

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESPUESTA HUMORAL EN HUMANOS
A LA COLONIZACION INTESTINAL
POR *Escherichia coli* O157:H7

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

ARMANDO NAVARRO OCAÑA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO CRAVIOTO.

2000

00346



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo se realizó en El Laboratorio de Salud Pública, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de México con la dirección y asesoría de los Doctores: Alejandro Cravioto, Yolanda López Vidal y Carlos Eslava.

ESTE TRABAJO LO DEDICO MUY ESPECIALMENTE A:

Armando y Rodrigo: Que son fuente de inspiración y motivo de mi superación académica.

Agradezco a Irma el apoyo y cariño que me ha brindado durante este tiempo alentando siempre mi superación académica.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi profundo agradecimiento a los miembros del jurado:

Dr. Alejandro Cravioto

Dr. Carlos Eslava

Dra. Yolanda López Vidal

Dra. Irma Rosas

Dr. Javier Torres

Dra. Gloria Gutiérrez

Dr. Angel Manjarrez

Por su valioso tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus sugerencias y correcciones que contribuyeron a mejorar y enriquecer la calidad y el contenido de este trabajo.

En especial agradezco al Dr. Alejandro Cravioto, Director de la Facultad de Medicina por la dirección de esta tesis, así como su apoyo, sus acertadas y pertinentes observaciones y correcciones durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Carlos Eslava, Coordinador de Investigación del Departamento de Salud Pública y a la Dra. Yolanda López Vidal por sus valiosos comentarios, opiniones y sugerencias en la realización de este trabajo y por ser miembros de mi Comité Tutorial.

A la Dra. Guadalupe García De La Torre por su apoyo en el análisis estadístico de la actividad bactericida de los sueros humanos y de conejo empleado en este estudio.

A Ulises Hernández por su colaboración en la realización de las electrofóresis y transferencias de los LPS de *E. coli*.

A Gabriel Pérez, por su excelente apoyo en la preparación de cuadros y figuras de este trabajo.

A Luis León Alamilla por la realización de los ensayos de PCR de las cepas de *E. coli*.

A Delia Licona, José Luis Méndez y a Juan Manuel Hernández, por el apoyo en la caracterización bioquímica de las cepas de *E. coli* y de los ensayos de ELISA empleadas en este estudio.

A José Molina, por su participación en la realización de los ensayos de ELISA y en la extracción de los LPS de *E. coli*.

A Martha Solano, por su apoyo durante la realización de los ensayos de ELISA con sueros humanos y la identificación bioquímica de las cepas de *E. coli*.

A Carmen Guadalupe Chávez, por su excelente apoyo secretarial.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo: Ruth Beatriz García, Gabriela Delgado, Jorge Mateo Villaseca, Sandra Gavilanes, Luis Manuel Perea, Alma Inzunza, Maritoña Ramírez y Eva Salinas.

RESPUESTA HUMORAL EN HUMANOS A LA COLONIZACION INTESTINAL POR *Escherichia coli* O157: H7

RESUMEN

I. INTRODUCCION

Escherichia coli O157: H7 enterohemorrágica (EHEC).

Relaciones clónales del complejo O157: H7.

Respuesta inmune: anticuerpos neutralizantes contra Stx, LPS O157 y contra proteínas de secreción.

Relaciones antigénicas entre el serogrupo O157 EHEC y otros grupos bacterianos.

Importancia epidemiológica de *Escherichia coli* enterohemorrágica en México.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. OBJETIVO GENERAL

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS HIPOTEIS

V. MATERIAL Y METODO

Cepas bacterianas.

Identificación y tipificación serológica.

Detección de los genes *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA*.

Reactividad antigénica inespecífica en sueros de conejo.

Obtención y purificación del LPS.

Sueros humanos contra *E. coli* O157, O116 y O7.

Perfil electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Actividad bactericida del suero de conejo.

Actividad bactericida de sueros obtenidos de pacientes con antecedentes con infección por *Salmonella*.

VI. RESULTADOS

Identificación y tipificación serológica.

Genes *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA*.

Reactividad antigénica cruzada.

Análisis electroforético y por inmunoelectrotransferencia de los LPS.

Respuesta de sueros humanos contra el LPS de *E. coli*.

Actividad bactericida del suero de conejo.

Reactividad del suero de conejo anti *S. typhi* y el de pacientes con antecedente de infección por *Salmonella* contra *E. coli* O157.

VII. DISCUSION

VIII. CONCLUSIONES

IX. REFERENCIAS

X. TABLAS Y FIGURAS

RESPUESTA HUMORAL EN HUMANOS A LA COLONIZACION INTESTINAL POR *Escherichia coli* O157: H7

RESUMEN

En países en desarrollo *E. coli* es uno de los agentes bacterianos más frecuentemente implicados en infecciones intestinales, sin embargo, la incidencia de aislamiento del serotipo O157: H7 es baja. Se ha propuesto que la baja frecuencia de aislamiento de esta bacteria en la población mexicana, podría estar relacionada con una resistencia de tipo natural contra dicho patógeno. También se ha sugerido la existencia de inmunidad inespecífica, relacionada con la exposición a patógenos que comparten epítomos comunes con *E. coli* O157. Al respecto diferentes investigadores han señalado reactividad antigénica cruzada entre *E. coli* O157: H7 y los serogrupos O7 y O116 de la bacteria, así como otros grupos bacterianos como *Salmonella* del grupo N, *Citrobacter freundii*, *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* e inclusive *Escherichia hermannii*. En México no existen reportes de síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (CH) asociados a la infección por *E. coli* O157, desconociéndose que factores están involucrados al respecto. El propósito del presente trabajo fue identificar algunos factores del hospedero que pudieran estar implicados en la baja incidencia de aislamientos de *E. coli* O157: H7 observada en México, considerando la posibilidad de utilizar este microorganismo como modelo para el diseño de estrategias para el control de infecciones bacterianas intestinales. El análisis de la tipificación serológica de 7200 cultivos de *E. coli* mostró 36 cepas O157 de las cuales 28 (77.8%) fueron no móviles (NM), 4 (11.1%) con antígeno flagelar H10 y 3 (8.3%) con los antígenos flagelares H28, H51 y H42. La fórmula O157: H7 se observó únicamente en un aislamiento (2.8%) obtenido de un paciente asintomático. En un ensayo de PCR múltiple para amplificar los genes de virulencia *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* se identificaron dos cepas con los tres genes y una solo con los genes *eaeA* y *ehxA*. El análisis de la reactividad antigénica de 64 cepas de *E. coli* O157 contra sueros O7 y O116 mostró que 35 (54.7%) de las cepas presentaban aglutinación con el suero O7 y 40 (62.5%) con el suero O116. La respuesta observada con cepas del serotipo O157: H7 reportó 9 (81.8%) de 11 cepas que aglutinaron con el suero O7 y 3 (27.3%) con ambos sueros (O7 y O116); mientras que las cepas O157: no móviles 28, presentaron reactividad antigénica con el antisuero O116 (66.7%) y con ambos sueros 15 (35.7%) cepas.

Finalmente cepas O157 con antígeno H diferente a H7, la reactividad antigénica con los sueros O7 y O116 fueron similares (81.8%).

El análisis de la respuesta humoral en sueros de niños menores de seis meses contra los LPS O7, O116 y O157 evaluada por el método de ELISA mostró que 17 de 43 (40%) muestras de suero reaccionaron con el LPS O116 y 2/43 (4.6%) con O157. Por otro lado, la respuesta de 562 muestras de suero humano obtenido de población abierta contra los LPS O116 y O157 utilizando 0.7 (D O a 405nm) como punto de corte fue positiva en 4.8 y 5.0% respectivamente, sin embargo, contra el LPS O7 esta fue de solo 2.0%. Al evaluar por inmunoelectrotransferencia la respuesta de los sueros que dieron por el método de ELISA lecturas intermedias (0.4 a 0.699) contra el LPS de *E. coli* O157 se encontró que 61/88 (70%) de estos reaccionaban contra este LPS. Por lo que la respuesta de los sueros contra el LPS O157 por el método de ELISA e inmunoelectrotransferencia en conjunto se incrementó al 15.0%. Para determinar si los anticuerpos que presentan reactividad antigénica cruzada eran de tipo protector se realizó un ensayo de actividad bactericida. En este estudio se encontró que todos los sueros de conejo (anti O7, O116, O157) presentaban actividad bactericida tanto contra su cepa homóloga como contra las heterólogas. El mismo ensayo de actividad bactericida se realizó utilizando sueros humanos de pacientes con antecedentes de infección previa por *S. typhi*. Estos sueros analizados por la prueba de ELISA mostraron reactividad contra el LPS O157 en 3 (42%) de los siete sueros analizados. Al evaluar la actividad bactericida de estos sueros contra *E. coli* O157: H7 se encontró que 4/7 (57.1%) disminuían significativamente el número de colonias con diluciones que iban de 1:16 hasta 1:128. Los resultados obtenidos permiten proponer que la respuesta inmune observada contra el LPS O157 podría ser un factor que este contribuyendo a la baja colonización por esta bacteria, tanto en humanos como en animales y en consecuencia a la ausencia de cuadros clínicos como el SUH y CH en la población mexicana. Todo lo anterior sugiere la existencia de un sistema natural de control de transmisión de *E. coli* en países como México, que pudiera estar relacionado con la existencia de anticuerpos protectores inespecíficos que evitan la colonización por la bacteria tanto en sus reservorios naturales (bovinos) como en el hombre.

RESPUESTA HUMORAL EN HUMANOS A LA COLONIZACION INTESTINAL POR *Escherichia coli* O157: H7

I. INTRODUCCION

***Escherichia coli* O157: H7 ENTEROHEMORRAGICA (EHEC).**

Riley en 1982 (1982)¹ reportó dos brotes de colitis hemorrágica (CH) en los estados de Oregon y Michigan en los Estados Unidos asociadas con el consumo de hamburguesas en un restaurante de comida rápida. Los cultivos de las heces de estos pacientes mostraron la presencia de *Escherichia coli* O157: H7 un serotipo poco común en ese tiempo. Posteriormente Karmali (1983)² en Ottawa, Canadá, reportó casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombótica-trombocitopénica relacionados con el aislamiento de cepas de *E. coli* O157: H7 en las heces de los pacientes. Las alteraciones clínicas (SUH y CH) antes mencionadas, se han observado principalmente en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Alemania, Argentina y recientemente en Japón (Takeda, 1997)³. Aunque existen diferentes serotipos incluidos en el grupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), el serotipo O157: H7 se considera como el prototipo responsable de enfermedad en humanos.

El termino de *E. coli* Verotoxigénica (VTEC) fue propuesto por las observaciones de Konowalchuck (1977)⁴, quien primeramente describió cepas productoras de una toxina que era citotóxica para las células Vero (Células de riñón de mono verde). Posteriormente el termino *E. coli* enterohemorrágica fue propuesto para designar aquellas cepas que presentan un plásmido de 60 MDa, ocasionan CH y SUH. son productoras de la toxina tipo Shiga (SLT) y causantes de las lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E) en células epiteliales (Levine, 1987)⁵.

La familia de citotoxinas Shiga (Stx) esta compuesta por la toxina Stx1 que produce *Shigella dysenteriae* serotipo 1 y el grupo de citotoxinas que produce el grupo EHEC. de las que se conocen dos tipos Stx1 y Stx2. De la citotoxina Stx2 considerada la toxina representante de este grupo, se conocen variedades designadas como Stx2c, Stx2v, Stx2hb y Stx2e, esta última variante relacionada con la enfermedad del edema en cerdos (Pierard, 1991)⁶. Las variantes antigénicas de esta citotoxina difieren en especificidad del receptor. La toxina Stx de *S. dysenteriae* 1 se localiza invariablemente en el cromosoma de la bacteria, y los genes que codifican para Stx1 y Stx2 se encuentran localizados en bacteriófagos lisogénicos tipo λ (Scotland, 1983, O'Brien 1984)⁷⁻⁸.

Las citotoxinas Stx muestran una estructura molecular AB (70kDa), la subunidad A (32 kDa), es la fracción enzimáticamente activa y se encuentra unida no covalentemente a la subunidad B que es pentamérica (Stein, 1992)⁹. Esta última es la que realiza la unión al receptor celular y cada uno de los monómeros de la subunidad esta compuesta por 69 aminoácidos y el peso molecular de cada uno de los monómeros es de 7.7 kDa. La subunidad A tiene actividad enzimática y actúa como una N-glicosidasa que escinde un residuo de adenina (A-3732) localizado a 376 nucleótidos del extremo 3' de la subunidad 28S del RNA ribososomal (rRNA). Esta depurinación tiene como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas en las células, tanto en ribosomas de procariontes como de eucariontes que son sensibles a la actividad de la N-glicosidasa de Stx (Saxena, 1989)¹⁰. Como consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas se presenta la muerte de células epiteliales del endotelio renal, de las líneas celulares Vero y HeLa, o de cualquier célula que posea los receptores del tipo globotriaosilceramido (Gb₃ o Gb₄).

Además de los genes *stx1* y *stx2*, la bacteria posee una isla de patogenicidad de 35 kilobases llamada locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), que consiste de tres dominios. El primer

dominio codifica para la intimina (*eaeA*) una proteína de 94 kDa involucrada en el evento de adherencia y esfacelamiento (A/E), así como para los genes de la proteína receptor de la intimina (Tir), Kenny (1997)¹¹. El segundo dominio es el del sistema III de secreción, los genes son designados *sep* y *esc* codifican para varias proteínas que comparten homología con otras proteínas de bacterias como *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella* que presentan el mismo sistema III de secreción. El tercer dominio corresponde a las proteínas de secreción de *E. coli* (Esp) que incluyen EspA (24-25 kDa), EspB (37 kDa) y EspD (39.5 kDa). Esta última proteína solo se ha reportado en *E. coli* enteropatógena (EPEC) y aunque *E. coli* O157: H7 presenta los genes y la expresión de la proteína no se ha reportado en este serotipo. Otro factor que contribuye a la virulencia de este grupo de bacterias son los genes *ehxA*, presentes en un plásmido de 60 MDa los cuales codifican para una hemolisina. En *E. coli* O157: H7 y otros serotipos EHEC se ha descrito además la presencia de otro plásmido de entre 93 y 104 kb llamado pO157, éste codifica para una serina-proteasa llamada EspP que se ha identificado escinde el factor V de coagulación en humanos. Se considera que este podría contribuir a la hemorragia de la mucosa que se observa en la CH, (Brunder, 1997)¹². Sin embargo, la participación de este plásmido en la patogénesis de EHEC no es muy claro ya que ensayos con un modelo animal empleando cepas EHEC con y sin plásmido se observan el mismo tipo de lesiones.

RELACIONES CLONALES DEL COMPLEJO O157: H7.

Whittam (1993)¹³ mediante el ensayo de enzimas multilocus con 20 diferentes enzimas de *E. coli* O157: H7 y otros serotipos patógenos, observó que los tipos electroforéticos (ETs) de O157: H7 eran similares a los de la cepa EPEC del serotipo O55: H7, mostrando diferencia únicamente en

la alelo-enzima gluconato-6-fosfato deshidrogenasa (PGD). No obstante la relación clonal entre los dos serotipos, al analizar la presencia de los genes *stx* se demostró que estos solo estaban presentes en las cepas O157: H7. Ambas observaciones sugieren que el origen de *E. coli* O157: H7 fue a partir de una cepa EPEC O55: H7 y que a través de la transferencia horizontal de genes fue que adquirió propiedades de virulencia no presentes en el serotipo O55: H7. Feng y Whittam (1998)¹⁴ propusieron un modelo evolutivo de la emergencia del complejo O157, al respecto señalan que dos mutaciones puntuales del alelo *uidA* a -10 del promotor y +92 del gen estructural se presentaron en cepas O157: H7 y O157: H-, mientras que las cepas O55: H7 solo presentaron la mutación del alelo *uidA* a -10. Lo anterior sugiere que el alelo *uidA* de O55: H7 es un alelo intermedio entre el alelo silvestre y el alelo *uidA* de O157: H7, por lo que se propone un ancestro común para las cepas EPEC tipo de la actualidad que son sorbitol (SORB+) y β -glucuronidasa (GUD+) positivas. Esta cepa EPEC ancestro inmediato de O55: H7 al evolucionar pudo dar origen al ancestro más reciente de las clonas de los serotipos O55: H7 y O157: H7 y a otras cepas relacionadas, lo que permite asumir que las mutaciones en *uidA*-10 ocurrieron en todo el complejo O157: H7.

RESPUESTA INMUNE: ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA Stx, LPS O157 Y CONTRA PROTEINAS DE SECRECION.

Diferentes estudios han mostrado que las infecciones por cepas de *E. coli* O157: H7 y otros serogrupos EHEC inducen la formación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) contra las verotoxinas así como anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria (Chart, 1999 y Jenkins, 1999)¹⁵⁻¹⁶. Chart (1989)¹⁷ al estudiar pacientes con SUH observaron la presencia de

anticuerpos IgM a títulos elevados contra el LPS O157 pero no del tipo IgG. Estos autores también detectaron aunque en menor frecuencia anticuerpos contra proteínas de membrana externa pero no contra el flagelo bacteriano ó contra LPS diferentes a O157 (Chart, 1991)¹⁸.

Otros estudios han mostrado que las infecciones por *E. coli* O157: H7 inducen la formación de anticuerpos neutralizantes IgM, IgG e IgA contra las verotoxinas, y anticuerpos IgM e IgG contra el LPS de la bacteria (Greatorex, 1994)¹⁹. En un estudio para conocer la presencia de anticuerpos neutralizantes contra la toxina Stx así como contra el lipopolisacárido de *E. coli* O157: H7 en poblaciones expuestas y no expuestas se observó que residentes de áreas endémicas presentaban anticuerpos neutralizantes anti VT-1 y contra el LPS O157 en una frecuencia de 42.0% y 12.5% respectivamente, siendo significativamente mayor a lo reportado en población de áreas urbanas en donde se encontró una frecuencia de 7.7% y 4.7% (Reymond, 1996)²⁰. Wilson (1996)²¹ estudió 335 residentes de 80 granjas lecheras en Ontario, Canadá, para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra VT, en 97 (41.3%) de estos residentes encontró anticuerpos contra la toxina y en 30 (12.5%) contra el LPS O157. También observó que la proporción de personas que presentaban anticuerpos contra el LPS O157 se incrementaba gradualmente desde el nacimiento hasta los 50 años, con un valor significativamente mayor ($p < 0.05$) en los grupos de 40 a 50 años (26%) de edad. En contraste con lo anterior, la prevalencia de anticuerpos anti VT fue mayor en niños < 5 años (78%) declinando la frecuencia con la edad en forma significativa ($p < 0.001$). Un estudio similar fue realizado por Ludwig (1996)²² en 107 pacientes con SUH, en 8 se realizó el aislamiento de *E. coli* EHEC, en 5 de éstos las cepas fueron de los serogrupos O26 y O55 y en tres con serogrupo O111. En los 8 pacientes se analizó la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgG contra diferentes LPS de los serogrupos EHEC. Los resultados observados en los pacientes con

aislamiento de cepas EHEC O26 y O55 reportaron anticuerpos IgM, IgA e IgG contra el LPS homólogo a títulos altos, sin embargo, en los tres de quienes se aislaron cepas O111 los títulos de anticuerpos contra el LPS homólogo fueron bajos. En los ocho pacientes también se determinaron anticuerpos contra otros LPS; en un paciente con aislamiento de cepas de *E. coli* O26 se identificaron anticuerpos contra LPS de los serogrupos O157, O55, O111 y O128. Por otro lado del grupo de 99 pacientes sin aislamiento de cepas EHEC, 3 tuvieron anticuerpos IgA, IgM o IgG contra el LPS O157.

Otro estudio realizado por Chart (1996)²³ en 68 sueros de pacientes con SUH se identificaron anticuerpos contra el LPS de los serogrupos EHEC O5, O26, O115, O128, O145 y O153. Mediante un ensayo de ELISA e inmunotransferencia se confirmó la presencia de anticuerpos séricos contra el LPS O5 (5/68), sin embargo, la asociación del serogrupo O5 con SUH es poco frecuente, contrario a lo observado con cepas O26: H11 que después de *E. coli* O157 son las que se han relacionado en segundo lugar con SUH.

En sueros de pacientes con SUH no sólo se han observado anticuerpos contra la toxina tipo Shiga o contra el LPS O157, también se han detectado contra proteínas que presentan el sistema de secreción del tipo III de *E. coli*. Chart (1998)²⁴ estudió el suero de 34 pacientes que presentaban anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157, en 21(62%) de ellos detectaron además anticuerpos contra una o varias de cinco diferentes proteínas de secreción (15, 25, 39, 40 y 80 kDa). En 12 de los mismo 34 sueros se identificaron anticuerpos contra los LPS de *E. coli* O5 (8), O115 (2), O145 (1) y O153 (1). Lo anterior sugiere que las infecciones por cepas EHEC O157 y serotipos que no son O157 inducen anticuerpos contra el LPS, la citotoxina y las proteínas de secreción. En un estudio más reciente (Jenkins, 1999)¹⁶ con 167 sueros humanos con evidencia de infección por

EHEC en los que no se detectaron anticuerpos contra el LPS O157, mostraron anticuerpos contra proteínas de secreción, la enterohemolisina y el antígeno flagelar H7, así como anticuerpos contra los LPS de *E. coli* O5 (1), O26 (2), O115 (2), O145 (1), O165 (5). Lo anterior sugiere que la búsqueda de anticuerpos contra el LPS de cepas de *E. coli* productoras de la toxina tipo Shiga, constituye un elemento importante para realizar vigilancia epidemiológica y seroprevalencia de infecciones por EHEC.

RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE EL SEROGRUPO O157 EHEC Y OTROS GRUPOS BACTERIANOS.

La cadena lateral ó antígeno somático (O) del LPS de *Escherichia coli* O157, es un polisacárido no ramificado de unidades repetidas de un tetrasacárido compuesto de D-glucosa, L-fucosa, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactosa, y 4-acetamido-4,6-didesoxi-D-manosa (Perry, 1986)²⁵. El LPS O157 presenta reacciones antigénicas cruzadas tanto contra serogrupos de la misma especie como con grupos bacterianos como *Brucella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Salmonella* del grupo N (O30) y con bacterias del mismo género como *Escherichia hermannii*. Estas reacciones podrían estar relacionadas principalmente con el antígeno somático. Las reacciones cruzadas entre *E. coli* O157 y otros serogrupos de la especie se han analizado con suero policlonal de conejo, los resultados obtenidos muestran que las reacciones cruzadas se presentan con los serogrupos de *E. coli* O7 y O116 (Ewards, 1986 y Perry 1988)^{26,27} a diluciones de 1:320 y 1:1280 respectivamente. El suero policlonal contra O7 presenta reacciones cruzadas con el antígenos O116 a diluciones de 1:10420 y el suero contra O116 reaccionó con el antígeno O7 a diluciones de 1:640. Así mismo cepas de *E. hermannii* probadas contra un suero de *E. coli* O157 mostraron reacción a títulos de 1:80 por

aglutinación en porta objeto y 1:400 por aglutinación en tubo (Lior, 1987)²⁸. Rice (1992)²⁹ observó que cepas de *E. hermannii* aisladas de muestras clínicas aglutinaron con partículas de látex sensibilizadas con un suero contra O157. En 1990 Perry (1990)³⁰ observó que algunas cepas de *E. hermannii* con la secuencia de carbohidratos 4-amino-4,6-didesoxi- α -D-manopiranosido en su LPS era similar a la del LPS O157. Dicha reacción cruzada podría dar lugar a datos sero epidemiológicos falsos positivos cuando se analiza la incidencia de infecciones producidas por *E. coli* O157: H7. Sin embargo, las infecciones por *E. hermannii* son esporádicas y solo un pequeño número de cepas comparten el epítipo común del LPS de *E. coli* O157.

Las reacciones antigénicas cruzadas que se presentan entre cepas de *E. coli* O157 y *Brucella abortus* fueron descritas por Stuar y Corbel (1982)³¹ al emplear suero de conejo hiperinmune contra *E. coli* O157. En una paciente de cuatro años de edad con SUH, Notenboom (1987)³² observó que el suero de esta niña aglutinó con una cepa de *B. abortus*, sin embargo, del coprocultivo de la paciente únicamente se aisló *E. coli* O157: H7 y el título de aglutinación de su suero contra esta bacteria fue 1: 6400. Posteriormente Chart (1992)³³ con un suero de conejo hiperinmune obtenido contra *E. coli* O157, confirmó la presencia de reacciones cruzadas con *B. abortus*. Este investigador también observó que tanto el suero de pacientes infectados con *E. coli* O157 reaccionaba contra el LPS de *B. abortus* como el de pacientes con brucelosis contra el LPS de *E. coli* O157. En este estudio además de las reacciones cruzadas entre *B. abortus* y *E. coli* O157, se encontró que *Yersinia enterocolitica* O9 reaccionaba con el suero de pacientes con brucelosis. Utilizando 10 sueros de origen humano con aglutinación positiva contra el antígeno de *Brucella* se observó que cinco de estos aglutinaron tanto con *E. coli* O157 como con *Y. enterocolitica* O9, los otros cinco sueros solo aglutinaron con el LPS de *E. coli* O157.

Después de realizar diferentes ensayos de absorción entre los antígenos de *E. coli* O157 y *Y. enterocolitica* O9 se concluyó que las reacciones cruzadas entre ambas bacterias involucran cuando menos tres epítomos antigénicos, por lo que se propone que un epítomo denominado E (de *E. coli*) esta presente en el LPS de *E. coli* O157, el segundo epítomo denominado Y (de *Y. enterocolitica*) lo expresan cepas de *Y. enterocolitica* O9, mientras que el tercer epítomo llamado C (de común) lo presentan ambos grupos bacterianos (Chart, 1992)³³. También se ha mencionado que sueros contra *E. coli* O157 presentan reacción cruzada con cepas de *C. freundii*. Al respecto se observó que cepas de la bacteria aisladas del contenido intestinal de una paciente de 2.5 meses de edad aglutinaron con partículas de látex sensibilizadas con suero contra *E. coli* O157, los resultados confirmaron la presencia de antígenos similares en los LPS de *E. coli* O157 y *C. freundii* (Bettelheim, 1993)³⁴. Por otro lado ensayos de aglutinación con suero hiperinmune contra *E. coli* O157 sin absorber mostraron reacción de aglutinación con *E. coli* O157, *E. hermannii*, *Salmonella* del grupo N y una cepa de *C. freundii* (F90/2460-1). Cuando el suero fue absorbido con un cultivo de *E. hermannii* ya no se presentó reacción de aglutinación contra esta bacteria conservándose la aglutinación con *C. freundii* y *Salmonella* del grupo N. Esta respuesta sugiere que las cepas de *C. freundii* presentan epítomos compartidos con *E. coli* O157 pero diferentes a los epítomos de *E. hermannii*. Por lo que se propone que el residuo de carbohidratos 4-amino-4,6-didesoxi- α -D-manopiranosido de la cadena lateral del LPS de *E. coli* O157 pudiera ser el epítomo común entre este grupo de bacterias. El mismo patrón de reacciones cruzadas se ha observado en suero de pacientes con SUH y con suero hiperinmune de conejo contra el LPS de *E. coli* O157. Se ha descrito que las cepas de *C. freundii* forman parte de la microbiota normal del intestino humano y su amplia dispersión sugiere que la reacción cruzada entre esta bacteria y *E.*

coli O157 debe considerarse al realizar el diagnóstico etiológico de SUH. Chart (1993)³⁵ utilizando suero de conejo contra *E. coli* O157 en un ensayo de transferencia de colonias (dot blot), corroboró las reacciones cruzadas con *C. freundii*. Park (1998)³⁶ describió que cepas de *C. sedlakii* aisladas de un paciente con diarrea aglutinaban con partículas de látex sensibilizadas con suero contra *E. coli* O157. Dichas cepas se caracterizaron por fermentar el sorbitol, no producían las citotoxinas Stx1-2 pero pertenecían a las especies del género *Citrobacter* que comparten epítomos con *E. coli* O157.

También se ha observado como *E. coli* O157 reaccionó con un suero hiperinmune obtenido contra *Salmonella* del grupo N. Del mismo modo se ha observado la respuesta correspondiente de un suero hiperinmune contra *E. coli* O157 que reaccionó contra el LPS de *Salmonella* del serogrupo N. Resultados similares se encontraron al utilizarse sueros de pacientes con SUH asociado con *E. coli* O157: H7 (Chart, 1993)³⁷. Otro tipo de reacción cruzada que se ha observado es la que se presenta entre *Vibrio cholerae* O1 Inaba y *E. coli* O157 (Chart, 1993)³⁸. Aunque el suero de conejo hiperinmune obtenido contra el LPS de *V. cholerae* O1 Inaba aglutinó con el LPS de *E. coli* O157, suero de conejo hiperinmune contra *E. coli* O157 solo reaccionó contra el LPS homólogo. Lo anterior llevó a plantear que el suero de individuos con historia clínica de cólera o vacunados contra *V. cholerae* O1 Inaba pueden presentar anticuerpos que reconocen *E. coli* O157. Este hecho se demostró al estudiar por el método de ELISA el suero de nueve individuos sin historia clínica de SUH o cólera inmunizados con una vacuna contra *V. cholerae*. Al utilizar el LPS O157 como antígeno, se encontró que cinco de los sueros presentaban valores de ELISA entre 0.4 y 0.7 de densidad óptica a 405nm, los mismos sueros por inmunotransferencia mostraron reactividad contra el LPS de *E. coli* O157.

IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA EN MÉXICO.

En un estudio de 52 niños con diarrea y 52 controles apareados por edad, sexo y vecindad, pertenecientes a una cohorte de niños de una área rural y seguidos longitudinalmente durante los primeros dos años de vida (Cravioto, 1988)³⁹, se encontró que los niños con diarrea presentaron en las heces cepas de *E. coli* productora de cantidades moderadas y altas de citotoxinas Stx 1-2 significativamente mayor ($P < 0.01$) que las que se aislaron de niños sin diarrea. El aislamiento de cepas productoras de SLT-1 a niveles bajos o moderados se asoció con la presencia de cuadros de diarrea secretora leve o moderada sin moco o sangre. En contraste ocho de los niños del estudio a quienes se realizó aislamiento de *E. coli* productora de niveles elevados de SLT-1, tres presentaron cuadros de colitis hemorrágica afebril y cinco diarrea severa con sangre. La producción de SLT-1 se detectó en cepas de *E. coli* pertenecientes a los serotipos O26: H11, O111: NM, O111: H21, O119: NM, O128: H12 y O157: NM. En otro estudio en el que se analizó la presencia de *E. coli* en 75 niños (Cravioto, 1990)⁴⁰ se encontró que 11 de estos se colonizaron inicialmente con cepas EHEC, 9 (82%) de ellos con cuadros de diarrea aguda ó colitis hemorrágica y 2 (18%) asintomáticos. En las cepas de *E. coli* aisladas se detectaron los genes que codifican para la toxina SLT-1, además en ensayos *in vitro* utilizando células HeLa se observó que el 45% de las cepas eran productoras de SLT II. Las cepas productoras de las toxinas SLT 1 y 2 presentaron los serotipos O128ab: H7 y O157: H7, mientras que las cepas productoras de SLT-1 fueron del serotipo O26: H11. Ninguno de los niños colonizados con cepas EHEC desarrollaron SUH.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México las enfermedades infecciosas intestinales constituyen un grave problema de salud, *E. coli* es uno de los agentes bacterianos relacionados con mayor frecuencia con diarrea. Para que un patógeno pueda permanecer en la naturaleza es necesario que cuente con un hospedero al que colonice y a partir de este diseminarse. Para tal es indispensable que el microorganismo se adhiera a células del hospedero por medio de estructuras denominadas adhesinas que pueden ser apéndices fimbriales o componentes de membrana externa, el hospedero por su parte debe tener los receptores específicos para el factor de adherencia permitiendo que se realice la adherencia. En países en desarrollo como el nuestro, *E. coli* es uno de los agentes bacterianos más frecuentemente implicados en infecciones intestinales, sin embargo, la frecuencia en el aislamiento del serotipo O157: H7 es baja. Este escaso aislamiento de *E. coli* en la población mexicana, sugiere que existe una resistencia de tipo natural contra dicho patógeno (probablemente relacionada con ausencia del receptor celular para O157), o que se desarrolla inmunidad probablemente relacionada con la exposición a patógenos que comparten epítomos antigénicos comunes con *E. coli* O157. Observaciones previas indican la presencia de reactividad antigénica cruzada entre diferentes LPS de *E. coli*, éste hecho podría estar relacionado con una protección inespecífica contra la bacteria. En el caso de *E. coli* O157: H7 se ha observado respuesta inmune cruzada principalmente contra los serogrupos O7 y O116 de la misma especie, así como con grupos bacterianos como *Salmonella* del grupo N, *C. freundii*, *B. abortus*, *Y. enterocolitica* e inclusive entre *E. hermannii*. En México no existe información al respecto, tampoco se cuenta con una explicación sobre el mecanismo que hasta el momento ha permitido controlar la colonización por *E. coli* O157 en nuestra población. La respuesta inmune humoral desarrollada contra otros patógenos, podría participar en este proceso de control biológico por lo que, resulta importante evaluar si la reactividad antigénica cruzada contribuye en la producción de anticuerpos contra *E. coli* O157 que finalmente interfieren en el proceso de colonización de la bacteria.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si anticuerpos séricos (IgG), contra el LPS O157 de *E. coli* están implicados en la baja frecuencia de colonización y de aislamiento de *E. coli* O157: H7 observada en México. De ser probado lo anterior este microorganismo podría ser utilizado como modelo para el diseño de estrategias en el control contra infecciones bacterianas intestinales.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Conocer la frecuencia del serotipo O157 de *E. coli* analizando los cultivos de *E. coli* identificados en el cepario del Laboratorio del Departamento de Salud Pública.
2. Determinar por PCR la presencia de los genes de virulencia *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* en las cepas de *E. coli* O157 identificadas.
3. Determinar la homología antigénica entre el LPS O157 con otros LPS de *E. coli* mediante el ensayo de aglutinación en microplaca.
4. Conocer por inmunoelectrotransferencia la homología entre el LPS O157 y los LPS de *E. coli* en los que se determinó identidad.
5. Evaluar la respuesta inmune humoral contra el LPS de *E. coli* O157 en individuos asintomáticos.
6. Determinar la actividad bactericida de sueros hiperinmunes homólogos y heterólogos de conejo contra cepas de *E. coli* O7, O116 y O157.
7. Determinar si anticuerpos obtenidos en conejo contra otros géneros de enterobacterias reaccionan con el LPS de *E. coli* O157.
8. Determinar si el suero de pacientes con antecedente de fiebre tifoidea, presentan anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157.
9. Evaluar la actividad bactericida del suero de conejo anti *S. typhi* y el de pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea contra cepas de *E. coli* O157.

HIPOTESIS

La baja frecuencia del aislamiento de *E. coli* O157: H7 en población mexicana esta relacionada con la respuesta inmune humoral inducida por la exposición a bacterias que comparten epitopos con *E. coli* O157.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si anticuerpos séricos (IgG), contra el LPS O157 de *E. coli* están implicados en la baja frecuencia de colonización y de aislamiento de *E. coli* O157: H7 observada en México. De ser probado lo anterior este microorganismo podría ser utilizado como modelo para el diseño de estrategias en el control contra infecciones bacterianas intestinales.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Conocer la frecuencia del serotipo O157 de *E. coli* analizando los cultivos de *E. coli* identificados en el cepario del Laboratorio del Departamento de Salud Pública.
2. Determinar por PCR la presencia de los genes de virulencia *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* en las cepas de *E. coli* O157 identificadas.
3. Determinar la homología antigénica entre el LPS O157 con otros LPS de *E. coli* mediante el ensayo de aglutinación en microplaca.
4. Conocer por inmunoelectrotransferencia la homología entre el LPS O157 y los LPS de *E. coli* en los que se determinó identidad.
5. Evaluar la respuesta inmune humoral contra el LPS de *E. coli* O157 en individuos asintomáticos.
6. Determinar la actividad bactericida de sueros hiperinmunes homólogos y heterólogos de conejo contra cepas de *E. coli* O7, O116 y O157.
7. Determinar si anticuerpos obtenidos en conejo contra otros géneros de enterobacterias reaccionan con el LPS de *E. coli* O157.
8. Determinar si el suero de pacientes con antecedente de fiebre tifoidea, presentan anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157.
9. Evaluar la actividad bactericida del suero de conejo anti *S. typhi* y el de pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea contra cepas de *E. coli* O157.

HIPOTESIS

La baja frecuencia del aislamiento de *E. coli* O157: H7 en población mexicana esta relacionada con la respuesta inmune humoral inducida por la exposición a bacterias que comparten epítomos con *E. coli* O157.

V. MATERIAL Y METODO

CEPAS BACTERIANAS.

Las características y origen de las 64 cepas de *E. coli* incluidas en el estudio se muestra en el Cuadro 1. De estas 28 se aislaron de niños con y sin diarrea (Cravioto, 1990)⁴⁰, 2 del ambiente (Rosas, 1997)⁴¹, 3 de animales y otras tres de casos de diarrea desconociéndose las características del cuadro clínico de los pacientes. Las 28 cepas restantes fueron recibidas en el Laboratorio de Salud Pública para su identificación, o correspondieron a colecciones diferentes, también se incluyó una cepa de referencia.

IDENTIFICACION Y TIPIFICACION SEROLOGICA.

Las cepas se conservaron hasta su uso en medio de Dorset a temperatura ambiente, la identificación de las mismas se realizó de acuerdo a los métodos estandarizados propuestos por Ewing (1986)²⁶. Se analizó la capacidad de las cepas para utilizar sorbitol empleando medio de MacConkey con sorbitol (Difco) y medio líquido con sorbitol con el reactivo de Andrade. La tipificación serológica se realizó utilizando los métodos propuestos por Orskov F y Orskov I (1984)⁴², empleando sueros de conejo específicos (SERUNAM) preparados contra cada uno de los 175 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H). Para la caracterización del antígeno O la bacteria se sembró en agar de soya tripticaseina (Difco) y se incubó a 37 °C durante 18h, el cultivo bacteriano se cosechó resuspendiendo en solución salina 0.15M misma que se calentó a 100 °C con vapor fluente durante una hora, para finalmente ajustar la suspensión al tubo tres del Nefelómetro de McFarland. Empleando microplacas para titulación de 96 pozos (Dynatech

Instrument, California, USA), se distribuyeron en los pozos 50 µl de una dilución 1:100 de los 175 sueros de conejo SERUNAM posteriormente a cada pozo con la dilución del suero se le agregaron 50 µl del antígeno O en estudio. Las microplacas se incubaron a 50 °C durante 18h y al finalizar este período se realizó la lectura correspondiente. Con cada suero que reaccionó con el antígeno en estudio se realizó una titulación haciendo diluciones seriadas al doble y así poder comparar con el título del antígeno homólogo. Utilizando sueros anti O específicos se procedió a establecer con exactitud el serogrupo O del cultivo. La tipificación del antígeno H se realizó a partir de cultivos en medio semisólido en tubos de Cragie. El crecimiento bacteriano obtenido se inoculó en caldo nutritivo (Difco) y se inactivo con formalina (solución salina 0.15M con 0.6% de formaldehído al 37%). Al igual que en la tipificación del antígeno O, se utilizaron microplacas para titulación de 96 pozos en los que se distribuyeron 50 µl de las diluciones 1:100 de los sueros H SERUNAM de conejo y 50 µl del antígeno H. Las microplacas se incubaron a 50 °C durante 2 h, los sueros que presentaron reacción con el antígeno H fueron titulados haciendo diluciones seriadas al doble para comparar el título obtenido con el título homólogo del suero H, también se utilizaron sueros H específicos para determinar con exactitud el antígeno flagelar del cultivo. El conjunto de la fórmula antigénica obtenida (O-H) permitió establecer el serotipo del cultivo bacteriano.

DETECCION DE LOS GENES *eaeA*, *stx1-2* Y *ehxA*.

Para conocer la presencia de los genes involucrados en la virulencia del grupo EHEC se utilizó el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple descrito por Fratamico (1995)⁴³. Los genes *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* (presente en el plásmido de 60-Mda), fueron buscados en todas

las cepas de *E. coli* estudiadas. El Cuadro 2 muestra los iniciadores utilizados en el ensayo de la PCR. Para la extracción de DNA se tomaron tres colonias aisladas en medio de gelosa sangre de cada una de las cepas de *E. coli* incluidas en el estudio. Estas se colocaron en tubos Eppendorf (libres de DNA-RNA) que contenían 200 μ l de una solución de lisis (Triton X 100 al 0.5% en solución Tris 20 mM, pH 8.0 y 2 mM de EDTA) se mezclaron por agitación en vortex y se calentaron a 100 °C por 20 minutos. En un tubo Eppendorf libre de DNA-RNA se colocaron 49 μ l de la solución de lisis con 1 μ l de muestra, se agregó 1 gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Para evaluar los productos de amplificación se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución TBE 1X con 1.0 μ l de bromuro de etidium (10 mg/ml) por cada 40 ml de agarosa. Se utilizó voltaje de 110 volts-250 miliamperes durante 20-30 minutos. Finalmente el gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta (Photodyne) y se tomaron las fotos correspondientes utilizando una cámara polaroid con película 667.

REACTIVIDAD ANTIGENICA INESPECIFICA EN SUEROS DE CONEJO.

La reactividad inmune cruzada se determinó utilizando los LPS crudos de *E. coli* O7, O116 y O157 que fueron obtenidos calentando los cultivos a 100 °C a vapor fluente durante una hora. Los cultivos se lavaron tres veces con solución salina 0.15M recuperando el paquete bacteriano por centrifugación a 5000 g/10 minutos, cada cepa se puso a reaccionar contra los 175 sueros del esquema antigénico completo de *E. coli* en microplacas de 96 pozos como ya fue referido previamente, se registraron las reacciones positivas y se realizó la titulación correspondiente.

OBTENCION Y PURIFICACION DEL LPS.

Los LPS de *E. coli* O7, O116 y O157 (cepas de referencia DEP Sc O7, DEP Sc 377 O116, DEP Sc 644 O157: H19 y O157: H7, 993) utilizados en los ensayos de ELISA, en las inmunoelectrotransferencias y en los análisis electroforéticos se extrajeron por el método fenol-agua de Westphal (1965)⁴⁴. Dos cajas Petri (15cm) con agar de soya (Difco) se inocularon con cada uno de los cultivos bacteriano y se incubaron a 37 °C durante 18h. El crecimiento bacteriano obtenido se suspendió en 10 ml de agua desionizada calentada entre 72 y 75 °C, a esta suspensión se le adicionaron 10 ml de fenol saturado calentado (72-75 °C) manteniendo la temperatura en baño de María durante 15min con agitación constante. Las fases acuosa y fenólicas se separaron por centrifugación a 5000 g/10 minutos, este procedimiento se repitió adicionando 10 ml de agua destilada a 70 °C. Las fases acuosas y fenólicas obtenidas se dializaron contra agua desionizada durante 48 h empleando una membrana de diálisis (Spectrum Laboratories, Inc.) con punto de corte 6000 a 8000 Da de peso molecular. El producto obtenido después de la diálisis se liofilizó y se trató con DNAasa y RNAasa. El LPS se resuspendió en 5ml de buffer Tris-HCl pH 7.4 y se le agregó DNAasa y RNAasa a una concentración de 20 µg/ml, se incubaron 37 °C durante tres horas, después de este tratamiento se adicionó proteinasa K a una concentración de 200 µg /ml y se incubó nuevamente a 65 °C durante tres horas más (Siddons, 1993)⁴⁵. El LPS se separó de las proteasas por centrifugación (Sorvall RCM120X) a 35 000 g/120min para posteriormente liofilizarlos (Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA). El producto liofilizado obtenido se conservó a temperatura ambiente hasta su uso o se ajustó a una concentración de 1 mg/ml de agua destilada los cuales fueron conservados a -20 °C. Para evaluar la efectividad del

tratamiento con proteasas se midió la concentración de proteínas antes y después del tratamiento empleando el método de Lowry (Lowry 1951 y Ausubel, 1987)⁴⁶⁻⁴⁷.

SUEROS HUMANOS CONTRA *E. coli* O157, O116 Y O7.

Se evaluó la respuesta humoral contra los LPS O7, O116 y O157 en 562 sueros de individuos adultos de edades entre los 16 a 40 años y de 43 niños menores de un año utilizando el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de acuerdo al método descrito por Chart (1989 y 1991)¹⁷⁻¹⁸. Placas de 96 pozos (fondo plano para ELISA Maxi Sorb, Nunc) se recubrieron con 100 µl del LPS de *E. coli* O7, O116 y O157 de referencia a una concentración de 1.0 mg/1.0ml de buffer de carbonatos (1.59g de NaCO₃ y 2.93g de NaHCO₃/1l) pH 9.6. Las placas con el LPS se incubaron a 37 °C 2h y se dejaron en refrigeración por 18h. Pasado este tiempo las placas se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4/ Tween 20 al 0.05% y para evitar reacciones inespecíficas los pozos se bloquearon con 200 µl de PBS/albúmina bovina al 5.0% durante 30 min. Se utilizaron 100 µl del suero a una dilución 1:1000 en PBS pH 7.4, la prueba se realizó por duplicado empleando como controles positivos y negativos sueros de conejo anti O7, O116 y O157, las placas se incubaron a 37 °C durante 2h para posteriormente lavarlas tres veces en PBS/Tween. Para evaluar la reacción se agregó anti-IgG de humano obtenido en cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) a una dilución 1:1000 e incubando nuevamente a 37 °C durante 2h. Para hacer visible la reacción se adicionaron 200 µl del substrato p-nitrofenil-fosfato (Sigma) disuelto en buffer de dietanolamina pH 9.6, se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se paró adicionando 50 µl de NaOH 3M y se leyó en un lector de ELISA (Dynatech Instrument, California, USA) a 405 nm. Para determinar el punto de corte de los valores de ELISA,

se consideró la media aritmética de las densidades ópticas (D O) más dos veces la desviación estándar (Reymond, 1996)²⁰ a 405 nm y las 562 muestras de suero fueron diluidas 1:1000 para el ensayo.

PERFIL ELECTROFORETICO DE LPS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

El análisis electroforético de los LPS O7, O116 y O157 se realizó por el método descrito por Laemmli (1970)⁴⁸, utilizando urea 4M en el gel separador preparado al 15% de poliacrilamida. Los LPS en solución de formamida al 5.0% se mezclaron con un volumen igual de buffer de Laemmli 0.5 M de Tris-HCl, pH 6.8, 1.6 ml de 10% de SDS (w/v), 0.8 ml de glicerol, 0.2ml de 1% 2-mercaptoetanol(v/v) y 0.2ml de 0.1% de azul de bromofenol. La mezcla se calentó a 100 °C en baño de agua durante 5 min, y se aplicaron 60 µl de cada muestra en los pozos del gel, la electrofóresis se corrió con amperaje constante (25 mA por gel) hasta que el frente llegó al extremo opuesto.

La separación del LPS O157 en el gel fue visualizada realizando tinción con plata por el método descrito por Tsai (1982)⁴⁹ y Hitchcock (1983)⁵⁰. Para tal propósito el gel de poliacrilamida se fijó durante 18 horas con una solución de etanol al 40% y ácido acético al 5%. Para oxidar el LPS se reemplazó la solución fijadora por una solución de ácido per-iódico al 0.7% en etanol-ácido acético (40% -5%) durante 5 min. Después de la oxidación del LPS se realizaron tres lavados de diez min cada uno con 500 ml de agua desionizada. A la solución para teñir recientemente preparada compuesta por 28 ml de una solución 0.1 N de NaOH y 2 ml de hidróxido de amonio concentrado se le adicionaron 5 ml de una solución de nitrato de plata al 20% w/v agitando

continuamente. El gel se mantuvo en agitación constante (70 rpm) durante 10 min, concluida esta fase se realizaron tres lavados de 10 min con agua desionizada para finalmente reemplazar el agua por 200 ml de solución reveladora (50 mg de ácido cítrico y 0.5 ml de formaldehído al 37%/1000ml). El revelado se terminó cuando el teñido alcanzó la intensidad deseada, finalmente el gel se colocó en 1000ml de agua destilada para conservarlo hasta tomar la fotografía.

INUMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).

Se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Towbin (1979)⁵¹ y Chart (1994)⁵². Los geles de poliacrilamida se colocaron sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore, Immobilon-NC Transfer Membranes) y en una cámara de transferencia se sometieron a amperaje constante de 100 mA durante 13 horas. Al finalizar la transferencia las membranas fueron bloqueadas con TBS-leche descremada (Sveltex) al 5% durante una hora y lavadas tres veces con PBS-Tween 20 durante 30 min. Después de lavar, las membranas se incubaron con los sueros humanos diluidos 1:50 en TBS-leche descremada al 5% durante una hora con agitación constante y a temperatura ambiente. Las membranas nuevamente se lavaron tres veces como ya se describió anteriormente. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anti IgG humana obtenida en cabra marcada con fosfatasa alcalina (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) durante una hora a temperatura ambiente; en el caso de sueros de conejo se incubó con anti-IgG de conejo obtenida en cabra ((Zymed Laboratories, San Francisco, USA). Las membranas se lavaron dos veces con TBS-Tween 20 y una vez con TB pH 6.8. Las membranas de nitrocelulosa se sensibilizaron con una solución amortiguadora para fosfatasa alcalina pH 9.8 (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM, Trizma-Base 100mM). La reacción se reveló durante un minuto con solución comercial del substrato para

fosfatasa (Kirkegaard Perry Laboratories, Maryland, USA) 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/sales de tetrazolium nitroblue (BCIP/ NBT). Para su conservación y fotografía las membranas se lavaron y secaron a temperatura ambiente.

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO DE CONEJO.

La actividad bactericida de suero de conejo contra *E. coli* O7, O116 y O157 fue determinada de acuerdo a lo descrito por Losonsky (1997)⁵³ y Qadri (1995)⁵⁴ utilizando microplacas estériles de 96 pozos (Nunclon) para titulación. Para la realización del ensayo, los cultivos de *E. coli* O7, O116 y O157 se inocularon en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA, Difco) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. De estos cultivos se realizó una resiembra en placas de agar BHIA y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Del crecimiento obtenido se prepararon las suspensiones bacterianas que se ajustaron al tubo 0.5 (1.5×10^8 bacterias/ml) del Nefelómetro de McFarland. Un ml de la suspensión bacteriana se mezcló con 2 ml de complemento de cobayo (Sigma) y 17 ml de solución salina fría. En las microplacas (Nunclon) de titulación estériles se prepararon diluciones seriadas al doble de los sueros de conejo contra O7, O116, O157 así como de suero preinmune (control negativo de la actividad bactericida). A cada pozo con 25 µl de cada dilución del suero se le adicionaron 25 µl de la suspensión bacterias/complemento/salina y se incubaron a 37 °C durante una hora. Como control de crecimiento se utilizó un pozo que contenía bacterias/complemento/salina/caldo de BHI sin dilución de suero. Después de la primera incubación a cada pozo se le agregaron 150 µl de caldo BHI y las placas fueron incubadas nuevamente a 37 °C durante 3 horas más. Al término de la segunda incubación se determinó la absorbancia del cultivo a 570nm y se analizaron visualmente las placas para evaluar la inhibición del crecimiento. Por último las placas se colocaron en refrigeración durante 18 horas para realizar

el registro final de los resultados del efecto bactericida. Para corroborar los resultados de muerte bacteriana se realizó la cuenta viable de cada uno de los pozos y se determinó nuevamente la absorbancia en un lector de ELISA (Dynatech Instrument, California, USA) a 570 nm. Los títulos de la actividad bactericida de los sueros de conejo contra cepas de *E. coli* O7, O116 y O157 fueron determinados por la comparación de la media aritmética de las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una de las diluciones de los sueros de tres ensayos diferentes y se realizó el análisis de las varianzas de un factor con los paquetes estadísticos Epi. Info 6.04 y análisis de varianzas en Excel 97 con niveles de significancia (α) de 0.01 y 0.05.

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE SUEROS OBTENIDOS DE PACIENTES CON ANTECEDENTE DE INFECCION POR *Salmonella*.

Existen reportes que refieren reactividad antigénica cruzada entre *Salmonella* del serogrupo O30 y *E. coli* O157: H7. México es un país con alta incidencia de infección por *Salmonella* por lo que se consideró importante evaluar la respuesta de sueros humanos con antecedentes de infección por *Salmonella* contra *E. coli* O157. Se utilizaron 7 muestras de suero de pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea. Dichos sueros se probaron por aglutinación en microplacas de 96 pozos contra los antígenos de *E. coli* O7, O116 y O157 así como contra antígenos de *S. typhi* hervidos a 100 °C, utilizando diluciones seriadas al doble para determinar el título de la aglutinación. En estos sueros por el método de ELISA (Chart, 1989 y 1991)¹⁷⁻¹⁸ también se determinó la presencia de anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157 y se evaluó la actividad bactericida contra cepas de *E. coli* O7, O116 y O157 como se describió anteriormente (Losonsky, 1997 y Qadri 1995)⁵³⁻⁵⁴.

VI. RESULTADOS

IDENTIFICACION Y TIPIFICACION SEROLOGICA.

De 7200 cepas de *E. coli* tipificadas en los últimos diez años se identificaron 36 pertenecientes al serogrupo O157. De éstas el serotipo O157 de cepas no móviles (NM) fue el más común (28/36) y aunque en menor frecuencia, también se identificaron otras cepas con antígenos flagelares diferentes a H7 (Cuadro 3). Como dato de interés por la trascendencia, se identificó una cepa con el serotipo O157: H7, sin embargo, al parecer se encontraba en tránsito por el tracto digestivo ya que los datos del paciente del cual fue aislada refieren un cuadro clínico de probable intoxicación alimentaria.

De las 28 cepas O157 recibidas en el laboratorio 15 fueron de la colección de cepas diarrogénicas de *E. coli* (DEC) pertenecientes a la colección del CVD, 12 de Tailandia y una cepa de referencia del Laboratorio de Salud Pública de Colindale en Londres. De este grupo de cepas, 14 (50%) fueron no móviles, 10 (35.7%) con el antígeno flagelar H7 y 4 (14.3%) presentaron los antígenos flagelares H43 y H19.

GENES *eaeA*, *stx 1-2* Y *ehxA*.

De las 36 cepas O157 aisladas en México, 2 (5.6%) amplificaron los genes *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* y una (2.8%) los genes *eaeA* y *ehxA* (Cuadro 3). La cepa que amplificó los tres fragmentos fue del serotipo O157: NM aislada de un bovino con diarrea, con respecto a la otra cepa que presentó los mismos 3 fragmentos era la cepa O157: H7 aislada del paciente con intoxicación alimentaria.

REACTIVIDAD ANTIGENICA CRUZADA.

Al realizar el análisis de los ensayos de tipificación serológica que se practicaron a las cepas de *E. coli* O157 se encontró que además de reaccionar con su suero homólogo también presentaron aglutinación con los sueros anti O7 y O116 (Cuadro 4). Este análisis se realizó con las 64 cepas de *E. coli* O157 que se tienen en el Laboratorio y que fueron incluidas en el estudio (Cuadro 1). El resultado mostró que 35 cepas (54.7%) aglutinaron con el suero O7, 40 (62.5%) con O116 y 25 (39.1%) con ambos sueros (Cuadro 5). Para evaluar si la fórmula antigénica O:H presentaba variación en la reactividad, se realizó el análisis por serotipo de O157. Los resultados mostraron que 9 (81.8%) de las 11 cepas O157: H7 presentaron aglutinación con el suero O7, 3 (27.3%) con el suero O116 y 7 con ambos sueros 3 cepas (27.3%). Con respecto a las cepas del serotipo O157: NM, 28 (66.7%) presentaron reactividad cruzada con el antisuero O116. Las cepas con antígeno flagelar diferente al H7 aglutinaron con ambos sueros (O7 y O116) en la misma frecuencia (81.8%). Las 14 (21.9%) cepas restantes, no presentaron reacción cruzada con ninguno de los dos sueros.

Para establecer si la reactividad antigénica cruzada observada estaba relacionada únicamente con los antígenos somáticos, los sueros O7, O116 y O157 se absorbieron contra los antígenos homólogos y heterólogos. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que existe por lo menos una región compartida entre los tres lipopolisacáridos (Cuadro 6). Lo anterior se puede observar al comparar los resultados presentados en los Cuadros 4 y 6, en donde se aprecia como disminuyen los títulos de la respuesta cuando la absorción se realizó con los LPS heterólogos y como se hizo negativa cuando la absorción se realizó con el LPS homólogo.

ANALISIS ELECTROFORETICO Y POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LOS LPS.

Todos los LPS analizados incluyendo el de una cepa K12 mostraron el perfil electroforético clásico en escalera determinado por las unidades repetidas de carbohidratos. Además de la cadena lateral del LPS se observó su región central y el lípido A (Fig. 1). En los LPS O7 y O157 se observaron un grupo de unidades repetidas con peso molecular aproximado de 66 kDa, mientras que en el LPS O116 las unidades repetidas fueron de menor peso. En los tres LPS se identificaron unidades repetidas comunes con peso molecular entre los 34 y 45 kDa. Lo anterior permite considerar que algunas de estas fracciones podrían ser las que se asocian con la respuesta inmune cruzada observada entre los tres LPS.

Para conocer la respuesta del suero de conejo contra los perfiles electroforéticos de los LPS O7, O116 y O157 se realizó el análisis de estos por inmunolectrotransferencia. Los resultados obtenidos mostraron que en todos los casos la reactividad contra el LPS homólogo fue mayor y aunque se observó respuesta contra los heterólogos esta fue de menor intensidad (Fig. 2). Es importante mencionar que la respuesta observada era específica contra componentes del LPS, ya que no se presentaron reacciones con los sueros de conejo preinmunes.

Con el propósito de establecer que la actividad de los sueros de conejo era una respuesta específica contra la fracción polisacárida del LPS y no contra algún componente proteico se realizó el tratamiento del LPS con proteasas. En el LPS K12 utilizado como control la concentración de proteínas antes de tratarlo con las enzimas fue de 30.4 y disminuyó a 5.0 $\mu\text{g/ml}$ después del tratamiento; en el LPS O7 fue de 6.5 a 0.0 $\mu\text{g/ml}$; en O116 disminuyó de 27.97 a 3.3

$\mu\text{g/ml}$; en el LPS O157:H19 fue de 6.76 a 0.0 $\mu\text{g/ml}$; mientras que con el LPS O157:H7 no se detectó proteína.

Los resultados obtenidos mostraron que dicho tratamiento disminuyó e incluso eliminó la concentración de proteína por lo que se puede considerar que la respuesta tanto en la inmunoelectrotransferencia como en los otros ensayos era dirigida contra el LPS.

El análisis electroforético que se hizo de los LPS O157 de cepas con antígeno flagelar diferente al H7 y no móviles mostró que no obstante tratarse de LPS del mismo serogrupo, existen variedades fenotípicas probablemente relacionadas con cambios evolutivos en donde pudiera participar además el tipo de antígeno flagelar (Fig. 3).

RESPUESTA DE SUEROS HUMANOS CONTRA EL LPS DE *E. coli*.

La presencia de anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157 se analizó por el método de ELISA utilizando como puntos de corte lecturas de 0.580 y 0.7 de D O a una longitud de onda de 405 nm. Uno de los lotes de suero se obtuvo de niños de la Cd. de México de la Delegación de Cuajimalpa. El otro lote de sueros era de adolescentes y adultos (15-40 años) y fueron proporcionados por el Laboratorio Regional de Salud Pública en Hermosillo, Sonora. Estos individuos eran de población abierta y seleccionados al no cursar con diarrea por lo menos una semana antes de la toma del suero.

El punto de corte de los valores de ELISA, se determinó como la media aritmética más dos veces la desviación estándar de las densidades ópticas a 405 nm de las 562 muestras de suero diluidas 1:1000. La media aritmética obtenida fue 0.350 y la desviación estándar fue 0.175, por lo que el punto de corte determinado para los valores positivas de ELISA fue de 0.7 de D O.

La respuesta de los sueros de los niños contra los LPS O7, O116 y O157 utilizando como punto de corte lecturas de 0.58 de D O mostró que 17/43 (40%) reaccionaron con el LPS O116 y 2/43 (4.6%) con O157. Cuando el punto de corte se incrementó a 0.7 de D O la frecuencia de positivos contra el LPS O116 disminuyó al 12% pero manteniendo respuesta similar (4.6%) contra el LPS O157 (Fig. 4).

Los resultados observados en la muestra de 562 sueros de población abierta con los puntos de corte referidos (0.58 y 0.7 de D O) se presenta en la Figura 5. La frecuencia con el punto de corte 0.7 de D O fue de 27 (4.8%) y 28 (5.0%) contra los LPS O116 y O157 respectivamente y 7 (1.2%) contra el LPS O7.

Al analizar por inmunoelectrotransferencia la respuesta de las muestras de suero que dieron respuesta por ELISA, se observó que 12 (85.7%) de 14 muestras con valores < 0.7 y 61/ 88 (70%) con valores de 0.4 a 0.699 de D O reaccionaron con el LPS O157 (Fig. 6). Al sumar los resultados obtenidos en la prueba de ELISA con valores mayores a 0.7 (5.0%) con los obtenidos por inmunoelectrotrasferencia (10.9%) se pudo establecer que 89/562 (16%) de los sueros reaccionaban con el LPS O157 (Cuadro 7).

Sin embargo, el mismo ensayo con los sueros de niños menores de un año, fue negativo en todas las muestras. Lo anterior sugiere que los títulos de anticuerpos en estos niños eran inferiores a los que presentan los adultos, probablemente porque estos últimos han tenido un mayor número de estímulos antigénicos. Al probar por inmunoelectrotransferencia algunos de los sueros contra los LPS O7 y O116, se observó que la reacción contra O157 era más intensa que contra O7 y bastante menor contra el LPS O116 (Fig.7).

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO DE CONEJO.

Para evaluar si los anticuerpos que presentan reacciones antigénicas cruzadas participan en protección se realizó una prueba de actividad bactericida empleando sueros contra el LPS, homólogo y heterólogo. Los resultados obtenidos con los sueros de conejo mostraron que los anticuerpos tuvieron actividad bactericida inespecífica. Se realizó la cuantificación de las UFC después del ensayo y se observó que estas disminuían en por lo menos un \log_{10} con los sueros hiperinmunes, comparado las cuentas de UFC obtenidas con el suero preinmune. Al analizar de manera independiente la respuesta de cada suero se encontró que el suero O7 con un título $1.8 \log_{10}$ probado contra la cepa O116 disminuyó $1.1 \log_{10}$ las UFC. El mismo suero pero con un título de $2.1 \log_{10}$ probado contra *E. coli* O157: H7 disminuyó $0.6 \log_{10}$ las UFC (Cuadro 8). Cuando se probó el suero O116 se observó actividad bactericida con títulos del suero $1.8 \log_{10}$ contra las cepas O7, O116 y O157: H19 y con títulos de $1.5 \log_{10}$ y $2.1 \log_{10}$ contra la cepa O157: H7 (Cuadro 9). Con el suero contra O157 la respuesta se presentó a títulos de $1.8 \log_{10}$ contra O7 y O157: H19, mientras que con las cepas O116 y O157: H7 se observó a títulos de $2.1 \log_{10}$ y $1.5 \log_{10}$ respectivamente (Cuadro 10).

REACTIVIDAD DEL SUERO DE CONEJO ANTI *S. typhi* Y EL DE PACIENTES CON ANTECEDENTE DE INFECCION POR *Salmonella* CONTRA *E. coli* O157.

Un suero de conejo hiperinmune contra *S. typhi* y seis muestras de suero de personas con diagnóstico clínico y en algunos casos con aislamiento de *S. typhi* se probaron en microplaca de 96 pozos contra antígenos de *S. typhi* y *E. coli* O157. El suero de conejo dio reacción de

aglutinación contra *S. typhi* y contra *E. coli* O157 a títulos de 1.3 y 2.1 \log_{10} respectivamente. De los seis sueros de pacientes dos (MS y MEA) tuvieron un título de 2.8 \log_{10} contra el LPS O157, uno de estos sueros (MS) también reaccionó contra *S. typhi* a un título de aglutinación de 1.9 \log_{10} . Otro suero (RRE) que fue un caso de infección confirmado por aislamiento en heces de *S. typhi* aglutinó contra las cepas de *S. typhi* y *E. coli* O157 a títulos de 1.0 \log_{10} y 2.2 \log_{10} respectivamente. Los tres sueros restantes (AM, SG y ND) aunque refirieron antecedente de infección por *Salmonella*, solo presentaron aglutinación contra *E. coli* O157 (Cuadro 11). Los sueros de pacientes se analizaron contra el LPS de *E. coli* O157 por el método de ELISA, utilizando punto de corte 0.7 de D O. Tres de los sueros dieron positiva la prueba y los otros 3 presentaron respuesta intermedia con valores entre 0.4 a 0.699 de D O (Cuadro 11).

El ensayo de actividad bactericida de los sueros de pacientes contra *E. coli* O157: H7 mostró que tres de ellos disminuían significativamente las UFC con títulos de dilución de los sueros desde 1.2 \log_{10} hasta 1.8 \log_{10} (Cuadro 12). Uno de los seis sueros (MS) se probó por inmunoelectrtransferencia contra los LPS O7, O116 y o157 obteniendo una reacción intensa contra estos (Fig. 8).

VII. DISCUSION

Escherichia coli enterohemorrágica tiene gran importancia clínica y epidemiológica y es el serotipo O157: H7 el principal responsable de cuadros clínicos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Esta bacteria se considera un patógeno importante en países industrializados y es causa de brotes relacionados con el consumo de alimentos contaminados. En México así como en otros países con características semejantes, las diarreas son un problema importante de salud que afecta a individuos en los extremos de la vida. *E. coli* es uno de los principales agentes bacterianos implicados en la patogénesis del padecimiento. Sin embargo, la frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157 es muy baja, por lo que es considerado como un serogrupo raro.

La explicación de su ausencia se desconoce hasta el momento, ya que este serotipo no se aísla incluso de bovinos considerados reservorio natural la bacteria (Borezky 1987 y Orskov 1989)⁵⁵⁻⁵⁶.

Un aspecto quizás relacionado con la baja incidencia del aislamiento de *E. coli* O157 en países no industrializados, es la exposición a edades temprana ante diferentes antígenos bacterianos que inducen respuesta inmune que pudiera ser protectora y así controlar la colonización del hospedero. Existen antecedentes de reactividad cruzada (heteróloga) entre *E. coli* O157 y otros serogrupos de la bacteria, así como con otros géneros y especies de bacterias (Ewing 1986, Rice 1992, Perry 1990, Chart 1993)^{26,29,30,37}.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo relacionados con la incidencia de *E. coli* mostraron que de 7200 cultivos tipificados serológicamente durante los últimos 10 años, la frecuencia en la que se identificó *E. coli* O157 fue de 0.50% (36 cepas), de estas solo una cepa presentó la fórmula antigénica O157: H7. Es importante señalar que dentro de las cepas O157 el

mayor número (28) fueron del serotipo O157: NM, que de acuerdo a lo descrito por Feng (1998)¹⁴ son clones que derivaron de O157: H7 que perdieron la capacidad de movilización. Por otro lado en estos 10 años la frecuencia de aislamiento del serogrupo O7 fue de 0.85% (61 cepas), que pertenecen a los serotipos: O7: NM (21), O7: H4 (17), O7: H6 (10), O7: H18 (6) y 6 cepas que presentaron antígenos flagelares diferentes. El origen fue de niños menores de dos años (43), de animales (12) y ambientales (6). En lo que se refiere al aislamiento de cepas del serogrupo O116 fue negativo en este estudio. Esta última observación muestra una frecuencia de aislamiento de O7 y O157 similar, por lo que si no se cuenta con un sistema completo de tipificación para *E. coli* pueden tenerse resultados falsos positivos.

Estudios en Alemania han reportado casos de SUH asociadas con el aislamiento de cepas de *E. coli* O157: NM que fermentaron el sorbitol y presentaron los genes *stx2*, *eae* y *ehxA* (Gunzer, 1992 y Ammon, 1999)^{57 y 58}. Este análisis en el trabajo mostró que únicamente una cepa O157: NM aislada de un bovino presentó los genes *eaeA*, *stx1-2* y *ehxA* y otra dos de los genes referidos. Lo anterior aunque no explica la baja frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157 puede aclarar porque en México no se han presentado cuadros de CH y SUH relacionados con la infección por cepas EHEC.

Existen muy pocos estudios en animales en México para conocer la importancia epidemiológica de *E. coli* O157. En algunos países los bovinos constituyen la principal fuente de transmisión de la bacteria (Borezky 1987 y Orskov 1989)⁵⁵⁻⁵⁶, recientemente en Japón se observó que también los cerdos son un reservorio natural importante de *E. coli* productora de Stx (Nakazawa, 1999)⁵⁹. Entre las cepas estudiadas por nosotros una cepa con el serotipo O157: NM se aisló de un cerdo con diarrea. No obstante que los resultados de este estudio mostraron una baja frecuencia de

aislamiento de *E. coli* O157 y un número limitado de cepas portaban los genes relacionados con la virulencia. el hecho de que algunas de estas se aislaron de bovinos y cerdos fuente de transmisión de la bacteria, plantea la necesidad de realizar vigilancia epidemiológica ya que podríamos estar ante una posible emergencia del patógeno en nuestro país.

Edwards-Ewing (1986)²⁶ y Perry (1988)²⁷ reportaron la existencia de reacciones cruzadas entre cepas de *E. coli* O7, O116 y O157 cuando se utilizaron sueros policlonales de conejo. El análisis de los ensayos de aglutinación de 64 cepas de *E. coli* O157 mostró que este serogrupo reaccionaba con su suero homólogo y con sueros obtenidos contra otros los antígenos O7 y O116 de *E. coli* (Cuadro 3). La respuesta obtenida probablemente esté relacionada con la estructura química de los LPS. Al respecto sabemos que la cadena lateral del LPS de *E. coli* O7 es galactosa, manosa, rhamnosa, 4-acetamido-2,6-didesoxiglucosa (Marolda, 1993)⁶⁰, mientras que la estructura química del LPS de *E. coli* O157 es D-glucosa, L-fucosa, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactosa, y 4-acetamido-4,6-didesoxi-D-manosa (Perry, 1986)²⁵. La presencia de carbohidratos como glucosa, manosa y galactosa y su conformación en las unidades repetidas de las cadenas laterales del LPS, sugiere que éstos podrían ser los compuestos asociados con las reacciones observadas entre los serogrupos O157 y O7, aunque es necesario realizar más estudios sobre la presencia de regiones compartidas en las unidades repetidas de los LPS. Al realizar la absorción de un suero policlonal se logra mayor especificidad, para determinar el número posible de regiones compartidas. Después de realizar la absorción de los sueros contra el antígeno homólogo como los heterólogos se confirmó la existencia de regiones similares entre los tres grupos antigénicos analizados (Cuadros 4 y 6). Lo anterior se establece al observar que la respuesta obtenida inicialmente con el suero no absorbido disminuyó o incluso desapareció cuando se

utilizaron los sueros absorbidos. De este ensayo también se determinó que además de existir regiones similares entre los 3 LPS se encuentran otros que solo son compartidos entre dos de los LPS (Cuadro 6).

La respuesta humoral medida por ELISA e inmunolectrotransferencia de individuos asintomáticos, contra *E. coli* O157 mostró una frecuencia de 16% que fue ligeramente superior a la descrita para áreas endémicas (Reymond, 1996 y Wilson 1996)²⁰⁻²¹. En México el aislamiento de *E. coli* O157 que se encontró es muy baja (0.5%) por lo que surge la pregunta con respecto a cual podría ser el inmunógeno inductor de la respuesta inmune contra *E. coli* O157. Aunque la respuesta de los sueros incluidos en el estudio muestra reactividad contra los LPS O7, O116 y O157 por ELISA e inmunolectrotransferencia, la frecuencia en la que se identificaron estos serogrupos fue baja, 0.5% para O157, 0.8% para O7 y nula para O116. Este resultado sugiere que la respuesta inmune que se observó contra *E. coli* O157, podría relacionarse con infecciones subclínicas causadas por la bacteria, o por procesos infecciosos asociados con otras bacterias.

La posibilidad de una reacción cruzada que se desarrolla por la exposición a microorganismos que comparten epítomos con la bacteria es una posibilidad que cuenta con gran apoyo experimental (Conlan, 1999 y Konadu 1998)⁶¹⁻⁶². Uno de los posibles epítomos podría ser el polisacárido 4-acetamido-4,6-dideoxi-D-manosa (Perry, 1986)²⁵ presente en las unidades repetidas de la cadena lateral del LPS. Este componente del LPS se ha identificado en diversos grupos bacterianos incluidos los serogrupos de *E. coli* O7, O116 y en algunos serotipos de *Salmonella*.

Ensayos realizados con suero de conejo preparado contra *Salmonella* del serogrupo O30 mostraron reacción con el LPS de *E. coli* O157 y recíprocamente el suero de conejo contra esta bacteria reaccionó con la *Salmonella* O30 (Chart, 1993)³⁷.

Se ha reportado que pacientes con infección por *S. typhi* presentaron anticuerpos contra el LPS O9 y algunos contra el antígeno d (flagelar) de *S. typhi* (Chart, 1997)⁶³. En este estudio al realizar el mismo análisis se encontró que pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea además de presentar anticuerpos contra el antígeno O9 reaccionaron incluso a diluciones mayores contra *E. coli* O157. Esta observación permitió considerar que *S. typhi* al igual que *Salmonella* O30 comparten epítomos con *E. coli* O157.

El hecho de que existan anticuerpos que reaccionan contra antígenos heterólogos tiene importancia por la posibilidad de diagnóstico de falsos positivos. Sin embargo, la respuesta policlonal pudiera ser de utilidad para el hospedero, por el hecho de contar con anticuerpos que le protegen contra un patógeno causante de enfermedad. Al respecto la escasa incidencia de *E. coli* O157 en países como el nuestro, podría explicarse por la existencia de protección inespecífica que probablemente interfiere con la colonización por *E. coli* O157. Los anticuerpos producidos por el hospedero ante un estímulo antigénico son de clases diferentes y con actividades diversas. Una de estas actividades es la responsable de reconocer y eliminar el agente infeccioso. Los anticuerpos bactericidas cumplen con esta función en individuos previamente sensibilizados, evitando la colonización del órgano blanco por el microorganismo. En ninguno de los estudios previos se ha determinado la capacidad bactericida de los sueros que reaccionaban contra *E. coli* O157. En este trabajo se observó como los sueros de conejo mostraron actividad bactericida homóloga y heteróloga, confirmando su posible participación en la protección contra la infección. En un modelo animal con ratones inmunizados por vía oral con una cepa de *Salmonella landau* que posee antígenos compartidos con *E. coli* O157, Conlan (1999)⁶¹ observó que estos presentaron títulos de anticuerpos elevados contra el LPS de O157. Estos ratones al ser retados

con un inóculo oral de *E. coli* O157: H7 presentaron resistencia a la colonización en mayor proporción que los ratones testigo. El modelo antes referido apoya en cierta medida porque probablemente no exista colonización por O157 cuando la población tiene una respuesta inmune contra el LPS O157. Durante este estudio se analizó la reactividad de 7 muestras de leche materna (datos no referidos) por inmunoelectrotransferencia. Cinco de estas reaccionaron contra el LPS de *E. coli* O157 lo que sugiere que probablemente la exposición a antígenos inespecíficos indujo protección intestinal contra la bacteria. Con respecto a la respuesta observada en los niños menores de 6 meses, se puede considerar que el paso de anticuerpos por la vía entero-mamaria dio lugar a la presencia de anticuerpos en suero, y son éstos los que dan protección al niño, contra la colonización por el patógeno (Figura 9).

Chart (1993)⁶⁶ señaló la existencia de perfiles electroforéticos a los que denominó A, B y C que se observan con cepas de *E. coli* O157 con diferentes antígenos flagelares. En el perfil A se incluyen los antígenos H6 y H19, en el B los antígenos H2, H16, H20, H39, H42 y H45; en el perfil C los flagelares H7 y H8. En este estudio observamos el perfil C tanto con los anticuerpos de conejo como los de origen humano. Resulta interesante que la respuesta de individuos sin cuadro clínico sea similar a la mostrada por pacientes que presentaron CH y SUH. Este hallazgo sugiere que no obstante la baja frecuencia del aislamiento de *E. coli* O157 pudieran presentarse infecciones subclínicas por el microorganismo.

Los resultados obtenidos permiten postular que infecciones con bacterias de la misma especie o de especie diferente inducen una respuesta inmune del tipo humoral protectora, que participa en la baja frecuencia de colonización y una baja frecuencia del aislamiento de *E. coli* O157. Esta protección inespecífica a su vez contribuye a la ausencia de cuadros de CH y SUH asociados con

la infección por *E. coli* O157. Los resultados también sugieren la posibilidad del uso de inmunógenos heterólogos para la protección contra *E. coli* O157 en caso de la emergencia del patógeno. Falta por estudiar si esta respuesta inmune se presenta en bovinos, lo que explicaría la ausencia del reservorio que complementa el ciclo de vida de EHEC.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que esta bacteria presente una fase de latencia como el estado viable no cultivable descrito en diferentes bacterias (Colwell, 1985)⁶⁷ y que esta sea una posible explicación de su aislamiento ocasional.

VIII. CONCLUSIONES

1. Hasta el momento no se tiene información en México, que relacione cuadros de colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico con infección por *E. coli* O157. Sin embargo, en nuestro país se han aislado cepas de *E. coli* O157 de fuentes diferentes.
2. La respuesta inmune heteróloga podría ser un factor que este contribuyendo a la baja colonización que se ha observado en humanos y animales por *E. coli* O157.
3. La presencia de respuesta inmune contra los diferentes serotipos de *E. coli* O157, podría estar asociada con infecciones subclínicas ocasionadas por la bacteria.
4. La existencia de reactividad antigénica cruzada entre *E. coli* O157 y los serogrupos O7 y O116, así como bacterias de otros géneros bacterianos como *Salmonella*, probablemente inducen una respuesta inmune humoral protectora contra la bacteria.
5. La posibilidad de la emergencia de *E. coli* O157 lo convierte en un patógeno importante en países como el nuestro, en donde su incidencia se ha mantenido a tasas muy bajas.
6. Realizar vigilancia epidemiológica para evitar la emergencia de *E. coli* O157 es de la mayor importancia.

IX. REFERENCIAS

1. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML. 1982. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N England Med. **308**:681-5.
2. Karmali M A, Steele, Petric M, Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet **1**: 619-20.
3. Takeda Y. 1997. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. World Health Stat. Q. **50**: 74-80.
4. Konowalchuk J, Spiers JI, Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **18**: 775-779.
5. Levine M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, entero invasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**: 377-389.
6. Pierard D, Huyghens L, Lauwers S and Lior H. 1991. Diarrhoeae associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. Lancet **338**: 762.
7. Scotland S, Smith H, Willshaw G and Rowe B. 1983. Verocytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. Lancet **ii**: 216.
8. O'Brien A, Newland J, Miller S, Holmes R, Smith H and Formal S. 1984. Shiga toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science **226**: 694-696.
9. Stein P, Boodhoo A, Tyrrell G, Brunton J and Read R. 1992. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *Escherichia coli*. Nature **355**: 748-750.
10. Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. 1989. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidase of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. **264**:596-601.
11. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid D, Frey E and Finlay B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell **91**: 511-520.
12. Brunder W, Schmidt H, and Karch H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V. Mol. Microbiol. **24**: 767-778.
13. Whittam T, Wolfe M, Wachsmuth K, Orskov F, Orkov Y, and Wilson R. 1993. Clonal relationship among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect. Immun. **61**:1619-1629.
14. Feng P, Lampel K, Karch H and Whittam T.1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* 157:H7. J. Infect. Dis. **177**: 1750-3.
15. Chart H and Jenkins C. 1999. The serodiagnosis of infections caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. **85**: 731-740.
16. Jenkins C and Chart H. 1999. Serodiagnosis of infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157. J. Appl. Microbiol. **86**: 569-575.
17. Chart H, Scotland S and B. Rowe 1989. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157: H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. **27**: 285-290.

18. Chart H, Smith H, Scotland S, Rowe B, Milford D and Taylor C. 1991. Serological identification of *Escherichia coli* O157: H7 infections in haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* **337**: 138-40.
19. Greatorex J and Thorne G. 1994. Humoral immune response to Shiga-Like Toxin and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **32** (5): 1172-1178.
20. Reymond D, Johnson R, Karmali MA, Petric M, Winkler M, Johnson S, Rahn K, Renwick S, Wilson J, Clarke RC and Spika J. 1996. Neutralizing antibodies to *Escherichia coli* vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2053-57.
21. Wilson J, Clarke R, Renwick, Rahn, Johnson R, Karmali M, Lior H, Alves D, Gyles C, Sandhu K, McEwen S and Spika J. 1996. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infections in dairy farm families. *J. Infect. Dis.* **174**: 1021-1027.
22. Ludwig K, Bitzan M, Zimmermann S, Kloth M, Ruder H and Müller-Wiefel D. 1996. Immune response to non-O157 vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **174**: 1028-1039.
23. Chart H, Cheasty T and Rowe B. 1996. Serological identification of infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 322-324.
24. Chart H, Jenkins C, Smith H and Rowe B. 1998. Serum antibodies to secreted protein in patients infected with *Escherichia coli* O157 and other VTEC. *Epidemiol. Infect.* **120**: 239-243.
25. Perry M, MacLean L and Griffith D. 1986. Structure of O-chain polysaccharide of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157: H7. *Biochem. Cell Biol.* **64**: 21-28
26. Ewing WH. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co.
27. Perry MB, Bundle D, Gidney M and Lior H. 1988. Identification of *Escherichia coli* serotype O157 strains by using a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **26**(11): 2391-2394.
28. Lior H and Borczyk A. 1987. False positive identifications of *Escherichia coli* O157. *Lancet* **i**: 333.
29. Rice E, Sowers E, Johnson C, Dunnigan M, Strockbine N, and Edberg S. 1992. Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. *J. Clin. Microbiol.* **30** (5): 1315-1316.
30. Perry MB and Bundle D. 1990. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157, *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **58**(5): 1391-1395.
31. Stuart, FA and Corbel MJ. 1982. Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157. *Veterinary Record*, **110**: 202-203.
32. Notenboom RH, Borczyk A, Karmali MA and Duncan LM. 1987. Clinical relevance of a serological cross-reaction between *Escherichia coli* O157 and *Brucella abortus*. *The Lancet* **ii**: 744.
33. Chart H, Okubadejo OA and Rowe B. 1992. The serological relationships between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. *Epidemiol. Infect.* **108**: 77-85.

34. Bettelheim K, Evangelidis H, Pearce J, Sowers E and Strockbine A. 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157. J. Clin. Microbiol. **31** (3): 760-761.
35. Chart H, Willshaw G, Cheasty T and Rowe B. 1993. Structure and antigenic properties of *Citrobacter freundii* lipopolysaccharides. J Appl. Bacteriol. **74**: 583-587.
36. Park C, Martin E and White E. 1998. Isolation of a nonpathogenic strain of *Citrobacter sedlakii* which expresses *Escherichia coli* O157 antigen. J Clin. Microbiol. **36**(5): 1408-1409.
37. Chart H, Cheasty T, Giorgio T and Rowe B. 1993. Antigenic cross-reaction between *Escherichia coli* O157, *Vibrio cholerae* O1 Inaba O1 and group N *Salmonella*. Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Diseases. **5**: 81-84.
38. Chart H and Rowe B. 1993. Antibody cross-reactions with lipopolisaccharide from *E. coli* O157 after cholera vaccination. Lancet **341**:1282.
39. Cravioto A, Vázquez V, Soria A, Navarro A y Ortiz M. 1988. Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT 1) en cepas de *Escherichia coli* aislada de niños con diarrea en una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. **45**(4): 206-210.
40. Cravioto A, Reyes R, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De la Roca J, Hernández JM, Pérez G, and Vázquez V. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am. J. Epidemiol. **131**(1): 886-904.
41. Rosas I, Salinas E, Yela A, Calva E, Eslava C and Cravioto A. 1997. *Escherichia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico City. Appl. Environ. Microbiol. **63**(10): 4093-4095.
42. Orskov F and Orskov Y.1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In T. Bergan(ed), Methods in Microbiology. Academic Press Ltd., London. **V14**: 43-112.
43. Fratamico P, Sackitey S, Wiedmann M and Deng M. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **33** (8): 2188-2191.
44. Westphal and Jan K.1965. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydr. Chem. **5**: 83-91.
45. Siddons C and Chapman P. 1993. Detection of serum and faecal antibodies in haemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. **39**: 408-415.
46. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, and Randall R J. 1951. Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
47. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D and Smith J. Ed. 1987. Current protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons N. Y., USA.
48. Laemmli UK.1970. Cleavage of estructural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. **227**:680-685.
49. Tsai C and Frasch C. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **119**: 115-119.
50. Hitchcock P and Brown T. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. **154**(1): 269-277.
51. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some aplications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 4350-4354.

52. Chart H, Montgomery S and Rowe B. 1994. A rapid immunoblotting procedure for detecting serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 100-101.
53. Losonsky G, Lim Y, Motamedi P, Comstock L, Johnson J, Morris G, Tacket C, Kaper J and Levine M. 1997. Vibriocidal antibody responses in North American volunteers exposed to wild-type or vaccine O139: specificity and relevance to immunity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**(3): 264-269.
54. Qadri F, Mohi G, Hossain J, Azim T, Khan AM, Salam MA, Sack RB, Albert AM, and Svennerholm AM. 1995. Comparison of the vibriocidal antibodies response in cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal with the response in cholerae due to *Vibrio cholerae* O1. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**(6): 685-688.
55. Borezyk A, Karmali M A, Lior H, and Duncan L. 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet* **i**: 98.
56. Orskov F, Orskov I and Villar J. 1989. Cattle as a reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet* **ii**: 276.
57. Gunzer F, Böhm H, Rüssmann H, Bitzan M, Aleksic S and Karch H. 1992. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **30**(7): 1807-1810.
58. Ammon A, Petersen L and Karch H. 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol- fermenting strain of *Escherichia coli* O157: H-. *J. Infect. Dis.* **179**: 1274-1277.
59. Nakazagua M, Akimbo M and Sometime T. 1999. Swine as a potential reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H7 in Japan. *Emerging Infect. Dis.* **5**(6): 833.
60. Marolda CL and Valvano MA. 1993. Identification, expression, and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis genes encoded by the O7 *rfb* gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). *J. Bacteriol.* **175**(1): 148-158.
61. Conlan JW, KouLee R, Webb A and Perry MB. 1999. *Salmonella landau* as a live vaccine against *Escherichia coli* O157: H7 investigated in a mouse model of intestinal colonization. *Can. J. Microbiol.* **45**(9): 723-731.
62. Konadu E, Parke J, Tran H, Bryla D, Robbins J and Szu S. 1998. Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults. *J Infect. Dis.* **177**: 383-387.
63. Chart H, Rowe B and Cheesbrough JS. 1997. Serological response of patients infected with *Salmonella typhi*. *J. Clin. Pathol.* **50**(11): 944-946.
64. Kato T and Owen R. 1999. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: *Mucosal Immunology*. Academic Press. London. p115-132.
65. Croitoru K and Bienenstock J. 1994. Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue. In: Ogra P, Lamm M, McGhee J, Mestecky J, Strober W and Bienenstock J (Eds). *Handbook of mucosal immunology*. Academic Press. New York. p 141-150.
66. Chart H, Said B, Stokes N and Rowe B. 1993. Heterogeneity in expression of lipopolysaccharides by strains of *Escherichia coli* O157. *J. Infect.* **27**: 237-241.
67. Colwell R, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA and Palmer LA. 1985. Viable but no-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of engineered micro-organisms: *Bio/Technol.* **3**: 817-20.

Cuadro 1. Origen de las diferentes de cepas de *Escherichia coli* incluidas en el estudio

Procedencia	Fuente	Número de cepas
Tlaltizapan, Mor. México	Niños < 2 años (Cravioto, 1990) ⁴⁰	26
IMSS	Niños < 5 años	2
INDRE	Casos clínicos	3
Edo. Méx.	Bovinos con diarrea	2
Edo. Méx.	Cerdos de granjas porcícolas	1
CA-UNAM	Ambientales, (Rosas, 1997) ⁴¹	2
CVD	Colección DEC, (Whittam, 1993) ¹³	15
Tailandia	Casos clínicos, Peter Echeverria	12
DEP	Referencia Internacional	1
		64

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social.

INDRE: Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica.

CA-UNAM: Instituto de Ciencias de la Atmosfera, UNAM.

CVD: Centro de Desarrollo de Vacunas, Baltimore, Maryland.

DEC: *Escherichia coli* Diarrogénica.

DEP: División de Patógenos Entéricos, Laboratorio de Salud Pública, Londres Inglaterra.

Cuadro 2. Iniciadores* utilizados en el ensayo de PCR para determinar la presencia de los genes *eae*, *stx1-2* y *ehxA* (plásmido de 60 MDa)

Primer	Secuencia del oligonucleotido (5' a 3')	Genes amplificados	Tamaño del Producto de amplificación (pb)
BT5	CAG GTC GTC GTG TCT GCT AAA	<i>eaeA</i>	1087
BT65	TCA GCG TGG TTG GAT CAA CCT		
BT3	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC	<i>stx1-2</i>	224 y/o 227
BT4	CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC		
BT1	ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA	<i>ehxA</i>	166
BT2	CTT CAC GTC ACC ATA CAT AT		

* Fratamico (1995)⁴³

Cuadro 3. Características fenotípicas y genotípicas de cepas de *E. coli* O157 aisladas en México

Origen de la cepa	Número de cepas	Fenotipo		Genotipo		
		Serotipos	Sorbitol	<i>eaeA</i>	<i>stx1-2</i>	<i>ehxA</i> (60-MDa)
Niños (14) (2) (1) Adulto (1)	25	O157:NM	+	-	-	-
	4	O157:H10	+	-	-	-
	1	O157:H28	-	-	-	-
	1	O157:H7	-	+	+	+
Bovinos (2) Cerdos (1)	1	O157:NM	-	+	+	+
	1	O157:NM	-	+	-	+
	1	O157:NM	+	-	-	-
Ambientales (2)	1	O157:H51	-	-	-	-
	1	O157:H42	-	-	-	-

Cuadro 4. Reactividad antigénica de diferentes sueros de conejo contra antígenos homólogos y heterólogos de

E. coli

Titulo* de la respuesta contra los antígenos	
Antisuero	O7
O7	0116
O116	0157
O157	0116
	07
	2.3
	2.6
	3.2
	2.0
	3.5
	2.0
	2.3
	3.5

* log₁₀

Cuadro 5. Reactividad antigénica entre sueros de conejo anti O7
y O116 contra diferentes cepas de *E. coli* O157*

Serotipo	No. de Cepas	Antisuero				Sin reacción cruzada (%)
		O7 (%)	O116 (%)	O7 / O116 (%)		
O157:H**	11	9 (81.8)	9 (81.8)	7 (63.6)	0	
O157:H7	11	9 (81.8)	3 (27.3)	3 (27.3)	2 (18.2)	
O157:NM	42	17 (40.5)	28 (66.7)	15 (35.7)	12 (28.6)	
	64	35 (54.7)	40 (62.5)	25 (39.1)	14 (21.9)	

* Los títulos de aglutinación obtenidos fueron entre 2.3 log₁₀ / 2.6 log₁₀.

** H diferente a H7 : H10 (4), H28 (1), H51 (1), H42 (1), H43 (3), H19 (1).

Cuadro 6. Reacciones de aglutinación cruzada y pruebas de absorción de aglutininas entre antisueros de *E. coli*

Antisuero	Título* de la respuesta contra los antígenos		
	O7	O116	O157
O7			
Absorbido con O7	< 1.7	< 1.7	< 1.7
Absorbido con O116	3.5	< 1.7	< 1.7
Absorbido con O157	3.5	2.3	< 1.7
O116			
Absorbido con O7	< 1.7	3.2	2.0
Absorbido con O116	< 1.7	< 1.7	< 1.7
Absorbido con O157	< 1.7	2.6	< 1.7
O157			
Absorbido con O7	< 1.7	1.7	3.5
Absorbido con O116	< 1.7	< 1.7	3.5
Absorbido con O157	< 1.7	< 1.7	< 1.7

* log₁₀

Cuadro 7. Reactividad de muestras de suero de población abierta contra el LPS O157 determinada por inmunoelctrotransferencia

Sueros probados 562	Valores de DO*	ELISA (n)	Inmunoelctrotransferencia	
			(+)	(-)
	> 0.7	28	12/14 (85.7 %)	2 (14.3 %)
	0.4 - < 0.7	114**	61/88 (69.3 %)	27 (30.7 %)
	< 0.4	420		
		562		

* 405 nm.

** En 26/114 (22.8 %) el ensayo no se realizó

Cuadro 8. Actividad bactericida* de suero de conejo anti O7 contra bacterias de los serogrupos homólogo y heterólogos

	Serotipos de <i>E. coli</i> (UFC / ml)			
Título (log ₁₀)	O7:NM	O116:H10	O157:H7	O157:H19
1.5	5.66 X 10 ^{5**}	5.26 X 10 ^{4**}	7.4 X 10 ^{4**}	2.32 X 10 ^{5**}
1.8	6.62 X 10 ^{5***}	1.89 X 10 ^{5**}	2.25 X 10 ^{5**}	3.17 X 10 ^{5**}
2.1	≥ 2.29 X 10 ⁶	≥ 2.29 X 10 ⁶	6.25 X 10 ^{5**}	≥ 2.29 X 10 ⁶
Testigo (0.3)	2.29 X 10 ⁶			

* Promedio de tres experimentos (Análisis de varianza. Epi Info 6.04).

** p < 0.01

*** p < 0.05

**Cuadro 9. Actividad bactericida* de suero de conejo
O116 contra bacterias de los serogrupos
homólogo y heterólogos**

		Serotipos de <i>E. coli</i> (UFC)		
Título (log ₁₀)	O7:NM	O116:H10	O157:H7:H7	O157:H19
1.5	6.75 X 10 ^{5***}	1.74 X 10 ^{5***}	5.36 X 10 ^{4**}	7.9 X 10 ^{4**}
1.8	8.4 X 10 ^{5***}	7.25 X 10 ^{5***}	5.25 X 10 ^{5***}	8.5 X 10 ^{5***}
2.1	≥ 1.75 X 10 ⁶	≥ 1.75 X 10 ⁶	8.75 X 10 ^{5***}	< 1.75 X 10 ⁶
Testigo (0.3)	1.75 X 10 ⁶			

* Promedio de tres experimentos (Análisis de varianza. Epi Info 6.04).

** p < 0.01

*** p < 0.05

**Cuadro 10. Actividad bactericida* de suero de conejo
anti O157 contra bacterias de los serogrupos
homólogo y heterólogos**

		Serotipos de <i>E. coli</i> (UFC)		
Título (log ₁₀)	O7	O116	O157:H7	O157:H19
1.5	1.97 X 10 ^{5**}	3.95 X 10 ^{4**}	2.60 X 10 ^{5**}	4.5 X 10 ^{4**}
1.8	3.5 X 10 ^{5***}	2.48 X 10 ^{5***}	8.75 X 10 ⁵	1.98 X 10 ^{5**}
2.1	≥1.65 X 10 ⁶	2.48 X 10 ^{5***}	≥1.65 X 10 ⁶	1.1 X 10 ⁶
Testigo (0.3)	1.65 X 10 ⁶			

* Promedio de tres experimentos (Análisis de varianza. Epi Info 6.04).

** p < 0.01

*** p < 0.05

Cuadro 11. Respuesta contra *E. coli* O157 y *S. typhi* del suero de pacientes con antecedentes de infección previa por *S. typhi*

Suero de pacientes	Título de la aglutinación con <i>E. coli</i> O157 (log ₁₀)	Título de la aglutinación con <i>Salmonella typhi</i> (log ₁₀)	Respuestas contra el LPS O157 por ELISA (D O)**
MS	2.8	1.9	1.284
*RRE	2.2	1.0	0.604
MEA	2.8	< 0.3	0.578
AM	2.2	1.0	0.853
ND	1.5	< 0.3	0.842
RC	< 0.3	< 0.3	0.513
ANTI O157	3.5	< 0.3	2.0
<i>S. typhi</i>	1.3	2.1	ND

* Caso confirmado por aislamiento .

** Valores de punto de corte 0.7 para ensayos ositivos, 0.4 A 0.699 de D O para resultados intermedios.

Cuadro 12. Actividad bactericida* del suero humano contra cepas de *E. coli*

Serotipos de <i>E. coli</i> (UFC)				
SUERO	O7	O116	O157:H7	O157:H19
RRE	$\geq 2.77 \times 10^5$	$\geq 2.77 \times 10^5$	$1.32 \times 10^{5***}$	$\geq 2.77 \times 10^5$
AM	$1.64 \times 10^{5****}$	$4.6 \times 10^{4****}$	$4.6 \times 10^{4****}$	$8.3 \times 10^{3****}$
ND	$\geq 2.77 \times 10^5$	$\geq 2.77 \times 10^5$	$\geq 2.77 \times 10^5$	$1.76 \times 10^{5*}$
<i>S. typhi</i>	$2.77 \times 10^{5****}$	$1.15 \times 10^{4****}$	$5.17 \times 10^{4****}$	$4.5 \times 10^{5****}$

*Promedio de tres experimentos (Análisis de varianza. Epi Info 6.04).

Título del suero (\log_{10}):

** 1.2

*** 1.5

**** 1.8

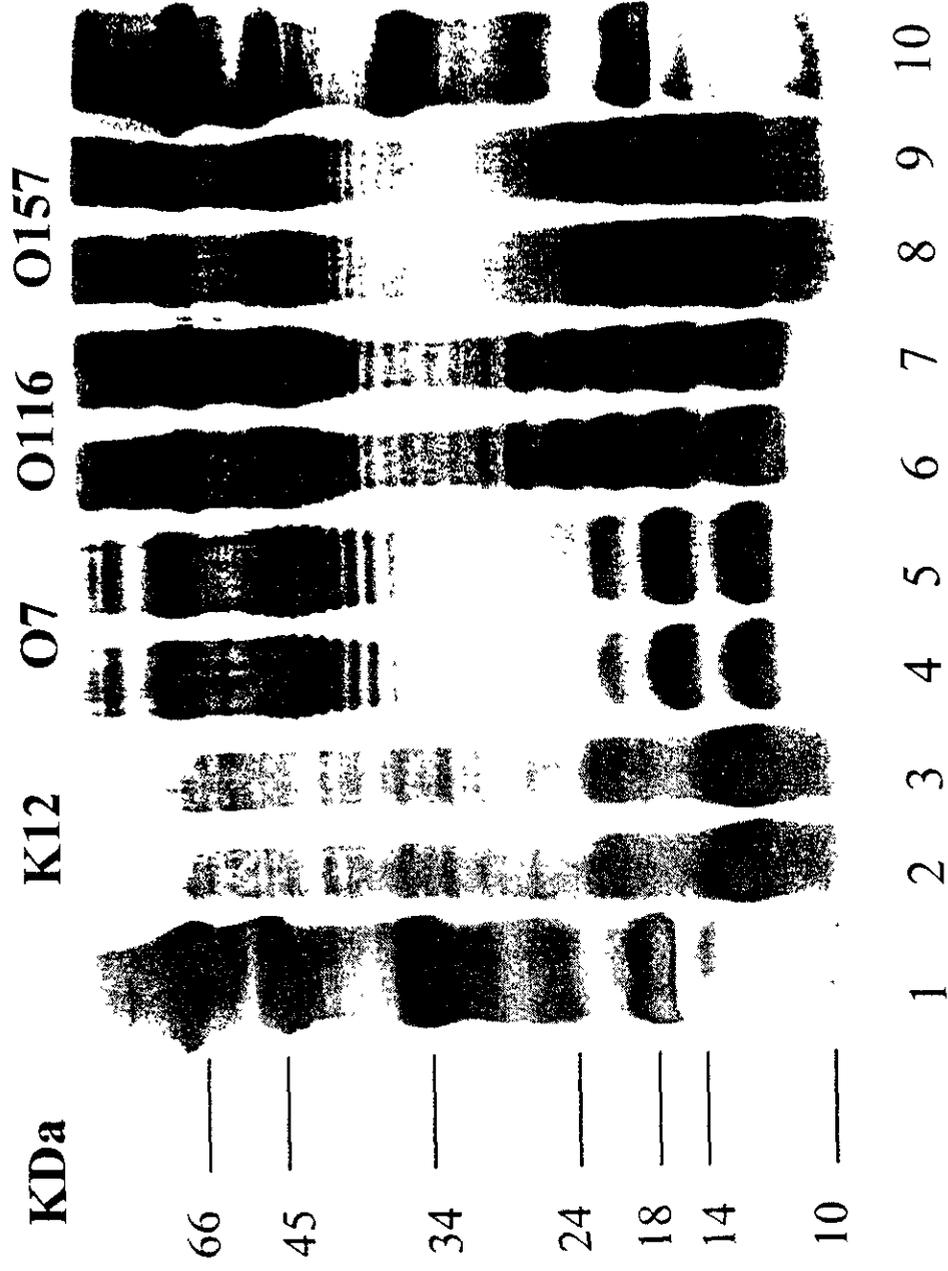


Fig 1. Perfil electroforético en geles de poliacrilamida al 15% de diferentes LPS de *E. coli*. Carriles 1 y 10 marcadores de peso molecular.

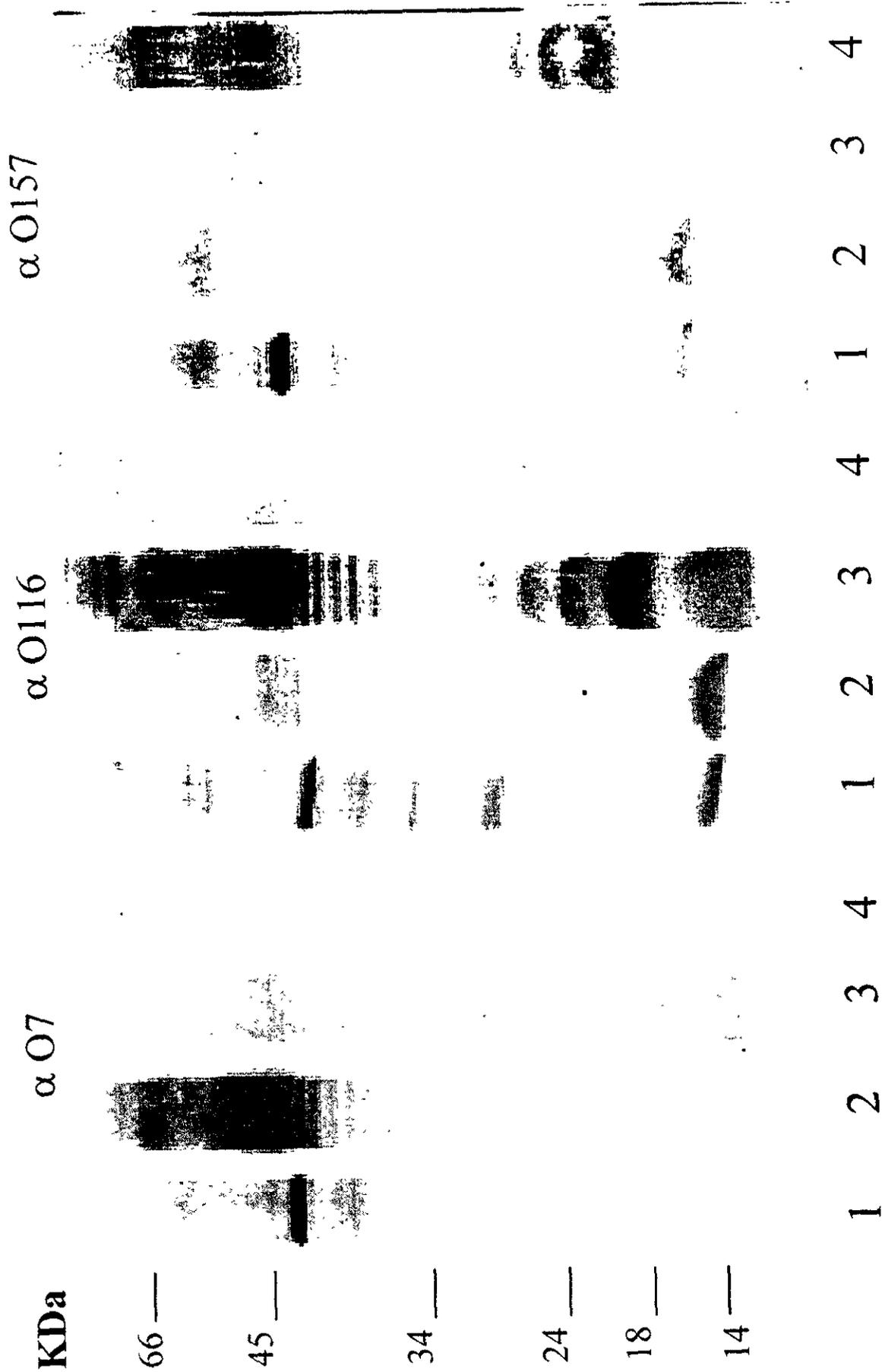


Figura 2. Inmunoelctrotransferencia de los LPS K12, O7, O116, Y O157 revelado con sueros de conejo ($2 \log_{10}$) y visualizado con anti IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Carriles (1) LPS K12, (2) LPS O7, (3) LPS O116 Y (4) LPS O157.

KDa

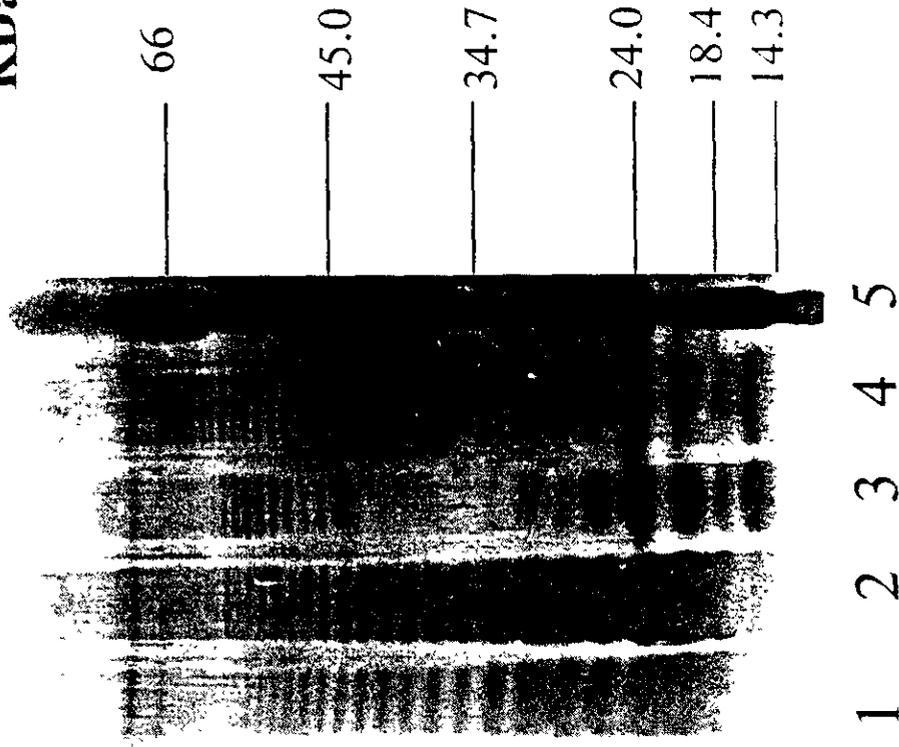


Fig 3. Perfil electroforético en geles de SDS - PAGE (15%) de LPS de *E. coli* O157 con diferente antígeno flagelar. Carriles: 1 y 2 LPS O157:H19; 3 LPS O157:H7; 4 LPS O157:NM; 5 marcadores de peso molecular.

■ 0.58 □ 0.7** D.O.

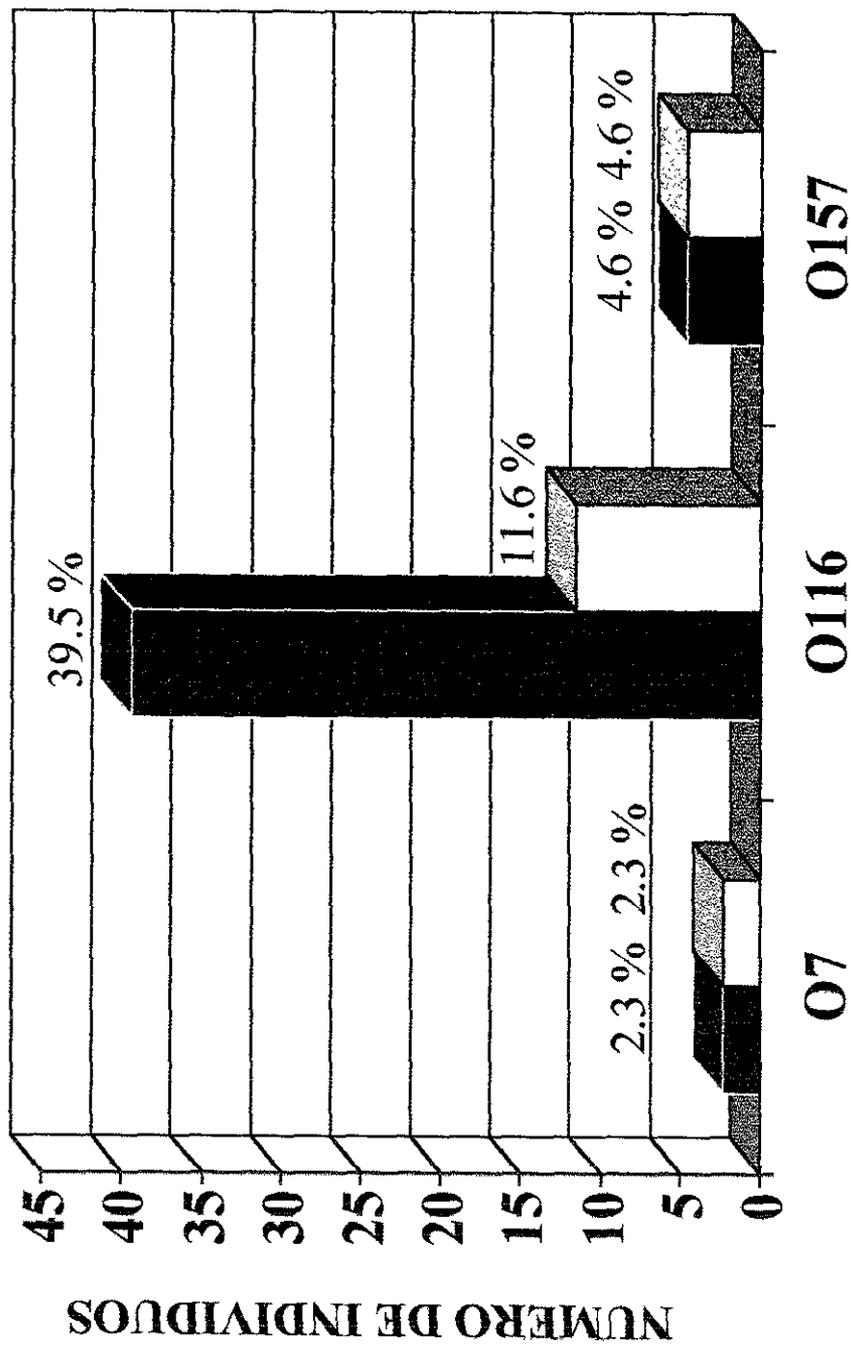


Fig 4. Porcentaje de sueros de niños con anticuerpos séricos por ELISA contra LPS diferentes de *E. coli*.

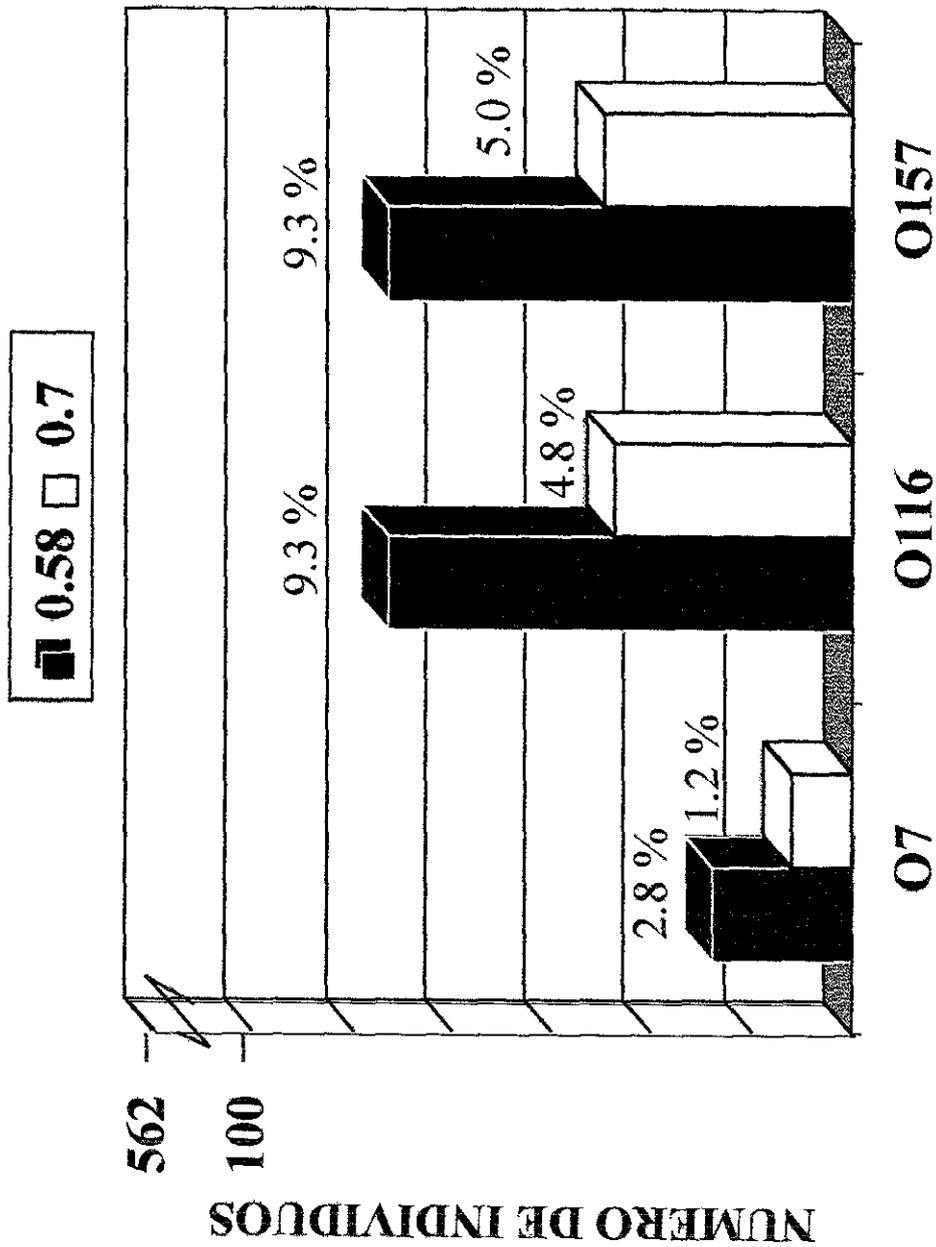


Fig 5. Porcentaje de sueros de población adulta con anticuerpos séricos por ELISA contra LPS diferentes de *E. coli*.

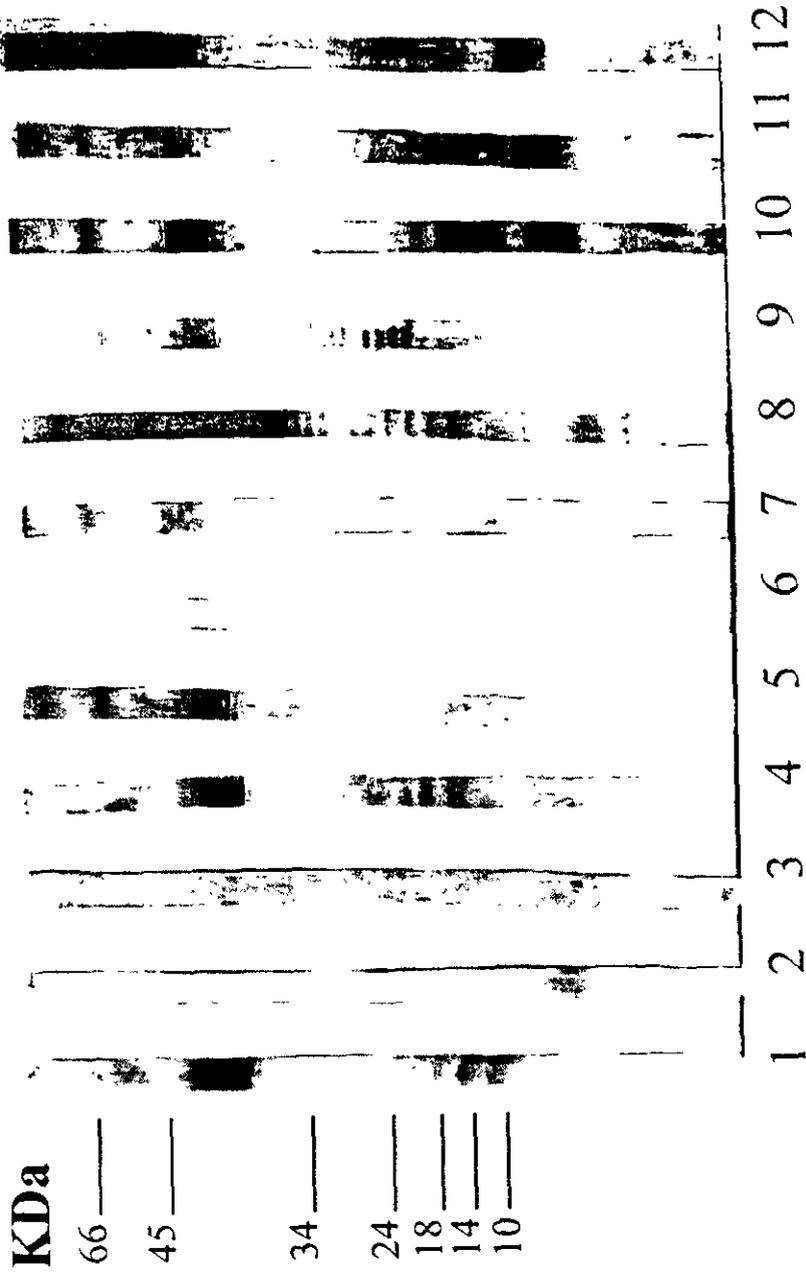


Fig 6. Inmunoelectrotransferencia con sueros de adulto contra LPS de *E. coli* O157. Carriles: 1 suero de conejo anti O157; 2 suero de conejo preinmune; 3 suero humano (negativo por ELISA) contra el LPS O157; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sueros humanos con valores de ELISA intermedios de 0.4 a 0.699 de DO; 11 suero humano positivo por ELISA; 12 suero de paciente con infección por *S. typhi*.

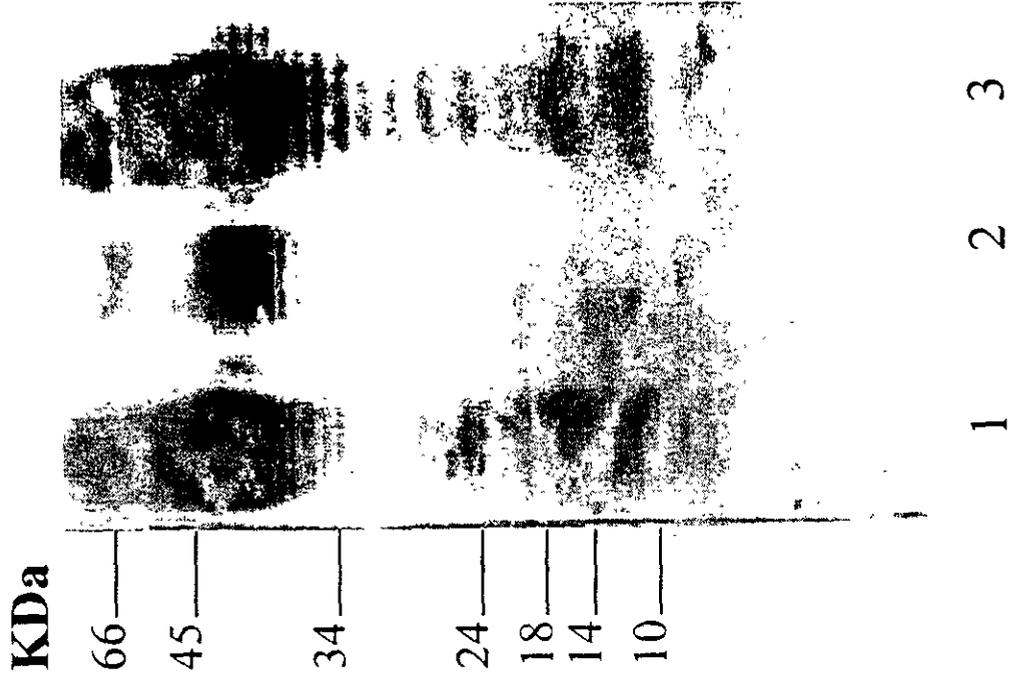


Fig 7. Inmunoelectrotransferencia de un suero de adulto humano, con valores intermedios en la prueba de ELISA contra LPS diferentes de *E. coli*. Carriles: (1) LPS O7; (2) LPS O116; (3) LPS O157.

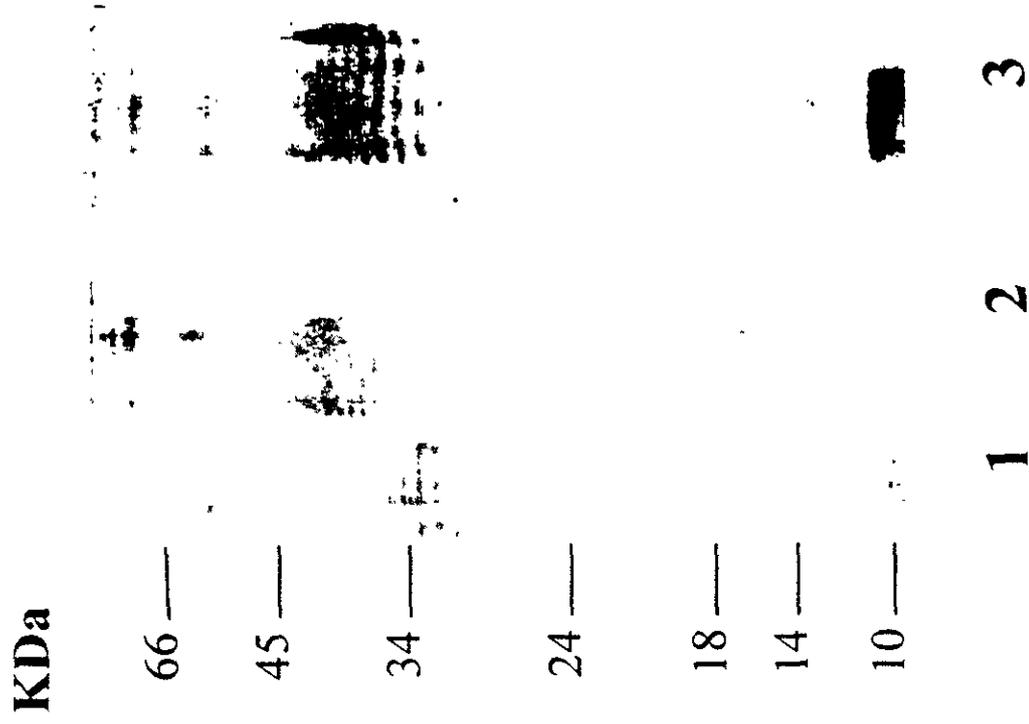


Fig 8. Inmunoelectrotransferencia de un suero de paciente con antecedentes de infección por *S. typhi*. Contra diferentes LPS de *E. coli*. Carriles:(1) LPS O7; (2) LPS O116; (3) LPS O157.

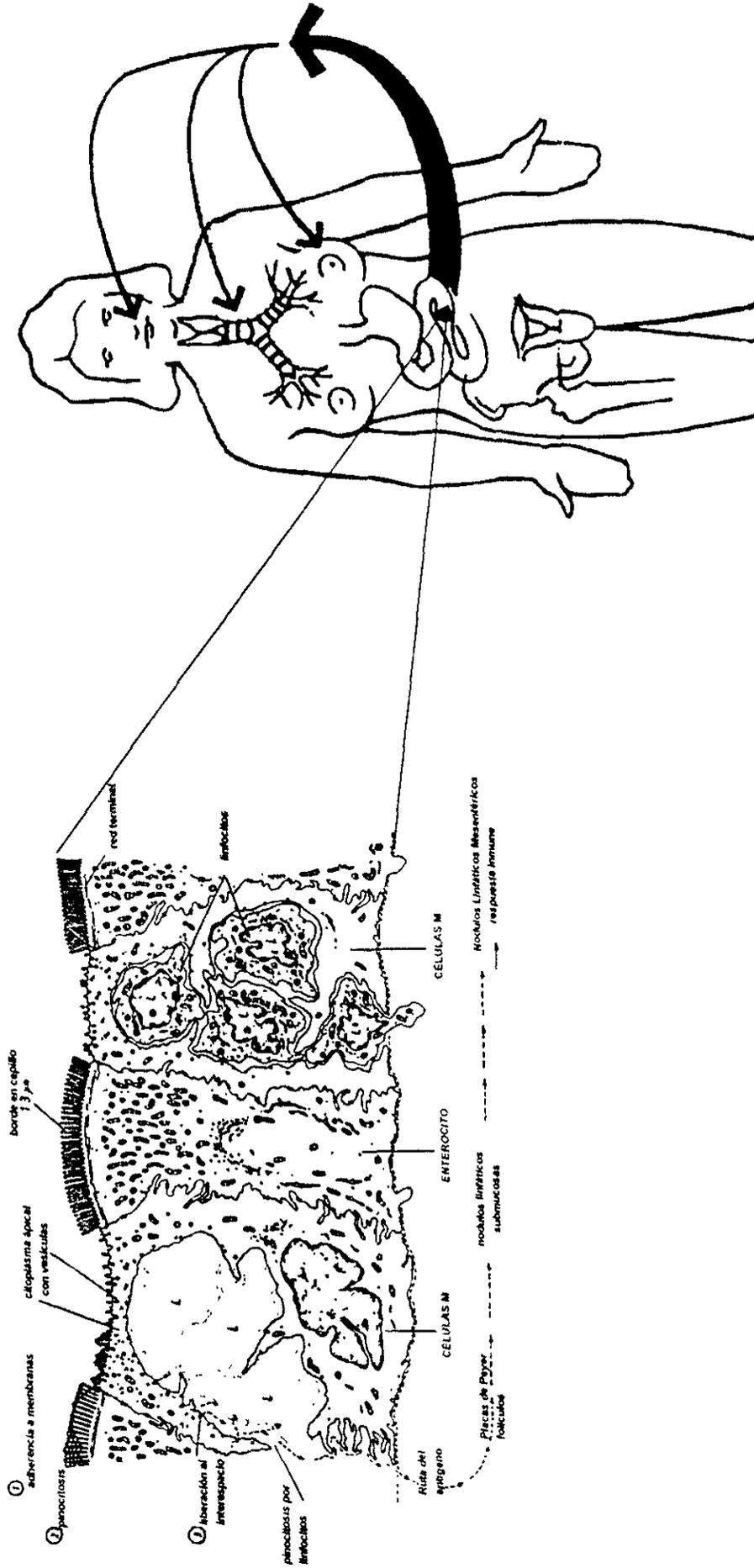


Fig 9. Respuesta inmune enteromamaria