de EIEC aisladas de su población concordaban con los patrones característicos propuestos para las cepas invasivas de *E. coli*, a excepción de una cepa que



fue capaz de descarboxilar a la lisina con antígeno somático O:28ac , junto con dos cepas móviles pertenecientes al grupo O:28ac y O:124.

Cheasty y Rowe (1983), observaron que hay reacción antigénica cruzada entre los antígenos O de *E. coli* enteroinvasiva con los antígenos O de *Shigella*, y la identificación serológica para éstos microorganismos no es útil para detectar a todas las EIEC.

La identificación de EIEC de *Shigella* spp desde un punto de vista clínico no es distingible, ya que ambos organismos producen una enfermedad con cuadro clínico similar si no idéntico, pero desde el punto de vista epidemiológico o para estudios de patogenicidad en cepas productoras de brotes, la diferenciación entre EIEC y *Shigella* spp es esencial, ya que apoya los estudios epidemiológicos<sup>(32)</sup>.

### **3.3 PRODUCCION DE QUERATOCONJUNTIVITIS EN COBAYO O PRUEBA DE SERENY.**

La prueba de Sereny se utiliza para hacer el análisis de cepas invasivas *in vivo*, en la cual se inocula una suspensión bacteriana (mayor a  $10^{10}$  células) en el saco conjuntival del cobayo o conejo, provocando queratoconjuntivitis. Este signo mimetiza la infección intestinal por la invasión y multiplicación en las células epiteliales de la córnea con infiltración de polimorfonucleares<sup>(33)</sup>. Los efectos secundarios en el animal no se producen, y es muy fácil la lectura de la prueba.

Yamagata y cols. (1986), propusieron el uso de ratones en sustitución de cobayos para la prueba de Sereny, particularmente cuando el número de muestras a examinar es muy grande, además observaron que había una buena correlación con los resultados obtenidos en cobayos y ratones.

La prueba de Sereny se considera como la prueba más completa para el análisis de la invasividad, ya que es indispensable que la bacteria posea todos los genes completos del genóforo bacteriano y del plásmido de 120-140 MDa, ya que si se producen mutaciones en estos genes es posible inactivar la reacción de Sereny<sup>(4)</sup>.

Yamada y cols. (1989), estudiaron una proteína de 12 KDa producida por el gene *kcp A* involucrada en la virulencia durante la diseminación de las bacterias a las células adyacentes, ya que las mutantes *kcp A-* solo se multiplicaron y diseminaron dentro del citoplasma de las células que invadieron pero no lograron infectar a las células adyacentes y no se desarrolló la queratoconjuntivitis *in vivo*. Las mutantes *kcp A(-)* permanecieron localizadas dentro del citoplasma de la célula hospedera debido a su incapacidad de escapar de las vacuolas fagocíticas.

### **3.4 INVASION A LA LINEA CELULAR HEp-2.**

El primer paso en la patogénesis de la disentería bacilar es la penetración en las células epiteliales por el patógeno ya que las cepas bacterianas que han perdido ésta capacidad son avirulentas<sup>(7)</sup>. El modelo

experimental clásico para el análisis de la invasividad en *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva es la prueba de Sereny, este exámen y la invasividad en cultivo celular se consideran dos modelos independientes para medir el mismo fenómeno; ya que el primero solo va a evaluar la capacidad de la bacteria para penetrar a la célula y el segundo, mide la penetración, la multiplicación del microorganismo con la subsecuente reinfección a las células vecinas (43).

La invasividad de *E. coli* en células HeLa se describió por Melhman y cols. (1977), definiendo el criterio para dar positiva la prueba de invasividad: es indispensable que las células hospederas internalicen por lo menos cinco bacterias (55, 29). Estos valores se basan en el análisis microscópico cuidadoso que permite decidir si una bacteria es invasiva o no, pero existe el riesgo de confundir la invasividad con la adherencia que pueda exhibir el microorganismo y que ésta pudiera ser considerada como una prueba positiva.

Donenberg y cols. (1989), diseñaron un método para evaluar invasividad en células HEp-2 agregando ampicilina y gentamicina al medio de cultivo después del periodo de incubación de la bacteria con la célula, con el fin de eliminar a todos los microorganismos que no fueron capaces de penetrar la monocapa celular, así sería eliminada cualquier bacteria que se haya adherido solamente a la célula y que pudiera considerarse como invasiva por análisis visual. Utilizan al final de la prueba tritón x 100 al 1% para romper a las células liberando así a las bacterias intracelulares. El criterio invasivo es por lo tanto cuantitativo, se realiza en microplaca y se correlaciona la cuantificación de las bacterias intracelulares mediante

cuentas viables hechas por el método de Miles y Mishra en forma comparativa con testigos negativos y positivos.

Vesikari y cols. (1982), propusieron, en un trabajo con *Yersinia enterocolitica*, centrifugar la monocapa celular infectada a 1000 rpm por 10 min para acortar el tiempo de infección, aumentar la adherencia, toxicidad e invasividad. Este método fue probado, por los mismos autores, con *E. coli* invasiva, y lo compararon con los métodos tradicionales de invasión, encontrando que el porcentaje de infectividad para los métodos tradicionales fue del 0.5 al 5%, y para la técnica con centrifugación se encontró por arriba del 42%. Por éste método, la multiplicación que se detectó en las células con dos horas de incubación fue la misma que la observada después de varias horas. Las cepas que solo tuvieron la capacidad de adherirse a la célula, no lograron penetrar la monocapa celular por lo que no hubo falsos positivos. El método se acepto como seguro ya que no interfiere con los resultados en la prueba de invasividad<sup>(6)</sup>.

#### **4.5 CAPTACION DEL COLORANTE ROJO CONGO.**

Sasakawa y cols. (1986), utilizaron la prueba de la captación del colorante rojo Congo como un marcador de hidrofobicidad y observaron que había relación con la captación del hierro del medio, ya que se ha encontrado que las cepas virulentas son más hidrofóbicas que las avirulentas. Así, las cepas virulentas que unen el colorante desde un medio sólido, van a producir colonias pigmentadas de color rojo (Crb+) y las avirulentas de color blanco (Crb-). Además, las cepas capaces de dar la

prueba de rojo Congo presentan un aumento en la capacidad de *E. coli*, *Salmonella* y *S. flexneri* de adherirse a las células intestinales en animales experimentales (48).

La captación del rojo Congo se ha asociado también con la adquisición del hierro. La cantidad de éste elemento en forma libre en los tejidos del huésped es restringida ( $10^{-10}$ ) encontrándose intracelularmente como complejo hemo, ferritina y hemosiderina, y extracelularmente se localiza en el suero u otros fluidos, como lactoferrina o transferrina. *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva necesitan del hierro para realizar sus funciones metabólicas y lo obtienen del hospedero por la producción de sistemas quelantes de "alta afinidad" a estos elementos se les denomina sideróforos que forman parte del grupo de las aerobactinas (49). *E. coli* enteroinvasiva, bajo éstas condiciones, produce cuatro PME con peso molecular de: 81 KDa, 74 KDa, 76 KDa y trazas de 78 KDa, con un patrón idéntico al expresado por el transconjugante *E. coli* K-12-*S. flexneri* en donde Griffiths y cols. (1988), reportaron que la PME de 74 KDa, posiblemente pudiera estar involucrada como receptor para la aerobactina férrica.

Tigyl y cols. (1987), encontraron una mutante de *S. flexneri* que era incapaz de sintetizar aerobactina (luc-) pero con características virulentas en embrión de pollo, en ojo de cobayo y con la capacidad de invadir células HeLa. Esta mutante fue incapaz de captar el hierro ligado a lactoferrina o transferrina, pero utilizó a la hemina como fuente de hierro única. Esto sugiere que los compuestos hemo pueden servir como fuente de hierro para la bacteria *in vivo*.

Quadri y cols (1988), proponen el uso del agar rojo Congo en sustitución de la prueba de Sereny para la detección de cepas virulentas, por ser de fácil manejo en el laboratorio.

Maurelly y cols. (1984), y Sakai y cols. (1986), reportaron que los genes necesarios para la captación del colorante rojo Congo se encuentran en el plásmido de 140 MDa que codifica para la invasividad en *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva. Ya que pérdidas o deleciones en éste plásmido resultan en el fenotipo Crb- y se convierten en cepas avirulentas. Además, encontraron que la expresión de la captación del rojo Congo, al igual que la virulencia, están termorreguladas en *S. flexneri* y que la unión del colorante solo se presenta cuando el organismo crece a 37 °C.

Daskaleros y Payne (1987), describieron que los organismos rojo Congo + crecidos a 30 °C no son capaces de unir hemina ni rojo Congo indicando que la captación de rojo Congo y la adsorción de hemina parece ser que están relacionados y que ambos pudieran estar termorregulados por un mismo gen. Además los ensayos de competencia entre las moléculas de hemina y rojo Congo sugieren que los dos compuestos se unen en el mismo sitio celular.

La infectividad de EIEC en células HeLa con cepas Crb + cuando se tratan previamente con hemina (hemina pre-unida) o cuando esta se agrega a la monocapa celular revelan que hay un incremento en la virulencia. Este aumento puede indicar que los productos de los genes pudieran estar involucrados en el ataque bacteriano sobre las células epiteliales intestinales, de manera que la bacteria puede utilizar a las moléculas del

grupo hemo ó similares que se encuentran presentes en los alimentos digeridos parcialmente en el lumen intestinal. Así, el complejo bacteria-hemo podría unirse a un receptor celular intestinal responsable de la captación del grupo hemo. Alternativamente, la captación de las moléculas parecidas al grupo hemo podrían alterar la carga bacteriana superficial o su hidrofobicidad para así incrementar la interacción con las células del hospedador (9).

Albert y Leach (1989), reportaron que no había correlación entre la captación de rojo Congo e invasividad en EIEC; ellos probaron 292 muestras de origen clínico, aislando 21 cepas lisas de *E. coli* rojo Congo positivas. Bioquímicamente éstas fueron lisina descarboxilasa positiva, lactosa positiva y la mayoría fueron móviles. Ninguna de esas cepas hibridaron con la prueba de DNA para invasividad que emplea un iniciador (primer) obtenido a partir del gene pINV (66). Finalmente concluyeron que la unión a rojo Congo no denota enteroinvasividad y pudiera ser que todas las EIEC sean rojo Congo positivas, pero no todas las cepas de *E. coli* rojo Congo positivas son necesariamente enteroinvasivas.

### **3.6 PERFIL DE PLASMIDOS DE *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.**

La aseveración de que el plásmido de 120-140 MDa está asociado con el fenotipo virulento en *E. coli* enteroinvasiva está basado en las siguientes observaciones:

1. El plásmido de peso molecular alto (pINV) está invariablemente presente en cepas virulentas de *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva<sup>(22)</sup>.

2. La pérdida de éste plásmido está acompañada de la conversión a avirulencia<sup>(15)</sup>.

3. La virulencia se reconstituye al readquirir las cepas el plásmido de alto peso molecular (pINV) a partir de especies homólogas mediante ensayos de conjugación<sup>(37)</sup>.

La asociación entre el plásmido de alto peso molecular y la enteroinvasividad en *E. coli* fue reportada Harris y cols. (1982). Realizaron el perfil de plásmidos de cepas de *E. coli* enteroinvasiva por la técnica de Birnboim y Doly y otras, encontrando que la técnica de Birnboim y Doly fue la única que permitió evidenciar el plásmido de 120-140 MDa, y que las técnicas restantes no detectaron el plásmido debido a su peso molecular alto.

La extracción alcalina por el método de Birnboim y Doly<sup>(3)</sup> se basa en la desnaturalización del DNA genómico a pH 12.0-12.5 sin dañar al DNA plasmídico (ccc). Las bacterias se tratan con lisozima para romper la pared celular, y se lisan completamente con SDS y NaOH. El DNA genómico se desnaturaliza selectivamente y se precipita con acetato de sodio a pH ácido. Simultáneamente, la concentración del acetato de sodio favorece la precipitación de complejos proteína-SDS y RNA de alto peso molecular. En éste paso, las tres macromoléculas más contaminantes son coprecipitadas y pueden ser removidas por centrifugación. Los plásmidos y



residuos de RNA de bajo peso molecular se recuperan del sobrenadante por precipitación con etanol, y se analizan por electroforesis en geles de agarosa.

Maurelli y cols. (1985), reportaron que la técnica rápida de extracción de plásmidos propuesta por Kado y Liu (1981), puede utilizarse para la detección del plásmido pINV<sup>(23)</sup>. Y que el plásmido de 120-140 MDa esta íntimamente ligado a la producción de queratoconjuntivitis en cobayos (Prueba de Sereny).

Deleciones en el plásmido de *S. flexneri* que reduce su tamaño de 20 a 95 MDa, se asocian con la pérdida de la capacidad para penetrar a las células HeLa<sup>(37)</sup>. A través de mutagénesis dirigida usando inserciones con Tn5, se identificaron tres fragmentos *EcoRI* diferentes del pWR100 (plásmido invasivo) los cuales codifican para las funciones necesarias en la invasión de células HeLa. Estos fragmentos *EcoRI* no son contiguos. El mapeo con enzimas de restricción demostró una secuencia común entre ellos de 37 Kb, que define la secuencia mínima necesaria para la expresión del fenotipo invasivo. El mapeo de inserciones específicas con Tn5, demostraron que hay dos regiones separadas de esa secuencia: del lado izquierdo un fragmento *EcoRI* de 7.6 Kb y un fragmento del lado derecho *Sal I* de 16.1 Kb capaces de producir invasividad en cultivo celular. Estas clonas no producen queratoconjuntivitis en una prueba de Sereny y fallan en la formación de placas líficas en cultivo celular, posiblemente porque no se clonó toda la secuencia necesaria para la expresión completa del

fenotipo invasivo, o porque los genes virulentos clonados no fueron expresados por los plásmidos recombinantes<sup>(56)</sup>.

### 3.7 HEMAGLUTININA MANOSA-RESISTENTE.

Nandadasa y cols. (1981), detectaron la presencia de una hemaglutinina manosa-resistente (MR-HA) específica para eritrocitos humanos involucrada en la adherencia a células HeLa y HEp-2 en *E. coli* enteroinvasiva, reportada como agregados polipeptídicos de alto peso molecular, ricos en aminoácidos hidrofóbicos.

Knutton y cols (1984), encontraron que las cepas mutantes de EIEC que presentaban la incapacidad de sintetizar hemaglutinina manosa-resistente perdían la propiedad de adherirse a la monocapa celular. Mediante microscopía electrónica observaron que la forma en que se adhieren las bacterias invasivas a eritrocitos humanos es la misma que se observa hacia las células en cultivo extrapolándose a las células epiteliales intestinales. La participación de la fimbria tipo 1 parece ser que no promueve la adherencia de EIEC hacia la mucosa intestinal, por lo que la hemaglutinina manosa resistente pudiera ser la responsable de la unión de la bacteria invasiva hacia la mucosa.

## II. JUSTIFICACION

En México se han realizado muy pocos trabajos con respecto a la caracterización bioquímica, serológica y molecular de cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) aisladas de casos de diarrea. Es necesario estudiar estos microorganismos para conocer el comportamiento fenotípico y genotípico de la EIEC mexicana, pues la mayoría de las investigaciones sobre EIEC se han realizado en otros países. Los ensayos de laboratorio para determinar EIEC dan resultados variables y debemos justificar si la relación entre el rojo Congo y el ensayo de invasividad en cultivo celular correlacionan con la presencia del plásmido de 120-140 MDa descrito por otros autores en cepas de referencia se presenta en cepas de campo aisladas de casos de diarrea. Es indispensable el conocimiento de este microorganismo para poder implementar estudios encaminados a la profilaxis y erradicación de la enfermedad causada por EIEC.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva aisladas en México de un grupo de casos de niños con diarrea y niños testigos sin diarrea, utilizando ensayos de invasividad "in vivo" e "in vitro".

#### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

Establecer los biotipos o biovares característicos de las cepas invasivas de *Escherichia coli*, y determinar la presencia de los serotipos relacionados con invasividad.

Determinar la capacidad invasiva de las cepas de *Escherichia coli* provenientes de niños con y sin diarrea por pruebas de Sereny y cultivo de células HEp-2.

Determinar la captación de hierro de las cepas sospechosas mediante la prueba de rojo Congo.

Obtener el perfil de los plásmidos de las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, y demostrar la presencia del plásmido de 120-140 MDa que codifica para la invasividad en ECEI.

Buscar si hay relación entre la presencia de la hemaglutinina manosa-resistente y el aislamiento de las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

#### IV. MATERIAL Y METODOS.

##### 1.0 CEPAS BACTERIANAS.

Se seleccionaron 39 cepas de *E. coli* previamente estudiadas en ensayos de invasividad en células HeLa y/o Sereny (López, J. 1988). Inicialmente estas cepas fueron aisladas de niños hospitalizados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional-IMSS y actualmente pertenecen a la colección bacteriana del laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

Se incluyó una cepa de referencia de *Shigella flexneri* como testigo positivo, la cepa de referencia de *Escherichia coli* K-12 y H-10407 como testigos negativos para determinar y evaluar las pruebas de invasividad en cultivo celular, rojo Congo, hemaglutinación y Sereny. La cepa de referencia *E. coli* 25292 para ensayos de susceptibilidad a los antibióticos. Para el perfil de plásmidos se utilizó la cepa de *Shigella* pDK9 albergadora de plásmidos de peso molecular alto ( 105 y 140 MDa) y la cepa de *E. coli* pBR322.

Las cepas se conservaron en medio base de agar sangre (BAB) y se liofilizaron. Se probó pureza subcultivando en gelosa eosina-azul de metileno, y se seleccionaron cepas lisas con la prueba de vapor fluente (28).

## **2.0 BIOVARES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD EN *Escherichia coli***

### **2.1 Pruebas bioquímicas.**

La búsqueda de los marcadores metabólicos relacionados a la invasividad en EIEC se hizo con las siguientes pruebas:

- a. Descarboxilación de lisina y movilidad (Silva, 1980; Toledo, 1983; y Taylor, 1986).
- b. Fermentación de ramnosa (Silva, 1980).
- c. Fermentación de la rafinosa, dulcitol, sorbitol, ramnosa, descarboxilación de la ornitina (Crichton, 1980).

### **2.2 Preparación del inóculo e interpretación.**

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo soya tripticaseína (TSB) a 37 °C por 24 h. Este cultivo se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland teniendo finalmente una densidad bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

Se inocularon 100 ul de la suspensión bacteriana ajustada a cada prueba bioquímica en tubo y en placa, y se incubaron a 37 °C por 24, 48 y 72 h para ensayos con carbohidratos, y de 24 a 48 h para pruebas con aminoácidos.

Los resultados se consideraron positivos cuando se presentó el vire del indicador de rojo a amarillo (fermentación del carbohidrato).

Se consideraron pruebas positivas en la descarboxilación de aminoácidos en placa, cuando se observaron colonias pigmentadas de color púrpura o moradas, y cuando las colonias fueron de color amarillo se consideraron negativas.

### **3.0 DETECCIÓN DEL ANTIGENO SOMÁTICO EN *Escherichia coli*.**

La detección del antígeno somático se realizó por pruebas de aglutinación en tubo de acuerdo al CDC de Atlanta<sup>(28)</sup> que consiste en el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo mediante el uso de antisueros que fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).

#### **3.1 Preparación del antígeno.**

Las cepas se sembraron por estría cruzada en placas con medio de BAB y se incubaron a 37 °C por 24 h.

Se seleccionaron colonias lisas (bacterias con pared celular intacta) a través del análisis en microscopio estereoscópico, y se resembraron masivamente en placas de BAB para tener el cultivo de la colonia lisa, y en 20 ml de TSB, que a las 6 h de incubación a 37 °C se sometió a vapor fluente a 2 lb de presión por 1 hora. A continuación, se dejó enfriar la suspensión bacteriana a temperatura ambiente y se incubó a 4 °C por 18 h

para favorecer la sedimentación de la pared celular, ya que los demás componentes bacterianos quedan en solución.

Las cepas lisas se sedimentaron uniformemente en el fondo del tubo y las rugosas formaron una malla igualmente en el fondo del tubo producida por la aglutinación irregular de las paredes celulares de las bacterias que la forman.

Con las cepas lisas se realizó la seroaglutinación con la siembra masiva, y las cepas rugosas se descartaron.

### 3.2 Preparación del antisuero.

Los antisueros fueron proporcionados por cortesía del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE, tabla# 2), preparados en el laboratorio de Control y Producción de Sueros. Se diluyeron 1:20 con solución salina formalinizada al 6% para su uso.

### 3.3 Prueba serológica en tubo (reacción antígeno-anticuerpo).

Se tomó 0.1 ml de la solución del antisuero diluido con 0.9 ml del antígeno preparado. Se agitó suavemente y se incubó en cámara húmeda a 50 °C por 24 horas.

Seroaglutinación positiva: formación de malla en el fondo del tubo.

Seroaglutinación negativa: formación de botón (sedimentación) en el fondo del tubo.



**TABLA# 2. ANTISUEROS UTILIZADOS PARA LA TIPIFICACION SOMATICA DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*.**

---

O:1	O:63
O:2	O:112
O:3	O:114
O:4	O:111
O:5	O:112
O:6	O:114
O:7	O:119
O:8	O:124
O:9	O:125
O:10	O:126
O:11	O:127
O:12	O:128
O:13	O:136
O:15	O:143
O:16	O:144
O:18ac	O:149
O:21	O:152
O:25	O:153
O:26	O:157
O:27	O:158
O:28a	O:159
O:44	O:164
O:55	O:167

---

Sueros de *Escherichia coli* preparados en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos utilizados para tipificar las 39 cepas de *E. coli* ensayadas.

#### 4.0 INVASIVIDAD EN CULTIVO CELULAR: HEp-2.

El ensayo de invasividad se realizó utilizando la línea celular HEp-2 de acuerdo a la técnica de Donenberg modificada<sup>(11)</sup>, considerando la determinación del patrón de susceptibilidad a kanamicina y amikacina, la preparación del inóculo bacteriano y del cultivo celular en microplaca, la infección de la monocapa celular y la cuenta viable de las bacterias invasivas.

##### 4.1 Determinación del patrón de susceptibilidad a kanamicina y amikacina.

Este ensayo se realizó mediante la técnica de Kirby-Bauer<sup>(14)</sup> para comprobar la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a la amikacina o kanamicina, ya que se requirió de un antibiótico capaz de eliminar a las bacterias extracelulares que se encontraran adheridas a la célula.

Se sembraron las cepas de *E. coli* problema, y la cepa de referencia *E. coli* 25292 en 3 ml de caldo Mueller-Hinton. Se incubaron a 37 °C por 24 h. Después se ajustaron al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland con el mismo caldo de cultivo estéril para obtener 150 millones de células por mililitro.

Se sembró cada inóculo ajustado en una placa de agar Mueller-Hinton y se le colocaron los sensidiscos (Sigma Chemical Co.) con 30 ug de amikacina y 30 ug de kanamicina y se incubaron a 37 °C por 24 h.

Si la bacteria era sensible se observó la presencia de halos de inhibición de su crecimiento alrededor del disco de antibiótico superiores a 17 mm de diámetro para amikacina y 18 mm para kanamicina.

#### 4.2 Preparación del inóculo bacteriano.

Se sembraron las cepas de *E. coli*, la *Shigella* (testigo positivo) y las cepas *E. coli* H-10407, K-12, (testigos negativos) en 3 ml de TSB a 37 °C por 18 h en agitación continua. Después se tomó 0.1 ml de cada cultivo y se resembró en 3 ml de TSB estéril incubándose a 37 °C por 2 h en agitación para obtener un cultivo en fase logarítmica indispensable para la realización del ensayo de invasividad.

De cada cultivo se centrifugaron 1.5 ml del crecimiento en fase logarítmica durante 3 minutos. Se desechó el sobrenadante, y con el sedimento bacteriano se ajustó con PBS estéril a una absorbancia de 0.20 +/- 0.01 con una  $\lambda=590$  nm que equivale a  $1 \times 10^7$  bacterias /ml.

#### 4.3 Preparación del cultivo celular en microplaca.

A partir de un cultivo de células HEp-2 pase 145 con 100% de confluencia, se realizaron los microcultivos celulares en una microplaca de 96 pozos, con una cuenta celular de  $8 \times 10^4$  células/ml. Se adicionó 200  $\mu$ l de medio M-199 suplementado con glutamina 2mM, suero fetal de bovino al 10%, estreptomina 100 $\mu$ g/ml y penicilina 100 u/ml.

Después de 18h de incubación, la microplaca se lavó con PBS completo pH=7.2, y se le adicionó 180 ul de medio M-199 suplementado sin antibiótico y se realizó un análisis de la confluencia celular antes de proceder con la infección de la monocapa celular.

#### 4.4 Infección de la monocapa celular.

Se inocularon por triplicado 20 ul de la suspensión bacteriana ajustada a cada pozo de la microplaca con el cultivo celular con 100% de confluencia.

Se dejaron al azar pozos sin inocular como medida de control de posibles contaminaciones cruzadas.

Se centrifugó la microplaca infectada a 800 g/10 min y se incubó a 37 °C por 3 h en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Al término de la incubación, se desechó el sobrenadante de la microplaca por inversión y se realizaron tres lavados con PBS completo pH=7.0. Agregando después 180 ul de medio M-199 adicionado con 100mg/ml de amikacina. Se incubó a 37 °C por una hora y se lavó subsecuentemente con 200 ul de PBS completo pH=7.0.

Se revisó la confluencia de la microplaca para verificar si hubo pérdida celular al final del proceso.

Se lisaron las células del cultivo utilizando 200 ul de Tritón X-100 al 1% en cada pozo para liberar a las bacterias intracelulares. Después de 20 min se tomaron 20 ul de cada pozo para realizar la cuenta viable por el método de Miles-Mishra (14).

#### 4.5 Cuenta viable de las bacterias invasivas e interpretación.

Se prepararon 10 microplacas de 96 pozos de fondo en U con 180 ul de TSB en cada uno de ellos. Se le agregó a cada pozo 20 ul del inóculo bacteriano proveniente de la microplaca infectada y se realizaron ocho diluciones seriadas de cada muestra.

Se tomaron 10 ul de las últimas seis diluciones para hacer la cuenta bacteriana que consistió en dividir la placa de agar soya tripticaseína en seis partes y colocar en cada una de ella los diez microlitros de la muestra. Se incubaron a 37 °C de 24 a 36 h.

Según el criterio de Donenberg y cols. (1977), se consideran invasivas las bacterias que hayan crecido en las tres últimas diluciones realizadas ( $10^6$ ,  $10^7$ , y  $10^8$ ).

### 5.0 PRUEBA DE SERENY.

#### 5.1 En ratón.

### 5.1.1 Preparación del inóculo.

Se sembraron las cepas de *E. coli*, *Shigella flexneri 2a* (como testigos positivos) y *E. coli* K-12 (como testigo negativo) en 3 ml de caldo soya tripticaseína (TSB) y se incubaron a 37 °C por 24 h en agitación constante.

Se resembraron 0.1 ml de cada cultivo en 3 ml de TSB. Incubándose a 37 °C por 3 h en agitación continua.

Se tomó 1.5 ml del cultivo anterior y se centrifugó en microcentrífuga por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y al sedimento se le agregaron 75 ul de PBS pH=7.2 para dar una cuenta bacteriana de  $5 \times 10^{11}$  UFC/ml.

### 5.1.2 Manejo de animales.

Se utilizaron 50 ratones macho de la cepa CM1 de seis semanas de edad. Estos animales presentaron un peso corporal entre los 20 a 25 g, y se obtuvieron del bioterio de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM.

Se colocaron en jaulas para ratón, en grupos de diez individuos, con alimento y bebida disponible en todo momento.

Se dejaron en cuarentena por cinco días antes de la aplicación de la prueba de Sereny.

### 5.1.3 Inoculación.

Se administraron 10  $\mu$ l del inóculo ajustado en el ojo derecho del ratón, y en el ojo izquierdo se le aplicó PBS a pH=7.2 como control. Se examinaron todos los animales cada 24 h por tres días consecutivos.

## 5.2 En cobayo.

### 5.2.1 Preparación del inóculo.

El inóculo necesario para trabajar con cobayos se procesó de la misma manera que en ratones.

### 5.2.2 Manejo de animales.

#### Primer ensayo:

Se trabajaron 50 cobayos adultos de la cepa Harley pura de 8 meses de edad proporcionados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

#### Segundo ensayo:

Se utilizaron 50 cobayos jóvenes de la cepa Harley pura de 1 mes de edad proporcionados también por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

Como la inoculación y el resto de la prueba de Sereny se llevó a cabo en el bioterio para ambos ensayos, no se requirió de un período de cuarentena.

### 5.2.3 Inoculación.

Se administraron por vía oftálmica 25  $\mu$ l del inóculo ajustado en el ojo derecho. En el ojo izquierdo se le administró PBS pH=7.2 en igual volumen como control.

Se examinaron cada 24 h por espacio de 5 días para buscar signos que denotaran invasividad por parte de *E. coli*.

Reacción positiva: Queratoconjuntivitis.

Reacción negativa: Efectos nulos, enrojecimiento ó inflamación.

## 6.0 CAPTACION DE ROJO CONGO.

### 6.1 Inóculo.

Se partió de un inóculo ajustado al tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland para la prueba de captación de rojo Congo ya que se requirió de un cultivo en fase logarítmica.

### 6.2 Captación del rojo Congo.

Se sembró el inóculo ajustado en agar soya tripticaseína con rojo Congo al 0.01% por estría cruzada. Se incubó a 37 °C por 18, 24 horas. Utilizando como testigo positivo, una cepa de *Shigella flexneri* 2a, y como testigo negativo la cepa: *Escherichia coli* K-12.



Las colonias anaranjadas a rojas que se observaron en el medio de cultivo se consideraron rojo Congo positivas y las colonias rosas a blancas se consideraron negativas.

## 7.0 PERFIL DE PLASMIDOS.

El perfil de plásmidos se realizó mediante la técnica de Birnboim y Doly (1979), que se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosomal a pH ácido dejando en solución el DNA plasmídico que se obtiene por precipitación con etanol.

### 7.1 Perfil de plásmidos de las cepas de *E. coli* invasivas.

El perfil de plásmidos se practicó a las cepas de *E. coli* que fueron positivas en la prueba de Sereny y/o cultivo celular, junto con las cepas captadoras del colorante rojo Congo. Se incluyeron las cepas de *Shigella flexneri 2a* como testigo positivo y *E. coli* K-12 como testigo negativo. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* ensayadas fueron: 14, 268, 715, 777, 783, 1012, 1077, 1098, 1110, 1214, 1257, 1267 y 1427.

Se sembraron en agar Luria enriquecido con rojo Congo al 0.01% para seleccionar las colonias rojas (pCR+), y se resembraron en 5 ml de caldo Luria incubándose después a 37 °C por 18 h en agitación constante.

Del cultivo anterior se cosechó mediante centrifugación. Con este inóculo se procedió a la extracción de plásmidos por la técnica de Birnboim y Doly<sup>(3)</sup>.

## **8.0 PRUEBA DE HEMAGLUTINACION.**

La hemaglutinación se realizó de acuerdo Knutton y cols (1984), en base a la capacidad de la bacteria de adherirse a los eritrocitos humanos formando una malla en el fondo del tubo.

### **8.1 Ensayo de hemaglutinación.**

Se sembraron 13/39 cepas con características invasivas: 14, 268,715,777,783,1012,1077,1098,1110,1214,1257,1267 y 1427 en placas de base de agar sangre, y se incubaron a 37 C por 24 h.

Se preparó una suspensión de eritrocitos humanos del grupo "O" al 3% con solución salina fisiológica y otra suspensión de eritrocitos con manosa al 1%.

Se colocó una asada del cultivo anterior en una microplaca de 96 pozos de fondo en U con 50 ul de solución salina en cada pozo. Se realizaron seis suspensiones homogéneas por cada cepa. A las primeras tres, se les agregó la suspensión de eritrocitos en solución salina fisiológica, y a las tres restantes la suspensión con manosa al 1%. Se agitaron suavemente y se tomó la primera lectura inmediatamente si se presentó hemaglutinación, si no fue así, se incubaron a 37 °C por 2 h y se volvieron a leer.

**Hemaglutinación positiva: formación de malla en el fondo de la microplaca.**

**Hemaglutinación negativa: sedimentación de los eritrocitos en el fondo de la microplaca.**

## V. RESULTADOS

La tabla # 3 presenta los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas ensayadas para la búsqueda de un marcador metabólico relacionado con la invasividad y se observa que 37/39 (94%) cepas utilizaron la ramnosa como única fuente de carbono, la melobiosa 38/39 (97%), y el sorbitol fue fermentado por 39/39 (100%) de las cepas probadas y degradaron la sacarosa, rafinosa y dulcitol 21/39 (53%), 31/39 (79%) y 22/39 (56%) de las cepas dieron positiva.

En la tabla # 4 se muestran los biotipos obtenidos en las cepas de *E. coli* ensayadas por la técnica de Crichton y Old (1980), donde se observa que el mayor porcentaje de cepas se encontró dentro de los biotipos 1 (33%) y 2 (36%).

En las pruebas con aminoácidos, de las 39 cepas de *E. coli* examinadas solo una no descarboxilo a la ornitina (cepa 268). En cuanto a la descarboxilación de la lisina, solo tres cepas, 1022, 1064 y 1126 carecieron de la enzima necesaria para descarboxilarla (tabla # 5).

En el examen para evaluar la movilidad de la bacteria, se detectaron 12 cepas no móviles incluyendo las cepas 1022 y 1064 que fueron lisina descarboxilasa negativa. El resto del grupo presentó movilidad (27/39 cepas).

Los antígenos somáticos de la pared celular encontrados en las cepas ensayadas se muestran en la tabla # 6. A 5/39 cepas no se les

TABLA # 3. BIOVARES DE LAS 39 CEPAS DE *E. coli*

<i>Escherichia coli</i>	Ram	Mel	Sal	Sac	Raf	Dul	Sor
12	+	+	-	+	+	+	+
37	+	+	-	+	+	+	+
712	+	+	-	+	+	+	+
776	+	+	-	+	+	+	+
777	+	+	-	+	+	+	+
778	+	+	-	+	+	+	+
783	+	+	-	+	+	+	+
786	+	+	-	+	+	+	+
1023	+	+	-	+	+	+	+
1031	+	+	-	+	+	+	+
1077	+	+	-	+	+	+	+
14	-	+	-	-	-	-	+
19	+	+	-	-	-	+	+
1154	+	+	-	-	-	+	+
70	+	+	-	-	-	-	+
268	+	+	-	-	-	-	+
715	+	+	-	-	-	+	+
801	-	+	-	+	+	+	+
1010	+	+	-	-	-	+	+
1012	+	+	-	-	-	-	+
1022	+	+	-	-	-	-	+
1034	+	+	+	+	+	-	+
1046	+	+	+	+	+	-	+
1064	+	-	-	+	+	-	+
1098	+	+	-	-	+	-	+
1103	+	+	-	-	+	+	+
1110	+	+	-	+	+	-	+
1126	+	+	-	-	+	-	+
1214	+	+	-	-	+	-	+
1257	+	+	-	-	+	-	+
1200	+	+	+	+	+	+	+
1267	+	+	-	-	-	-	+
1282	+	+	-	-	+	-	+
1284	+	+	-	-	+	-	+
1295	+	+	-	-	+	-	+
1296	+	+	-	+	+	+	+
1326	+	+	-	-	+	-	+
1327	+	+	-	+	+	-	+
1427	+	+	-	-	+	-	+
<b>Total positivas:</b>	<b>37/39</b>	<b>38/39</b>	<b>3/39</b>	<b>21/39</b>	<b>31/39</b>	<b>22/39</b>	<b>39/39</b>

Ram: Ramnosa; Mel: Melobiosa; Sal: Salicina; Sac: Sacarosa; Raf: Rafinosa; Dul: Dulcitol; Sor: Sorbitol.

**TABLA # 4. BIOTIPOS DE LAS 39 CEPAS DE *E. coli* DE ACUERDO A CRICHTON (8).**

<i>Escherichia coli</i>	Raf	Dul	Sor	Orn	Biotipo	Porcentaje	
12	+	+	+	+	1	biotipo 1 33%	
37	+	+	+	+	1		
712	+	+	+	+	1		
776	+	+	+	+	1		
777	+	+	+	+	1		
778	+	+	+	+	1		
783	+	+	+	+	1		
786	+	+	+	+	1		
801	+	+	+	+	1		
1077	+	+	+	+	1		
1103	+	+	+	+	1		
1200	+	+	+	+	1		
1296	+	+	+	+	1		
1031	+	.	+	+	2		biotipo 2 35%
1034	+	.	+	+	2		
1046	+	.	+	+	2		
1064	+	.	+	+	2		
1098	+	.	+	+	2		
1110	+	.	+	+	2		
1214	+	.	+	+	2		
1237	+	.	+	+	2		
1282	+	.	+	+	2		
1284	+	.	+	+	2		
1295	+	.	+	+	2		
1326	+	.	+	+	2		
1327	+	.	+	+	2		
1427	+	.	+	+	2		
1126	+	.	+	.	4	biotipo 4 2%	
19	.	+	+	+	9	biotipo 9 10%	
715	.	+	+	+	9		
1010	.	+	+	+	9		
1154	.	+	+	+	9		
14	.	.	+	+	10	biotipo 10 15%	
70	.	.	+	+	10		
1012	.	.	+	+	10		
1022	.	.	+	+	10		
1023	.	.	+	+	10		
1267	.	.	+	+	10		
268	.	.	+	+	12		biotipo 12 2%

Raf: Rafinosa; Dul: Dulcitol; Sor: Sorbitol; Orn: ornitina. Se observa que el biotipo más encontrado fue el 2 y el 1. El biotipo 4 y 12 solo incluyeron una cepa respectivamente.

**TABLA #5 DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS DE ACUERDO A EDWARDS Y EWING<sup>(14)</sup> PARA LAS 39 CEPAS DE *Escherichia coli*.**

<i>Escherichia coli</i>	Orn	Lis	Arg
268	.	+	+
1022	+	.	+
1064	+	.	+
1126	.	.	.
12	+	+	+
14	+	+	+
19	+	+	+
37	+	+	+
70	+	+	+
712	+	+	+
715	+	+	+
776	+	+	+
777	+	+	+
778	+	+	+
783	+	+	+
786	+	+	+
801	+	+	+
1010	+	+	+
1012	+	+	+
1023	+	+	+
1031	+	+	+
1034	+	+	+
1046	+	+	+
1077	+	+	+
1098	+	+	+
1103	+	+	+
1110	+	+	+
1154	+	+	+
1214	+	+	+
1257	+	+	+
1200	+	+	+
1267	+	+	+
1282	+	+	+
1284	+	+	+
1295	+	+	+
1296	+	+	+
1326	+	+	+
1327	+	+	+
1427	+	+	+
<b>Total positivas:</b>	<b>37/39</b>	<b>36/39</b>	<b>38/39</b>

Orn: ornitina; Lis: lisina; Arg: arginina. Se detectaron solo 3 cepas incapaces de descarboxilar la lisina, 2 a la ornitina, y 38 lograron asimilar a la arginina.

**TESIS**

**COMPLETA**



**Tabla #6. ANTIGENOS SOMATICOS ENCONTRADOS EN LAS CEPAS DE *E. coli* ENSAYADAS.**

Cepa	Serogrupo	Grupo patógeno
14	O:111	EPEC
37	O:55	EPEC
70	O:25	ETEC
776	O:3	
778	O:25	ETEC
1023	O:25	ETEC
1110	O:11	ETEC
1200	O:7	

Cepas rugosas: 786, 1031, 1034, 1077 y 1126.

practicó la prueba de aglutinación en tubo ya que presentaron una pared celular rugosa.

No hubo aglutinación de las cepas ensayadas con los antisueros del grupo invasivo. Se detectaron los serogrupos: O:3, O:7, O:11, O:25, O:55 y O:111, algunos de ellos incluidos en los grupos de *E. coli* enteropatogena y enterotoxigénica. Se obtuvieron además, dos serogrupos O:3 y O:7 que no se encuentran involucrados en los grupos patogénicos de *E. coli* reportados hasta ahora.

La capacidad de *E. coli* para invadir a las células HEp-2 se muestra en la tabla # 7, donde de las 39 cepas de *E. coli* examinadas para invasividad seis de ellas fueron capaces de penetrar a las células HEp-2: 268, 715, 1110, 1214, 1257, y 1427. Ninguna de estas cepas invasivas fueron lisina descarboxilasa negativa e inmóviles.

La tabla # 8 muestra los resultados obtenidos en la captación del rojo Congo. De 39 cepas trabajadas solo se obtuvieron 9 cepas rojo Congo +, las cuales mostraron colonias pigmentadas de color naranja y rojo.

Utilizando ratones CD1 y cobayos adultos en la prueba de Sereny, no se detectó ninguna cepa positiva, solo se observó la producción de secreción e inflamación de los párpados con ligero enrojecimiento de la conjuntiva en los cobayos adultos, signos que

**Tabla #7. CEPAS DE *Escherichia coli* CON CAPACIDAD INVASIVA EN CULTIVO CELULAR (HEp-2).**

Número de Cepa:
268
715
1110
1214
1257
1427

**Tabla # 8. CEPAS DE *E. coli* CAPTADORAS DEL COLORANTE ROJO CONGO AL 0.01%.**

<i>Escherichia coli</i>	ROJO CONGO 0.01%
14	+
268	+
777	+
783	+
1010	+
1012	+
1077	+
1110	+
1267	+
<i>Shigella flexneri</i> 2a	+
<i>E. coli</i> K-12	-

no son considerados Sereny +, ya que solo la producción de queratoconjuntivitis se considera una prueba positiva.

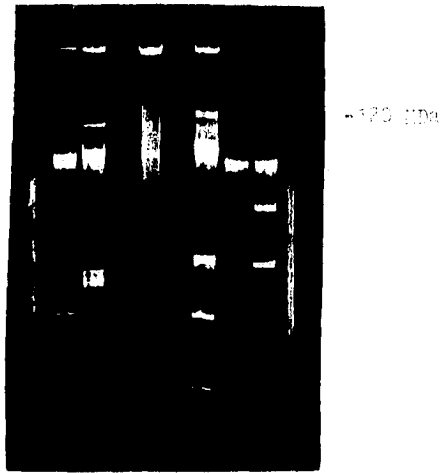
Empleando cobayos de 1 mes de edad se detectó a las 48 h, inflamación y queratinización de la conjuntiva en los cobayos inoculados con la cepa 268. A las 72 h, la cepa 1098 fue Sereny +. Ninguna otra cepa fue positiva. Los ojos izquierdos de los animales se inocularon con PBS como testigo negativo y en ningún momento se detectaron reacciones cruzadas.

En la figura # 3 y #4 se muestra el perfil de plásmidos de las cepas positivas en la prueba de rojo Congo, invasividad en cultivo celular (HEp-2), y/o Sereny, para detectar la presencia del plásmido de 120-140 Mdal responsable de la capacidad invasiva en *E. coli*. Se observa claramente la existencia de varias bandas plasmidiales con diferentes pesos moleculares por debajo de 23 Kb.

En las cepas ensayadas no se observaron bandas de peso molecular similar entre ellas que respondieran a un patrón común ya que presentaron múltiples bandas de diferentes pesos moleculares.

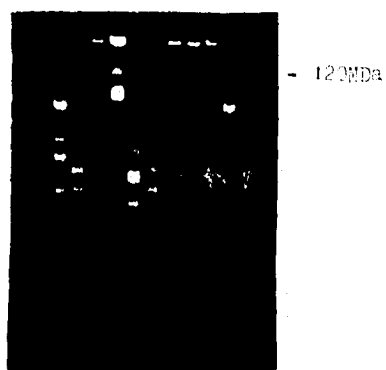
La tabla # 9 presenta 13/39 cepas que hemaglutinaron en presencia /ausencia de manosa. La cepa 268 no hemaglutinó bajo ninguna condición mientras que la cepa 1098 solo hemaglutinó en presencia de manosa. No se observó ningún patrón característico que denotara la influencia de la hemaglutinina manosa-resistente involucrada en la invasividad ya que cepas rojo Congo + que fueron no invasivas en cultivo celular o las que dieron Sereny + mostraron

Fig. #3. Perfil de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* con características invasivas.



Electroforesis en agarosa al 0.7% a 80 volts. A. 715, B. 268, D. 777, E. 14, F. 1098, G. pDK9, H. pBR322.

Fig. #4. Perfil de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* con características invasivas.



Electroforesis en agarosa al 0.7% a 80 volts. A. 1110, B. 1257, C. 783, D.pDK9, E 268, F. 1098, G. 1214, H. 1267, I. 1457, J. 1257. K. 1012.

la capacidad de hemaglutinar eritrocitos humanos en presencia de manosa. Además, la cepa 268 que fue invasiva en las pruebas anteriores y presentó el plásmido pINV no hemaglutinó en presencia de manosa.

La hemaglutinina manosa-resistente no mostró ninguna relación con la capacidad invasiva en EIEC.



**TABLA #9. Hemaglutinación de 13/39 cepas de *Escherichia coli* en presencia/ausencia de manosa al 1%.**

CEPA	Hemaglutinación sin manosa.	Hemaglutinación con manosa.
14	-	-
268	-	-
715	+	+
777	-	-
783	-	-
1012	-	-
1077	-	+
1098	-	+
1110	+	-
1214	-	-
1257	-	-
1267	+	+
1427	-	-
<b>Total positivas:</b>	<b>3/13</b>	<b>4/13</b>

## VI. DISCUSION.

En el estudio de las cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se realizaron diferentes pruebas encaminadas a la evaluación de la capacidad invasiva de la bacteria, a la búsqueda de un marcador metabólico característico para el diseño de una prueba de diagnóstico rápida y accesible (prueba serológica, rojo Congo, hemaglutinación), y se buscó la presencia del plásmido de 120-140 MDa (pINV) responsable del proceso invasivo.

En las pruebas bioquímicas con carbohidratos, los resultados obtenidos en la fermentación de la ramnosa no fueron los esperados de acuerdo al criterio de Silva y cols. (1980) ya que ellos encontraron que las cepas de *E. coli* con características invasivas de su estudio no fermentaron dicho carbohidrato mientras que el 97% de nuestras cepas (invasivas o no invasivas) la fermentaron. Esta prueba por tanto, no fue una herramienta útil en la detección de invasividad en EIEC.

La fermentación de la sacarosa, la rafinosa, el dulcitol y el sorbitol junto con la descarboxilación de la ornitina recomendados por Silva y cols., Toledo y cols. y Crichton y cols., tampoco presentaron valor como marcadores bioquímicos, ya que todas las cepas de *E. coli* ensayadas con características invasivas (Sereny+, invasividad en cultivo celular +, presencia del pINV+) dieron resultados muy variables que no se asociaron con la enteroinvasividad.

Toledo y cols. (1980, y 1983), entre otros, destacaron a la lisina como el marcador metabólico en la detección de EIEC en base a su incapacidad de fermentarla. 3/39 cepas de *E. coli* ensayadas fueron lisina descarboxilasa negativa, sin embargo, éstas tres cepas no fueron invasivas ni en Sereny ni en cultivo celular. Mientras tanto cepas que fueron lisina positivas presentaron propiedades invasivas: 6/39 en cultivo celular, 2/39 en Sereny y 9/39 captaron el rojo Congo, por lo que es probable que no exista correlación entre la descarboxilación de la lisina y la enteroinvasividad en EIEC en dichas cepas.

Dentro del esquema bioquímico propuesto por Crichton para la biotipificación de *E. coli*<sup>(8)</sup>, de los seis biotipos encontrados: 1, 2, 4, 9, 10 y 12, ninguno se relacionó exclusivamente con la invasividad, ya que tanto las cepas invasivas como las no invasivas estuvieron dentro de ellas, además las cepas captadoras del colorante rojo Congo se encontraron dispersas en los biotipos 1, 9 y 10; las invasivas a las células HEp-2 en el biotipo 2, y 9. Por otra parte, la cepa 268, que mostró propiedades invasivas en todas las pruebas ensayadas y además exhibió el pINV, fue la única que se encontró dentro del biotipo 12. Las cepas no invasivas se encontraron en los biotipos mencionados.

Estamos de acuerdo con los resultados reportados por Faundez y cols.<sup>(16)</sup> en su estudio con cepas de *E. coli* invasivas de origen Chileno, ya que las pruebas bioquímicas con carbohidratos y aminoácidos no son útiles en la identificación de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

En la detección de EIEC por medio del antígeno somático de la pared celular, no se obtuvieron serogrupos pertenecientes al grupo invasivo ya que de las 39 cepas de *E. coli* examinadas, solo en seis de ellas se identificaron los siguientes serogrupos: O:3, O:7, O:11, O:25, O:55 y O:111. De los cuales, los serogrupos O:11 y O:25 pertenecen al grupo enterotoxigénico, y los serogrupos O:55 y O:111 al enteropatogeno<sup>(7)</sup>. Mientras que los serogrupos O:3 y O:7 no se encuentran reportados para *E. coli* patógena.

La cepa 1110 serotipo O:11 resultó invasiva en cultivo celular. Esta cepa pertenece al grupo enterotoxigénico de *E. coli* aunque no es de los serogrupos más frecuentes. Dentro de la patología infecciosa por ETEC no se tiene evidencia previa de la invasión a las células epiteliales pues el mecanismo patológico de éstos microorganismos es a través de la producción de toxinas que causan diarrea acuosa además de los factores antigénicos (CFAs) que promueven su adhesión al epitelio<sup>(13)</sup>. Sin embargo, no se pierde la posibilidad de que ETEC invada la mucosa intestinal durante el proceso infeccioso. Elsinghorst y cols. (1992), comprobaron que ETEC tiene la capacidad de invadir a las líneas celulares colónicas e ileocecales, pero no a las células HeLa que frecuentemente se utilizan para el estudio de patógenos invasivos. Sería interesante analizar la posible producción de toxinas LT y ST por parte de *E. coli* 1110 para comprobar si además de poseer características invasivas puede producir estas toxinas clásicas del grupo enterotoxigénico de *E. coli*.

Puede ser que las cepas invasivas de *E. coli* 268 y 1098 puedan pertenecer a un nuevo serogrupo de *E. coli* enteroinvasiva no reportado

aún, de la misma forma que Toledo y cols (1980) aislaron en Brasil una cepa de *E. coli* invasiva que no aglutinó con ningún suero contra los grupos patógenos de *E. coli*, designándola *E. coli* Sao Paulo hasta la dilucidación de su antígeno O.

La invasividad y la captación a rojo Congo en *E. coli* no estuvieron relacionadas, pues las cepas 14, 777, 783, 1010, 1012, 1077 y 1267 captadoras de dicho colorante, es decir rojo congo +, fueron negativas a las pruebas de invasividad realizadas, y las cepas 715, 1098, 1214, 1257 y 1427 con capacidad invasiva no fueron rojo Congo+. Estos resultados concordaron con los encontrados por Albert y cols. (1989), que reportaron la falta de correlación entre la invasividad en EIEC y *Shigella* y la captación de rojo Congo, ya que todas las *E. coli* invasivas pueden ser rojo Congo+, pero no todas las *E. coli* que unen el colorante del medio son enteroinvasivas<sup>(1)</sup>.

Knutton y cols. (1984), reportaron que la adherencia a la mucosa por *E. coli* enteroinvasiva es a través de una hemaglutinina manosa-resistente. La cepa 268 que fue invasiva en todas las pruebas ensayadas, no mostró la hemaglutinina manosa-resistente involucrada en la adherencia hacia el enterocito, mientras que las cepas 1267 y 1077 que sí la presentan no fueron invasivas. Por lo que creemos que la hemaglutinina manosa resistente, en la cepa 268 Sereny +, no fue necesaria para poder invadir el epitelio celular.

La cepa 715 que presentó la hemaglutinina manosa-resistente no fue invasiva de acuerdo con la técnica de Sereny aunque sí logró penetrar la

monocapa en cultivo celular. Es posible que la hemaglutinina pudiera contribuir solamente a la adherencia hacia la célula y así facilitar la penetración.

Si una bacteria es Sereny positiva es que tiene toda la maquinaria genética necesaria para producir el proceso invasivo: penetración primaria a la célula, replicación, dispersión del microorganismo a las células vecinas y la posterior diseminación en el mismo. El ensayo en cultivo celular dió solamente una estimación de los pasos iniciales de la invasión pero no involucra todo el proceso invasivo total. De las 39 cepas ensayadas solo se encontraron seis cepas que penetraron la monocapa celular, pero de estas seis solo una produjo queratoconjuntivitis, y otra fue Sereny + pero no invadió eficientemente a las células en cultivo, a diferencia de lo que encontraron Day y cols. (1981), que reportaron total correlación entre la invasividad de EIEC y *Shigella* en cultivo celular y la prueba de Sereny.

Al analizar el perfil de plásmidos de las cepas invasivas encontramos que solo las 2/39 cepas Sereny positivas presentaron el plásmido de 120 MDa al igual que otros investigadores<sup>(21)</sup>.

Si la cepa 1098 tiene la información genética para invadir, e invade la córnea del cobayo ¿porqué entonces no invade la monocapa celular si es la prueba que evalúa los pasos iniciales de la invasión? Podría ser que esta cepa presentara una disminución en su hidrofobicidad, ya que es rojo congo negativa, que repercutiera en que no se adhiriera eficientemente o que no fuera eficazmente internalizada por la célula huésped, por lo que posiblemente requeriría un mayor tiempo de exposición con la célula, ya

que si comparamos el tiempo que tardó en producirse la queratoconjuntivitis en la prueba de Sereny vemos que se tardó dos días más que la cepa 268 o el testigo positivo. Puede ser que esta cepa tenga una pequeña mutación en algún gen involucrado en la síntesis de la proteína de 30 KDa que es codificada por el gene *vir F* y por lo tanto este alterado el control positivo de los genes *ipa* para la producción de los polipéptidos Ipa que haga la invasión más lenta pero con igual eficacia que la cepa *E. coli* 268 o la *Shigella* ensayada como testigo positivo. Tal vez si se prolongara el periodo de incubación bacteria-célula por más tiempo (arriba de dos horas) la bacteria lograría invadir la monocapa. O bien se investigaran otros modelos experimentales para evaluar que pudieran estar involucrados diferentes receptores en los dos modelos utilizados<sup>(20)</sup>.

Las cepas de *E. coli* 715, 1110, 1214, 1257 y 1427 que solo penetraron a las células HEp-2, y fueron Sereny negativas, en su perfil plasmídico no se detectaron plásmidos de peso molecular alto, pero se observó la presencia de varias bandas de peso molecular por debajo de las 30 Kb. Tal vez el plásmido pINV relacionado a la invasividad pudiera haberse degradado produciendo bandas de menor peso molecular, por lo que la información genética para presentar el fenotipo invasivo completo ya no se produce. Es posible que alguna de esas bandas presentara intacta la información genética necesaria para penetrar a las células HEp-2, pero no para diseminarse. Falkow y cols. (1987), utilizando un solo un fragmento de 25 Kb del plásmido de 120-140 MDa pudieron restaurar la habilidad de una mutante de *Shigella* para entrar a las células epiteliales. Sasakawa y cols. (1986), usaron cepas de *E. coli* mutantes en el gene *ics A* (contenido en el plásmido de 120 MDa) que al ensayarlas en la prueba de Sereny

fueron negativas pero lograron invadir a las células en cultivo (como en nuestros resultados) con lo que demostraron que ésta mutación no promueve la diseminación célula a célula, pero sí la colonización intracelular (fenotipo Olm + exhibido).

Es posible que las 6 cepas invasivas en cultivo celular inicialmente hayan albergado el plásmido de 120 MDa, pero quizá con los pases de cultivo sucesivos estos se hayan perdido así como los genes indispensables para la colonización total del epitelio (Sereny +).

EPEC se ha considerado como un microorganismo no invasivo ya que no causa queratoconjuntivitis en cobayo como EIEC, *Shigella* y *Yersinia* (39). Moon y cols. (1983) y Cantley y cols. (1991), reportaron que *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) está también asociada con la penetración a la célula(34), la desorganización del citoesqueleto y la pérdida de los filamentos de actina principalmente en la zona citoplasmática apical del enterocito. Andrade y cols. (1989), reportaron que la infección por EPEC en células HEp-2 difiere de la invasión por *Shigella* spp ó EIEC, ya que EPEC es Sereny negativo, además de que por microscopia óptica utilizando células HeLa infectadas con *Shigella* ó EIEC se detectaron bacterias diseminadas en el citoplasma después de la incubación por 5-8 h y las agrupaciones bacterianas no fueron detectadas en los estados tempranos de la infección. En el modelo patogénico de EPEC se propone que primero se lleva a cabo la adherencia a las células epiteliales por el pili BFP (bundle-forming pili), después un locus del genóforo inicia la transcripción para llevar a cabo la fosforilación de la tirosina, la elevación intracelular del calcio produciéndose esfacelamiento de la microvellosidad y secreción de



fluido. A continuación, el gene *eae* codifica la intimina que produce las lesiones AE (attaching and effacing), las cuales estan asociadas con alteraciones del citoesqueleto de los enterocitos afectados y la pérdida de la microvellosidad<sup>(41)</sup>. Es posible, las cepas de *E. coli* ensayadas que solo penetraron a las células HEp-2 pero que fueron Sereny negativas solo se hubieran internalizado a la célula por un fenómeno de AE, y que correspondieran al grupo de *E. coli* enteropatógena. Esto se podría confirmar realizando estudios de adherencia e inhibición de la adherencia en cultivo celular o usar sondas específicas<sup>(18, 31)</sup>, así como aumentar el número de antisueros ya que con los antisueros probados no se pudo detectar su serogrupo.

## VII. CONCLUSIONES.

No se obtuvieron biotipos característicos de las cepas invasivas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) ya que no siguieron un patrón bioquímico predecible. Además, los marcadores metabólicos relacionados a la enteroinvasividad en EIEC propuestos por diversos investigadores en el mundo no fueron de utilidad en la identificación de las cepas invasivas de *E. coli* ensayadas.

No se detectaron serotipos relacionados al grupo invasivo, solo se identificaron por serotipificación somática seis cepas, en la que se encuentran serogrupos de *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica.

No se encontró correlación alguna entre la captación del colorante rojo Congo y la invasividad en EIEC, ya que cepas de *E. coli* invasivas ó no invasivas lo unen indistintamente.

No se detectó relación entre la invasividad en cultivo celular (línea HEp-2) y la prueba de Sereny en cobayo.

La prueba de Sereny correlacionó con la presencia del plásmido de 120-140 MDa. Las cepas que solo invadieron la monocapa celular presentaron en su patrón electroforético varias bandas de bajo peso molecular que pudieran provenir originalmente del plásmido de invasividad.

La hemaglutinina manosa-resistente no mostró relevancia en el proceso de invasividad de EIEC, ya que si bien puede contribuir a la adherencia al epitelio celular es indispensable la presencia de otros factores para la invasión a la mucosa.

Es necesario aumentar los estudios con EIEC ya que bioquímica y serológicamente difieren de las cepas de *E. coli* enteroinvasivas reportadas en el mundo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Referencias:

- 1 .- Albert, J., y A. Leach. 1989. Lack of Correlation Between Congo Red Binding and Enteroinvasiveness in *Escherichia coli*. *Infect. Dis.* 160 (1): 169-170.
- 2 .- Andrade, J. R., V. F. Da Veiga, M. Santa Rosa, e I. Suassuma. 1989. An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 28: 49-57.
- 3 .- Birnboim, H. C., y J. Doly. 1979. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6): 1513-1523.
- 4 .- Bishop, P. W., y M. H. Ulshen. 1988. Clínicas Pediátricas de Norteamérica. *Gastroenterología.* 1: 73-90.
- 5 .- Brenner, J. D., B. Davis, A. Stelgerwalt, C. Ride, A. McWhorter, S. Allen, J. J. Farmer III, Y. Saito, y G. Fanning. 1982. Atypical Biogroups of *Escherichia coli* Found in Clinic al Specimens and Description of *Escherichia hermannii* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 15(4): 703-713.
- 6 .- Cantley, M. R., y S. L. Meseley. 1991. HeLa Cell Adherence, Actin Aggregation, and Invasion by Nonenteropathogenic *E. coli* Possessing the *eae* Gene. *Infec. Immun.* 59 (11):3924-3929.
- 7 .- Cheasty, T., y B. Rowe. 1983. Antigenic Relationships Between the Enteroinvasive *Escherichia coli* O Antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O Antigens. *J. Clin. Microbiol.* 17 (4): 681-684.
- 8 .- Crichton, B. P., y D. C. Old. 1980. Differentiation of Strains of *Escherichia coli*: Multiple Typing Approach. *J. Clin. Microbiol.* 11 (6): 635-640.
- 9 .- Daskaleros, P., y S. Payne. 1987. Congo Red Binding Phenotype Is Associated with Hemin Binding and Increased Infectivity of *Shigella flexneri* in the HeLa Cell Model. *Infec. Immun.* 55 (6): 1393-1398.

10. - Day, N. P., S. M. Scotland, y B. Rowe. 1981. Comparison of an HEp-2 Tissue Culture Test with the Sereny Test for Detection of Enteroinvasiveness in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. J.Clin Microbiol. 13 (3): 596-597.
11. - Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe, y G. Keusch. 1977. Epithelial Cell Invasion: of EPEC Associated with the EPEC Adherence Factor. J. Infect. Dis. 160 (3): 452-459.
12. - Donohue-Rolfe, A., D. Acheson, y G. Keusch. 1991. Shiga Toxin: Purification, Structure, and Function. Rev. Infec. Dis. 13 (Suppl 4): S293-S297.
13. - Elsinghorst, E., y D. Kopecko. 1992. Molecular Cloning of Epithelial Cell Invasion Determinants from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infec. Immun. 60 (6): 2409-2417.
14. - Ewing y Edwards. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4ta. ed. Nueva York, Elsevier, 93-136 p.
15. - Falkow, S., P. Small, R. Isberg, S. F. Hayes, y D. Corwin. 1987. A Molecular Strategy for the Study of Bacterial Invasion. Rev. Infec. Dis. 9 (Suppl 5): S450-S455.
16. - Faundez, G., G. Figueras, M. Troncoso, y F. Cabello. 1988. Characterization of Enteroinvasive *Escherichia coli* Strains Isolated from Children with Diarrhea in Chile. J. Clin. Microbiol. 26 (5): 928-932.
17. - Formal, S. B., y R. Hornick. 1978. Invasive *Escherichia coli*. J. Infec. Dis. 137 (5): 641-644.
18. - Gomes, A., M. R. Toledo, L. Trabulsi, P. Wood, y J. Morris. 1987. DNA Probes for Identification of Enteroinvasive *E. coli*. J. Clin. Microbiol. 25 (10): 2025-2027.
19. - Griffiths, E., P. Stevenson, T. Hale, y S. Formal. 1985. Synthesis of Aerobactin and a 76 KDa Iron-Regulated Outer Membrane Protein by *Escherichia coli* K-12-*Shigella flexneri* Hybrids and by Enteroinvasive Strains of *Escherichia coli*. Infec. Immun. 49 (1): 67-71.
20. - Hale, T. 1991. Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. Microbiol. Rev. 55 (2): 206-222.

- 21.- Hale, T., P. Sansonetti, P. Schad, S. Austin, y S. Formal. 1983. Characterization of Virulence Plasmids and Plasmid-Associated Outer Membrane Proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. *Infec. Immun.* 40 (1): 340-350.
- 22.- Harris, J. R., I. K. Wachsmuth, B. Davis, y M. Cohen. 1982. High-Molecular-Weight Plasmid Correlates with *Escherichia coli* Enteroinvasiveness. *Infec. Immun.* 37 (3): 1295-1298.
- 23.- Kado, C. I., y S. T. Liu. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* 15 (3): 1365-1373.
- 24.- Kadurgamuwa, J., M. Rhode, J. Whland, y K. N. Timmis. 1991 Intercellular Spread of *Shigella flexneri* through a Monolayer Mediated by Membranous Protrusions and Associated with Reorganization of the Cytoskeletal Protein Vinculin. *Infec. Immun.* 59 (10): 3463-3471.
- 25.- Kmetten, S., P. Williams, D. Loyd, D. Candy, y A. McNeish. 1984. Ultrastructural Study of Adherence to and Penetration of Cultured Cells by Two Invasive *Escherichia coli* Strains Isolated from Infants with Enteritis. *Infec. Immun.* 44 (3): 599-608.
- 26.- Kopecko, D. J., L. S. Baron, y J. Buyase. 1985. Genetic Determinants of Virulence in *Shigella* and Dysenteric Strains of *Escherichia coli*: Their Involvement in the Pathogenesis of Dysentery. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118: 71-92.
- 27.- Labrec, E., H. Schneider, T. Magnani, y S. Formal. 1964. Epithelial Cell Penetration as an Essential Step in the Pathogenesis of Bacillary Dysentery. *J. Bacteriol.* 88 (5): 1503-1518.
- 28.- Lambden, A. 1973. Applications and Evaluation Methods for Laboratory Immunological and Microbiological Reagents, Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents. 4ta. ed. E. U., DHEW, PHS, HSMHA, CDC.
- 29.- Lawson, M., V. Burke, y B. Chang. 1985. Invasion of HEp-2 Cells by Fecal Isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Infec. Immun.* 7 (3): 680-683.

- 30.- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* That Cause diarrhoea. Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155 (3):377-388.
- 31.- Levine, M. M., V. Prado, R. Robins-Browne, J. Nataro, P. Vial y B. Tall. 1988. Use of DNA Probes and HEp-2 Cell Adherence Assay to Detect Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 158 (1):224-228.
- 32.- Lindberg, A., A. Kärnell, y A. Weintraub. 1991. The Lipopolysaccharide of *Shigella* Bacteria as a Virulence Factor. *Rev. Infect. Dis.* 13 (Suppl 4): S279-284.
- 33.- López, J. 1988. Diarreas Bacterianas: Estudio de los mecanismos de Patogenicidad de Cepas de *Escherichia coli* en Poblaciones controladas. Invasividad y Patrón de Producción de lipasa, lecitinasa, proteasa y hemolisina. FES-Cuautitlán-UNAM.
- 34.- Mathewsan, J. J., y A. Cravioto. 1989. HEp-2 Cell Adherence as an Assay for Virulence Among Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 159 (6):1057-1060.
- 35.- Maurelli, T. A. 1992. *Shigella* Inside and Out Lifestyles of the Invasive and Dysenteric. *ASM News.* 58 (11):603-608.
- 36.- Maurelli, T. A., B. Blackunon, y R. Curtiss III. 1984. Loss of Pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is Correlated with Loss of Virulence and Virulence-Associated Plasmid. *Infect. Immun.* 42 (1):397-401.
- 37.- Maurelli, T. A., B. Baudry, H. D'Hauteville, T. Hale, y P. J. Sansonetti. 1985. Cloning of Plasmid DNA Sequences Involved in Invasion of HeLa Cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 49 (1):164-171.
- 38.- Maurelli, T. A., y P. J. Sansonetti. 1988. Genetic Determinants of *Shigella* Pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:127-150.
- 39.- Millotis, M. D., H. Koornhof, y J. I. Phillips. 1989. Invasive Potential of Noncytotoxic Enteropathogenic *Escherichia coli* in an In Vitro HeLa 407 Cell Model. *Infect. Immun.* 57 (7):1928-935.

- 40.- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. Levine, y R. Giannella. 1983. Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit Intestines. *Infec. Immun.* 41: 1340-1351.
- 41.- Muhldorfer, I., y J. Hacker. 1994. Genetic Aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial. Pathog.* 16:171-181.
- 42.- Nandadasa, H. G., G. F. Sargent, M. C. M. Britown, A. S. McNeilsh, y P. H. Williams. 1981. The Role of Plasmids in Adherence of Invasive *Escherichia coli* to Mammalian Cells. *J. Infec. Dis.* 143 (2):286-290.
- 43.- Okamura, N., y R. Nakaya. 1977. Rough Mutant of *Shigella flexneri* 2a That penetrates Tissue Culture Cells but Does Not Evoke Keratoconjunctivitis in Guinea Pigs. *Infec. Immun.* 17 (1): 4-8.
- 44.- Okamura, N., T. Nagai, R. Nakaya, M. Murakami, y K. Hisatsune. 1983. HeLa Cell Invasiveness and O Antigen of *Shigella flexneri* as Separate and Prerequisite Attributes of Virulence to Evoke Keratoconjunctivitis in Guinea Pigs. *Infec. Immun.* 39 (2): 505-513.
- 45.- Otto, B. R., A. M. Verweij-van Vught, y D. MacKareu. 1992. Transferrins and Heme-Compounds as Iron Sources for Pathogenic Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 18 (3): 217-233.
- 46.- Pál, T., J. Newland, B. Tall, S. Formal, y T. Hale. 1989. Intracellular Spread of *Shigella flexneri* Associated with the *kcp A* Locus and a 140-Kilodalton Protein. *Infect. Immun.* 57 (2):477-486.
- 47.- Pál, T., S. Formal, y T. Hale. 1989. Characterization of Virulence Marker Antigen of *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27 (3): 561-63.
- 48.- Quadri, F., S. Hossain, I. Ciznar, K. Haldeer, y D. Sack. 1988. Congo Red Binding and Salt Aggregation as Indicators of Virulence in *Shigella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 26 (7): 1343-1348.



- 49.- Sakai, T., C. Sasakawa, y M. Yoshikawa. 1986. Molecular Cloning of a Genetic Determinant for Congo Red Binding Ability Which Is Essential for the Virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 51(2): 76-82.
- 50.- Sambrook, D., E. F. Fritschi, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. E. U., Cold Spring Harbor Laboratory Press, B.13 p.
- 51.- Sansonetti, F. J., H. D'Hauteville, C. Ecobichon, y C. Pourcel. 1983. Molecular Comparison of Virulence Plasmids in *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol.* 134 A: 95-98.
- 52.- Sansonetti, P. J. 1991. Genetic and Molecular Basis of Epithelial Cell Invasion by *Shigella* Species. *Rev. Infec. Dis.* 13 (Suppl 14): S285-S292.
- 53.- Sasakawa, C., K. Kamata, y M. Yoshikawa. 1986. Molecular Alteration of the 10-Megadalton Plasmid Associated with Loss of Virulence and Congo Red Binding Activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 51 (2): 470-475.
- 54.- Silva, R. M., M. R. Toledo y L. Trabulsi. 1980. Biochemical and Cultural Characteristics of Invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 11 (5): 41-444.
- 55.- Small, P. L., R. Isberg, y S. Falkow. 1987. Comparison of the Ability of Enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* to Enter and Replicate within HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* 55 (7): 1674-1676.
- 56.- Small P. L., y S. Falcow. 1988. Identification of Regions of a 230-Kilobase Plasmid from Enteroinvasive *Escherichia coli* that are Required for Entry into HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* 56 (1): 225-229.
- 57.- Taylor D., P. Echeverria, O. Sethabutr, C. Pitarangsi, U. Kelsomboon, y J. Cress. 1988. Clinical and Microbiologic Features of *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* Infections Detected by DNA Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 26 (7): 1362-1366.

- 58.- Taylor D., P. Echeverria, T. Pal, O. Sethabutr, S. Saiborusuth, y J. Cross. 1986. The Role of *Shigella* spp, Enteroinvasive *Escherichia coli*, and other Enteropathogens as Causes of Childhood Dysentery in Thailand. *J. Infec. Dis.* 153 (6): 1132-1138.
- 59.- Tigyl, Z., A. Kishore, J. Masland, A. Forsgren, y S. Nadiu. 1992. Lactoferrin-Binding Proteins in *Shigella flexneri*. *Infec. Immun.* 60 (7): 2619-2626.
- 60.- Toledo, M. R., C. Alvariza, J. Murahovschi, S. Ramos, y L. Trabulsi. 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes and Endemic Diarrhea in Infants. 39 (2): 586-589.
- 61.- Toledo, M. R., H. Reis, R. Almeida, y L. Trabulsi. 1979. Invasive Strain of *Escherichia coli* Belonging to O Group 29. *J. Clin. Microbiol.* 9 (2): 288-289.
- 62.- Toledo, M. R., H. Reis, y Luiz R. Trabulsi. 1980. New invasive *Escherichia coli* Strain. *J. Clin. Microbiol.* 11 (4): 422-423.
- 63.- Toledo, M. R., y L. Trabulsi. 1983. Correlation Between Biochemical and Serological Characteristics of *Escherichia coli* and Results of the Sereny Test. *J. Clin. Microbiol.* 17 (3): 419-421.
- 64.- Vasselou, T., J. Mounier, R. Hellio, y P. J. Sansonetti. 1992. Movement along Actin Filaments of the Perijunctional Area and De Novo Polymerization of Cellular Actin Are Required for *Shigella flexneri* Colonization of Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *Infec. Immun.* 60 (3): 1031-1040.
- 65.- Vesikari, T., J. Bromirska, y M. Mäki. 1982. Enhancement of Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in HEP-2 Cells by Centrifugation. *Infec. Immun.* 36 (2): 834-836.
- 66.- Wood, P., G. Morris, J. R. Pamela, y J. Kapper. 1986. Comparison of DNA Probes and the Sereny Test for identification of Invasive *Shigella* and *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 24 (3): 498-500.

- 67.- Yamada, M., C. Sasakawa, N. Okada, S. Makino, y, M. Yoshikawa. 1989. Molecular Cloning and Characterization of chromosomal virulence region *hcp A* of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 3 (2):207-213.
- 68.- Yamagata, S., T. Sakay, S. Makino, y M. Yoshikawa. 1986. The Use of Mice in the Sereny Test as a Virulence Assay of *Shigellae* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun. 51 (2): 696-698.

- 67.- Yamada, M., C. Sasakawa, N. Okada, S. Makino, y. M. Yoshikawa. 1989. Molecular Cloning and Characterization of chromosomal virulence region *kcp A* of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 3 (2):207-213.
- 68.- Yamagata, S., T. Sakay, S. Makino, y M. Yoshikawa. 1986. The Use of Mice in the Sereny Test as a Virulence Assay of *Shigellae* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 51 (2): 696-698.