

26  
0.  
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

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.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a:

*Jorge Alejandro López Bermudez*



1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS.....	23
DISCUSION.....	31
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

## INTRODUCCION

Escherichia coli es un organismo aerobio y anaerobio facultativo, descrito por primera vez en 1886, por Paul Escherich. Es una bacteria común y numerosa en la flora fecal humana, se considera como patógeno oportunista cuando se encuentra fuera de su nicho ecológico. (7)

A pesar de que se sospechaba, no se tenían evidencias contundentes que pudieran afirmar que podía ser el agente etiológico de enfermedades diarreicas. Estudios epidemiológicos realizados en la década de los cuarentas, demostraron que E. coli era responsable de diarrea epidémica en niños. (23)

Estudios subsecuentes realizados con voluntarios humanos a quienes se infectó con la bacteria, dieron mayor evidencia del carácter patógeno de estos microorganismos. (22) A partir de esa fecha se han descrito cuatro grupos principales de E. coli diarreogénica, dentro de éstos se considera: E. coli enterotoxigénica (ETEC), este grupo posee la capacidad de producir dos enterotoxinas; una la toxina termolábil (LT), actúa sobre el sistema de adenilato ciclasa, es semejante a la toxina producida por Vibrio cholerae (7, 15), la otra una toxina termoestable (ST); Esta actúa sobre el sistema guanilato ciclasa y STb, que no actúa sobre sistema de nucleótidos cíclicos (15). E. coli enteroinvasiva (EIEC) estas tienen la capacidad de invadir células epiteliales de manera semejante a Shigella (15). E. coli enteropatógena (EPEC), ha sido caracterizada tradicionalmente por serología, hasta la fecha no se ha dilucidado claramente su mecanismo de patogenicidad; en la actualidad, se piensa que la adherencia y la producción de citotoxinas son parte fundamental de este (23). Este grupo se ha dividido en dos clases de acuerdo al patrón de adherencia que presenta en células Hep-2. Las cepas EPEC clase I exhiben adherencia localizada a células Hep-2 y las EPEC clase II, que exhiben adherencia difusa o no adherencia a células Hep-2 (25). E. coli enterohemorrágica (EHEC), es un grupo recientemente descrito, su mecanismo de patogenicidad se ha asociado con la producción de una potente citotoxina, estas cepas inicialmente se relacionaron a el serogrupo O157; H7 (32).

En los últimos años los conceptos sobre la forma en que E. coli puede causar diarrea se han aclarado, Levine y col (24) en base a la capacidad para causar diarrea empleando uno o varios mecanismos de patogenicidad, propuso una clasificación con la que la mayoría de los investigadores están de acuerdo; en ella, se señala la relación entre los serogrupos y los mecanismos de patogenicidad así como, el cuadro clínico probable que presenta cada grupo de acuerdo a dicho mecanismo. (Tabla 1)

Sakazaki y col (1967) (33) demostraron que algunas cepas de E. coli podían causar una enfermedad disintérica; casi coincidentalmente con el descubrimiento de ETEC. En 1971, Dupont y col (10) describieron que ciertas cepas de E. coli con capacidad invasiva daban un cuadro clínico disintérico de enfermedad

TABLA 1

Relación entre los serogrupos y los mecanismos de patogenicidad de E. coli así como el cuadro clínico probable.

<u>CATEGORIA DE E. COLI</u>	<u>CLASES</u>	<u>SINDROMES CLINICOS</u>	<u>SINDROMES EPIDEMIOLOGICOS</u>	<u>SEROGRUPOS O</u>
ETEC		Diarrea muy acuosa con gran pérdida de electrolitos	Diarrea infantil en países menos desarrollados; diarrea del viajero en adultos.	06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 085, 0115, 0128, 0148, 0159
EIEC		Diarrea; disentería	Afecta usualmente a adultos; algunos -- brotes por alimentos en neonatos.	0124, 0136, 0143, 0144, 0147, 0152, 0164, 029, 0167
EHEC		Diarrea sanguinolenta; colitis -- hemorrágica; síndrome urémico hemolítico	Brotes por alimentos en adultos y neonatos	0157
EPEC	Clase I	Diarrea infantil aguda y crónica	Brotes de diarrea en guarderías; casos esporádicos y epidémicos de diarrea infantil en comunidades; rara en adultos	055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128, 0142,
	Clase II	Diarrea infantil	Brotes de diarrea	018, 044, 0112, 0114

diarréica en voluntarios, semejante al ocasionado por Shigella. Este grupo de bacterias por lo tanto, se designaron E. coli disintérica o enteroinvasiva.

Las cepas de E. coli cuyo mecanismo de patogenicidad es la invasividad, se caracterizan por pertenecer a un número de serogrupos relativamente pequeño dentro de los que se incluyen: 028, 029, 042, 0112, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 (41). La destrucción de tejido ocasionada por las cepas de EIEC, produce un proceso inflamatorio que lleva a la formación de abscesos y úlceras en la mucosa colónica humana. Estos procesos destructivos dan lugar al cuadro clínico caracterizado por la presencia de moco y sangre en las heces diarréicas (1).

Las características de crecimiento en diferentes medios de cultivo fueron estudiadas por Silva y col (1980) (41), ellos observaron que el crecimiento de estas bacterias se inhibía en menor proporción en el medio de McConkey, que en otros medios de cultivo, señalando que era conveniente utilizar para algunas cepas el medio de Hecktoen agar (42). Las propiedades metabólicas de E. coli invasiva, se han estudiado poco sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en señalar que este grupo comparte vías metabólicas con Shigella (39) (Tabla 2).

La relación entre E. coli invasiva y Shigella no es sólo en cuanto a comportamiento bioquímico, sino que incluso comparten características antigénicas y genéticas por lo cual se incluyen en la misma tribu (39) (Tabla 3).

Los generos Escherichia y Shigella están intimamente relacionados y no se pueden diferenciar aún utilizando la hibridación de DNA. Estudios que involucran recombinación genética han permitido establecer algunas de las regiones del cromosoma de estas bacterias que participan en la expresión del fenotipo invasivo.

Gemski y col (1972) (13), basados en el análisis de híbridos de E. coli K-12 y Shigella flexneri 2a, encontraron que por lo menos existen dos regiones del cromosoma bacteriano indispensables para la virulencia. El locus kcp, que se asocia con la capacidad de Shigella flexneri para producir queratoconjuntivitis en cobayos y las regiones cercanas al operon "his" que codifican para antígenos somáticos "O" (12, 13)

Estos autores observaron además, que todos los híbridos rugosos eran incapaces de dar una prueba de Sereny positiva, sus resultados indican que no sólo se requiere de un LPS "liso" para la penetración y multiplicación en el interior de las células; sino que además la estructura del LPS, puede ser un factor determinante en este proceso (12).

Sansonetti y col (1983) (36), demostraron que cepas virulentas de Shigella flexneri, perdían su capacidad para producir queratoconjuntivitis en cobayos, cuando la región "pure" de E. coli K-12 reemplazaba su región homóloga en el cromosoma de Shigella; esto se debe a que el locus kcp, está intimamente unido a esta región (36). De la misma manera, híbridos de Shigella flexneri que incorporaron las regiones xyl y rha de -

TABLA 2

Biotipos de E. coli comensal, enteroinvasiva y Shigella spp

PRUEBA	<u>E. coli</u>	<u>EIEC</u>	<u>Shigella</u>
Descarboxilación de la lisina	88.7	0	0
Citrato	10.0	8.3	0
Movilidad	69.1	7.2 <sup>a</sup>	0
Lactosa	90.0	30.9	0.3
Gas de glucosa	91.1	73.2	0
Salicina	40.0	20.6	0
Ramnosa	82.3	57.7	16.6

Los resultados se expresan en % de positividad

a = Sólo la cepa 0124

Tomado de la referencia ( 39 ).

TABLA 3

Serogrupos 0 de EIEC y otros de Shigella

SEROGRUPO EIEC	RELACION IDENTICA	ANTIGENICA REACCION CRUZADA <sup>a</sup>
028		<u>S. boydii</u>
029		
042		
0112		<u>S. dysenteriae</u>
		<u>S. boydii</u>
0124 <sup>c</sup>	<u>S. dysenteriae</u>	
0136 <sup>d</sup>		<u>S. dysenteriae</u>
0143	<u>S. boydii</u>	
0144		<u>S. dysenteriae</u>
0152	<u>S. dysenteriae</u>	
0164		<u>S. dysenteriae</u>
0167		<u>S. boydii</u>

a = Indica reactividad cruzada señalando que es sólo parcialmente absorbible.

c = Serogrupo de EIEC más comunmente aislado.

d = Este serogrupo también da reacción cruzada con S. boydii (anti 0:136 aglutina S. boydii pero anti-S. boydii no aglutina 0:136)

Tomado de la referencia ( 39 ).



una *E. coli* ya no eran capaces de producir enfermedad ni en co bayos ni en monos (36).

Además de estas regiones, otro segmento del cromosoma de *Shigella* ligado a los locus *arg* y *mtl*, es necesario para la producción de líquido en el modelo de asa ligada y para producir una reacción positiva en la prueba de Sereny (36). Se realizaron diferentes intentos para obtener un híbrido virulento de *E. coli* K-12, utilizando las regiones cromosómicas asociadas con la virulencia en *Shigella*; sin embargo, los híbridos obtenidos no dieron una reacción positiva en la prueba de Sereny, aunque fueron capaces de penetrar la mucosa intestinal, pero su capacidad de multiplicación fue limitada (13). Estos resultados llevaron a los investigadores a la conclusión de que un factor ajeno al cromosoma bacteriano, debería participar en la producción de enfermedad.

Sansonetti y col (1982) (35) señalan que un plásmido de 140 MDa está relacionado con la virulencia en *Shigella*, al observar que variantes que habían perdido el plásmido resultaron avirulentas (35).

Hale y col (1983) (19) encontraron que este plásmido de *Shigella* presentaba una notable homología con otro plásmido, también de 140 MDa, presente en cepas de *E. coli* invasiva (19, 45). En otro estudio realizado por los mismos autores, empleando sistemas con minicélulas, observaron que las minicélulas a las cuales se les había incluido el plásmido, expresaban el fenotipo invasivo. Empleando sistemas de síntesis de proteínas con metionina S<sup>35</sup>, se observó que se producían 10 polipéptidos con una masa molecular de entre 12 y 62 Kda, sintetizados sólo en las minicélulas que contenían el plásmido asociado a la virulencia (19).

El inicio de una infección en células epiteliales, involucra una interacción célula-célula; es posible que los polipéptidos codificados por el plásmido de 140 MDa, se inserten en la membrana externa de los organismos invasivos funcionando como ligando, probablemente favoreciendo la fagocitosis de la bacteria por la célula hospedadora (19).

Maurelli y col (1985) (28), identificaron una región de 37 Kb del plásmido de 140 MDa, asociado con la virulencia; induciendo mutagénesis con el transposon Tn5 y clonando en un cósmido demostraron, que esta región de 37 Kb, contiene tres fragmentos que se identificaron al tratar con la enzima de restricción EcoRI, obteniéndose fragmentos con pesos aproximados de 7.6, 11.5 y 17 Kb. En estos fragmentos se encuentran todos los locus necesarios para producir la invasión a células epiteliales (28).

Empleando la técnica de inmunoelectrotransferencia ("Western blot") en las clonas obtenidas del cósmido mencionado, fue posible establecer que la síntesis de los 10 polipéptidos identificados por Hale y col (19), está codificada por la región de 37 Kb. Se observó también que la expresión de estos genes está termoregulada; cuando la bacteria se crece a 30°C, no se expresan los determinantes genéticos incluidos en esta región.

Una nueva incubación del microorganismo a 37°C restablece su fenotipo invasivo (18, 28).

La invasividad se presenta en un selecto grupo de microorganismos; para que un parásito invasivo pueda entrar en una célula hospedadora, se requiere de un reconocimiento y adherencia previa. Posteriormente para entrar a la célula hospedadora, el parásito puede ser captado pasivamente por ésta o en forma activa forzar su entrada utilizando su propia energía (27).

Hale y col (1979) (17), establecieron que en la infección de células epiteliales por Shigella, se requiere de actividad metabólica por parte de la bacteria; ya que cuando se trabajó con microorganismos no viables, éstos no eran observados en el interior de las células (17).

Knutton y col (1984) (22) mediante microscopía electrónica, estudiaron la adherencia de cepas de E. coli invasiva en cultivos de células HeLa y Hep-2. En este estudio encontraron que hemaglutininas presentes en la superficie de la bacteria, son fundamentales para interactuar con receptores presentes en la célula hospedadora (22). Estos mismos autores recientemente en 1987 (20), mediante un análisis ultraestructural de la superficie de una cepa EIEC, establecieron que una fimbria muy delgada, es la responsable de la hemaglutinación manosa-resistente a glóbulos rojos humanos; ésta además, permite a la bacteria adherirse a cultivos de tejidos y a las células en el borde en cepillo del colon en humanos (20, 22). Esta fimbria al parecer evita el efecto electrostático repulsivo, que opera en una distancia de 10 nm, entre la bacteria y la célula con lo cual el microorganismo esquivó factores de defensa del hospedador, tales como la capa de moco en la superficie de las células epiteliales, la cual puede ser penetrada por la estructura fina y circular de la fimbria (20).

Inman y col (1986) (21) utilizando una cepa EPEC, que expresaba los antígenos somáticos 3, 4 de Shigella, demostraron que la adherencia inicial de estas bacterias es específica a las células M que son una "ventana" de el sistema inmune en el intestino humano, se encuentran situadas en forma intercalada con las células epiteliales y su borde en cepillo es bastante irregular. Estas células presentan actividad fagocítica; por medio de vacuolas transportan el material fagocitado hacia las placas de Peyer, ahí un grupo de células del sistema inmune se encarga del reconocimiento y procesamiento del antígeno para la inducción de la respuesta inmune, si está fuese necesaria (21). Las cepas invasivas evitan su destrucción al liberarse de la vacuola en la que fueron incluidas por la célula M durante el proceso de penetración.

Hale y Formal (1981) (16) estudiaron el papel que podría tener la toxina de Shiga, producida por cepas de Shigella dysenteriae tipo 1 y la toxina semejante a Shiga producida por cepas de E. coli, ellos atribuyen a la acción de la toxina el efecto inmediato observado sobre la función celular, señalando que si la

toxina de Shiga inhibe la síntesis de proteínas en las células del colón con una eficiencia análoga a la observada "in vitro" de los microorganismos quedarían atrapados en células a punto de morir lo cual les permitiría continuar con su mecanismo de patogenicidad (4, 16).

Sin embargo, la mayoría de los estudios parecen indicar que la toxina de Shiga no es un factor determinante en la virulencia de las cepas invasivas. Sansonetti y col (1986) (37) mediante estudios de cinética de crecimiento intracelular, demostraron que cepas de E. coli portadoras del plásmido asociado a la virulencia que eran productoras de trazas de la citotoxina semejante a la toxina de Shiga ("Shiga-like"), presentaban un crecimiento mucho mayor que el de una cepa altamente productora de esta citotoxina pero carente del plásmido (37). Se demostró así que al parecer esta citotoxina no es responsable del daño y de la multiplicación intracelular de las cepas invasivas. Esto condujo a los autores a suponer que la capacidad de multiplicación intracelular de las bacterias, podría deberse a rompimiento de la vacuola fagocítica, probablemente por enzimas hidrolíticas, lo cual permitiría a la bacteria establecerse en el citoplasma de la célula.

La producción de enzimas como parte del mecanismo de daño - empleado por las bacterias, es un factor de virulencia importante que ha sido descrito en diferentes microorganismos (1, 9, 46).

Se considera un paso esencial en la producción de enfermedad, la síntesis de proteasas por Pseudomona aeruginosa aislada de infecciones pulmonares (9) o la misma Shigella dysenteriae aislada de materia fecal capaz de producir mucinasas que hidrolizan los azúcares de la mucina que baña las células epiteliales del colón (1).

Winkler (1982) (46) describió la producción de una fosfolipasa A, por Rickettsia prowasekii (microorganismo invasivo), la cual hidroliza los glicérofósfolípidos de la membrana de células L-929, pudiendo provocar la muerte celular cuando se empleaban aproximadamente 50 microorganismos viables por célula. Se considera que esta enzima pudiera ser producida por la bacteria "in vivo" y favorecer el escape bacteriano del fagosoma (46).

E. coli enteroinvasiva de manera similar, elabora una fosfolipasa, la cual ha sido evidenciada en el modelo de hemólisis por contacto. En este sistema se mide la cantidad de hemoglobina liberada a 545 nm cuando se induce la unión de bacterias y eritrocitos (37). La producción de esta enzima no se observa en placas de gelosa sangre, este hecho hace pensar en la necesidad de receptores específicos o bien de un microambiente adecuado que favorezca la producción de la enzima. En el modelo empleado, la centrifugación facilita la interacción bacteria-célula eliminando la necesidad de receptores para EIEC -

en la superficie de los eritrocitos, que no son el hospedador natural de este grupo de bacterias. Sansonetti y col (1986) -- ( 37 ) demostraron que bacterias invasivas que había perdido el plásmido de 140 MDA, no producían lisis de eritrocitos en el modo de hemólisis por contacto; lo cual, habla de que los determinantes genéticos necesarios para la producción de esta enzima probablemente se encuentren codificados en tal plásmido ( 37 ).

Aunque una visión convencional indica que el interior de una célula animal presenta un medio extremadamente rico para el crecimiento de un microorganismo, no existe evidencia convincente de que este fenómeno se presente ( 27 ). Debido a que la mayoría del hierro corporal se localiza intracelularmente como ferritina, hemosiderina o grupo hemo y extracelularmente se encuentra unido a proteínas captadoras de hierro de alta afinidad como la lactoferrina y la transferrina, la concentración de -- hierro en los tejidos del hospedador está restringida. Las bacterias patógenas se multiplican exitosamente bajo tales condiciones, debido a que han desarrollado mecanismos para asimilar tal elemento del medio.

Algunas bacterias patógenas presentan sistemas para captación de hierro de muy alta afinidad, en éstos una característica esencial es la síntesis y secreción de sideróforos de manera conjunta con la producción de proteínas de membrana externa ( 14 ). Los compuestos de hierro así obtenidos favorecen entonces el desarrollo de la bacteria ( 14, 30, 43 ).

Griffiths y col (1985) ( 14 ) examinando cuatro cepas de EIEC -- encontraron que cada una de ellas producía aerobactina (agente sideróforo) y una proteína de membrana externa de 76 K, durante su crecimiento en un medio pobre en hierro ( 14 ). Identificaron además la región del cromosoma bacteriano que codifica tanto para la aerobactina como para la proteína de 76 K, la cual -- sirve como receptor del sideróforo que capta el hierro. Tal región se localiza en un sitio cercano a los locus arg-mtl del -- cromosoma de Shigella ( 14 ).

Después de la multiplicación intracelular la bacteria sale de -- la célula hospedadora y debe sobrevivir durante un período suficiente, hasta que el microorganismo invade una nueva célula -- hospedadora ( 27 )

El mecanismo de patogenicidad propuesto para EIEC y Shigella se ilustra en la figura 1.

La capacidad de algunos microorganismos para invadir células epiteliales se ha hecho evidente empleando modelos "in vivo" e "in vitro"; entre los primeros se encuentra la prueba de Sereny, que fué la primera que se describió. Esta consiste en colocar una gota de una suspensión bacteriana con aproximadamente 10<sup>10</sup> bacterias por mililitro, en la conjuntiva de cobayos, buscando señales de conjuntivitis acompañada de secreción purulenta y edema a las 24, 48 y 72 horas ( 39 ).

Yamagata (1986) ( 48 ) estudió la posibilidad de realizar la prueba de Sereny en ratones, por las ventajas que estos animales presentan en su manejo. Encontró que aunque la reacción desaparece más rápidamente y no es tan pronunciada como en los cobayos, las cepas EIEC dieron una reacción positiva en la conjuntiva de los ratones ( 48 ).

Powell y Finkelstein (1978) ( 29 ), señalaron que era posible identificar diferencias en el mecanismo de virulencia de E. coli mediante la inoculación alantoidea de embriones de pollo con 13 días de edad ( 29 ).

Nandasa y col (1981) ( 31 ) utilizando cepas de EIEC aisladas de muestras diarreicas, demostraron que estas cepas eran capaces de adherirse a la superficie de células Hep-2 y células HeLa, en condiciones que normalmente eliminaban bacterias no adherentes ( 31 ). Esta observación abrió la posibilidad de utilizar el cultivo de células para la estandarización de una prueba de invasividad. En el ensayo de invasividad en cultivo de tejidos, se incuba un inóculo ajustado de la bacteria a probar con una monocapa celular, durante un período de tiempo suficiente, que permita a las bacterias invasivas penetrar al interior de las células. Posteriormente, se agregan los reactivos necesarios para eliminar a las bacterias que sólo se encuentran adheridas a la superficie de la monocapa celular. Por último, tras una intensa serie de lavados se desintegra la monocapa celular y se busca la presencia de las bacterias en el interior de las células. Un método indirecto bastante eficaz para tal efecto, es la realización de cuentas viables bacterianas a partir de la siembra de la suspensión de células ( 37 ).

Day y col (1981) ( 8 ) en un estudio comparativo de la prueba de invasividad en cultivo de tejidos y la prueba de Sereny, demostraron la efectividad del método en cultivos celulares para la identificación de cepas de EIEC y de Shigella ( 8 ).

En años recientes la hibridación de DNA, ha resultado ser un método útil para la identificación de diversos grupos de bacterias. Este método incluye la clonación de un fragmento de DNA que por su homología con el material genético que se quiere analizar, existe reconocimiento de bases y da la reacción de hibridación correspondiente. De acuerdo al porcentaje de homología se puede inferir si las regiones hibridadas son homólogas o no y de esta forma establecer la identidad de la bacteria. Este procedimiento ha permitido identificar la pre-

sencia de caracteres genéticos, que dan lugar al fenotipo patógeno característico en diferentes grupos de bacterias. La identificación de regiones críticas del plásmido asociado -- con la virulencia en EIEC, como el fragmento de 37 Kb, descrito por Maurrelli y col ( 28 ), permitió a Boileau y col ( 47 ) y a Small y Falkow ( 47 ), diseñar en forma independiente sondas de DNA para la identificación de cepas invasivas de E. coli ( 47 ).

La producción de enzimas hidrolíticas como ya se mencionó anteriormente, parece ser un factor determinante en la virulencia de EIEC, por lo cual el reconocimiento de un patrón enzimático, podría emplearse como método alternativo para la caracterización de estas bacterias.

Las enzimas hidrolíticas pueden ser liberadas o estar en un medio celular interno, su acción resulta en el desdoblamiento o reducción del tamaño molecular del sustrato; generalmente cambian una sustancia del estado coloidal al estado cristalóide ( 3 ).

Basados en el hecho de que las enzimas hidrolíticas degradan un sustrato en particular, es posible identificarlas al sembrar -- una bacteria en un medio con un sustrato conocido, se puede examinar el agar alrededor de las colonias bacterianas para observar si la producción de estas enzimas lo ha modificado, generalmente se produce un halo de aclaramiento y así se puede establecer la producción de la enzima por la bacteria ( 2 ). Sin embargo, no debe olvidarse la posibilidad de que la producción de algunos productos como una enzima puede ser favorecida sólo en un medio ambiente intracelular, lo cual haría difícil la caracterización de estas sustancias por métodos "in vitro".

En México, la enfermedad diarreica es un padecimiento de gran importancia que ocasiona serios problemas a un sector importante de la población ( -- ). El establecer la etiología de las diarreas bacterianas, es de gran importancia para poder valorar los efectos nocivos que diferentes bacterias pueden ocasionar a la economía del hospedador.

La disentería bacilar esta asociada a las 4 especies de Shigella así como a ciertos serogrupos de E. coli que poseen antígenos somáticos "O", que dan reacción cruzada con Shigella. Esta enfermedad, es una causa importante de daño en los humanos y muestra una marcada distribución geográfica. S. dysenteriae, S. flexneri; así como E. coli invasiva se aíslan con mayor frecuencia en países poco desarrollados y causan un cuadro severo. En contraste, S. sonnei se aísla con mayor frecuencia en países industrializados y el cuadro que provoca es menos severo ( 1 ).

E. coli ocupa un lugar muy importante en la etiopatogenia de las diarreas por su elevada frecuencia de aislamiento sobre todo en niños y hospedadores inmunocomprometidos. Se trata de una bacteria que se presenta como comensal en su hospedador, sin embargo, como se ha mencionado, ciertos serogrupos característicos son capaces de producir enfermedad. Establecer los grupos patógenos resulta importante para poder implementar métodos efec-

tivos que lleven al control de estos microorganismos.

La prueba de invasividad en cultivo de tejidos ha resultado ser un método efectivo y confiable para la identificación de EIEC, sin embargo, se trata de un ensayo que no es accesible a la generalidad de los laboratorios. Con el fin de estandarizar un método de bajo costo y de fácil acceso a cualquier laboratorio se pensó en la posibilidad de establecer un patrón enzimático para la caracterización de cepas de EIEC. Por otro lado, la realización de estos ensayos enzimáticos, complementaría en alguna medida nuestros conocimientos acerca del mecanismo de patogenicidad de las bacterias invasivas.

## OBJETIVOS

- Determinar la capacidad invasiva de cepas de Escherichia coli aisladas de niños con y sin diarrea, utilizando la prueba de invasividad en cultivo de células HeLa.
- Investigar el patrón enzimático (lipasa, lecitinasa, gelatinasa y caseínasa) de las cepas que resulten positivas en la prueba de invasividad.
- Investigar la capacidad de las cepas invasivas para la captación del colorante rojo Congo.



## MATERIAL Y METODOS

## - CEPAS

69 cepas obtenidas de la materia fecal de niños con diarrea - aisladas en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional.

305 cepas obtenidas de la materia fecal de niños sin diarrea aisladas en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional.

26 cepas obtenidas de niños del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, de los que no se cuenta con los datos referentes a su cuadro clínico.

Escherichia coli invasiva 9001

Escherichia coli No invasiva H-10407-P

Obtenidas del cepario del Laboratorio de Diagnóstico y Referencia Depto. de Microbiología. ENCB. IPN.

Todas las cepas utilizadas en este trabajo se encontraban conservadas en un medio altamente nutritivo "gelosa especial" ( -- ) a temperatura de 2 a 4°C y forman parte de la colección microbiana empleada en el proyecto.

CONACYT: PCCBBNA-021504

DEPI: 862541

## - MEDIOS DE CULTIVO

## a) Medios para crecimiento bacteriano:

Agar de soya tripticaseína (Bioxon de México, S.A. de C.V.)  
 Caldo de soya tripticaseína (Bioxon de México, S.A. de C.V.)  
 Agar Mueller-Hinton (Bioxon de México, S.A. de C.V.)  
 Agar McConkey (Bioxon de México, S.A. de C.V.)  
 Caldo Evans (según Ref. 11)

## b) Medios para pruebas enzimáticas:

Agar yema de huevo (según Ref. 26)  
 Agar caseína (según Ref. 6 )  
 Medio de gelatina nutritiva (según Ref. 6 )  
 Medio de leche tornasolada (DIFCO Laboratories Michigan USA)  
 Agar rojo Congo (según Ref. 38)

## c) Medios para cultivos celulares:

Medio mínimo esencial (MEM) adicionado de 5% de suero fetal de ternera. (DIFCO Laboratories Michigan USA)

## - PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

## a) Caldo Evans (según Ref. 11)

Casaminoácidos	2.0	g
Extracto de levadura	0.6	g
Cloruro de sodio	0.25	g
Fosfato de potasio dibásico	0.871	g
Trazas	0.1	ml

Se disuelve en 100 ml de agua destilada y se distribuye en tubos con 3 ml cada uno, esterilizando a 15 lb/15 min.

## b) Agar caseína (según Ref. 6 )

Leche descremada al 10%	500	ml
Agar nutritivo de doble conc.	500	ml

Preparar la leche descremada y esterilizar a 115°C durante 10 min. enfriar a 50°C y agregar el agar nutritivo previamente esterilizado y enfriado a 55°C. Mezclar vigorosamente y distribuir en placas de Petri estériles.

## c) Medio de gelatina nutritiva (según Ref. 6 )

Extracto de carne	3	g
Peptona	5	g
Gelatina	120	g
Agua destilada	1000	ml

Agregar la gelatina al agua y dejar 15 a 30 minutos. Calentar para disolver la gelatina, agregar los otros constituyentes y disolver. Ajustar el pH a 7.0 esterilizar por calentamiento a 114°C durante 20 min.

## d) Agar yema de huevo (según Ref. 26 )

Agar de soya tripticaseína		
Digerido pancreático de caseína	40	g
Fosfato de sodio dibásico	5	g
Fosfato de potasio monabásico	1	g
Cloruro de sodio	2	g
Sulfato de magnesio	0.1	g
Glucosa	2	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver y ajustar pH a 7.6 esterilizar a 121°C 15 minutos, enfriar a 50-55°C. Lavar un huevo con etanol 95% - una hora, aspirar y separar el huevo de su cascara. Adicionar un huevo a 500 ml de la base de agar y agitar hasta tener una suspensión homogénea. Distribuir en placas de Petri.

## e) Agar rojo congo (según Ref. 38)

Medio de Luria:		
Bactotripton	10	g
Extracto de levadura	5	g
Cloruro de sodio	10	g
Agar	20	g
Agua destilada	1000	ml

Se prepara una base de agar Luria y se agrega el colorante rojo congo a una coc. final de 0.01%. Esterilizar y distribuir en placas de Petri.

- REACTIVOS

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS Completo)  
Sulfato de cobre saturado, solución.  
Solución de cristal violeta en ácido cítrico.

- PREPARACION DE REACTIVOS

PBS Completo:

Solución "A"	Cloruro de sodio	80	g
	Cloruro de potasio	2	g
	Fosfato de sodio dibásico	11.5	g
	Fosfato de potasio monobásico	2	g
	Agua destilada	800	ml
Solución "B"	Cloruro de calcio	1	g
	Agua destilada	1000	ml
Solución "C"	Cloruro de magnesio	1	g
	Agua destilada	1000	ml

Se esteriliza separadamente cada solución en autoclave a 15 lb/15 min. y se mezcla en frío como sigue:

80 ml "A" + 100 ml "B" + 100 ml "C" + 720 ml agua destilada

Cristal violeta en ácido cítrico:

Acido cítrico	21	g
Cristal violeta	1	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver el ácido cítrico en el agua destilada y posteriormente agregar el cristal violeta. Se agita durante 2 horas y se deja reposando toda la noche a temperatura ambiente. Filtrar en papel Whatman No. 2.

- PROPAGACION DE CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea celular HeLa, mantenida en botellas de plástico, con 25 cm<sup>2</sup> de superficie, a las que se agregó medio mínimo esencial (MEM) con 5% de suero fetal de ternera y penicilina (100 U/ml) estreptomycin (100 micro g/ml). A partir de una botella con una confluencia del 100% se -- tripzinzisaron las células con tripsina-verseno ( ), se -- desechó el exceso de reactivo y se dejó actuar el reactivo residual durante 5 minutos a 37°C para despegar las células. Se agregaron 30 ml de MEM sin antibiótico y se resuspendió con pipeta 30 veces para homogenizar la suspensión celular, y se distribuyó en porciones de 1 ml. para cada tubo de rosca de 16 X 150. Los tubos se incubaron inclinados durante 24 h. a 37°C. En la prueba de invasividad sólo se utilizaron los tubos que presentaron una confluencia mínima del -- 70%.

#### - PREPARACION DEL INOCULO BACTERIANO

Se tomó una asada de la bacteria del medio en que se encuentra conservada (gelosa especial) para inocular un tubo con 3 ml de caldo de soya tripticaseína, se hizo una preincubación de 4 h. a 37°C y se inoculó con 3 gotas de este crecimiento - un tubo con 3 ml de caldo Evans, se incubó de 18 a 24 h. a -- 37°C.

Suspensión bacteriana se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min desechando el sobrenadante y se resuspendió el paquete en PBS completo estéril. Se ajustó el inóculo a una densidad óptica de 14 a 16 U. Klett con filtro rojo.

#### - PRUEBA DE INVASIVIDAD

Se inocularon dos tubos con cultivos celulares, con 0.1 ml -- del inóculo ajustado, éstos se incubaron inclinados durante - 6 h. a 37°C. Se lavó tres veces con PBS completo estéril; -- después del último lavado, se agregó a la mitad de los tubos 1 ml de MEM con antibióticos (kanamicina 25 mg-estreptomicina 100 mg/ml) y a la otra mitad 1 ml de MEM sin antibióticos. Se incubó 1 hora a 37°C. Se desechó el medio y se lavó tres veces con PBS completo estéril, enseguida se agregaron 0.5 -- ml de tripsina-verseno a cada tubo desechando el exceso de -- reactivo e incubando durante 15 minutos a 37°C para desprender las células del tubo. Se añadió 1 ml de PBS completo estéril y se resuspendió enérgicamente con una pipeta serológica para obtener una suspensión celular homogénea. 0.1 ml de la suspensión celular se sembró en una placa de medio de -- McConkey, con una varilla estéril de vidrio, extendiendo la - suspensión sobre toda la superficie del medio para realizar - una cuenta viable aproximada de bacterias. Se tomó 0.2 ml de cristal violeta en ácido cítrico y se añadió a 0.2 ml de la - suspensión celular, para realizar la cuenta celular en una cámara de Neubauer. Los restantes 0.7 ml se centrifugaron a -- 500 rpm 15 minutos y de el pequeño paquete formado se tomó -- una muestra para realizar un frote fijado con metanol y teñido con cristal violeta en ácido cítrico.

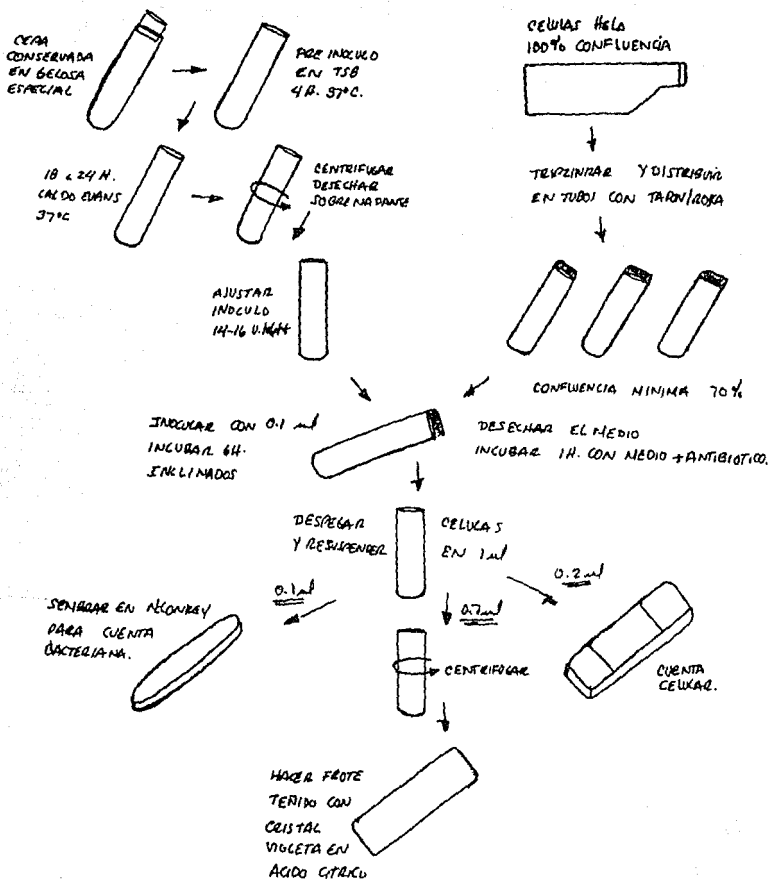
La cuenta bacteriana obtenida del medio sin antibiótico, se - utilizó como un testigo del crecimiento bacteriano, de esta - forma se eliminó la posibilidad de falsos negativos provocados por una viabilidad baja de alguna cepa.

La cuenta bacteriana obtenida del medio con antibiótico se utilizó para identificar a las cepas invasivas.

El criterio que se tomó para aceptar a una cepa como invasiva fué el descrito por Mehlman (44) quien estudiando la capacidad invasiva de cepas de *E. coli* y *Yersenia enterocolitica* en cultivos celulares, estableció que para aceptar a una cepa como invasiva deberían de existir en el ensayo por lo menos una bacteria por cada célula, para tal efecto se relacionó el número de unidades formadoras de colonias con el número de células obtenido en la cuenta celular en cámara de Neubauer.

A todas las cepas positivas en el ensayo de invasividad, se -- les determinó su espectro de sensibilidad a los antibióticos

utilizados en la prueba. Esto con el fin de diferenciar a las cepas exclusivamente resistentes a los antibióticos de las realmente invasivas.



- DETERMINACION DEL ESPECTRO DE SENSIBILIDAD A kanamicina/estreptomisina DE LAS CEPAS INVASIVAS.

Para este ensayo se utilizó el agar Mueller-Hinton, que por sus características nutricionales y su carencia de inhibidores, favorece el desarrollo adecuado de la bacteria. Se preparó una placa de medio con cada una de las diluciones del antibiótico seleccionadas para el ensayo, las cuales fueron obtenidas en base a la concentración de antimicrobianos utilizada en la prueba de invasividad. De tal forma se prepararon placas de agar Mueller-Hinton que contenían las siguientes diluciones de cada antibiótico:

Kanamicina: 100 mG/ml; 50 mG/ml; 25 mG/ml; 12.5 mG/ml  
 Estreptomisina: 300 mG/ml; 200 mG/ml; 100 mG/ml; 50 mG/ml

Se crecieron las cepas a probar en caldo de soya tripticaseína por 24 h. a 37°C, se ajustó el inóculo a una densidad óptica aproximadamente igual al tubo 1 de McFarlan diluido 1:2 (150 x 10<sup>8</sup> bacterias/ml); del inóculo ajustado se hizo una dilución 1:4 en caldo TSB estéril y de esta última dilución se depositó una gota con asa calibrada a cada uno de los medios con las diferentes concentraciones de los antibióticos. Fueron aceptadas como sensibles aquellas cepas cuyo crecimiento se vio inhibido por lo menos a la concentración corte del antibiótico.

- TIPIFICACION SEROLOGICA

Todas las cepas positivas en la prueba de invasividad se tipificaron con sueros comerciales. La cepa mantenida en gelosa especial se sembró en medio de agar de soyatripticaseína (TSA) y se incubó durante 24 h. a 37°C. Del crecimiento bacteriano se hicieron tres suspensiones con solución salina estéril al 0.85% a una de las suspensiones se le agregó una gota de solución salina 0.85%, para descartar a las cepas autoglutinables y a la última se le agregó una gota de suero polivalente de E. coli del Instituto Pasteur (Instituto Pasteur Production).

Las cepas que dieron aglutinación positiva con el suero polivalente, se probaron con sueros polivalentes A y B de E. coli (Bigaux diagnostica S.A.) y polivalente C de E. coli (Difco Laboratories)

Las cepas que aglutinaron con suero Pasteur y no aglutinaron con los sueros polivalentes A, B y C, se hirvieron durante una hora en solución salina fisiológica y se volvieron a probar.

- PRUEBAS ENZIMATICAS

a) Identificación de la producción de proteasas por E. coli

Digestión de caseína en placa: Se inocularon placas de agar caseína a partir de un crecimiento bacteriano de 18 h. en caldo TSB. Se examinó a intervalos de 24 h. durante 7 días, tomando como criterio de positividad el aclaramiento del medio alrededor del crecimiento bacteriano ( 6 ).

Digestión de caseína en tubo: Se inocularon tubos que contenían 3 ml de leche descremada al 10% con 5 gotas de un crecimiento bacteriano de 18 h. en caldo TSB. La producción de proteasas se identificó observando la peptonización del coágulo formado por la producción de ácido ( 3 ).

Prueba de leche tornasolada: Se inocularon tubos que contenían 3 ml de medio de leche tornasolada. En esta prueba se valoró la producción de ácido manifiesta por la aparición de una tonalidad blanca varios días después de la incubación inicial ( 3 ).

Hidrólisis de gelatina: Se inoculó un tubo con gelatina nutritiva, por picadura con un asa recta, utilizando un inóculo pesado y se dejó incubar a 37°C durante 7 días. Para realizar la lectura de la prueba, los tubos se enfriaron a 4°C durante 2 h. y después se examinaron buscando la licuefacción del medio para señalar una prueba como positiva ( 6 ).

b) Identificación de la producción de lipasa y lecitinasa por E. coli.

Digestión de medio con huevo: Se inocularon placas de agar yema de huevo con un crecimiento bacteriano de 18 h. en caldo TSB. Se incubó a 37°C durante 7 días.

La producción de lipasa se presenta como un precipitado en el medio, alrededor y por debajo de la colonia bacteriana, así como la formación de una capa iridicente o capa perlada que cubre el crecimiento bacteriano. Tal precipitado y capa perlada están compuestos de ácidos grasos libres -- producidos por la degradación de los lípidos ( 40 ).

La producción de lipasa se hace más evidente si se vierten sobre el medio 10 ml de una solución saturada de sulfato de cobre, la cual reacciona con los ácidos grasos libres -- producidos por la acción de esta enzima para formar un jabón insoluble azul-verdoso alrededor de las colonias de bacterias ( 40 ).

La producción de lecitinasa se presenta como una gran zona de opacidad en el medio que rodea a las colonias. El precipitado resultante está compuesto principalmente de proteína insoluble que proviene de la degradación de la lecitina ( 6, 40 ).

- PRUEBA DE CAPTACION DE ROJO CONGO

Se inocularon placas de agar rojo congo, con una asada de un crecimiento bacteriano de 18 h. en caldo TSB, dejando incubar a 37°C durante 24 h.

Las cepas capaces de captar el colorante, crecen en colonias de color rojo intenso, mientras que las demás bacterias producen colonias de color blanco ( 38).



## RESULTADOS

Se estudió la capacidad invasiva de 400 cepas de Escherichia coli aisladas de muestras de materia fecal de 86 niños con y sin diarrea. En la tabla 4, se muestran las características de estas cepas.

Se encontraron inicialmente 27 cepas invasivas en el modelo de cultivo de células; sin embargo, 8 de ellas resultaron resistentes a los antibióticos utilizados en el ensayo (kanamicina 25 /ml y estreptomycinina 100 /ml) (tabla 5). Estas cepas se volvieron a probar, utilizando amikacina, a una concentración de 100 /ml. Sólo una cepa de las ocho probadas resultó invasiva, lo cual dió un total de 19 cepas invasivas de las 400 probadas en el estudio (tabla 4).

Se analizó la relación entre aislamiento de E. coli enteroinvasiva y el cuadro clínico que presentaban los sujetos de los cuales se aisló la bacteria. Los resultados descritos en la tabla 7, muestran que el porcentaje de aislamiento más elevado de cepas invasivas, se encontró en los niños que presentaban cuadro diarreico con moco y sangre.

Al establecer el serogrupo al cual pertenecían las cepas invasivas, la mayoría resultaron no tipificables, sólo en una cepa se pudo identificar el serogrupo (tabla 6).

El patrón enzimático se estudió en las 19 cepas invasivas así como en 30 cepas no invasivas (tabla 8). La más alta producción de enzimas hidrolíticas se observó en el grupo de cepas invasivas, especialmente en la prueba de lipasa y caseína.

Durante la realización de este ensayo, se observó un fenómeno curioso, 47% de las cepas invasivas produjeron un pigmento café rojizo cuando se utilizó medio líquido con leche descremada al 10%. Cabe mencionar que ninguna de las cepas no invasivas fué capaz de producir este pigmento.

En la tabla 9, se señala la relación entre las cepas de E. coli invasivas y no invasivas con la prueba de captación del colorante rojo Congo. Todas las cepas invasivas captaron el colorante, mientras que sólo el 10% de las no invasivas dió la prueba positiva.

Paralelo a este estudio, se determinaron otros mecanismos de patogenicidad de estas cepas de E. coli. Se identificó la capacidad de adherencia a células HeLa así como la producción de toxinas y citotoxinas.

En la tabla 10, se muestran estos datos. Sólo una cepa invasiva mostró capacidad de adherencia al cultivo de células y sólo dos fueron productoras de toxina, en ambos casos de citotoxina semejante a la toxina de Shiga ("Shiga-like toxin").

TABLA 4

Capacidad invasiva de 400 cepas de E. coli aisladas de materia fecal en niños, determinada por la prueba de invasividad en -- cultivo de células HeLa.

<u>ORIGEN</u>	<u>No. DE CEPAS</u>	<u>CEPAS INVASIVAS *</u>
17 niños con diarrea del Hospital de Pediatría C.M.N.	69	6
69 niños sin diarrea del Hospital de Pediatría C.M.N.	305	11
Sin hoja de datos - clínicos	26	2
<b>TOTALES</b>	<b>400</b>	<b>19</b>

\* Dos cepas 1012, 1257 fueron productoras de toxina semejante a Shiga (SLT) y una cepa 1022 dió adherencia difusa.

TABLA 5

Sensibilidad a kanamicina (25 g/ml) y estreptomycin (100 g/ml) de las cepas positivas en la prueba de invasividad.

<u>No. de cepa</u>	<u>Kana/strep</u>	<u>Resultado</u>
1012	S	Invasiva
1022	R	Invasiva *
1031	S	Invasiva
1034	S	Invasiva
1046	S	Invasiva
1064	S	Invasiva
1077	S	Invasiva
1079	R	No Invasiva
1098	S	Invasiva
1103	S	Invasiva
1110	S	Invasiva
1126	S	Invasiva
1129	R	No Invasiva
1130	R	No Invasiva
1139	R	No Invasiva
1154	S	Invasiva
1200	S	Invasiva
1214	S	Invasiva
1257	S	Invasiva
1267	S	Invasiva
1280	R	No Invasiva
1284	R	No Invasiva
1326	S	Invasiva
1427	S	Invasiva
1452	R	No Invasiva
1344	R	No Invasiva

\* Sólo la cepa 1022 resultó ser invasiva, cuando todas las cepas resistentes se probaron nuevamente utilizando amikacina.

R = resistente

S = sensible

TABLA 6

Relación entre Escherichia coli enteroinvasiva y serogrupo.

<u>No. de cepas</u>	<u>Serogrupo identificado</u>
3	Suero Pasteur positivo *
1	Suero polivalente II positivo (086; K61, 0112; K66, 0128; K67, 0117; K69, 0125; K70, 0124; K72)
15	No tipificables.

\* Ninguna de estas cepas dió reacción positiva con los sueros polivalentes I, II y III de E. coli

TABLA 7

Cepas de E. coli invasivas determinado por cultivos celulares y su relación con diarrea y presencia de moco y sangre.

	No. de cepas	INV	Características de las evaluaciones			
			c/moco	s/moco	c/sangre	s/sangre
Niños con diarrea	6	+	5/6 (83.4%)	1/6 (16.6%)	5/6 (83.4%)	1/6 (16.6%)
Niños sin diarrea	11	+	5/11 (45.5%)	6/11 (54.5%)	0/11 ( 0% )	11/11 (100%)
TOTALES	17		10	7	5	12

No se encontraron los datos clínicos de dos de las cepas invasivas por lo tanto no fueron incluidas en esta tabla.

TABLA 8

Patrón enzimático de E. coli invasiva a células HeLa y de E. coli no invasiva determinado "in vitro" en medios de cultivo.

<u>PRUEBA</u>	<u>E. coli invasiva</u>	<u>E. coli No invasiva</u>
Producción de caseinasa en placa	15/19 (78.9%)	6/30 (20%)
Producción de caseinasa en tubo	a) 18/19 (94.7%) b) 9/19 (47.3%)	29/30 (96.6%) 0/30 ( 0.0%)
Producción de lipasa en medio de huevo	13/19 (68.4%)	8/30 (26.6%)
Producción de lecitinasa en medio de huevo	1/19 ( 5.2%)	2/30 ( 6.6%)
Producción de gelatinasa	1/19 ( 5.2%)	1/30 ( 3.3%)
Medio de leche tornasolada		
- Producción de ácido	18/19 (94.7%)	29/30 (96.6%)
- Formación de coágulo	16/19 (84.2%)	28/30 (93.3%)
- Peptonización	15/19 (78.9%)	8/30 (26.6%)
- Reducción	16/19 (84.2%)	28/30 (93.3%)

Los resultados se expresan en % de positividad.

a) = Formación de coágulo

b) = Formación de coágulo y producción de pigmento.

TABLA 9

Prueba de captación de rojo Congo en cepas de E. coli invasiva a células HeLa y en cepas No invasivas.

<u>PRUEBA</u>	<u>E. coli invasiva</u>	<u>E. coli No invasiva</u>
Captación de rojo Congo	19/19 (100%)	3/30 (10%)

Los resultados se expresan en porcentaje de positividad.

Las cepas invasivas se identificaron en el modelo de cultivo de tejidos.

TABLA 10

Relación entre E. coli invasiva y otros mecanismos de patogenicidad de E. coli

Clave cepa	Invasividad en HeLa	Adherencia en HeLa	Producción de SLT	Producción de LT
1012	+	-	+	-
1022	+	+ <sup>a</sup>	-	-
1031	+	-	-	-
1034	+	-	-	-
1046	+	-	-	-
1064	+	-	-	-
1077	+	-	-	-
1098	+	-	-	-
1103	+	-	-	-
1110	+	-	-	-
1126	+	-	-	-
1154	+	-	-	-
1200	+	-	-	-
1214	+	-	-	-
1257	+	-	+	-
1267	+	-	-	-
1295	+	-	-	-
1326	+	-	-	-
1427	+	-	-	-
	100%	5.2%	10.5%	0.0%

<sup>a</sup>El patrón de adherencia de esta cepa fué difusa.



## DISCUSION

La invasión de la mucosa del colón es el primer paso en la patogenesis de la disentería bacilar (37).

Shigella spp. y ECEI son microorganismos responsables de este proceso.

Esta propiedad se ha relacionado en estas bacterias con la presencia de un plásmido de 120-140 MDa. La identificación experimental de este fenómeno ha sido posible mediante el modelo "in vivo" de prueba de Sereny. (39) e "in vitro" mediante el modelo de invasividad en cultivos celulares; descrito por Day y col (1981) (8) quienes demostraron la eficiencia del método al comparar sus resultados con la prueba de Sereny (8).

En este trabajo se identificaron 19 cepas invasivas a células HeLa de un total de 400 estudiadas. Estas cepas invasivas se aislaron tanto de individuos con diarrea como de individuos -- que no presentaban este cuadro clínico.

El porcentaje de cepas invasivas obtenido fué de 4.7% superior al reportado en otros estudios sobre ECEI, en los que se señala que la frecuencia de aislamiento de este grupo de bacterias está por debajo del 1% (24).

Sin embargo, un estudio realizado en Tailandia por Talyor y col (1986) (42), empleando la hibridización de DNA para la identificación de microorganismos invasivos, señala una frecuencia de aislamiento de ECEI del 3% (42). Estos datos apoyan lo encontrado por nosotros y además sugieren la importancia que probablemente tiene este grupo de microorganismos en la etiopatogenia de la diarrea en países en vías de desarrollo.

Aunque es importante señalar que se considera que sólo las cepas Sereny positivas son virulentas, por lo que sería interesante verificar si nuestras cepas presentan esta característica.

Con el fin de conocer si este grupo de bacterias se aíslan en la misma proporción de individuos sanos o de aquellos que presentan diarrea se analizaron en forma independiente ambos grupos, encontrándose un porcentaje de aislamiento del 3.7% en niños sin diarrea y del 8.7% en niños con diarrea.

Estos resultados nos muestran nuevamente que este grupo de bacterias probablemente tiene un papel importante en la producción de enfermedad diarreica. El haber encontrado un porcentaje alto (3.7%) de cepas invasivas en niños sin diarrea, nos sugiere por el tipo de población estudiada la posibilidad de que exista una fuente de infección intrahospitalaria.

Escherichia coli invasiva al igual que Shigella se multiplica en el interior de las células epiteliales hasta destruirlas para invadir a las células adyacentes (Figura 1) (1). Este proceso destructivo ocasiona una reacción inflamatoria durante la cual se presenta en forma macroscópica la salida de sangre y moco en las heces.

Al analizar los expedientes de los pacientes encontramos que 5 de 6 de los individuos con diarrea presentaron sangre y moco en sus evacuaciones, lo cual correlaciona con las manifestaciones clínicas observadas en las infecciones producidas por ECEI. Por otro lado, en algunos de los individuos sin diarrea (46.5%) en los que se identificaron cepas invasivas, se detectó la presencia de moco en la materia fecal. Tal situación habla de un proceso inflamatorio que se podría interpretar como el inicio probable del cuadro patológico ocasionado por los microorganismos invasivos.

No fué posible establecer el serogrupo de las cepas que resultaron invasivas, ya que sólo se contaba con sueros polivalentes del grupo enteropatógeno. Sólo una de las cepas invasivas aglutino con estos sueros polivalentes. Esto nos indica que la gran mayoría de las cepas no pertenece al grupo ECEP, lo cual concuerda con lo señalado por Levin y col (1984) (24) quienes afirman que este grupo no incluye cepas invasivas (24).

Se han señalado que ECEI es en su mayoría inmóvil e incapaz de descarboxilar la lisina (41).

En este trabajo la mayoría de las cepas de *E. coli* invasiva identificadas fueron móviles y el 57.9% de ellas fué lisina descarboxilasa positivas. Taylor y Echeverría (1986) (42) estudiando las características bioquímicas de cepas de ECEI aisladas de niños con síndrome disentérico en Tailandia, encontraron que el 86% de las cepas fueron lisina/d Descarboxilasa positivas. Esto plantea la existencia de cepas invasivas con comportamiento metabólico diferente al descrito para este grupo de bacterias. Sin embargo, Taylor y col. al igual que nosotros sólo determinamos la invasividad asociada al plásmido de 140 MDA y no la relacionada con la capacidad para producir queratoconjuntivitis, esta podría ser la explicación de las características metabólicas de nuestras cepas.

La producción de enzimas como factor de virulencia ha sido establecida en diferentes microorganismos invasivos como *Rickettsia* y *Shigella* (46) (1). Estudiando *E. coli* invasiva Sansonetti y col (1986) (37) propusieron la producción por ECEI de una enzima que destruye glóbulos rojos. Esta enzima probablemente sea una fosfolipasa la cual altera la membrana eritrocítica.

Clerc y col (1987) (5) por su parte, trabajando con la línea celular de macrófagos J774 demostraron que cepas de ECEI fagocitadas se liberan del fagosoma por efecto de un factor el cual no tiene relación con la producción de citotoxina semejante a la toxina de Shiga (Shiga-like).

Estos datos apoyan la posible producción de enzimas hidrolíticas relacionadas con el mecanismo de virulencia de ECEI. Consideramos por tal motivo que tratar de establecer un patrón enzimático en *E. coli* podría ser útil en la identificación de ECEI mediante el uso de métodos de laboratorio más sencillos y accesibles que las pruebas de invasividad establecidas.

Se investigó la producción de caseína, lipasa, lecitinasa y gelatinasa; además de la prueba de leche tornasolada. Se practicaron estas pruebas a las 19 cepas invasivas así como a un grupo de 30 cepas No invasivas, los resultados observados en estas últimas se utilizaron como punto de comparación entre ECEI y otras cepas de *Escherichia*.

En las cepas invasivas se encontró una elevada producción de enzimas hidrolíticas, especialmente de caseína (79%) y lipasa (68%). La producción de estas enzimas en el grupo No invasivo, comparativamente fué más baja, resultando sólo el 20% productoras de caseína y el 26% de lipasa.

Estos datos apoyan el planteamiento de utilizar el patrón de enzimas hidrolíticas para sospechar la presencia de ECEI. Sin embargo, consideramos que hay que estudiar un número mayor de cepas invasivas para demostrar de manera más contundente la utilidad de estas pruebas en la identificación de estas cepas.

Los datos observados en las pruebas de determinación de caseína y lipasa observados en este estudio, correlacionan con los datos de Winkler (1982) (46), lo cual nos permite especular que probablemente tales enzimas podrían participar en la degradación del fagosoma como lo hace la fosfolipasa A producida por *Rickettsia prowasekii* (46); lo que permite a las bacterias invasivas liberarse en el citoplasma celular.

Algunos autores (38) señalan que la capacidad de las bacterias para captar el colorante rojo congo de un medio de cultivo está relacionada de manera directa con su habilidad para captar el hierro, ellos explican que el hierro se une al colorante disuelto en el medio de tal forma que cuando la bacteria capta tal elemento, adquiere también el colorante; lo que da como resultado el crecimiento de colonias pigmentadas.

Sakai y col (1986) (34) identificaron una secuencia de aproximadamente 1.0 kb. derivada del plásmido de 140 MDa que es la responsable de la captación del rojo congo, estableciendo que todas las cepas que poseen el plásmido deben presentar la capacidad de captación de este colorante. Basados en estos estudios se utilizó la prueba de captación del rojo congo, como un marcador indirecto de la presencia del plásmido asociado con la virulencia en EIEC, para determinar si las cepas invasivas a células HeLa realmente presentaban esta característica.

Se encontró que las 19 cepas invasivas resultaron positivas (100%) a la prueba de captación del rojo congo; lo cual sugiere que todas las cepas invasivas a células HeLa identificadas presentan el plásmido de 140 MDa. Por otro lado las 30 cepas no invasivas probadas solo 3 (10%) fueron positivas a la prueba; lo cual habla de la presencia de esta característica también en algunas cepas no invasivas.

Basados en que el 100% de las cepas invasivas fueron captado--

ras del rojo congo y debido a las facilidades que este ensayo presenta para su realización se pensó en esta prueba como un procedimiento más para la caracterización de cepas invasivas. Sin embargo, no se debe pasar por alto que no todas las cepas capaces de captar el rojo congo son cepas invasivas, algunos autores han reportado cepas toxigénicas de *E. coli* que poseen sistemas captadores de hierro, por lo cual no se puede considerar a la prueba como específica ( ).

La producción de sideroforos se han considerado un factor de virulencia importante para *E. coli* invasiva, ya que le permite a la bacteria crecer bajo condiciones restringidas de hierro - (1) como las que se presentan en el medio intracelular. Con respecto a la captación de hierro, la prueba de hidrólisis de caseína en el medio de leche al 10% mostró un hallazgo interesante, el 47% de las cepas invasivas produjeron un pigmento --cafe rojizo a las 24 h. de incubación fenómeno que no ha sido descrito anteriormente, observándose que ninguna de las cepas no invasivas presentó este fenómeno. Griffiths y col (14) observaron tal coloración como una característica de la proteína captadora de hierro aerobactina una vez que se ha unido a este elemento en cepas de *E. coli*. La producción de pigmento en nuestro estudio se pudo deber probablemente a la elaboración de sideroforos para las cepas invasivas, estudios posteriores que involucren la utilización del medio de leche al - 10% resultarían útiles para establecer las características de este fenómeno.

La identificación de este pigmento podría completar la serie de pruebas que se han mencionado aquí (producción de lipasa, caseinasa y captación de rojo congo) con el fin de identificar cepas invasivas mediante pruebas y de fácil acceso a cualquier laboratorio.

Levine y col (1987) señalan que la adherencia de las cepas invasivas involucran mecanismos totalmente diferentes a los utilizados por las cepas enteroadherentes, de tal forma el hecho de encontrar sólo una cepa invasiva adherente en este estudio habla de las diferencias existentes entre ambos mecanismos de patogenicidad. La cepa que presentó ambos mecanismos requiere de un estudio más a fondo para establecer la importancia -- que pueda tener cepas con los dos mecanismos; nosotros suponemos que este fenómeno se debió a la presencia de los plásmidos que codifican para estos fenómenos en la misma cepa.

Dos cepas invasivas fueron productoras de citotoxinas semejante a la toxina de Shiga. Esto contribuye a apoyar lo previamente descrito por Clerc y col (5) en relación que esta -- citotoxina no tiene un papel importante en el proceso de invasibilidad quedando sin esclarecer la función precisa de la citotoxina.

## CONCLUSIONES

Se identificaron 19 cepas invasivas a células HeLa de un total de 400 estudiadas, lo que da un porcentaje de aislamiento de E. coli invasiva del 4.7%.

Se encontró una elevada producción de enzimas hidrolíticas en el grupo invasivo, lo que nos permite especular sobre el posible establecimiento de un patrón enzimático para ECEI como factor de caracterización para este grupo de bacterias. Además, esta situación nos habla de la posible participación de las --enzimas hidrolíticas en el mecanismo virulento de ECEI. Sin embargo, consideramos que es necesario estudiar una población de cepas invasivas más grande, para que los resultados obtenidos sean más confiables.

Todas las cepas invasivas a células HeLa fueron rojo Congo positivas, lo que contribuye a pensar que todas ellas presentan el plásmido asociado con la virulencia en ECEI.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 .-Binns M.M.1985.Molecular genetics of virulence in Shigella.Microbiological sciences . 2 (9):275-278
- 2 .-Booth B. Finkelstein R. 1986. Presence of hemagglutinin/ protease and other virulence factors in 01 and non-01 Vibrio cholerae. J infect dis 154 (1):183-186.
- 3 .-Bradshaw J.L.1976.Microbiologia de laboratorio. Ed el manual moderno. Impreso en México 1976.Capitulo 4:46-61
- 4 .-Brown E. Rothman S. and Doctor B.1980.Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by Shigella dysenteriae toxin.Infect immun.29 (1) :98-107
- 5 .-Clerc Philippe.Ryter Antoinette.Mounier Joelle and Sansonetti Philippe.1987. Plasmid-mediated early killing of eucariotic cells by Shigella flexneri as studied by infection of J774 macrophages. Infect immun 55 (3):521-527.
- 6 .-Cowan y Steel's1982.Manual para la identificación de bacterias de importancia medica. Ed. CECSA. Impreso en Meexico 1982. Apendice A y C :193-259.
- 7 .-Davis Dulbecco1978.Tratado de Microbiologia. Ed. Salvat Impreso en España.
- 8 .-Day N.P. Scotland and Rowe.1981.Comparison of an Hep-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in Shigella and E.coli. J clin microbiol. 13:596-597.
- 9 .-Dqoring G. Ournesser H.J. Botznhart K. Fanning B. Halby M. and Hofman A.1983. Proteases of Pseudomona aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J infect dis.147(4):744-750
- 10 .-Dupont M.C. Formal S.B. Hernick M.J.Snyder J.P. Lobant G.G. and Kalos J.P. 1971.Pathogenesis of E.colidiarrhea. N Engl J Med 285 :1-9.
- 11 .- Evans D.J. Evans D.G. and Gorbach S.L. 1973.Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic E.coli isolated from man. Infect immun.3:725-730.
- 12 .-Formal S.B.and Hornick R.B.1978.Invasive E.coli. J infect Dis.137 (5):641-647.
- 13 .-Gemski P.Sheahau D.G. andFormal S.B.1972.Virulence of S.flexneri hybrids expressingf E.coli somatic antigens.Infect immun. 6(2):104-110.
- 14 .Griffiths E. Stevenson P. and Formal S.B.1985.Synthesis of aerobactin and a 76000dalton iron-regulated outer membrane protein by E.coliK-12/S.flexneri hybrids and by enteroinvasive strains of E.coli. Infect immun.49 (1):67-71.
- 15 .-Guerrant R.L.1985.new concepts in the pathogenesis of E.coli diarrhea.Ed. Leive.Printed in USA.ASM Microbiology.
- 16 .- Hale T. and Formal S.B.1981.Protein synthesis in HeLa or Henle 407 cells infected with S.dysenteriae 1,S.flexneri 2a or Salmonella typhimurium W118. Infect immun 32 (1):13-144.

- 17 .-Hale T.Morris R.and Bonaventure P.F.1979.Shigellainfection of Henle intestinal epithelial cells;role of the host cell. Infect immun 24 (3):887-894.
- 18 .-Hale T.Oaks E. and Formal S.1985.Identification and antigenic characterization of virulence-associated plasmid coded proteins of Shigella spp. and enteroinvasive E.coli. Infect immun 50 (3):620-629.
- 19 .-Hale T. Sansonetti P. Schad P. Austin S. and Formal S. 1983.Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in S.flexneri,S.sonnei and E.coli. Infect immun.40 (1):340-350
- 20 .- Hinson G. Knutton S. Lan-po-tang M. Mcneish A. and Williams P.1987. Adherence of human colonocytes of an E.coli strain isolated from sever infantile enteritis:molecular and ultrastructural studies of a fibrilla adhesin. Infect immun.55 (2):397-402.
- 21 .- Inman R. Cantley J.and Formal S.1986. Colonization virulence and mucosal interaction of an EPEC (strain RDEC-1) expressing Shigellasomatic antigen in the rabbit intestine. J. infect dis. 154 (5):742-750.
- 22 .- Knutton S. Williams P. Lloyd D. Candy C. and McNeish A. 1984.Ultrastructural study of adherence to and penetration of cultured cells by two invasive E.coli strains isolated from infants with enteritis. Infect immun 44 (3):599-608.
- 23 .- Levine M. Nataro J. Korch H. Baldini M. Kuper J. Black R. Clements M. and O'brien A.1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic E.coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J.infect dis. 152 (3):550-559.
- 24 .-Levine M. and Edelman.1984.Epidemical Rev 6 :31-51.
- 25 .- Levina M.1987. J.infect dis. 155 (3):377-388
- 26 .- Manual of chemical Microbiology. Fourth edition.American society of Microbiology.Washington 1985.Printed in USA. 1064-1065.
- 27 .- Maulder J.1974.Intracellular parasitism;life in an extreme environment. J. infect dis.130 (3):300-306.
- 28 Maurelli A. Baudry B. D'Hanteville H. Hale T. and Sansonetti P. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by Shigella flexneri. Infect Immun 49 (1):164-171.
- 29 .- Minshew B. Jorgensen J.Counts G. and Falkow S.1978.Association of hemolysin production,hemagglutination of human erythrocytes and virulence for chicken embryos of extraintestinal E.coli isolates.Infect immun.20 (1):50-54.
- 30 .- Montgomerie J. Binderreif A. and Neillandes J. 1984.Association of hydroximate siderophore (aerobactin) with E.coli isolated from patients with bacteremia. Infctet immun.146 (3): 835-838.
- 31 Nandadasa H. Sargent G. Brown M. McNeish A. and Williams P. 1981. The role of plasmids in adherence of invasive E.coli to mammalian cells. J. infect dis.143 (2):286-290.
- 32 .- Padhye V. Beery J. Kittell F. and Dayle M. 1987. Colonic.

- hemorrhage produced in mice by unique Vero cell cytotoxin from E.coli strain that causes hemorrhagic colitis. J infect dis. 155 (6):1249-1253.
- 33 .- Robins B. 1987. Traditional enteropathogenic E.coli infantile diarrhea. Rev infect dis.9 (1):28-53.
- 34 .- Sakai T. Sasakawa C. Makino S. Kamata K. 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):476-482.
- 35 .- Sansonetti P. Kopecko D. and Forma S. 1982. Involment of a plasmid in the invasive ability of S.flexneri. Infect immun 35 (3):852-860.
- 36 .- Sansonetti P. Hale T. Damming G. Kapfer C. Collins H and Formal S. 1983. Alteration in the pathogenicity of E.coli K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from S.flexneri Infect immun.39 (3):1392-1402.
- 37 .- Sansonetti P. Ryter A. Clerc P. Maurelli A. and Naunier J. 1986. Multiplication of S.flexneri within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect immun.51 (2):461-469.
- 38 .- Sasakawa C. Kamata K. Sakai T. Murayama S. Makino S. and Yoshikawa M. 1986. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in Shigella flexneri. Infect immun 51 (2):470-475.
- 39 .-Scotland Gross. 1985. The virulence of E.coli. Ed. Academic Press. Printed in USA 1985.
- 40 .- Shapton Board. Isolation of anaerobes. Ed. Academic Press segunda reimpression. Printed in Great Britain 1975. Paginas 15, 16, 29.
- 41 Silva R. Toledo F. and Trabulsi L. 1980. Biochemical and cultural characteristics of invasive E.coli. J clin Microb 11 (5):441-44.
- 42 .- Taylor and Echeverria. 1985. Microorganism that causes dysenteric syndrom in Thailand. Infect immun 51(2):482-291.
- 43 .-Valvano M. Crosa J. 1985. Aerobactin iron transport genes commonly encoded colIV plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of E.coli K-1. Infect immun 46 (1):159-167.
- 44 .- Vesikari T. Bromiska and Maki M. 1982. Enhancement of invasiveness of Yersinia enterocolitica and E.coli in Hep-2 cells by centrifugation. Infect immun.36:834-836.
- 45 .- Watanabe H. Nakamura A. 1985. Large plasmids associated with virulence in Shigella species have a common function necessary for epithelial cell penetration. Infect immun.48 (1):260-262.
- 46 .- Winkler H. and Miller E. 1982. Phospholipase A and the interaction of Rickettsia prowazekii and mouse fibroblasts (L-929) Infect immun.38 (1):109-113.



- 47 .-Wood P. Morris G. Small P. Sethabutr O. Toledo R. Trabulsi L. and Kaper J. 1986. Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive Shigella and E.coli strains J clin microb. 24 (3):498-500.
- 48 .- Yamagata S. Takashi S. Makino S. Kurata T. Sasakawa C. and Yoshikawa M. 1986. The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of Shigella and EIEC. Infect immun. 51 (2): 696-698.