

10524
16



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

Departamento de

**" CARACTERIZACION DE CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVAS
AISLADAS EN LA CIUDAD DE MEXICO.
POR INVASIVIDAD EN CELULAS HEP-2
CAPTACION DEL COLORANTE ROJO
CONGO. PRUEBA DE SERENY. PATRON
DE HEMAGLUTINACION Y PERFIL DE
PLASMIDOS "**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ILIANA ALEJANDRA CORTES ORTIZ

A S S O R E S :
DRA. SILVIA GIONO CEBEZO
DR. GERARDO APARICIO OZORES
DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 2002

A



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Caracterización de cepas de Escherichia coli enteroinvasiva aisladas en la ciudad de México, por invasividad en células HEp-2, captación del colorante rojo Congo, prueba de Sereny, patron de hemaglutinación y perfil de plásmidos.

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

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Julio de 2003

PRESIDENTE Dra. Gilva Flores Rosales

VOCAL Q. P. I. Andrea Becerra Osaya

SECRETARIO Dr. Gerardo Cruz Jiménez

PRIMER SUPLENTE Q. EnC. Sandra Díaz Barriga Arco

SEGUNDO SUPLENTE Q. V. Mercedes E. Salgado Moreno

B

RECONOCIMIENTOS:

Si tuviera que agradecer a todas las personas que me apoyaron a la conclusión del presente trabajo no alcanzarían ni siquiera todas las hojas de esta tesis para reconocer su invaluable ayuda. Por lo tanto, a todos ustedes:

Gracias

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Silvia Giono Cerezo y el Dr. Gerardo Aparicio Ozores.

D

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	4
RESUMEN	5
I. ASPECTOS GENERALES	6
1.0 ANTECEDENTES	6
2.0 PATOGENICIDAD POR <i>Shigella</i> Y <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA	8
3.0 MARCADORES ASOCIADOS EN <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA	16
3.1 Metabólicos	16
3.2 Antígeno Somático	17
3.3 Producción de queratoconjuntivitis en cobayo o prueba de Sereny	19
3.4 Invasión a la línea celular HEP-2.	20
3.5 Captación del colorante rojo Congo	21
3.6 Plásmido plav de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	23
3.7 Hemaglutinina manosa-resistente	25
II. JUSTIFICACIÓN	27
III. OBJETIVOS	28
IV. METODOLOGÍA	29
1.0 CEPAS BACTERIANAS	29
2.0 BIOVARES ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD EN <i>E. coli</i>	30
3.0 DETECCIÓN DEL ANTIGENO SOMÁTICO EN <i>E. coli</i>	31
4.0 INVASIVIDAD EN CULTIVO CELULAR: HEP-2	32
5.0 PRUEBA DE SERENY	36
6.0 CAPTACION DE ROJO CONGO	37
7.0 PERFIL DE PLÁSMIDOS	38
8.0 HEMAGLUTINACIÓN	39

V. RESULTADOS	40
VI. DISCUSIÓN	51
VII. CONCLUSIONES	59
VIII. BIBLIOGRAFIA	61
IX. GLOSARIO	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Genes involucrados en la invasividad por <i>Escherichia coli</i> y sus diferentes niveles de regulación.	11
FIGURA No. 2	Proceso de invasividad por <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva en el epitelio intestinal.	14
FIGURA No. 3	Perfil de plásmidos de cepas de <i>Escherichia coli</i> con características invasivas.	47

INDICE DE TABLAS.

Tabla No. 1	Biovars de las 39 cepas de <i>E. coli</i>.	41
Tabla No. 2	Descarboxilación de aminoácidos de acuerdo a Edwards y Ewing para las 39 cepas de <i>E. coli</i>.	42
Tabla No. 3	Antígenos somáticos encontrados en las cepas de <i>E. coli</i>.	44
Tabla No. 4	Cepas de <i>E. coli</i> captadoras del colorante rojo Congo al 0.01%.	45
Tabla No. 5	Hemaglutinación de 14/39 cepas de <i>E. coli</i> en presencia o ausencia de manosa al 1%.	49
Tabla No. 6	Resultados condensados de las pruebas de invasividad realizadas en las <i>E. coli</i> con características invasivas.	50

RESUMEN

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) produce un síndrome disentérico similar al de *Shigella* caracterizado por evacuaciones con moco y sangre. Para caracterizar este grupo de *E. coli* en cepas aisladas en México se probaron 39 cepas de *E. coli* invasivas por ensayos previos. Se realizaron pruebas bioquímicas, serología, invasividad en células HEp.2, prueba de Sereny, captación del rojo congo, perfil de plásmidos y hemaglutinación. De las 39 cepas ensayadas, 6 penetraron a las células en cultivo, 9 captaron el colorante rojo Congo y solo 2 cepas fueron Sereny positivas, estas últimas coincidieron con la presencia del plásmido *pluv*. Además, fueron lisina positiva y móviles al igual que las cuatro cepas que invadieron el cultivo celular. La hemaglutinina manosa-resistente no se encontró involucrada en el mecanismo de patogenicidad de EIEC. Serológicamente no fueron reconocidas por los antisueros atribuidos al grupo invasivo. Es probable que se trate de un nuevo grupo de EIEC no descrito a las cepas EIEC reportadas hasta ahora.

I. ASPECTOS GENERALES.

1.0 ANTECEDENTES

Escherichia coli puede ser el agente causal de infecciones urémicas, neonatales y gastroentéricas. Se han encontrado seis tipos de *E. coli* patogénica: enterotoxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC), enteropatogénico clásico (EPEC), y el enteroagregativo (EA_gEC) (Levine, 1987). *E. coli* adherente difusa (DAEC) también se ha propuesto como patógena. En humanos, este grupo se ha asociado con diarrea, disentería, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Miliotis, 1989). Aunque se han propuesto otras dos categorías adicionales: *E. coli* separadora celular, del inglés cell-detaching *E. coli* (CDEC), y *E. coli* productora de toxina citolítica, del inglés cytolethal distending toxin-producing *E. coli* (CLDTEC), en base a la presencia de genes plasmídicos y genómicos diferentes que están ausentes en la mayoría de las cepas comensales, además del efecto que producen en células epiteliales y en monocapas en cultivo celular (Okeke, 2000).

EIEC produce un síndrome disentérico similar al causado por *Shigella*, caracterizado por dolor abdominal severo y diarrea con moco y sangre. Aunque los signos clínicos de esta enfermedad varían en cada paciente se le atribuye fiebre, cefalea, mialgia y diarrea, hasta disentería y en casos severos, hipotensión (Maurelli, 1992).

En los brotes por EIEC, el 90% de los pacientes presentan diarrea acuosa sin sangre. Este signo dificulta la explicación de la simple invasión celular dando la hipótesis de que *Shigella* y EIEC pueden producir una ó mas enterotoxinas que

producen diarrea secretora. La actividad enterotóxica no se ha asociado con daño celular (Nataro, 1995). Fasano (1995), describió la enterotoxina de *Shigella* ShET1, y Nataro (1995), la caracterizó mediante el uso de sondas encontrando que todos los miembros de *Shigella* tienen el gen de la enterotoxina localizado en plásmido de invasividad.

La toxina Shiga es una citotoxina producida en altas concentraciones por *Shigella dysenteriae* tipo 1 y no parece estar involucrada en la muerte de las células infectadas, ya que según los estudios hechos con mutantes incapaces de producir la toxina eliminan a las células infectadas con igual eficacia que las cepas productoras de ella (Donohue-Rolfe, 1991). Lo que se ha observado con la secreción de la toxina Shiga es una marcada alteración de los capilares en la mucosa del intestino grueso, es responsable de la colitis isquémica y hemorrágica observada durante la infección con *S. flexneri* (Donohue-Rolfe, 1991). Además se han reportado dos toxinas adicionales: la enterotoxina 1 (ShET-1) y la enterotoxina 2 (ShET-2). La primera está codificada en genes genómicos y la segunda por el plásmido de invasividad (Vargas, 1999).

Nataro y Kaper (1998) reportaron que existe una nueva proteína llamada Sen con 63 kDa de peso, codificada por el plásmido plnv y cuando se induce una mutación en esa región se disminuye la actividad enterotóxica. Sin embargo, la participación de las enterotoxinas no está probada, pero su presencia puede explicar la diarrea acuosa atribuida a EIEC.

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

Los trabajos realizados con *Shigella* constituyen la vanguardia en el estudio de la invasividad y a través del conocimiento obtenido de éstos se especula y se prueba cuales son los genes o proteínas que actúan en EIEC de manera similar que en *Shigella* (Pál, 1989), ya que por sus múltiples similitudes feno-genotípicas es muy probable que ambas presenten la misma regulación genética (Sansoneetti, 1983).

La información genética en *Shigella* que codifica a todos los factores involucrados en el proceso de invasividad se encuentra localizada en el genóforo bacteriano y en un plásmido de 120 MDa en *Shigella sonnei* y de 140 MDa en otros serotipos de *Shigella* y en EIEC (Nataro, 1998).

La regulación genómica está mediada por una isla de patogenicidad denominada SH-2 (Ochmann, 2000), en donde participan los genes *vir R* y *kcp A*. El gene *virR* ejerce control negativo dependiente de la temperatura hacia los genes de invasión plasmídicos, ya que cuando se cultiva a 30 °C es no invasiva y a 37°C si lo es (Kopecko, 1985). Se ha demostrado que la región *vir* de *Shigella* es idéntica a EIEC (Muhldorfer y Hacker, 1994).

El gene *kcp A* es necesario para la producción de queratoconjuntivitis en cobayos, aparentemente promueve la regulación positiva de la expresión del gene *ics A* (*vir G*) (Yamada, 1989).

El gene *vir F*, que se encuentra en el plásmido de virulencia, codifica para la síntesis de una proteína de 30 KDa que regula positivamente la expresión de los genes *ipa* en el nivel transcripcional. Esta proteína, a nivel citoplasmático, también tiene control positivo sobre la expresión de una proteína de membrana externa de 120 KDa codificada por los genes del mismo plásmido (gen *ics A*, región *virG*) relacionada con el movimiento de la bacteria dentro de la célula infectada (Vasselon, 1992). *vir F* no puede activar la transcripción de *vir B* cuando el plásmido pINV está integrado en el genóforo produciendo un fenotipo no invasivo (Colonna, 1995).

Los genes *ipa*, *mxi* y *spa* (Nataro, 1998) codifican la producción y secreción de los polipéptidos Ipa. Estos péptidos son referidos como IpaA (78KDa), IpaB (62 KDa), IpaC (43 KDa), e IpaD (38 KDa) que están involucrados en el proceso de entrada a la célula ya que son liberadas durante la internalización a las células epiteliales y son considerados como "invasinas" (Lebrec, 1984), y pueden ser responsables de la muerte de la célula infectada mediante apoptosis (Islam, 1996), aunque se ha considerado que solo Ipa B induce apoptosis (Finlay y Cossart, 1997) además de participar en la internalización bacteriana y lisis de la membrana fagosomal (Marquart, 1996). Ipa D e Ipa C se han logrado purificar y se ha observado que Ipa D no tiene actividad mientras que Ipa C se une específicamente a las células epiteliales e induce un número de respuestas celulares.

El gene *vir B*, se encuentra en el plásmido de invasión, codifica para una proteína de 33 KDa que regula, a nivel transcripcional, la expresión de los antígenos de invasión Ipa A, B, C, D. Este gene se controla positivamente, a su

vez, por el gen *vir F* y su transcripción es dependiente de temperatura de manera semejante a la descrita para *vir F* (Sansonetti, 1991).

La región *vir G* (*ics A*) se localiza en el plásmido de virulencia dentro de una región de 4 Kb que codifica una proteína de 130 KDa que es regulada a su vez por una proteína de 30 KDa codificada por el gene *vir F*, y se requiere para la diseminación de la bacteria de una célula a otra (Kadurgamuwa, 1991). *Omp T*, es una proteasa de superficie que actúa como supresor en la expresión de *vir G* (Ochman, 2000). El locus *ics B* está en el plásmido de 120-140 MDa y es responsable de la diseminación intercelular por la lisis de la membrana celular en la protrusión que se forma cuando la bacteria esta diseminándose (Kadurgamuwa, 1991).

La figura No 1 presenta un esquema que muestra los genes involucrados en invasividad y sus diferentes niveles de regulación (Maurelli y Sansonetti, 1988).

Se ha detectado un nuevo gene relacionado a la virulencia: *vir A*. Fue identificado corriente arriba del gene *vir G* en el plásmido de 120 MDa. Se ha visto que mutantes de dicho gen decremanta 50 veces su capacidad invasiva en cultivo celular, además de que también se disminuye su capacidad de diseminación intracelular (Uchiya, 1995).

Invasividad.

En el epitelio celular de la mucosa colónica, la bacteria entra en contacto con distintos tipos celulares, incluyendo macrófagos y células

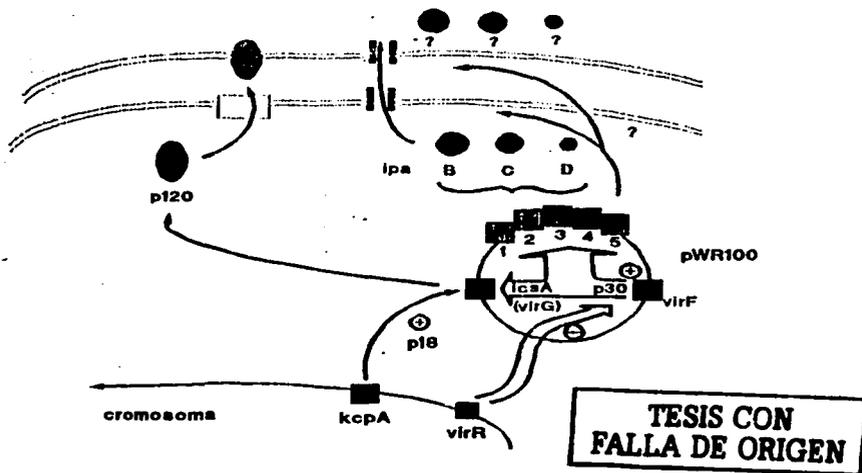


FIGURA No 1. GENES INVOLUCRADOS EN LA INVASIVIDAD DE *Escherichia coli* Y SUS DIFERENTES NIVELES DE REGULACION (Maurelli y Sansonetti, 1988).

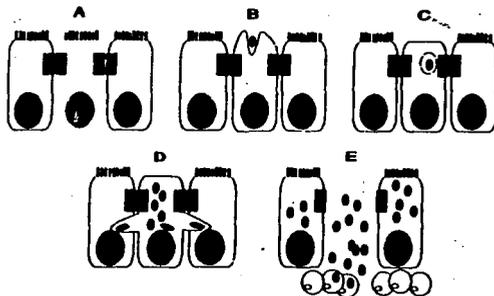
intestinales. Esta bacteria es capaz de invadir a estos tipos celulares produciendo diferentes tipos de infección (Mantis, 1996). Estudios *in vivo* revelaron que el mejor sitio de entrada es a través de las células M de las placas de Peyer para llegar a la superficie basolateral del enterocito (Fasano, 1997). Inicialmente se adhiere a través de las proteínas de membrana externa (OMP) codificadas por el plásmido de 120-140 MDa. Histológicamente, se observa la primera alteración: una degeneración localizada del "borde de cepillo" de la célula epitelial intestinal (Lebrec, 1964). Después que el microorganismo ha alcanzado la membrana celular epitelial, el gen *vir F* que codifica para la síntesis de una proteína de 30 KDa regula positivamente la expresión de los genes *ipa* dando lugar a los polipeptidos Ipa A, B, C y D penetrar así la membrana celular del enterocito (Vasselon, 1992). En el citoplasma celular, se observa que se empieza a polimerizar la actina junto con la acumulación de la miosina directamente en el sitio por donde va a penetrar la bacteria. La célula se encuentra metabólicamente activa y por ello va a fagocitar al microorganismo quedando éste atrapado dentro de una vacuola fagocítica. No se sabe con exactitud si la bacteria escapa rápidamente del fagosoma a través de exoenzimas hidrolíticas como fosfolipasas, lipasas o/y lecitinasas (López, 1988), ó por medio de un estallido respiratorio involucrando el incremento en la acidez de la vacuola por liberación de radicales de oxígeno (Falkow, 1987), ó por la acción de Ipa B (Marcuat, 1996; Finlay y Cossart, 1997), ó por la actividad hemolítica por contacto mediada por el plásmido pINV, ya que estudios hechos con mutantes incapaces de realizar el proceso de entrada a la célula tampoco presentan actividad hemolítica por contacto (Sansone, 1991). La bacteria induce la lisis de la membrana fagocítica poco tiempo después de la entrada a la célula, ya que *in vitro* se ha visto que a los treinta minutos siguientes todas las bacterias invasivas se encuentran libres en el citoplasma de las células hospederas en la línea celular

Caco-2 (Vasselon, 1992). La figura No 2 presenta un esquema de lo descrito (Maurelli y Sansonetti, 1988).

Cuando el microorganismo se encuentra libre en el citoplasma, el gen *ics A* codifica a una proteína de membrana externa de 120 KDa que permite a la bacteria moverse dentro de la célula, y reinfectar a las células vecinas. Así, exhibe dos movimientos: el primero se ha designado fenotipo *Ics* (diseminación intra e intercelular) caracterizado en células HeLa. Este es rápido y orientado, y conjuntamente con la multiplicación bacteriana en el interior de la célula, el microorganismo es capaz de atravesar el citoplasma de 4 a 5 h. Este movimiento, da lugar a la formación de protrusiones que se dan para infectar a las células adyacentes. Se observan así múltiples focos de nucleación en la célula y la formación de pequeños filamentos de actina, cerca de la superficie bacteriana. Estos filamentos forman un saco polarizado en la superficie de la bacteria que promueve su locomoción por un proceso todavía no bien explicado (Vasselon, 1992). Golberg y Theriot (1995), demostraron que únicamente la proteína *Ics A* es necesaria para permitir el movimiento en el interior del citoplasma.

Las mutantes *icsA* (*virG*) que pierden la capacidad de polimerizar la actina, pueden adherirse, entrar a la célula y lisar a la membrana fagosomal formando microcolonias cerca del núcleo de la célula infectada, pero son incapaces de producir placas en células HeLa con crecimiento confluyente y no dan la prueba de Sereny positiva (Sansonetti, 1991).

El fenotipo *Olm* (organelle like movement), se ha caracterizado en fibroblastos de embrión de pollo. La bacteria durante la colonización de la célula infectada se desliza a lo largo del "haz de actina" moviéndose suave y unidireccionalmente a través de éstos filamentos. Esto también se ha observado en células HeLa, lo que



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA No 2. PROCESO DE INVASIVIDAD POR *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA EN EL EPITELIO INTESTINAL. A Célula intacta. B Penetración. C Internalización. D Diseminación. E Muerte celular. (Maurelli y Sansonetti, 1988).

explica la acumulación de las bacterias mutantes *ics A* cerca del núcleo celular (Vasselon, 1992).

Utilizando la línea celular Caco-2 proveniente de un carcinoma de colon humano, se observa que la infección inicial se produce en las células periféricas y la colonización de las células centrales se da por el movimiento intracelular o por la diseminación de célula a célula en la monocapa epitelial. La presencia de un antibiótico en el medio de cultivo previene la reinfección por bacterias extracelulares, por lo tanto, el proceso de invasión es exclusivamente intra e intercelular (Vasselon, 1992). Las mutantes *ics A*, solo entran y se diseminan en las células adyacentes de las "isletas" pero no infectan a las que se encuentran centralmente. Esto sugiere, que la expresión del fenotipo *Ics* es necesaria para que se efectuara la colonización completa del epitelio celular. Por lo tanto en este modelo se demostró que éste fenotipo era necesario para observar el pasaje de una célula a otra, mientras que el fenotipo *Olm* fue responsable de la colonización intracelular (Kadurgamuwa, 1991).

La capacidad de la bacteria de diseminarse intracelularmente e infectar a las células adyacentes se refleja en la formación de placas en cultivo celular, donde el microorganismo invasivo que pasa de una célula a otra causa efecto citopático inmediato (Pál, 1989).

3.0 MARCADORES ASOCIADOS EN *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.

3.1 METABÓLICOS

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

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

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

Toledo (1980) propone la fermentación de la lactosa como prueba adicional para la identificación de EIEC.

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

Faundez (1988), analizó la fermentación de carbohidratos, la resistencia a antibióticos y el perfil de plásmidos de unas cepas de origen chileno, encontrando, a diferencia de los demás investigadores, gran variabilidad entre ellas, solo las *E. coli* O:143 presentaron biotipos y resistotipos similares con alta correlación con el perfil de plásmidos. Ellos mencionan que las pruebas con carbohidratos y aminoácidos no son útiles en la clasificación de EIEC.

3.2 ANTÍGENO SOMÁTICO.

La tipificación serológica del antígeno somático de la pared celular en el estudio de EIEC se han encontrado 12 serogrupos: O:28ac, O:29, O:112ac, O:115, O:124, O:135, O:136, O:143, O:144, O:152, y O:164 (Cheasty y Rowe, 1983).

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

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

En Chile, Faundez (1988), encontró que las cepas de EIEC aisladas de su población concordaban con los patrones característicos propuestos para las cepas invasivas de *E. coli*, a excepción de una cepa que fue capaz de descarboxilar a la lisina con antígeno somático O:28ac, junto con dos cepas móviles pertenecientes al grupo O:28ac y O:124.

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

La identificación de EIEC de *Shigella* spp desde un punto de vista clínico no es distinguible, ya que ambos organismos producen una enfermedad con cuadro clínico similar, pero desde el punto de vista epidemiológico es esencial.

3.3 PRODUCCIÓN DE QUERATOCONJUNTIVITIS EN COBAYO O PRUEBA DE SERENY.

La prueba de Sereny se considera como la prueba más completa para el análisis de la invasividad, pues es indispensable que la bacteria posea todos los genes completos del genóforo bacteriano y del plásmido de 120-140 MDa, por lo tanto, si se producen mutaciones en estos genes es posible inactivar la reacción de Sereny (Okamura,1983).

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

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

3.4 INVASIÓN A LA LÍNEA CELULAR HEP-2.

El primer paso en la patogénesis de la disentería bacilar es la penetración en las células epiteliales por el patógeno ya que las cepas bacterianas que han perdido ésta capacidad son avirulentas (Lebrec, 1964). El modelo experimental clásico para el análisis de la invasividad en *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva es la prueba de Sereny, este examen y la invasividad en cultivo celular se consideran dos modelos independientes para medir el mismo fenómeno; el primero solo evalúa la capacidad de la bacteria para penetrar a la célula y el segundo, mide la penetración y la multiplicación del microorganismo con la subsecuente reinfección a las células vecinas (Okamura y Nakaya, 1977).

La invasividad de *E. coli* en células HeLa se describió por Melhman (1977), mencionando que las células hospederas deberán internalizar por lo menos cinco bacterias (Lawson, 1985; Small, 1987). Estos valores se basan en el análisis microscópico cuidadoso que permite decidir si una bacteria es invasiva o no, pero existe el riesgo de confundir la invasividad con la adherencia que pueda exhibir el microorganismo y que ésta pudiera ser considerada como una prueba positiva.

Donenberg (1989), diseñó un método para evaluar invasividad en células HEP-2 agregando ampicilina y gentamicina al medio de cultivo después del período de incubación de la bacteria con la célula, con el fin de eliminar a todas los microorganismos que no fueron capaces de penetrar la monocapa celular. Así se eliminaría cualquier bacteria que se haya adherido a la célula. Se rompen las células con tritón x 100 al 1% al final de la prueba, liberando así a las bacterias intracelulares. El criterio invasivo es cuantitativo ya que las bacterias

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

Vesikari (1982), propuso en un trabajo con *Yersinia enterocolitica*, centrifugar la monocapa celular infectada a 1000 rpm por 10 min para acortar el tiempo de infección, aumentar la adherencia, toxicidad e invasividad. Este método fue probado, por los mismos autores con *E. coli* invasiva, comparando con los métodos tradicionales de invasión. Encontró que el porcentaje de infectividad en los métodos tradicionales fue del 0.5 al 5%, y usando la técnica con centrifugación se incrementó mas del 42%. La multiplicación que se detectó en las células con dos horas de incubación fue la misma que la observada después de varias horas. Las cepas que solo tuvieron la capacidad de adherirse a la célula, no lograron penetrar la monocapa celular por lo que no hubo falsos positivos. El método se consideró seguro ya que no interfirió con los resultados en la prueba de invasividad (Vesikari, 1982).

4.5 CAPTACIÓN DEL COLORANTE ROJO CONGO.

Sasakawa (1986), utilizó la prueba de la captación del colorante rojo Congo como un marcador de hidrofobicidad y observó que había relación con la captación del hierro del medio, ya que se ha encontrado que las cepas virulentas son más hidrófobas que las avirulentas. Así, las cepas virulentas que unen el colorante desde un medio sólido, van a producir colonias pigmentadas de color rojo (Crb+) y las avirulentas de color blanco (Crb-). Además, las cepas capaces de dar la prueba de rojo Congo presentan un aumento en la capacidad de *E. coli*, *Salmonella* y *S. flexneri* de adherirse a las células intestinales en animales experimentales (Quadri, 1988).

La captación del rojo Congo se ha asociado también con la adquisición del hierro ya que el rojo Congo se une al hierro del medio. *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva lo necesitan para realizar sus funciones metabólicas y lo obtienen del hospedero por la producción de sistemas quelantes de "alta afinidad" a los que se les denomina sideróforos (Otto, 1992).

Tigyl (1992), encontró una mutante de *S. flexneri* incapaz de sintetizar aerobactina (iuc-) pero con características virulentas en embrión de pollo, en ojo de cobayo y con la capacidad de invadir células HeLa. Esta mutante no captó el hierro ligado a lactoferrina o transferrina, pero utilizó a la hemina como fuente única de hierro. Esto sugiere que los compuestos hemo pueden servir como fuente de hierro para la bacteria *in vivo*.

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

Maurelly (1984), y Sakai (1986), reportaron que los genes necesarios para la captación del colorante rojo Congo se encuentran en el plásmido pInV en *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva. Pérdidas o deleciones en este plásmido resultan en la producción de cepas avirulentas con fenotipos Crb-. Además, encontraron que la expresión de la captación del rojo Congo, al igual que la virulencia, están termorreguladas en *S. flexneri* y que la unión del colorante solo se presenta cuando el organismo crece a 37 °C.

La infectividad de EIEC crb+ en células HeLa aumenta cuando se agrega hemina. Así, *in vivo*, las bacterias podrían utilizar las moléculas del grupo hemo ó

similares que se encuentran presentes en los alimentos digeridos parcialmente en el lumen intestinal. El complejo bacteria-hemo podría unirse a un receptor celular intestinal responsable de la captación del grupo hemo para así incrementar la interacción con las células del huésped (Daskaleros y Payne, 1987).

A diferencia de los reportes anteriores, Albert y Leach (1989), encontraron que no había correlación entre la captación de rojo Congo e invasividad en EIEC. Probaron 292 muestras de origen clínico y aislaron 21 cepas de *E. coli* rojo Congo positivas. Bioquímicamente éstas fueron lisina descarboxilasa positiva, lactosa positiva y la mayoría fueron móviles. Y ninguna hibridó con una sonda que emplea un iniciador (primer) obtenido a partir del gene pINV (Wood, 1986). Finalmente concluyen que la unión a rojo Congo no denota enteroinvasividad.

Spears (1992), encontró baja correlación entre la captación del rojo Congo y el ensayo de letalidad en embrión de pollo y concluye también en que no es una buena prueba para medir virulencia.

3.6 PLÁSMIDO pInv DE *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.

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

1. El plásmido pInv está invariablemente presente en cepas virulentas de *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva (Harris, 1982).

2. La pérdida de éste plásmido está acompañada de la conversión a avirulencia (Falkow, 1987).

3. La virulencia se reconstituye al readquirir las cepas el plásmido de alto peso molecular (pInV) a partir de especies homólogas mediante ensayos de conjugación (Maurelli, 1985).

La asociación entre el pInV y la enteroinvasividad en *E. coli* fue reportada por Harris (1982). Encontraron que la técnica de Birnboim y Doly es la única técnica que permite evidenciar el plásmido de 230 Kb o 140 MDa.

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

Maurelli (1985), reportó que la técnica rápida de extracción de plásmidos propuesta por Kado y Liu (1981), puede utilizarse para la detección del plásmido pInV, y que el plásmido de 230 Kb está íntimamente ligado a la producción de queratoconjuntivitis en cobayos (Prueba de Sereny).

Deleciones en el plásmido de 230 Kb se asocian con la pérdida de la capacidad para penetrar a las células HeLa (Maurrelli, 1985). A través de mutagénesis dirigida usando inserciones con Tn5, se identificaron tres fragmentos *EcoRI* diferentes del pWR100 (plásmido invasivo) los cuales codifican para las funciones necesarias en la invasión de células HeLa. Estos fragmentos *EcoRI* no son contiguos. El mapeo con enzimas de restricción demostró una secuencia común entre ellos de 37 Kb, que define la secuencia mínima necesaria para la expresión del fenotipo invasivo. El mapeo de inserciones específicas con Tn5, demostraron que hay dos regiones separadas de esa secuencia: del lado izquierdo un fragmento *EcoRI* de 7.6 Kb y un fragmento del lado derecho *Sal I* de 16.1 Kb capaces de producir invasividad en cultivo celular. Estas clonas no producen queratoconjuntivitis en una prueba de Sereny y fallan en la formación de placas líticas en cultivo celular, posiblemente porque no se clonó toda la secuencia necesaria para la expresión completa del fenotipo invasivo, o porque los genes virulentos clonados no fueron expresados por los plásmidos recombinantes (Small, 1988).

3.7 HEMAGLUTININA MANOSA-RESISTENTE.

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

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

II. JUSTIFICACIÓN

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

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva aisladas en México.

OBJETIVOS PARTICULARES.

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

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

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

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

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

IV. MATERIAL Y METODOS.

1.0 CEPAS BACTERIANAS.

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

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

Las cepas se conservaron en medio base de agar sangre (BAB) y se liofilizaron. Se probó pureza subcultivando en gelosa eosina-azul de metileno, y se seleccionaron cepas lisas con la prueba de vapor fluente (Lambden,1973).

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

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

- a. Fermentación de carbohidratos: ramosa, melobiosa, sacarosa, rafinosa, dulcitol y sorbitol.
- b. Descarboxilación de aminoácidos: ornitina, lisina y arginina
- c. Prueba de movilidad en tubo.

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo soya tripticaseína (TSB) a 37 °C por 24 h. Este cultivo se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland teniendo finalmente una densidad bacteriana de 1.5×10^7 UFC/ml.

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

La fermentación del carbohidrato, en base rojo de fenol, se consideró positiva cuando se observó el vire del indicador de rojo a amarillo.

La descarboxilación del aminoácido se consideró positiva cuando se observaron colonias pigmentadas de color púrpura o moradas.

3.0 DETECCIÓN DEL ANTÍGENO SOMÁTICO EN *Escherichia coli*.

La detección del antígeno somático se realizó por aglutinación en tubo de acuerdo al CDC de Atlanta (Lambden, 1973) que consiste en el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo mediante el uso de antisueros que fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).

Preparación del antígeno.

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

Se seleccionaron colonias lisas (bacterias con pared celular intacta) a través del análisis en microscopio estereoscópico, y se comprobó por vapor fluente resembrando masivamente las colonias seleccionadas en placas de BAB y en 20 ml de TSB, que a las 6 h de incubación a 37 °C se sometieron a vapor fluente (2 lb de presión por 1 hora). A continuación, se dejó enfriar la suspensión bacteriana a temperatura ambiente y se incubó a 4 °C por 18 h para que las cepas lisas se sedimentaran uniformemente en el fondo del tubo y las rugosas formaron una malla producida por la aglutinación irregular de las paredes celulares de las bacterias que la forman.

Las cepas lisas se utilizaron para la aglutinación y las cepas rugosas se descartaron.

Preparación del antisuero.

Los antisueros fueron proporcionados por cortesía del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), y fueron los siguientes:

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

Estos sueros fueron preparados en el laboratorio de Control y Producción de Sueros y se diluyeron 1:20 con solución salina formalinizada al 6% para su uso.

Prueba serológica en tubo (reacción antígeno-anticuerpo).

Se tomaron 0.1 ml de la solución del antisuero diluido con 0.9 ml del antígeno preparado. Se agitó suavemente y se incubó en cámara húmeda a 50 °C por 24 horas. Se considero una aglutinación positiva por la formación de malla en el fondo del tubo, y una aglutinación negativa con la formación de botón (sedimentación en el fondo del tubo).

4.0 INVASIVIDAD EN CULTIVO CELULAR: HEP-2.

El ensayo de invasividad se realizó utilizando la línea celular HEP-2 de acuerdo a la técnica de Donenberg modificada (Donenberg, 1977), considerando la determinación del patrón de susceptibilidad a kanamicina y amikacina, la

preparación del inóculo bacteriano y del cultivo celular en microplaca, la infección de la monocapa celular y la cuenta viable de las bacterias invasivas.

Determinación del patrón de susceptibilidad a kanamicina y amikacina.

Este ensayo se realizó mediante la técnica de Kirby-Bauer (Ewing y Edwards, 1986) para comprobar la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a la amikacina o kanamicina, ya que se requirió de un antibiótico capaz de eliminar a las bacterias extracelulares que pudieran adherirse a la célula.

Se sembraron las cepas de *E. coli* problema, y como cepa testigo la cepa de referencia *E. coli* 25292 en 3 ml de caldo Mueller-Hinton. Se incubaron a 37 °C por 24 h. Después se ajustaron al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland con el mismo caldo de cultivo estéril para obtener 1.5×10^7 células/ml.

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

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

Preparación del inóculo bacteriano.

Se sembraron las cepas de *E. coli* en 3 ml de TSB a 37 °C por 18 h en agitación continua, y se incluyeron una cepa de *Shigella* como testigo positivo y las cepas

E. coli H-10407 y K-12 como testigos negativos. Después se tomó 0.1 ml de cada cultivo y se sembró en 3 ml de TSB estéril incubándose a 37 °C por 2 h en agitación para obtener un cultivo en fase logarítmica indispensable para la realización del ensayo de invasividad.

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

Preparación del cultivo celular en microplaca.

A partir de un cultivo de células HEP-2 (pase 145) con 100% de confluencia, se realizaron los microcultivos celulares en una microplaca de 96 pozos, con una cuenta celular de 8×10^4 células/ml. Se adicionó 200 µl de medio M-199 suplementado con glutamina 2mM, suero fetal de bovino al 10%, estreptomycin 100µg/ml y penicilina 100 µg/ml.

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

Infección de la monocapa celular.

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

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

Se centrifugó la microplaca infectada a 2500 rpm por 10 min y se incubó a 37°C por 3 h en atmósfera de CO₂ al 5%.

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

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

Se lisaron las células del cultivo utilizando 200 µl de Tritón X-100 al 1% en cada pozo para liberar a las bacterias intracelulares. Después de 20 min se tomaron 20 µl de cada pozo para realizar la cuenta viable por el método de Miles-Mishra (Ewing y Edwards, 1986).

Cuenta viable de las bacterias invasivas e interpretación.

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

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

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

5.0 PRUEBA DE SERENY.

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

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

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

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

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

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

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

Reacción positiva: Queratoconjuntivitis.

Reacción negativa: Efectos nulos, enrojecimiento ó inflamación.

6.0 CAPTACIÓN DE ROJO CONGO.

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

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

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

7.0 PERFIL DE PLÁSMIDOS.

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

El perfil de plásmidos se practicó a las cepas de *E. coli* que fueron positivas en la prueba de Sereny y/o cultivo celular, junto con las cepas captadoras del colorante rojo Congo. Se incluyeron las cepas de *Shigella flexneri 2a* como testigo positivo y *E. coli* K-12 como testigo negativo.

Se sembraron en agar Luria enriquecido con rojo Congo al 0.01% para seleccionar las colonias rojas (pCR+), y se resembraron en 5 ml de caldo Luria incubándose después a 37 °C por 18 h en agitación constante. Posteriormente se cosechó mediante centrifugación. Con este inóculo se procedió a la extracción de plásmidos por la técnica de Birnboim y Doly, 1979.

8.0 PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN.

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

8.1 Ensayo de hemaglutinación.

Se sembraron 13/39 cepas con características invasivas en placas de base de agar sangre, y se incubaron a 37 C por 24 h.

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

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

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

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

V. RESULTADOS

La tabla No 1 presenta los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas ensayadas para la búsqueda de un marcador metabólico relacionado con la invasividad y se observa que 37/39 (94%) cepas utilizaron la ramnosa como única fuente de carbono, la melobiosa 38/39 (97%), y el sorbitol fue fermentado por 39/39 (100%) de las cepas probadas y degradaron la sacarosa 21/39 (53%), rafinosa 31/39 (79%), y dulcitol 22/39 (56%).

En las pruebas con aminoácidos, de las 39 cepas de *E. coli* examinadas solo una no descarboxilo a la ornitina (cepa 268). En cuanto a la descarboxilación de la lisina, solo tres cepas, 1022,1064 y 1126 carecieron de la enzima necesaria para descarboxilarla como se muestra en la tabla No 2.

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

TABLA No 1. BIOVARES DE LAS 39 CEPAS DE *Escherichia coli*

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

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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA No 2 DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS DE ACUERDO A EDWARDS Y EWING PARA LAS 39 CEPAS DE *Escherichia coli*.

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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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

Los antígenos somáticos de la pared celular encontrados en las cepas ensayadas se muestran en la tabla No 3. A 5/39 cepas no se les practicó la prueba de aglutinación en tubo ya que presentaron una pared celular rugosa.

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

De las 39 cepas de *E. coli* examinadas para invasividad seis de ellas fueron capaces de penetrar a las células HEp-2: 268, 715, 1110, 1214, 1257, y 1427. Ninguna de estas cepas invasivas fueron lisina descarboxilasa negativa e inmóviles.

La tabla No 4 muestra los resultados obtenidos en la captación del rojo Congo. De 39 cepas trabajadas solo se obtuvieron 9 cepas rojo Congo +, las cuales mostraron colonias pigmentadas de color naranja y rojo.

Utilizando ratones CDI y cobayos adultos en la prueba de Sereny, no se detectó ninguna cepa positiva, solo se observó la producción de secreción e inflamación de los párpados con ligero enrojecimiento de la conjuntiva en los cobayos adultos, signos que no son considerados Sereny positivos, ya que solo la producción de queratoconjuntivitis se considera una prueba positiva.

**Tabla No 3. ANTIGENOS SOMATICOS ENCONTRADOS EN LAS CEPAS
Escherichia coli ENSAYADAS.**

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

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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TABLA No 4. CEPAS DE *Escherichia coli* CAPTADORAS
DEL COLORANTE ROJO CONGO AL 0.01%.**

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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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

En la figura No 3 se muestra el perfil de plásmidos de las cepas positivas en la prueba de rojo Congo, invasividad en cultivo celular (HEp-2), y/o Sereny, para detectar la presencia del plásmido de 230 Kb responsable de la capacidad invasiva en *E. coli*. Se observa claramente en las cepas Sereny positivas la presencia del plásmido de 230 Kb que posiblemente corresponda al plásmido de invasividad. En las demás cepas se detectaron varios plásmidos de diferentes pesos moleculares entre 23 Kb y 2Kb aproximadamente, exceptuando a las cepas 14, 777, 1077 y 1267 (rojo Congo positivas) que no presentaron plásmidos por esta técnica de extracción. Curiosamente, las cepas invasivas por cultivo celular presentaron cinco ó más bandas por debajo de 23 Kb en su perfil plasmídico mientras que la mayoría de las cepas captadoras del colorante presentaron un plásmido o ninguno. No se encontró un patrón común entre el perfil de plásmidos de las cepas invasivas en cultivo celular o las captadoras del rojo Congo ya que presentaron múltiples bandas de diferentes pesos moleculares, solo las cepas 1257 y 1427 muestran cierta homología en su perfil, ya que aunque las bandas de la cepa 1257 son 8, y las bandas de la cepa 1427 son 5, estas últimas corresponden en posición a 5 bandas de la cepa 1257.

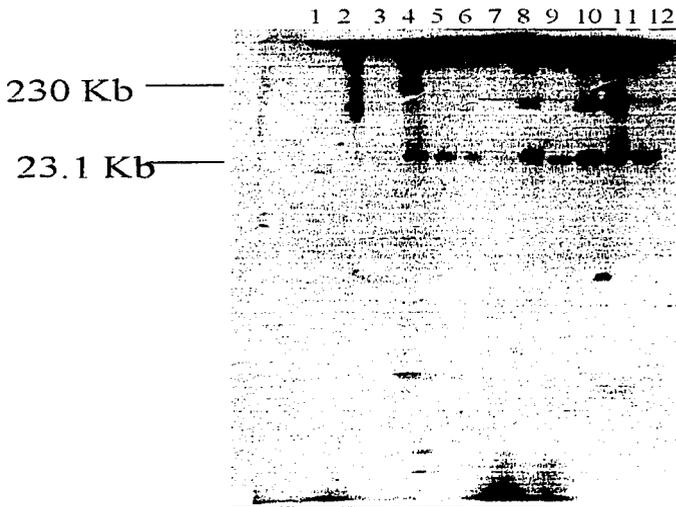


FIGURA No 3. Perfil de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* con características invasivas. Electroforesis en agarosa al 0.7%. A. h/Hind III, B. R-100, C. RP4, D. pDK9, E. 268, F. 1257, G. 1214, H. 1098, I. 1010, J. 1427, K. 715, L. 1110.

La tabla No 5 presenta 14/39 cepas que hemaglutinaron en presencia/ausencia de manosa. La cepa 268 no hemaglutinó bajo ninguna condición mientras que la cepa 1098 solo hemaglutinó en presencia de manosa. No se observó ningún patrón característico que denotara la influencia de la hemaglutinina manosa-resistente involucrada en la invasividad ya que cepas rojo Congo + que fueron no invasivas en cultivo celular o las que dieron Sereny + mostraron la capacidad de hemaglutinar eritrocitos humanos en presencia de manosa. Además, la cepa 268 que fue invasiva en las pruebas anteriores y presentó el plásmido pINV no hemaglutinó en presencia de manosa.

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

La tabla No. 6 muestra a las cepas de *E. coli* ensayadas que resultaron positivas en alguna (o algunas) pruebas de invasividad.

TABLA No 5. HEMAGLUTINACION DE 14/39 CEPAS DE *Escherichia coli* EN PRESENCIA/AUSENCIA DE MANOSA.

CEPA	Hemaglutinación sin manosa.	Hemaglutinación con manosa al 1%.
14	-	-
268	-	-
715	+	+
777	-	-
783	-	-
1010	-	-
1012	-	-
1077	-	+
1098	-	+
1110	+	-
1214	-	-
1257	-	-
1267	+	+
1427	-	-
Total positivas:	3/14	4/14

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA No 6. RESULTADOS CONDENSADOS DE LAS PRUEBAS DE INVASIVIDAD REALIZADAS EN LAS 39 CEPAS DE *E. coli* EVALUADAS.

CEPA	INVASIVIDAD EN HEp-2	SERENY BOJO CONGO	PLAQUEO pENV	HEMAGLUTINACION <small>(E. coli - E. coli)</small>
14	-	-	+	-
268	+	+	+	-
715	+	-	-	+
777	-	-	+	-
783	-	-	+	-
1010	-	-	+	-
1012	-	-	+	-
1077	-	-	+	+
1098	-	+	-	+
1110	+	-	+	-
1214	+	-	-	-
1257	+	-	-	-
1267	+	-	+	+
1427	+	-	-	-

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

VI. DISCUSIÓN.

En el estudio de las cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se realizaron diferentes pruebas encaminadas a la evaluación de la capacidad invasiva de la bacteria, a la búsqueda de un marcador metabólico característico para el diseño de una prueba de diagnóstico rápida y accesible (prueba serológica, rojo Congo, hemaglutinación), y se buscó la presencia del plásmido de 230 Kb (pINV) responsable del proceso invasivo.

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

La fermentación de la sacarosa, la rafinosa, el dulcitol y el sorbitol junto con la descarboxilación de la ornitina recomendados por Silva (1980) y Toledo (1983) tampoco presentaron valor como marcadores bioquímicos, ya que todas las cepas de *E. coli* ensayadas con características invasivas (Sereny+, invasividad en cultivo celular +, presencia del pINV+) dieron resultados muy variables que no se asociaron con la enteroinvasividad.

Toledo (1980 y 1983) entre otros, destacó a la lisina como el marcador metabólico en la detección de EIEC en base a su incapacidad de fermentarla, 3/39 cepas de *E. coli* ensayadas fueron lisina descarboxilasa negativa, sin embargo,

éstas tres cepas no fueron invasivas ni en Sereny ni en cultivo celular. Mientras tanto cepas que fueron lisina positivas presentaron propiedades invasivas: 6/39 en cultivo celular, 2/39 en Sereny y 9/39 captaron el rojo Congo, por lo que es probable que no exista correlación entre la descarboxilación de la lisina y la enteroinvasividad en EIEC en dichas cepas.

Estamos de acuerdo con los resultados reportados por Faundez (1988) en su estudio con cepas de *E. coli* invasivas de origen Chileno, ya que las pruebas bioquímicas con carbohidratos y aminoácidos no son útiles en la identificación de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

En la detección de EIEC por medio del antígeno somático no se obtuvieron serogrupos pertenecientes al grupo invasivo pues solo se obtuvieron serogrupos pertenecientes al grupo enterotoxigénico y enteropatogénico. Mientras que los serogrupos O:3 y O:7 no se encuentran reportados para *E. coli* patógena.

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

interesante analizar la posible producción de toxinas LT y ST por parte de *E. coli* 1110 para comprobar si además de poseer características invasivas puede producir estas toxinas clásicas del grupo enterotoxigénico de *E. coli*.

Puede ser que las cepas invasivas de *E. coli* 268 y 1098 puedan pertenecer a un nuevo serogrupo de *E. coli* enteroinvasiva no reportado aún, de la misma forma que Toledo (1980) aisló en Brasil una cepa de *E. coli* invasiva que no aglutinó con ningún suero contra los grupos patógenos de *E. coli*, designándola *E. coli* Sao Paulo hasta la dilucidación de su antígeno O. De la misma forma, Trevejo (1999) reportó un brote en California por *S. flexneri* con un serogrupo diferente, y se clasificaron como *S. flexneri* grupo provisional 89-141(CDC 3007-94).

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

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

que la hemaglutinina manosa resistente no fue necesaria para poder invadir el epitelio celular.

La cepa 715 que presentó la hemaglutinina manosa-resistente no fue invasiva por Sereny aunque sí logró penetrar la monocapa en cultivo celular. Es posible que la hemaglutinina, junto con otras moléculas, pudiera contribuir solamente a la adherencia hacia la célula y así facilitar la penetración.

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

Al analizar el perfil de plásmidos de las cepas invasivas encontramos que solo 2/39 cepas Sereny positivas presentaron el plásmido de 230 Kb al igual que Hale (1983) encontró en su trabajo.

Si la cepa 1098 tiene la información genética para invadir, e invade la córnea del cobayo ¿porqué entonces no invade la monocapa celular si es la prueba que evalúa los pasos iniciales de la invasión? Podría ser que esta cepa presentara una

disminución en su hidrofobicidad, ya que es rojo Congo negativa, que repercutiera en que no se adhiriera eficientemente o que no fuera eficazmente internalizada por la célula huésped, por lo que posiblemente requeriría un mayor tiempo de exposición con la célula, ya que si comparamos el tiempo que tardó en producirse la queratoconjuntivitis en la prueba de Sereny veríamos que se tardó dos días más que la cepa 268 o el testigo positivo. Puede ser que esta cepa tenga una pequeña mutación en algún gen involucrado en la síntesis de la proteína de 30 KDa que es codificada por el gene *vir F* y por lo tanto este alterado el control positivo de los genes *ipa* (para la producción de los polipéptidos Ipa) que haga la invasión mas lenta pero con igual eficacia que la cepa *E. coli* 268 o la *Shigella* ensayada como testigo positivo. Tal vez si se prolongara el periodo de incubación bacteria-célula por más tiempo (arriba de dos horas) la bacteria podría invadir la monocapa. O bien se investigaran otros modelos experimentales para evaluar que pudieran estar involucrados diferentes receptores en los dos modelos utilizados (Hale, 1991).

Las cepas de *E. coli* 715, 1110, 1214, 1257 y 1427 que solo penetraron a las células HEp-2, y fueron Sereny negativas, en su perfil plasmídico no se detectaron plásmidos de peso molecular alto, pero se observó la presencia de varias bandas de peso molecular por debajo de las 23 Kb. Es posible que algunas de estas bandas fueran plásmidos que codifican para funciones distintas como la resistencia a antibióticos, producción de toxinas, o también podríamos suponer que algunas de estas bandas pudieran ser producto de la degradación del plásmido pINV lo que justificaría que las cepas no pudieran presentar el fenotipo invasivo completo (el ser Sereny positivas) aunque pudieran invadir a células en cultivo ya que posiblemente alguna banda presentara intacta la información genética necesaria para penetrar a las células HEp-2 pero no para diseminarse en ellas.

Falkow (1987), utilizó un solo fragmento de 25 Kb del plásmido de 230 Kb pudieron restaurar la habilidad de una mutante de *Shigella* para entrar a las células epiteliales. Sasakawa (1986), usó cepas de *E. coli* mutantes en el gene *ics* A (contenido en el plásmido pINV) que al ensayarlas en la prueba de Sereny fueron negativas pero lograron invadir a las células en cultivo (como en nuestros resultados) con lo que demostraron que esta mutación no promueve la diseminación célula a célula, pero sí la colonización intracelular (fenotipo OIm + exhibido). Existe otra posibilidad, que el plásmido de 230 Kb se hubiera integrado en el genóforo bacteriano en estas cepas por lo que no se visualizo en el perfil de plásmidos, ya que Zagaglia (1991), encontró que el pINV es capaz de integrarse en el genoma bacteriano, por lo que en una extracción de plásmidos no se visualiza, aunque la cepa sea realmente invasiva.

Una última posibilidad es que las 6 cepas invasivas en cultivo celular inicialmente hayan albergado el plásmido de 230 Kb pero quizá con los pases de cultivo sucesivos se haya perdido.

Gordillo (1992), reportó un perfil plasmídico común en las cepas de EIEC aisladas de un brote en Houston, mientras que Wanager (1988), encontró que no existe un patrón plasmídico común asociado a dicha bacteria. En el perfil plasmídico de las cepas ensayadas en el presente trabajo coincidimos con Wanager, ya que no detectamos perfiles de plásmidos semejantes. Estos plásmidos pudieran ser de resistencia, ya que Navia (1999) reporta que los determinantes de resistencia a los antibióticos se encuentran en plásmidos de resistencia de bajo peso molecular, y que la diseminación de *Shigella* multirresistente en la población es una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial.

EPEC se ha considerado como un microorganismo no invasivo ya que no causa queratoconjuntivitis en cobayo como EIEC, *Shigella* y *Yersinia* (Miliotis, 1989). Moon (1983) y Cantley (1991) reportaron que *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) está también asociada con la penetración a la célula (Mathewson y Cravioto, 1989), la desorganización del citoesqueleto y la pérdida de los filamentos de actina principalmente en la zona citoplasmática apical del enterocito. Andrade (1989), reportó que la infección por EPEC en células HEP-2 difiere de la invasión por *Shigella* spp ó EIEC, ya que EPEC es Sereny negativo, además de que por microscopía óptica utilizando células HeLa infectadas con *Shigella* ó EIEC se detectaron bacterias diseminadas en el citoplasma después de la incubación por 5-8 h y las agrupaciones bacterianas no fueron detectadas en los estados tempranos de la infección. En el modelo patogénico de EPEC se propone que primero se lleva a cabo la adherencia a las células, después se produce esfacelamiento de la microvellosidad y secreción de fluido. A continuación, el gene *eae* codifica la intimina que produce las lesiones AE (attaching and effacing), las cuales están asociadas con alteraciones del citoesqueleto de los enterocitos afectados y la pérdida de la microvellosidad (Muhldorfer y Hacker, 1994). Es posible que las cepas de *E. coli* ensayadas que solo penetraron a las células HEP-2 pero Sereny negativas solo se hubieran internalizado a la célula por un fenómeno de AE, y que correspondieran al grupo de *E. coli* enteropatógena. Esto se podría confirmar realizando estudios de adherencia e inhibición de la adherencia en cultivo celular o usar sondas específicas contra *bfp* o *eae*.(Gomes, 1987 y Levine, 1988) así como subtificación genética (Karkkainen, 1996).

Es de suma importancia el diagnóstico etiológico de las infecciones invasivas, como el caso de la diarrea causada por EIEC, ya que se da la pauta para la

investigación epidemiológica y para el desarrollo de planes e implementación de medidas preventivas.

De acuerdo con nuestros resultados podemos decir que la prueba de Sereny sigue siendo el estándar de oro en invasividad, y que la detección del plásmido de 230 Kb es una medida útil para saber si una cepa de *E. coli* puede ser invasiva o no, a diferencia de las demás metodologías empleadas (serología, rojo Congo y marcadores bioquímicos) que no mostraron efectividad en la búsqueda de invasividad. Sería de gran utilidad el uso de sondas hacia el gen o genes de invasividad dirigidas hacia el DNA total de la bacteria, ya que así se detectarían los genes involucrados en invasividad aunque el plásmido pINV se haya insertado en el genoma o haya sufrido alguna pérdida de genes durante la extracción o almacenamiento, así se eliminarían esos posibles falsos negativos.

VII. CONCLUSIONES.

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

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

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

No se detectó relación entre la invasividad en cultivo celular (línea HEP-2) y la prueba de Sereny en cobayo, aunque esta última correlacionó con la presencia del plásmido pInv.

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

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

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Albert, J. and Leach, A. 1989. Lack of Correlation Between Congo Red Binding and Enteroinvasiveness in *Escherichia coli*. *Infect. Dis.* **160** (1): 169-170.
- Andrade, J. R., Da Veiga, V. F., Santa Rosa, M. and Suassunana, L. 1989. An Endocytic Process in HEP-2 Cells Induced by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **28**: 49-57.
- Birnbolm, H. C. and Doly, J. . 1979. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
- Cantley, M. R. and Moseley, S. L. 1991. HeLa Cell Adherence, Actin Aggregation, and Invasion by Nonenteropathogenic *E. coli* Possessing the *eae* Gene. *Infec. Immun.* **59** (11):3924-3929.
- Cheasty, T. and Rowe, B. 1983. Antigenic Relationships Between the Enteroinvasive *Escherichia coli* O Antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O Antigens. *J. Clin. Microbiol.* **17** (4): 681-684.
- Colonna, B., Casalino, M., Fradimmi, P. A., Zagaglia, C., Naitza, S., Leonzi, L., Prosseda, G. and Nicoletti, M. 1995. H-NS Regulation of Virulence Gene Expression in Enteroinvasive *Escherichia coli* Harboring the Virulence Plasmid Integrated into the Host Chromosome. *J. Bacteriol.* **177**(16): 4703-4712.
- Daskaleros, P. and Payne, S. 1987. Congo Red Binding Phenotype Is Associated with Hemin Binding and Increased Infectivity of *Shigella flexneri* in the HeLa Cell Model. *Infec. Immun.* **55** (6): 1393-1398.
- Day, N. P., Scotland, S. M. and Rowe, B. 1981. Comparison of an HEP-2 Tissue Culture Test with the Sereny Test for Detection of Enteroinvasiveness in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. *J.Clin Microbiol.* **13** (3): 596-597.
- Donsenberg, M. S., Domshue-Ralfe, A. and Kusch, G. 1977. Epithelial Cell Invasion: of EPEC Associated with the EPEC Adherence Factor. *J. Infect. Dis.* **160** (3): 452-459.

- Donohue-Roffe, A., Acheson, D. and Kusch, G.** 1991. Shiga Toxin: Purification, Structure, and Function. *Rev. Infec. Dis.* **13** (Suppl 4): S293-S297.
- Elsinghorst, E. and Kopecko, D.** 1992. Molecular Cloning of Epithelial Cell Invasion Determinants from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infec. Immun.* **60** (6): 2409-2417.
- Ewing, E. and Edwards, F.** 1986. The genus *Escherichia*. En "Identification of Enterobacteriaceae". 4th ed. Nueva York, Elsevier, 93-136 p.
- Falkow, S., Small, P., Isberg, R., Hayes, S. F. and Corwin D.** 1987. A Molecular Strategy for the Study of Bacterial Invasion. *Rev. Infec. Dis.* **9** (Suppl 5): S450-S455.
- Fasano, A.** 1997. Cellular Microbiology: How Enteric Pathogens Socialize with Their Intestinal Host. *ASM News.* **63** (5): 259-265.
- Fasano, A., Noriega, F., Maneval, D., Channaongeram, S., Russell R., Guandalini, S. and Levine, M.** 1995. *Shigella* Enterotoxin-1: An Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Active in Rabbit Small Intestine *in vivo* e *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **95**: 2853-2861.
- Faundez, G., Figueroa, G., Troncoso, M. and Cabello, M.** 1988. Characterization of Enteroinvasive *Escherichia coli* Strains Isolated from Children with Diarrhoea in Chile. *J. Clin. Microbiol.* **26** (5): 928-932.
- Finlay, B. and Cossart, P.** 1997. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. *Science.* **276**: 718-725.
- Goldberg, M. B. and Theriot, J. A.** 1995. *Shigella flexneri* Surface Protein IcsA is Sufficient to Direct Actin-based Motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**(14):6572-6576.
- Gomes, A., Toledo, M. R., Trabulsi, L., Wood, P. and Morris J.** 1987. DNA Probes for Identification of Enteroinvasive *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* **25** (10): 2025-2027.
- Gordillo, M. E., Reeve, G. R., Pappas, J., Mathewson, J. J., DuPont, H. L. and Murray, B. E.** 1992. Molecular Characterization of Strains of Enteroinvasive *Escherichia coli* O143, Including Isolates from a Large Outbreak in Houston, Texas. *Infec. Immun.* **30** (4):889-893.
- Hale, T.** 1991. Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. *Microbiol. Rev.* **55** (2): 206-222.

- Hale, T., Sansonetti, P., Schad, P., Austin, S. and Formal, S.** 1983. Characterization of Virulence Plasmids and Plasmid-Associated Outer Membrane Proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. *Infec. Immun.* **40** (1): 340-350.
- Harris, J. R., Wachamuth, I. K., Davis, B. and Cohen, M.** 1982. High-Molecular-Weight Plasmid Correlates with *Escherichia coli* Enteroinvasiveness. *Infec. Immun.* **37** (3): 1295-1298.
- Islam, D., Wretting, B., Hammarström, L., Christensson, B. and Lindberg, A.** 1996. Semiquantitative Estimation of *Shigella* Antigen-Specific Antibodies: Correlation with Disease Severity During Shigellosis. *APMIS.* **104** (7): 567-574.
- Kado, C. I. and Liu, S. C.** 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* **15** (3): 1365-1373.
- Kadurgamuwa, J., Rhode, M., Whland, J. and Timmis, K. N.** 1991. Intercellular Spread of *Shigella flexneri* through a Monolayer Mediated by Membranous Protrusions and Associated with Reorganization of the Cytoskeletal Protein Vinculin. *Infec. Immun.* **59** (10): 3463-3471.
- Karkkainen, V. M., Kauppinen, J., Hakelimo, R. and Katila, L.** 1996. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of *E. coli* Strains: Comparison of urinary and concomitant blood isolates of urosepsis patients. *APMIS.* **104** (6): 437-443.
- Knutton, S., Williams, P., Loyd, D., Candy, D. and McNeish, A.** 1984. Ultrastructural Study of Adherence to and Penetration of Cultured Cells by Two Invasive *Escherichia coli* Strains Isolated from Infants with Enteritis. *Infec. Immun.* **44** (3): 599-608.
- Kopecko, D. J., Baron, L. S. and Bayase, J.** 1985. Genetic Determinants of Virulence in *Shigella* and Dysenteric Strains of *Escherichia coli*: Their Involvement in the Pathogenesis of Dysentery. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **118**: 71-92.
- Labrec, E., Schneider, H., Magnani, T. and Formal, S.** 1984. Epithelial Cell Penetration as an Essential Step in the Pathogenesis of Bacillary Dysentery. *J. Bacteriol.* **88** (5): 1503-1518.
- Lambden, A.** 1973. Applications and Evaluation Methods for Laboratory Immunological and Microbiological Reagents, Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents. 4th ed. E. U., DHEW, PHS, HSMHA, CDC.

- Lawson, M., Burke, V. and Chang, B.** 1985. Invasion of HEp-2 Cells by Fecal Isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Infec. Immun.* **7** (3): 680-683.
- Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* That Cause diarrhoea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155** (3):377-388.
- Levine, M. M., Prado, V., Robins-Browne, R., Nataro, J., Vial, P. and Tall, B.** 1988. Use of DNA Probes and HEp-2 Cell Adherence Assay to Detect Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **158** (1):224-228.
- Lindberg, A., Kärnell, A. and Weintraub, A.** 1991. The Lipopolysaccharide of *Shigella* Bacteria as a Virulence Factor. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl 4): S279-284.
- López, J.** 1988. Diarreas Bacterianas: Estudio de los mecanismos de Patogenicidad de Cepas de *Escherichia coli* en Poblaciones controladas. Invasividad y Patrón de Producción de lipasa, lecitinasa, proteasa y hemolisina. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán-UNAM.
- Mantis, N., Prévost, M. C. and Sansonetti, P.** 1996. Analysis of Epithelial Cell Stress Response during Infection by *Shigella flexneri*. *Infec. Immun.* **64**(7):2474-2482.
- Marquart, M., Pickling, W. and Piking, V.** 1996. Soluble Invasion Plasmid Antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri* Elicits Epithelial Cell Responses Related to Pathogen Invasion. *Infec. Immun.* **64**(10):4182-4187.
- Mathewson, J. J. and Cravioto, A.** 1989. HEp-2 Cell Adherence as an Assay for Virulence Among Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **159** (6):1057-1060.
- Maurelli, T. A.** 1992. *Shigella* Inside and Out Lifestyles of the Invasive and Dysenteric. *ASM News.* **58** (11):603-608.
- Maurelli, T. A., Blackmon, B. and Curtiss III, R.** 1984. Loss of Pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is Correlated with Loss of Virulence and Virulence-Associated Plasmid. *Infec. Immun.* **42** (1):397-401.

Maurelli, T. A., Baudry, B., D'Hauteville, H., Hale, T. and Sansonetti, P. J. 1985. Cloning of Plasmid DNA Sequences Involved in Invasion of HeLa Cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **49** (1):164-171.

Maurelli, T. A. And Sansonetti, P. J. 1988. Genetic Determinants of *Shigella* Pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:127-150.

Millotis, M. D., Koornhof, H. and Phillips, J. I. 1989. Invasive Potential of Noncytotoxic Enteropathogenic *Escherichia coli* in an In Vitro HeLa 407 Cell Model. *Infect. Immun.* **57** (7):1928-1935.

Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. and Giannella, R. 1983. Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. *Infect. Immun.* **41**: 1340-1351.

Muhldorfer, I. and Hacker, J. 1994. Genetic Aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial. Pathog.* **16**:171-181.

Nandadasa, H. G., Sargent, G. F., Britown, M. C. M., McNeish, A. S. and Williams, P. H. 1981. The Role of Plasmids in Adherence of Invasive *Escherichia coli* to Mammalian Cells. *J. Infect. Dis.* **143** (2):286-290.

Nataro, J. and Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev.* **11** (1): 142-201.

Nataro, J., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D., Guers, L., Levine, M. and Glenn Morris Jr., J. 1995. Identification and Cloning of a Novel Plasmid-Encoded Enterotoxin at Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. *Infect. Immun.* **63** (12): 4721-4728.

Navia, M., Capitano, L., Ruiz, J., Vargas, M., Vrassa, H., Schelemburg, D., Gascon, J. and Vila, J. 1999. Typing and Characterization of Mechanisms of Resistance of *Shigella* spp. Isolated from Feces of Children under 5 Years of Age from Ipakara, Tanzania. **37** (10):3113-3117.

Ochman H., Lawrence, J. A. and Groisman, E. A. 2000. Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation. *Nature.* **405**:299-304.

Okamura, N. and Nakaya, R. 1977. Rough Mutant of *Shigella flexneri* 2a That penetrates Tissue Culture Cells but Does Not Evoke Keratoconjunctivitis in Guinea Pigs. *Infect. Immun.* **17** (1): 4-8.

Okamura, N., Nagai, T., Nakaya, R., Murakami, M. and Hiatsune, K. 1983. HeLa Cell Invasiveness and O Antigen of *Shigella flexneri* as Separate and Prerequisite Attributes of Virulence to Evoke Keratoconjunctivitis in Guinea Pigs. *Infect. Immun.* **39** (2): 505-513.

Okeke, I. N., Lamikanra, A., Steinruck, H., and Kaper, J. B. 2000. Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Childhood Diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* **38**(1): 7-12.

Otto, B. R., Verweij-van Vught, A. M. and MacKarens, B. 1992. Transferrins and Heme-Compounds as Iron Sources for Pathogenic Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18** (3): 217-233.

Pál, T., Newland, J., Tall, B., Formal, S. and Hale, T. 1989. Intracellular Spread of *Shigella flexneri* Associated with the *kcpA* Locus and a 140-Kilodalton Protein. *Infect. Immun.* **57** (2):477-486.

Pál, T., Formal, S. and Hale, T. 1989. Characterization of Virulence Marker Antigen of *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27** (3): 561-63.

Quadri, F., Hossain, S., Cizaar, L., Haideer, K. And Sack, D. 1988. Congo Red Binding and Salt Aggregation as Indicators of Virulence in *Shigella* Species. *J. Clin. Microbiol.* **26** (7): 1343-1348.

Sakai, T., Sasakawa, C. and Yoshikawa, M. 1986. Molecular Cloning of a Genetic Determinant for Congo Red Binding Ability Which Is Essential for the Virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **51**(2): 76-82.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sansonetti, F. J., D'Hauteville, H., Ecobichon, C. and Pournet, C. 1983. Molecular Comparison of Virulence Plasmids in *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol.* **134** A: 95-98.

- Sansonetti, P. J.** 1991. Genetic and Molecular Basis of Epithelial Cell Invasion by *Shigella* Species. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl 14): S285-S292.
- Sasakawa, C., Kamata, K. and Yoshikawa, M.** 1986. Molecular Alteration of the 120-Megadalton Plasmid Associated with Loss of Virulence and Congo Red Binding Activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **51** (2): 470-475.
- Silva, R. M., Toledo, M. R. and Trabulsi, L.** 1980. Biochemical and Cultural Characteristics of Invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **11** (5): 41-444.
- Small, P. L., Inberg, R. and Falkow, S.** 1987. Comparison of the Ability of Enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* to Enter and Replicate within HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* **55** (7): 1674-1676.
- Small P. L. and Falcow, S.** 1988. Identification of Regions of a 230-Kilobase Plasmid from Enteroinvasive *Escherichia coli* that are Required for Entry into HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* **56** (1): 225-229.
- Spears, K. R., Wooley, R. E., Brown, J. and Nolan, L. K.** 1992. Failure of the Congo Red Dye Uptake Test to Discriminate Between Virulent and Avirulent Avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **36**:1012-1014.
- Taylor D., Echeverria, P., Pal, T., Sethabutr, O., Saiborasuth, S. and Cross, J.** 1986. The Role of *Shigella* spp, Enteroinvasive *Escherichia coli*, and other Enteropathogens as Causes of Childhood Disentery in Thailand. *J. Infect. Dis.* **153** (6): 1132-1138.
- Tigyl, Z., Kishore, A., MacLeland, J., Forsgren, A. and Nadiu, S.** 1992. Lactoferrin-Binding Proteins in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **60** (7): 2619-2626.
- Toledo, M. R., Alvariza, C., Murabovschi, J., Ramos, S. and Trabulsi, L.** 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes and Endemic Diarrhea in Infants. *Infect. Immun.* **39** (2): 586-589.
- Toledo, M. R., Reis, H., Almeida, R. and Trabulsi, L.** 1979. Invasive Strain of *Escherichia coli* Belonging to O Group 29. *J. Clin. Microbiol.* **9** (2): 288-289.

- Toledo, M. R., Reis, H. and Trabulsi, L. 1980. New invasive *Escherichia coli* Strain. J. Clin. Microbiol. 11 (4): 422-423.
- Toledo, M. R. and Trabulsi, L. 1983. Correlation Between Biochemical and Serological Characteristics of *Escherichia coli* and Results of the Sereny Test. J. Clin. Microbiol. 17 (3): 419-421.
- Trejejo, R. T., Abbott, S. L., Wolfe, M. L., Meshulam, J., Yong, D. and Flores, G. R. 1999. An Untypeable *Shigella flexneri* Strain Associated with an Outbreak in California. J. Clin. Microbiol. 37 (7): 2352-2353.
- Uchiya, K., Tobe, T., Komatsu, K., Suzuki, T., Watarai, M., Fukuda, L., Yoshikawa, M. and Sasakawa, C. 1995. Identification of a Novel Virulence Gene, *virA*, on the Large Plasmid of *Shigella*, Involved in Invasion and Intercellular Spreading. Mol. Microbiol. 17:241-250.
- Vargas, M., Gascon, J., Jaramenez de Anta, M. and Vila, J. 1999. Prevalencia of *Shigella* Enterotoxin 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Travelers Diarrhea. J. Clin. Microbiol. 37 (11): 3608-3611.
- Vasselon, T., Mounier, J., Hellio, R. and Sansonetti, P. J. 1992. Movement along Actin Filaments of the Perijunctional Area and De Novo Polymerization of Cellular Actin Are Required for *Shigella flexneri* Colonization of Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. Infect. Immun. 60 (3): 1031-1040.
- Vesikari, T., Brossmerka, J. and Mikki, M. 1982. Enhancement of Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in HEp-2 Cells by Centrifugation. Infect. Immun. 36 (2): 834-836.
- Wamager, A. R., Murray, G. E., Mathewson, J. J. and Du Pont H. L. 1988. Enteroinvasive *E. coli* in Travelers with Diarrhea. J. Infect. Dis. 158: 640-642.
- Wood, P., Morris, G., Pamela, J. R. and Kapper, J. 1986. Comparison of DNA Probes and the Sereny Test for identification of Invasive *Shigella* and *Escherichia coli* Strains. J. Clin. Microbiol. 24 (3): 498-500.

Yamada, M., Sasaki, C., Okada, N., Makino, S. and Yoshikawa, M. 1989. Molecular Cloning and Characterization of chromosomal virulence region *kcpA* of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 3 (2):207-213.

Yamagata, S., Sakay, T., Makino, S. and Yoshikawa, M. 1986. The Use of Mice in the Sereny Test as a Virulence Assay of *Shigellae* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun. 51 (2): 696-698.

Zagaglia, C., Casalino, M., Colonna, B., Conti, C., Calconi, A. and Nicoletti, M. 1991. Virulence Plasmids of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* Integrate into a Specific Site on the Host Chromosome: Integration Greatly Reduces Expression of Plasmid-Carried Virulence Genes. Infect. Immun. 59 (3):792-799.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

IX. GLOSARIO.

APOPTOSIS	Muerte celular programada
CEFALEA	Dolor de cabeza crónico
CITOPÁTICO	Destrucción de la célula
COBAYO	Cuyo, conejillo de las Indias
COLITIS	Inflamación del colon
DISENTERÍA	Inflamación del intestino grueso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FENOTIPO	Conjunto de caracteres hereditarios cuya aparición es debida a la existencia de genes que posee cada individuo perteneciente a determinada especie
GENÓFORO	Cromosoma bacteriano

GENOTIPO	Conjunto de factores hereditarios en un individuo
HIDROFOBICIDAD	Evasión al agua
HIPOTENSIÓN	Reducción de la tensión, especialmente sanguínea
ISQUEMIA	El flujo sanguíneo para un tejido es tan bajo que no es entregada a él la cantidad adecuada de oxígeno
PLÁSMIDO	DNA circular cerrado covalentemente que se encuentra fuera del genóforo bacteriano. Usualmente confiere resistencia a los antibióticos, codifica la producción de toxinas o fermentación de carbohidratos
QUERATOCONJUNTIVITIS	Inflamación de la conjuntiva con formación de precipitados de queratina en el ojo.
SÍNDROME	Conjunto de síntomas de una enfermedad