

411 201



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

**ADHERENCIA A n-HEXADECANO Y CELULAS Hep-2 DE  
CEPAS DE Streptococcus Pyogenes AISLADAS DE  
PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA Y SUS  
CONTACTOS FAMILIARES, ESCOLARES  
PORTADORES Y NIÑOS CON FARINGITIS  
ESTREPTOCOCCICA.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A  
LUIS MANUEL PEREA MEJIA

Director de Tesis: **DRA. SILVIA GIONO CEREZO**



V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1990



## **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

ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE TABLAS, FIGURAS, GRAFICAS, DIAGRAMAS Y FOTOGRAFIAS.....	iii
RESUMEN .....	vi
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS .....	13
MATERIALES Y METODOS .....	14
RESULTADOS.....	27
DISCUSION .....	58
CONCLUSIONES .....	63
BIBLIOGRAFIA .....	64

## A b r e v i a t u r a s

- BHI - caldo infusión cerebro corazón.
- CF - contactos familiares de los pacientes con FR.
- ENCB - cepas de referencia de la Esc.Nac. de Ciencias Biológicas.
- EHB - estreptococos beta hemolíticos.
- EP - escolares portadores.
- FE - faringitis estreptocócica.
- FR - fiebre reumática.
- Hep-2 -línea celular de carcinoma epidermoide de laringe humana.
- n-Hex - n-hexadecano ( $C_{16}H_{34}$ ).
- M2, M3, M5 y M12 - serotipos de Streptococcus pyogenes de acuerdo al tipo de proteína M.
- MR-481 - cepa mutante de Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 deficiente para adherirse a n-hexadecano, testigo negativo de adherencia.
- PBS - regulador de fosfatos.
- PUM - regulador de urea y magnesio.
- RAG-1 - cepa de Acinetobacter calcoaceticus utilizada como testigo positivo para adherencia a n-hexadecano.
- T-H - caldo Todd-Hewitt.
- UFC - unidades formadoras de colonias.

LISTA DE TABLAS, FIGURAS, GRAFICAS, DIAGRAMAS  
Y FOTOGRAFIAS.

	Pag.
Tabla 1 - Criterios de Jones para fiebre reumática.....	2
Figura 1 - Estructura superficial de <u>S. pyogenes</u> .....	5
Figura 2 - Modelo hipotético de adherencia de <u>S.pyogenes</u> a células epiteliales . . . . .	10
Diagrama 1 - Determinación de la cantidad de <u>S. pyogenes</u> - utilizada en los ensayos de adherencia. . . . .	18
Diagrama 2 - Adherencia de <u>S.pyogenes</u> a n-hexadecano en di- ferentes condiciones de ensayo . . . . .	20
Diagrama 3 - Adherencia a n-hexadecano ce depas de referen- cia en diferentes condiciones de ensayo . . . . .	22
Diagrama 4 - Adherencia a n-hexadecano de cepas de EBH ais- ladas de diferentes fuentes. . . . .	23
Diagrama 5 - Adherencia de EBH a células Hep-2 . . . . .	25
Tabla 2 - Cantidad de <u>S.pyogenes</u> utilizada en los ensa- yos de adherencia a n-hexadecano . . . . .	29
Gráfica 1 - Curva de crecimiento de <u>S.pyogenes</u> ENCB 576 - (ATCC12385). . . . .	28
Gráfica 2 - Cantidad de <u>S. pyogenes</u> utilizada en los ensa- yos de adherencia a n-hexadecano. . . . .	30
Tabla 3 - Adherencia de <u>S.pyogenes</u> a n-hexadecano utili- zando diferentes tiempos de agitación . . . . .	31
Tabla 4 - Adherencia de <u>S.pyogenes</u> utilizando diferen- tes cantidades de n-hexadecano en el ensayo . . . . .	31
Gráfica 3 - Porciento de absorbancia de <u>S.pyogenes</u> en di- ferentes tiempos de agitación con n-hexade- cano . . . . .	32
Gráfica 4 - Porciento de absorbancia de <u>S.pyogenes</u> utili- zando diferentes cantidades de n-hexadecano . . . . .	33
Tabla 5 - Adherencia a n-hexadecano a cepas de <u>S.pyogenes</u> y <u>A.calcoaceticus</u> de referencia . . . . .	35
Gráfica 5 - Adherencia a n-hexadecano de cepas de ----- <u>S.pyogenes</u> y <u>A. calcoaceticus</u> de referencia . . . . .	36

Tabla	6 -	Adherencia a n-hexadecano de cepas de <u>refe</u> rencia en diferentes condiciones de ensayo. . . . .	37
Gráfica	6 -	Adherencia a n-hexadecano de cepas de <u>refe</u> rencia en diferentes condiciones de ensayo. . . . .	38
Gráfica	7 -	Adherencia a n-hexadecano de cepas de <u>refe</u> rencia en diferentes condiciones de ensayo. . . . .	39
Tabla	7 -	Adherencia a n-hexadecano de capas de <u>refe</u> rencia con y sin agitación . . . . .	40
Gráfica	8 -	Adherencia a n-hexadecano de cepas de <u>refe</u> rencia crecidas con y sin agitación. . . . .	41
Gráfica	9 -	Adherencia a n-hexadecano de EBH aislados- de pacientes con fiebre reumática. . . . .	43
Gráfica	10 -	Adherencia a n-hexadecano de EBH aislados- de contactos familiares de pacientes con - FR. . . . .	44
Gráfica	11 -	Adherencia de n-hexadecano de cepas de <u>S.</u> <u>pyogenes</u> aisladas de escolares portadores . . . . .	45
Gráfica	12 -	Adherencia a n-hexadecano de EBH aislado - de enfermos con infección estreptocóccica. . . . .	46
Gráfica	13 -	Adherencia a n-hexadecano de cepas de <u>refe</u> rencia de <u>S.pyogenes</u> y <u>A. calcoaceticus</u> . . . . .	47
Gráfica	14 -	Distribución de la adherencia a n-hexadeca no de todas las cepas de EBH probadas. . . . .	49
Tabla	8 -	Cantidad de <u>S.pyogenes</u> utilizada en los - ensayos de adherencia a células Hep-2 . . . . .	51
Gráfica	15 -	Cantidad de <u>S.pyogenes</u> utilizada en los en sayos de adherencia a células Hep 2. . . . .	52
Gráfica	16 -	Adherencia a células Hep-2 de EBH aislados de diferentes fuentes. . . . .	53
Fotografía	1 -	Celulas Hep-2 sin inocular . . . . .	54
Fotografía	2,3 4.	Células Hep-2 con estreptococcus betaheмо- líticos adheridos en su superficie. . . . .	54,55

Tabla	9	- Resultados positivos de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de las cepas de EBH probadas. . . . .	56
Gráfica	17	Resultados positivos de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de las cepas de EBH probadas. . . . .	57

## R E S U M E N .

Streptococcus pyogenes es un patógeno reconocido con capacidad invasiva para el humano, la adherencia a la célula blanco representa la primera etapa en la colonización, favoreciendo su acción patógena. Beachey y cols. demostraron la hidrofobicidad de las estructuras superficiales de la bacteria y de su sitio de unión a la fibronectina en la superficie de las células epiteliales. El porcentaje relativo de adherencia a 0.3 ml de n-hexadecano(n-Hex) se midió por el cambio en la lectura de absorbancia a 530 nm de 3 ml de suspensión bacteriana ajustada a 0.4 de turbiedad agitando durante 1 minuto. La adherencia a células Hep-2 se hizo en monocapas celulares crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pozos, observandose adherencia por microscopía de luz después de 3 h. Se ensayaron 130 cepas de estreptococos beta-hemolíticos; 10 cepas aisladas de pacientes con fiebre reumática (FR); 29 cepas de sus contactos familiares (CF); 54 cepas de escolares portadores (EP); 31 cepas de niños con faringitis estreptocócica (FE) y 6 cepas de referencia (ENCB). -- 80 % de las cepas FR, 79.3 % de CF y el 93.5 % de FE, presentaron una adherencia a n-Hex superior al 80 %. Ninguna cepa EP se adhirió en este porcentaje y las cepas ENCB en un 100%. En células Hep-2 el 90% de las cepas FR, 96.5 % de CF, 33.3% de EP, 83.8 % de FE y todas las cepas ENCB presentaron una adherencia igual o mayor al 80 % de las células Hep-2. Al parecer la adherencia microbiana en S. pyogenes como en otras enfermedades infecciosas es un factor importante para la colonización del hospedero.

## I N T R O D U C C I O N .

En los países en vías de desarrollo, la fiebre reumática es la principal causa de enfermedad y muerte de origen cardiaco, principalmente en niños y personas en edad productiva(44). La fiebre reumática es un síndrome inflamatorio que frecuentemente ocurre como consecuencia de infecciones de farínge producidas por estreptococo beta hemolítico de grupo A, que de manera característica tiende a producir recurrencias - (44). Las manifestaciones clínicas más comunes de la fiebre reumática son : carditis, artritis y corea(44).

En 1944 Jones, propuso diferentes criterios para realizar el diagnóstico de fiebre reumática, basado en manifestaciones clínicas como en datos de laboratorio( tabla N<sup>o</sup>1). Los signos clínicos característicos se designan como "criterios mayores", carditis, poliartritis, corea, eritema marginado y nódulos subcutáneos, además de los "criterios menores" que son menos característicos, pero no menos importantes que los anteriores, en donde se agrupan: fiebre, artralgia, antecedentes familiares de fiebre reumática y/o cardiopatía reumática, etc.(44).

En el siglo pasado la fiebre reumática se aceptó como una enfermedad en la que se integran diferentes manifestaciones clínicas que originalmente no se pensaba que estuvieran relacionadas. Aschoff a principios de siglo describió la lesión miocárdica específica y sugirió - que podría haber una relación entre la fiebre reumática y los antecedentes de infección faríngea. Hasta 1931 fué cuando se demostró mediante estudios bacteriológicos realizados en Inglaterra y los Estados Unidos la existencia de esta relación(44).

TABLA Nº 1

Criterios de Jones para el diagnóstico  
y clasificación de la fiebre  
reumática.

---

ACTIVA

---

Manifestaciones Mayores

Carditis

Poliartritis

Corea

Eritema marginado

Nódulos subcutáneos

Manifestaciones Menores

Fiebre

Artralgias

Historia de fiebre reumática  
o presencia de cardiopatía  
reumática.

Pruebas de laboratorio alteradas:

Reacciones de fase aguda.  
Aumento de la velocidad globular.  
Presencia de proteína C reactiva  
o de leucocitos.  
Intervalo PR prolongado.

---

INACTIVA

---

Cardiopatía reumática y antecedentes de fiebre reumática

---

Tomado de :Taranta y Markowitz. 1984.(44)

El agente causal del padecimiento es el estreptococo beta hemolítico del grupo A perteneciente a la especie Streptococcus pyogenes(44). Coburn y Morre en 1939, demostraron que la fiebre reumática podría - prevenirse mediante la medicación anti-estreptocócica continua. Massel y Wannamaker en 1949, comprobaron que el tratamiento de la farin<sup>g</sup>itis estreptocócica con penicilina, previene los primeros ataques de fiebre reumática(44).

El estreptococo forma parte de un grupo de bacterias conocidas como piógenas junto con el neumococo y estafilicoco(18). El género estreptococo se encuentra actualmente clasificado en la sección 12 dentro de los cocos gram positivos según la última edición del Manual - de Borgey's( 21 ), en general se describen como cocos gram positivos esféricos, agrupados en cadena que se dividen en plano perpendicular al eje de la cadena(18).

En 1874, Billroth los describió por primera vez , al aislarlos de exudados purulentos de enfermos con erisipela(18). Brown en 1919 los dividió de acuerdo a su capacidad para producir hemólisis(14). Lan- cenfield describió técnicas para la diferenciación serológica de los estreptococos beta hemolíticos en el año de 1933, de esta forma se - han agrupado en 21 grupos( designados de la letra A a la W excepto - I y J) clasificados actualmente(38).

Identificación.- El estreptococo beta-hemolítico puede ser identi- ficado mediante el empleo de diferentes pruebas microbiológicas. Para la identificación preliminar del grupo A se emplean: la prueba de -- sensibilidad a la bacitracina 0.04 U y sulfametoxazol-trimetoprima (SXT); la determinación de la presencia del factor CAMP y/o hidróli-

sis de hipurato de sodio para el grupo B; hidrólisis de esculina en -- presencia de bilis al 4% para grupo D y la capacidad para crecer en -- presencia de NaCl al 6.5%, característica de los enterococos(38).

El mejor método para la identificación de los estreptococos beta hemolíticos, consiste en extraer el polisacárido antigénico del estreptococo y hacerlo reaccionar con antisuero precipitante específico de grupo(31).

Estructura del estreptococo. La superficie del estreptococo se encuentra formada por la cápsula antifagocítica; la proteína M, responsable de la especificidad, ya que se considera el principal factor de virulencia y estimula la formación de anticuerpos; le sigue la proteína T que no es única y está formada por varias proteínas resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas; R que participa en reacciones de aglutinación; y la proteína B que aparentemente bloquea la formación de anticuerpos IgM o anti-M. Figura 1 (18).

La proteína M es una estructura fibrilar compuesta por dos cadenas de proteínas superenrolladas que se extienden aproximadamente 60 nm de la pared celular, actualmente se definen más de 75 serotipos distintos de esta molécula, cada uno de los cuales provee al estreptococo capacidad antifagocítica(15), es considerada como el principal factor de virulencia de este microorganismo. Es opsonizada eficientemente por la vía alterna del complemento, y en consecuencia estos son ingeridos y destruidos por los leucocitos del hospedero. No se encuentra como una capa unida a la cápsula, sino esta formada de "fibrillas" unidas a la superficie celular(46).

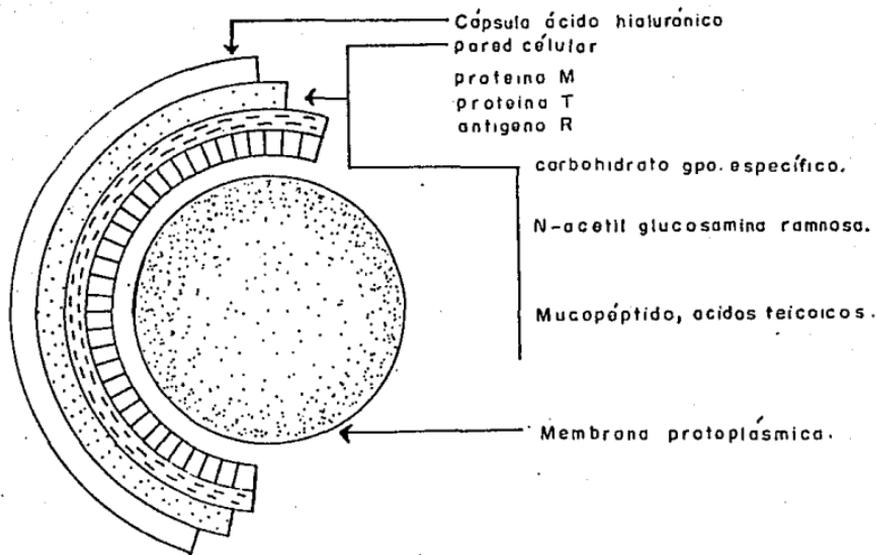


Figura 1.- Distribución de las estructuras superficiales de *Streptococcus pyogenes*. Tomado de Krause 1980. pag. 98 (22).

El ácido lipoteicoico (ALT) de S.pyogenes es una molécula compuesta de un polímero lineal de glicerol fosfato unido por enlaces 1-3 fosfo diéster. El esqueleto de poliglicerofosfato es sustituido con un éster unido a alanina y contiene un glicerofosforil diglucosil diglicérido principalmente en un extremo terminal(45). La molécula de ALT y ALT desacilado son secretados al medio circundante, por lo que se encuentran en tránsito constante a través de la pared celular y debido a su caracter polianiónico, el extremo poliglicerofosfato de la molécula puede formar complejos con sustancias cargadas positivamente en la pared celular del estreptococo(1,4,6).

El carbohidrato C ocupa el 10% del peso seco del organismo, está constituido de ramnosa y hexosamina con enlace alfa 1-3 unido al mucopéptido por puentes de alanina. La especificidad está dada por el residuo n-acetil glucosamina en el grupo A y por n-acetil galactosamina en el grupo C(18).

El estreptococo produce más de 32 sustancias extracelulares como fueron demostradas en un estudio electroforético que se realizó utilizando una mezcla de gamma globulina humana, observándose que en la infección estreptocócica, se producían un gran número de sustancias extracelulares que inducen la formación de anticuerpos(18). Entre las sustancias extracelulares que produce el estreptococo se encuentran, las estreptolisinas S y O, la toxina eritrogénica, etc,(18).

Adherencia.- Los reportes iniciales sobre la adherencia de S.pyogenes a células epiteliales indicaron la participación de la "fibrillas" superficiales en el fenómeno de adherencia, de este modo las cepas ricas en proteína M exhibieron mayor cantidad de fibrillas y mejor adherencia a células epiteliales, que las cepas que producían poca cantidad de esta proteína(1,12).

Ellen y Gibbons en 1973 encontraron que mediante un tratamiento enzimático, la proteína M y las fibrillas eran eliminadas, reduciéndose consecuentemente la habilidad de estas bacterias para adherirse a células epiteliales(13).

Beachey y Ofek en 1976, indicaron que las fibrillas de estas bacterias contienen tanto proteína M como ácido lipoteicoico y que el tratamiento con proteasas removía tanto a la proteína M como al ALT(6). Encontrando que una de las estructuras que participaba en la unión de la bacteria a la célula huésped era el ALT(5). Los anticuerpos dirigidos en contra de la proteína M y el carbohidrato C, no eran capaces de bloquear al unión bacteria-célula faríngea; lo que si se lograba con anticuerpos anti-ALT(6,7).

Beachey en 1982 manifestó que el ATL y la proteína M se orientaban de tal manera que dejaban libre el extremo lipídico al interactuar con los receptores específicos en las superficies mucosas de las células epiteliales(4).

Mirner y cols en 1983 señalaron en sus informes que la superficie del estreptococo es altamente hidrofóbica(29,30).

Beachey(1981), Simpson(1980) y otros autores han estudiado la interacción entre la albumina sérica y el ALT de S.pyogenes; observaron que esta proteína sérica se unía a la porción lipídica del ALT, bloqueando la adherencia de esta bacteria en una relación dosis-respuesta(4,6,42). Así mismo la albumina se adhería con mayor especificidad a los complejos ALT-proteína M, lo que confirmaba la existencia de extremos lipídicos libres que podrían interactuar con los receptores celulares(42).

Las características que presentan las células de la farínge se han venido estudiando para tratar de conocer el mecanismo o carácter de dicha unión. Se ha encontrado que la fibronectina, es una glicoproteína compuesta de dos polipéptidos que asociados a través de puentes de disulfuro cerca del grupo carboxilo-terminal formaban un dímero con un peso molecular de aproximadamente 550,000 daltones(37), que se localizan en la superficie de la célula epitelial de la farínge, y contienen varios sitios de unión a ácidos grasos que son capaces de reconocer el lípido principal del ALT del estreptococo(11,43).

Courtney y cols(1983) fragmentaron la molécula de fibronectina con termolisina y adsorbieron los fragmentos con células de S.pyogenes. La bacteria eliminó dos bandas de aproximadamente 24 y 28 kilodaltones observadas en SDS-PAGE(10,11). Estudios posteriores demostraron que los fragmentos eran reconocidos por anticuerpos dirigidos contra la fracción peptídica amino terminal de la molécula de fibronectina, lo que se confirmó también con el empleo de anticuerpos monoclonales(11, 43).

El dominio de unión de la fibronectina, se dice esta contenido en un fragmento de 24 kilodaltones orientado hacia el amino terminal de la molécula. Este sitio proporciona una unión específica para el ALT S.pyogenes(3).

El amino terminal de la fibronectina contiene una estructura denominada "five fingers"(dedos),constituída por uniones de disulfuro intracadenales, estas regiones son ricas en aminoácidos hidrofóbicos, se ha propuesto que la mitad de la molécula de ALT interactúa con un paquete hidrofóbico creado por uno o más de estos "dedos" y que dicha interacción molecular puede servir como un mecanismo para la adhe

rencia del estreptococo del grupo A a células epiteliales como se propone en la figura 2(11).

El fenómeno de adherencia bacteriana representa un determinante ecológico en la colonización microbiana de las diversas superficies celulares del huésped(6,19,32); así mismo, la adherencia bacteriana a la superficie de las mucosas es el evento inicial en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas por bacterias en animales y humanos(4).

Las células epiteliales bucales se han utilizado para el estudio de la adherencia de los estreptococos orales(17). En este sentido se ha demostrado la participación de componentes salivales tales como mucinas, IgA's, glicoproteínas, células descamativas, sales inorgánicas, lisozimas, albumina y fibronectina participan en la interacción bacteria-célula hospedero, así como en la colonización por estreptococos(17,20,24,41).

La interacción de la bacteria patógena con la célula del hospedero provoca la acción de fuerzas de atracción y repulsión que operan entre los componentes de la superficie de ambas células, eucariótica y procariótica. Estas fuerzas incluyen interacciones estereoespecíficas, entre un polímero adhesivo bacteriano(adhesina) y un receptor complementario en la membrana de la célula hospedero, el cual aumenta la carga neta de superficie y la relativa hidrofobicidad de la superficie celular(30).

Un procedimiento para medir la capacidad de adherencia de los residuos lipofílicos bacterianos, consiste en medir la hidrofobicidad de estos, utilizando para tal propósito un hidrocarburo líquido conocido como n-hexadecano( $C_{16}H_{34}$ )(30).

Se ha utilizado n-hexadecano para medir la hidrofobicidad de diversas superficies celulares bacterianas como : S.pyogenes, S.sanguis ,

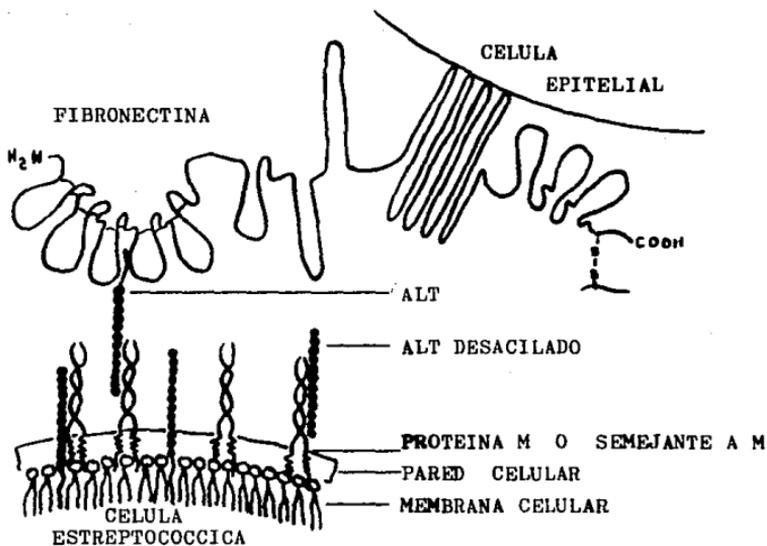


Figura 2. Modelo hipotético para la interacción de ALT en la superficie de *Streptococcus pyogenes* con fibronectina en la superficie de la célula epitelial. Tomado de Courtney, et al. 1980.(11).

A.calcoaceticus, E.coli, B.subtilis, S. aureus, S.albus, Ps.aeruginosa (2,9,30,34,35,36).

S.pyogenes tratado previamente con tripsina, pepsina a pH 4.5 o con HCl a 95°C, produce una reducción considerable en su capacidad de adherencia a n-hexadecano(26), considerándose que la adherencia a este producto puede ser dependiente de proteínas superficiales. La interacción estreptococo-n-Hex es inhibida por ciertas proteínas, entre ellas la albúmina sérica, aseverándose que la interacción del estreptococo con el n-Hex se lleva a cabo por residuos lipofílicos; dado por las regiones hidrofóbicas de las proteínas de superficie o por los complejos formados entre proteínas y glicolípidos, los que son orientados exponiendo su porción hidrofóbica a la superficie celular(9,30).

Courtney y cols. en 1985, demostraron que la fibronectina inhibe la adherencia de S.pyogenes a n-Hex de una manera dosis-dependiente( demostrando que los tratamientos que provocan una disminución en la adherencia de S.pyogenes a fibronectina también provocan una disminución de la adherencia de S.pyogenes a n-Hex ). La fibronectina si se incubaba previamente con ALT, pierde su capacidad para inhibir la adherencia de la bacteria a n-Hex; demostrando que la fibronectina se une al ALT(principal componente responsable de la hidrofobicidad del estreptococo) lo que provoca que esta molécula ya no presente la propiedad de inhibir la adherencia de S.pyogenes a n-Hex(9).

Utilizando al n-Hex como modelo de adherencia, Babu y cols en 1986, indicaron que la interacción de S.sanguis a n-Hex era inhibida con proteínas hidrofóbicas,provenientes de saliva, de 55 y 60 kilodaltonos(2).

El estudio de las superficies bacterianas ha provocado el desarrollo de técnicas sencillas que se han caracterizado por su bajo costo y fácil realización, entre estas técnicas se encuentran : la adherencia a hidrocarburos líquidos como el n-hexadecano(2,30,34,35,36), la adherencia a superficies solidas como el poliestireno(33,40), la adsorción en columnas cromatográficas de alta afinidad hidrofóbica, o el fenómeno del "Salting Out" utilizando sales de amonio(26). Estas técnicas tienden a ser evaluadas para comprobar su utilidad práctica en el diagnóstico y la investigación en bacteriología médica.

Al parecer las estructuras de caracter hidrofóbico(ALT) en la superficie del estreptococo juegan un papel importante en la adherencia del microorganismo a las células hospedero y por ende en la patogenicidad del mismo(14), por lo que un estudio de la capacidad de adherencia a n-hexadecano y a células Hep-2 de cepas de S.pyogenes aisladas de pacientes con fiebre reumática, sus contactos familiares, enfermos con faringitis estreptocócica y de personas aparentemente sanas puede aportar evidencias en la etiopatogenia de este microorganismo en la fiebre reumática y de su papel en la colonización presente en portadores y enfermos de infección estreptocócica.

## O B J E T I V O S .

### Objetivo General .

Determinar la capacidad de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de cepas de Streptococcus pyogenes aisladas de pacientes con fiebre reumática y sus contactos familiares, escolares portadores y niños con faringitis estreptocócica.

### Objetivos particulares .

Estandarizar la técnica de adherencia a n-hexadecano utilizando cepas de referencia de Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 y MR-481 y S.pyogenes M5.

Adaptar la técnica de adherencia a células Hep-2 descrita - por Nataro y cols. utilizando cepas de referencia de S.pyogenes

Determinar la capacidad de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de cepas de A.calcoaceticus y S.pyogenes de referencia.

Establecer la capacidad de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de cepas de estreptococos beta hemolíticos aisladas de diferentes fuentes.

## M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S .

### ADHERENCIA A n-HEXADECANO.

#### Material biológico.

54 cepas de Streptococcus pyogenes aisladas de escolares portadores de San Jerónimo Miacatlán Milpa Alta, D.F. (27).

10 cepas de estreptococos beta-hemolíticos aisladas de pacientes - con ataque agudo de Fiebre Reumática: 7 cepas de grupo A y 3 de grupo G del Instituto Nacional de Pediatría de la S.S. (8).

29 cepas de estreptococos beta-hemolíticos aisladas de contactos - familiares de los pacientes con fiebre reumática: 21 cepas de grupo A, 4 de grupo B, una de grupo C y 3 de grupo G (8).

31 cepas de estreptococos beta hemolíticos aisladas de niños con - faringitis estreptocócica: 16 cepas de grupo A, 4 de grupo B, 4 de - grupo C y 7 cepas de grupo G; aisladas de la clínica 29 "Gabriel Mancera" del I.M.S.S. (16).

#### Cepas de referencia.

S. pyogenes - E.N.C.B. 576 ( A/J17A4-CDC ) ( ATCC 12385 )

S. pyogenes - M2 -E.N.C.B. 591

S. pyogenes - M3 -E.N.C.B. 592

S. pyogenes - M5 -E.N.C.B. 594

S. pyogenes - M12 -E.N.C.B. 599

cepas proporcionadas por el cepario del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del I.P.N.

Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 (ATCC 31012) Testigo positivo -- para adherencia a n-hexadecano.

Acinetobacter calcoaceticus MR-481. Mutante de la cepa RAG-1 deficiente en adherencia a n-hexadecano. Testigo negativo para adherencia a n-hexadecano. Cepas proporcionadas por el Laboratorio de bacteriología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. Enviadas de Tel-Aviv, Israel por el Dr. Mel Rosemberg (34,35).

## Medios de cultivo .

Caldo Todd-Hewitt(T-H). Bioxon.

Caldo Infusión Cerebro Corazón(BHI). Bioxon.

Agar Soya Tripticaseína(TSA). Bioxon.

Gelosa Sangre de Carnero al 5 % ( G.S. ). Bioxon.

## Reactivos.

Reactivo de catalasa( peróxido de hidrógeno al 3 %)

Reactivo de coagulación Phadebact Streptococcus test(A,B,C, and G)

### Pharmacia Diagnostics.

Solución regularora de fosfatos, PBS pH 7.2 0.02M  $PO_4$  y 0.15M NaCl.

Solución reguladora PUM pH 7.1 ( 22.2g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 7.26 g  $KH_2PO_4$ ,

1.8 g urea, 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 1000 ml de  $H_2O$  destilada).

n-Hexadecano(  $C_{16}H_{34}$  ): Sigma.

## Material de vidrio .

Cajas de petri.

Tubos nuevos de 15 x 100 mm con tapón de rosca.

Matraz Erlen-meyer de 125 ml.

Pipetas Pasteur estériles.

Pipetas esteriles de 1 ml.

## Equipo.

Incubadora con agitación rotatoria. New Brunswick Mod.G25.

Estufa a 37°C.

Centrífuga Clínica.

Agitador Vortex-Genie. Modelo K-550-G

Espectrofotometro Bauch & Lomb (Mod. Spectronic 20).

## ADHERENCIA A CELULAS Hep-2 .

### Material biológico y cepas de referencia.

Se utilizaron las mismas cepas descrutas para adherencia a n-hexadecano.

### Células.

Se utilizó la línea celular Hep-2 de carcinoma epidermoide de la rínge humana.

### Medios de cultivo.

Caldo Todd-Hewitt(T-H). Bioxon.

Medio Mínimo Esencial(MEM). In Vitro.

Penicilina Estreptomícina(PES).

Suero de Ternera. In Vitro.

### Reactivos.

HCO<sub>3</sub>

Tripsina al 0.5 %

Cristal Violeta en Acido Cítrico(1%/2.1%)(25)

Solución reguladora de fosfatos.PBS pH7.2

Metanol Absoluto. J.T.Baker.

Balsamo de Canada.

### Material de vidrio.

Cajas de petri

Tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca.

Pipetas estériles de 1.0, 5.0 y 10 ml.

Pipetas pasteur estériles.

Microplaca con 24 pozos. Costar Cat# 3424 Mark II.

Portaobjetos y cubreobjetos.

### Equipo.

Estufa a 37°C , Campana de flujo laminar.

Micropipeta y puntas para micropipeta .

Microscopio óptico e invertido ,fotocolorímetro Klett-Summerson.

## M E T O D O S .

Cantidad de S.pyogenes utilizada en los ensayos de adherencia a n-hexadecano.

La cantidad de S.pyogenes se determinó a partir de un cultivo de 18-24 h de la cepa M5 en caldo T-H a 37°C. Se centrifugó a 2,500 rpm durante 15 min. Se lavó dos veces el paquete celular y se resuspendió en PBS pH 7.2. La suspensión bacteriana se ajustó en 3 tubos nuevos - 13 x 100 mm con tapón de rosca a aproximadamente 0.4 de Absorbancia a 530 nm (de acuerdo con Courtney et al(9)), utilizando un espectrofotómetro Bauch & Lomb mod. Spectronic 20, Se hicieron cuentas viables de los tubos por el método de Mile-Misra(23) utilizando pipetas Pasteur estériles para hacer diluciones logarítmicas en tubos de 7 x 50 mm con 9 gotas de caldo T-H. Se sembró una gota de cada una de las diluciones en placas de gelosa sangre dividida de acuerdo al diagrama 1. La placa de gelosa sangre se incubó 24 h a 37°C. Se contó el número de unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) utilizando un cuentacolonias.

Adherencia a n-hexadecano de S.pyogenes M5 en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento utilizando diferentes tiempos de agitación y cantidades de n-hexadecano en el ensayo:

La cepa de S.pyogenes M5 se sembró a partir de gelosa sangre en un matríz de 125 ml con 30 ml de caldo T-H, se incubó en agitación a 150 rpm durante 18-24 h a 37°C. Las bacterias se centrifugaron a 2 500 rpm durante 15 min. Se lavaron 2 veces con regulador de fosfatos PBS pH 7.2 y se ajustaron 3 ml a 0.4 Abs. a 530 nm en tubos nuevos o tratados con HCl de 13 x 100 mm con tapón de rosca. 7 tubos ajustados a 0.4 Abs. se le agregaron diferentes cantidades de n-hexadecano (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml) y se agitaron a máxima velocidad en un agitador Vortex-Genie durante 1 minuto; 6 tubos ajustados a 0.4 Abs. se les agregó 0.3 ml de n-hexadecano y se agitaron a diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 min) en Vortex. Después de la separación de fases se volvieron a leer a 530 nm. El porcentaje de adherencia se calculó utilizando la fórmula:

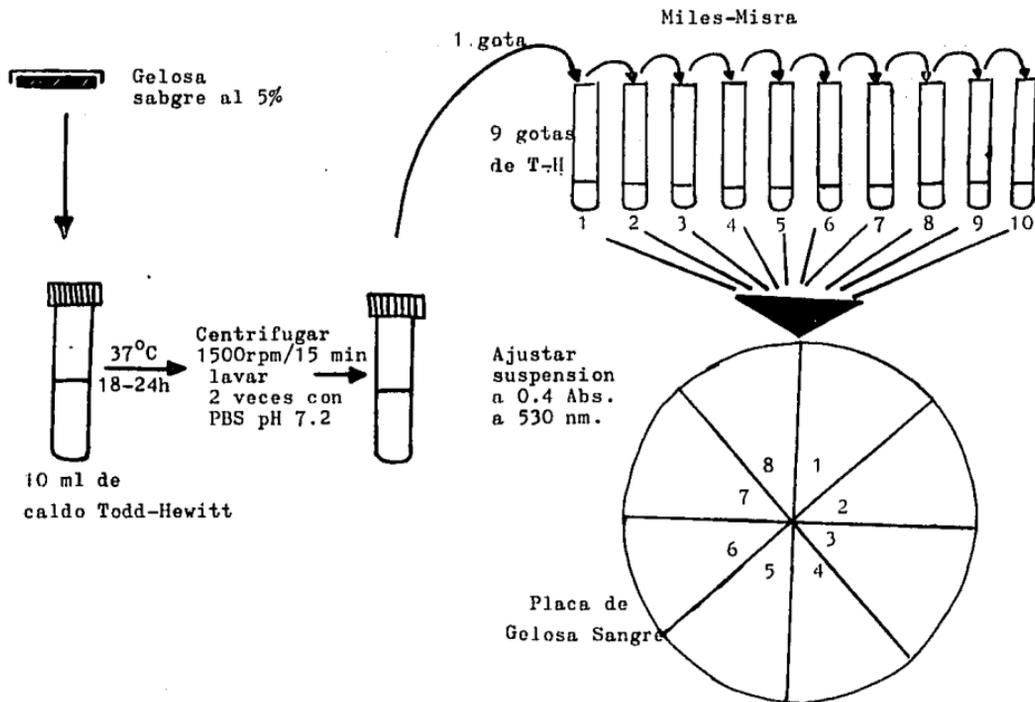


Diagrama 1. Determinación de la cantidad de *S. pyogenes* utilizada en los ensayos de adherencia a n-hexadecano utilizando el método de Miles-Misra.

$$\% \text{ de Adherencia a n-hexadecano.} = 1 - \left( \frac{\text{Abs. después de la agitación}}{\text{Abs. antes de la agitación}} \right) \times 100$$

La adherencia en fase logarítmica se hizo inoculando un matraz con 30 ml de caldo T-H un cultivo de S.pyogenes M5 con 18-24 hs de crecimiento y se incubó en agitación a 150 rpm durante 3 h a 37°C(9). ver diagrama 2.

Adherencia a n-hexadecano de cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoaceticus en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

El ensayo de adherencia para las cepas de referencia de S.pyogenes M2, M3, M5 y M12 se realizó como se describió en el diagrama 2 para la cepa M5, bajo las siguientes condiciones: las cepas se crecieron en tubos con 10 ml de caldo T-H; se utilizaron 0.3 ml de n-hexadecano y un minuto de agitación tanto para las cepas crecidas en fase -- estacionaria como las crecidas en fase logarítmica. El porcentaje de adherencia a n-hexadecano se calculó como se mencionó anteriormente.

Las cepas de A.calcoaceticus RAG-1(ATCC 31012) y MR-481 se incubaron a 32°C y se realizó el mismo procedimiento de adherencia a n-hexadecano para ambas fases de crecimiento.

Adherencia a n-hexadecano de cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoaceticus utilizando medios de cultivo diferentes y dos reguladores de pH en el ensayo.

A partir de placas de gelosa sangre, para cada cepa de referencia se inocularon dos matraces de 125 ml conteniendo cada uno 50 ml de caldo T-H y caldo para infusión cerebro corazón(BHI). Se incubaron ambos matraces en agitación a 150 rpm durante 24 h a 37°C. Las cepas de A.calcoaceticus RAG-1 y MR-481 se incubaron a 32°C. Se centrifugaron 20 ml de cultivo de cada matraz, se tomaron 10 ml, se lavaron

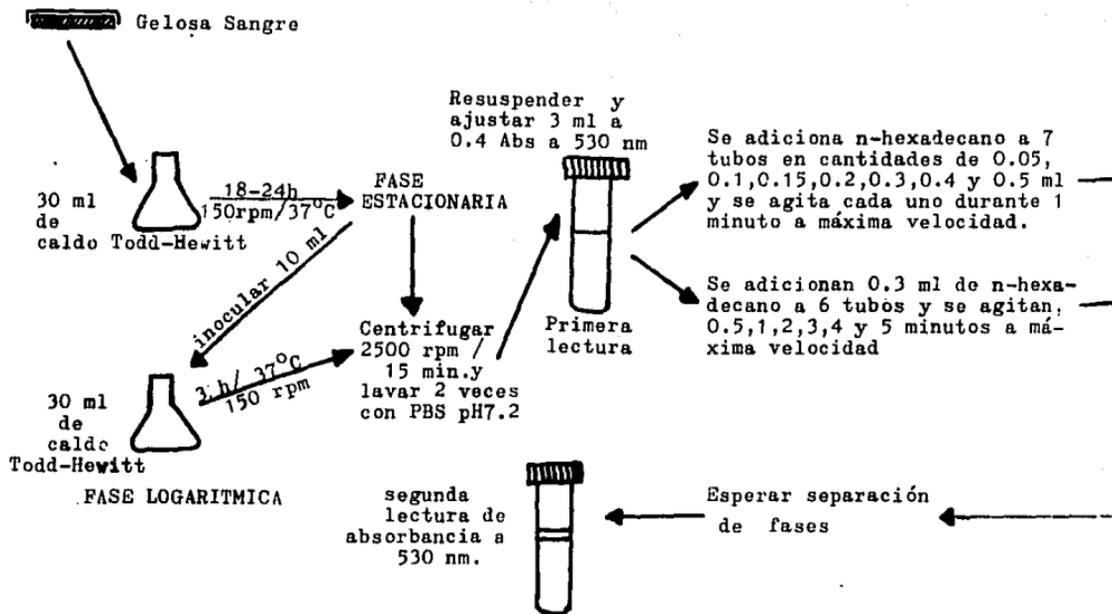


Diagrama 2 . Adherencia a n-hexadecano de *S. pyogenes* M5 en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento utilizando diferentes tiempos de agitación y cantidades de n-hexadecano en el ensayo.

2 veces y se resuspendieron utilizando PBS pH 7.2 como regulador ,y para otros 10 ml se utilizó PUM pH 7.1 como regulador. Las suspensiones se ajustaron a una absorbancia de aproximadamente 0.4 de lectura a 530 nm en tubos nuevos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. A 3 ml de cada suspensión ajustada, se adicionaron 0.3 ml de n-hexadecano. Se agitó a máxima velocidad en un agitador Vortex-Genie durante 1 minuto. Después de la separación de fases se midió nuevamente la absorbancia de la suspensión bacteriana en un espectrofotómetro Bauch & Lomb( Spectronic 20). Ver diagrama 3. El porcentaje de adherencia se calculó como se menciona anteriormente.

Adherencia a n-hexadecano de cepas de estreptococos beta-hemolíticos aisladas de niños con fiebre reumática, sus contactos familiares ,portadores sanos y enfermos con faringitis estreptocócica.

La adherencia a n-hexadecano de 124 cepas de estreptococos beta-hemolíticos aislados de diferentes orígenes se realizó de la manera siguiente: Las cepas de estreptococo beta-hemolítico(conservadas en caldo T-H) se sembraron en placas de gelosa sangre para verificar su viabilidad y pureza utilizando pruebas de : a) hemólisis, b) morfología colonial; c) tinción de Gram, d) catalasa, e) sensibilidad a bacitracina 0.4 U y f) coagulación con Phadebact Streptococcus test( A,B,C and G ) Pharmacia Diagnostics.(14). La adherencia a n-hexadecano de las cepas de estreptococo beta hemolíticos de grupos A,B,C y G se realizó como se indica en el diagrama 4. Las cepas se incubaron en tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca conteniendo 10 ml de caldo T-H, se incubaron en agitación a 150 rpm durante 18-24 h a 37°C. El paquete bacteriano se centrifugó a 2 500 rpm durante 15 minutos. Se lavó dos veces y se resuspendió en regulador de PBS pH 7.2 ajustandose 3 ml de la suspensión en tubos nuevos de 13 x 100 mm con tapón de rosca a aproximadamente 0.4 de absorbancia a 530 nm. A cada tubo se le adicionó 0.3 ml de n-hexadecano y se agitaron durante un minuto a máxima velocidad en un agitador Vortex-Genie. Después de la separación de fases se midió nuevamente la absorbancia en un espectrofotómetro Bauch & Lomb(Spectronic 20). El porcentaje de adherencia a n-Hex se determinó como se menciona antes.

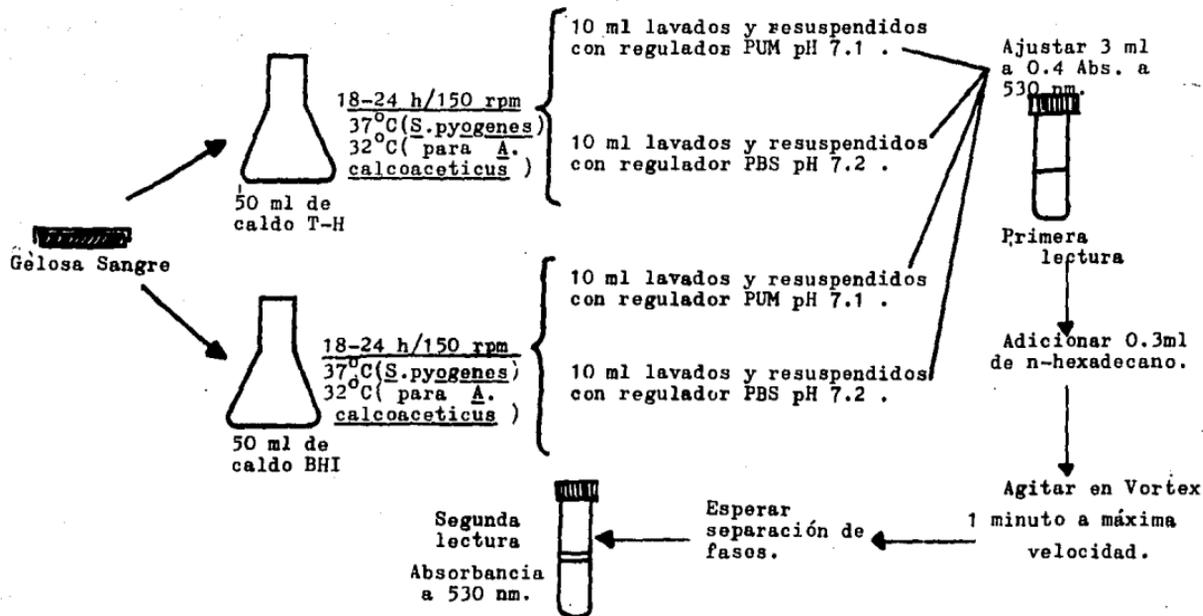


Diagrama 3. Adherencia a n-hexadecano de cepas de referencia de *S.pyogenes* y *A.calcoaceticus* utilizando medios de cultivo diferentes y dos reguladores de pH en el ensayo .

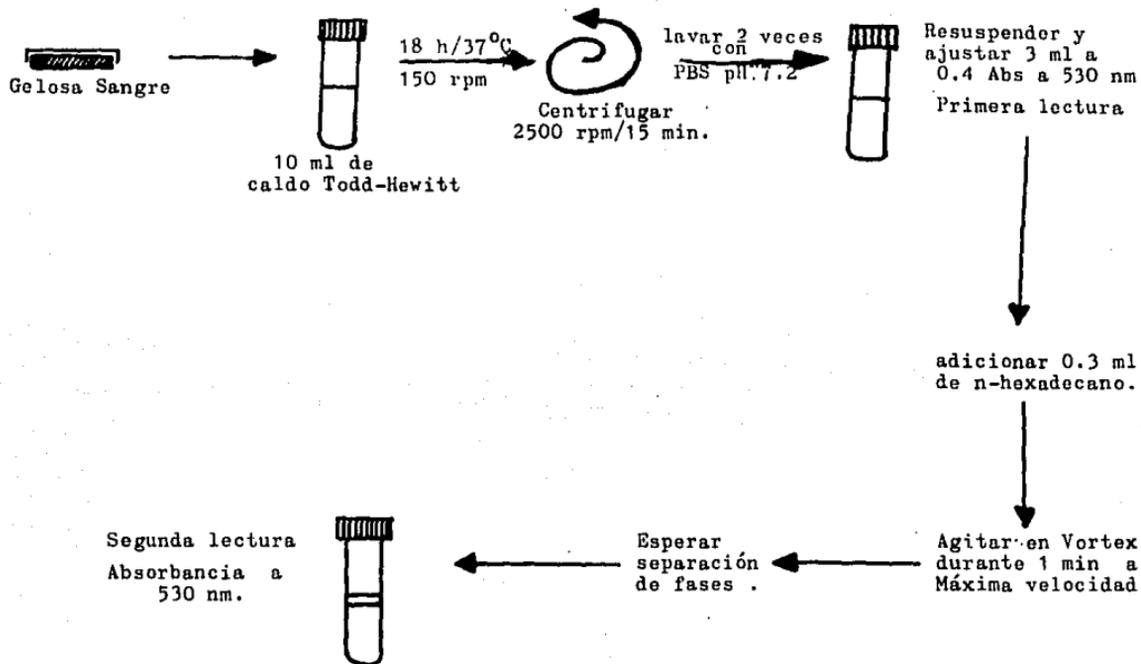


Diagrama 4 . Adherencia a n-hexadecano de cepas de Estreptococos beta-hemolíticos aislados de diferentes fuentes. (Modificado de Courtney et al. 1985. Infect. Immun. 47:341-343.)

Adherencia a células Hep-2 de las cepas de estreptococo beta hemolíticos, se realizó de acuerdo al diagrama N°5.

#### Preparación de la microplaca.

Se tripsinizaron botellas con un crecimiento celular confluyente (100%) de células Hep-2 utilizando 0.2-0.3 ml de tripsina al 5%, se agregó 30 ml de MEM al 5% de suero de ternera sin antibiótico para resuspender y se colocaron 1 ml de la suspensión de células Hep-2 en cada pozo de una microplaca (Costar N°3424 Mark II) de 24 pozos con una laminilla de vidrio en cada uno de ellos. La microplaca preparada se incubó 24 h a 37°C hasta la obtención de una confluencia celular del 70-80 %.

#### Preparación del inóculo.

A partir de gelosa sangre al 5 %, cada una de las cepas de estreptococos fueron inoculadas en un tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca con 5 ml de caldo T-H y se incubaron 18 h a 37°C; Para determinar la cantidad de bacterias utilizadas en el ensayo, después de la incubación y antes de la inoculación a la microplaca, se midió la turbiedad del cultivo en un fotocolorímetro Klett-Summerson utilizando filtro azul o en espectrofotómetro Bauch & Lomb (Spectronic 20) a 530 nm. Las lecturas en Klett-Summerson variaron de 140 a 395 Unidades Klett y de espectrofotómetro de 10 a 25 % de Transmitancia, y se realizaron cuentas viables de algunos tubos por el método de Mile-Misra descrito anteriormente (diagrama 1).

#### Ensayo de adherencia.

Se inocularon 50 ul de la suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente  $4 \times 10^6$  UFC/ml a cada pozo de la microplaca y se incubó a 37°C durante 3-4 h. Las laminillas se lavaron 6 veces con PBS pH 7.2, posteriormente se fejaron con metanol absoluto y se tiñieron con cristal violeta al 1 % en ácido cítrico al 2.1 % durante 15 minutos (25). Se lavaron en agua para eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar. Las laminillas se montaron sobre cubreobjetos utilizando como líquido de montaje, bálsamo de Canada, se observaron a inmersión y se

Bacterias inoculadas  
en caldo Todd-Hewitt

Medir turbiedad en  
Klett-Summerson o  
Absorbancia a 530 nm  
en espectrofotómetro.

Inocular 50  $\mu$ l a cada  
pozo de la microplaca  
( $\approx 4 \times 10^6$  UFC/ml )

Botellas con crecimiento  
celular confluyente (100%)

Tripsinizar con 0.3 ml de  
tripsina al 0.5 %.

A la botella agregar 30 ml  
de MEM al 5% de suero de ter-  
nera sin antibiótico y resus-  
pender.

Agregar 1 ml a cada pozo de  
una microplaca de 24 pozos con  
laminillas de vidrio.

Microplaca con una confluencia  
celular del 70-80 %.

Lavar 6 veces con PBS pH 7.2

Fijar con Metanol Absoluto

Teñir con cristal violeta al 1%  
en ácido cítrico 2.1% durante  
15 minutos.

Lavar 3 veces con agua destilada  
y dejar secar

Observar a inmersión.

Diagrama 5 . Adherencia de estreptococos beta-hemolíticos a  
células Hep-2. (Modificado de Nataro, J.P. y cols (28) ).

determinó el porcentaje de células Hep-2 que presentaron más de 5 bacterias por célula, observándose aproximadamente 100 campos al - microscopio por preparación.

#### C R I T E R I O S   D E   L E C T U R A .

n-HEXADECANO.

De acuerdo con los ensayos previos realizados con cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoaceticus. Se considero adherencia positiva a una adherencia a n-hexadecano superior al 80 %.

CELULAS Hep-2 .

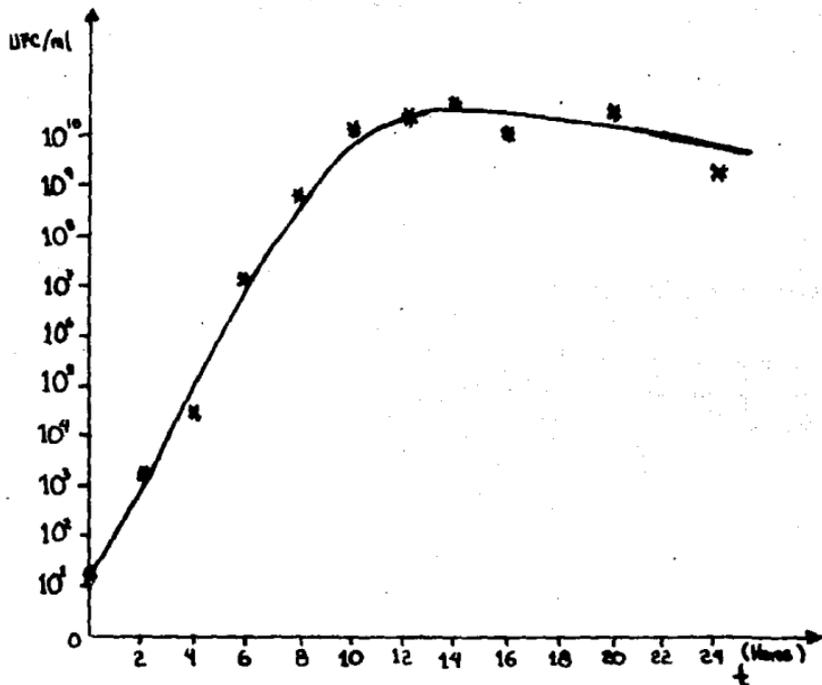
Más del 80 % de las células con más de 5 bacterias adheridas.

## RESULTADOS.

La gráfica N° 1 muestra la curva de crecimiento de la cepa de S. pyogenes ENCB 576(ATCC 12385) en la que se observó que la fase estacionaria de crecimiento comenzó a partir de las 12 h del cultivo, observándose que a las 3 h de cultivo las bacterias se encuentran en la fase logarítmica, lo que nos ayudó a determinar los tiempos que se utilizaron para ensayar nuestros cultivos en diferentes fases de crecimiento.

La tabla N°2 y gráfica N°2 muestran la cantidad aproximada de bacterias utilizadas en los ensayos de adherencia a n-hexadecano que correspondió a  $3.5 \times 10^5$  UFC/ml para una absorbancia de 0.4 a 530nm, utilizando el método de Miles-Misra (descrito en Materiales y Métodos). El porcentaje de adherencia a n-Hex de la cepa de S. pyogenes M5 creció tanto en fase logarítmica y estacionaria y utilizando diferentes tiempos de agitación se muestran en la tabla N° 3 y la gráfica N° 3 - en donde se observa que en fase estacionaria la cepa presenta un porcentaje de adherencia a n-Hex mayor al 60% para todos los tiempos de agitación utilizados en el ensayo (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos), observándose un mayor porcentaje de adherencia cuando se realizó la prueba a 0.5 y 5 minutos de agitación (77.83% y 77.3% respectivamente). En fase logarítmica el porcentaje de adherencia fue menor al 25 % para los tiempos probados, excepto a 5 minutos donde se presentó 42.4 % de adherencia a n-Hex.

Se utilizaron en el ensayo de adherencia diferentes cantidades de n-Hex, las bacterias en fase estacionaria de crecimiento, presentaron un porcentaje de adherencia mayor a n-Hex que las probadas en fase logarítmica, donde se observó que la adherencia fue menor al 15 % cuando se utilizaron concentraciones mayores de 0.2 ml del hidrocarburo; en contraste con la fase estacionaria el porcentaje de adherencia -- fue mayor al 85 % para estas cantidades de n-Hex probadas, como lo muestran la tabla N° 4 y la gráfica N° 4.

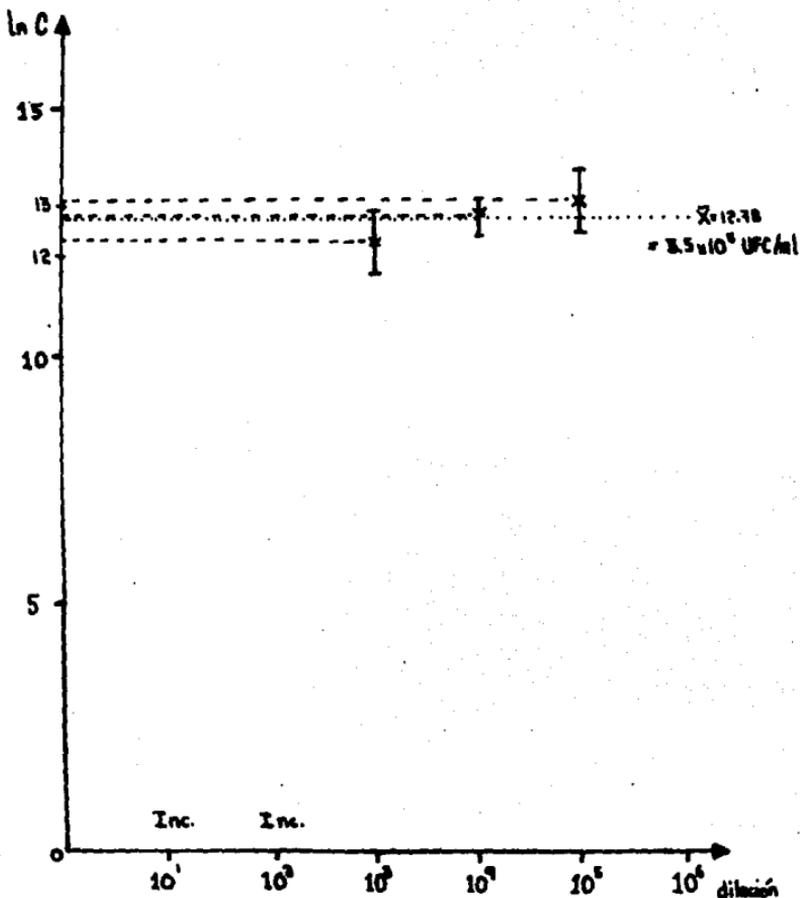


Gráfica 1.- Curva de crecimiento de S. pyogenes ENCB 576(ATCC 12385) crecida en caldo Todd-Hewitt en agitación a 150 rpm, 37°C. las UFC/ml se determinaron por el metodo de Miles-Misra.

tubo ajustado a 0.414 Abs.			tubo ajustado a 0.414 Abs.			tubo ajustado a 0.39 Abs.		
Sector(*)	Dil.(**)	# UFC colonias	Sector	Dil.	# UFC colonias	Sector	Dil.	# UFC colonias
0	0	Incontables.	0	0	Inc.	0	0	Inc.
1	10 <sup>1</sup>	Inc.	1	10 <sup>1</sup>	Inc.	1	10 <sup>1</sup>	Inc.
2	10 <sup>2</sup>	Inc.	2	10 <sup>2</sup>	Inc.	2	10 <sup>2</sup>	Inc.
3	10 <sup>3</sup>	389	3	10 <sup>3</sup>	122	3	10 <sup>3</sup>	158
4	10 <sup>4</sup>	54	4	10 <sup>4</sup>	38	4	10 <sup>4</sup>	29
5	10 <sup>5</sup>	10	5	10 <sup>5</sup>	5	5	10 <sup>5</sup>	3
6	10 <sup>6</sup>	0	6	10 <sup>6</sup>	0	6	10 <sup>6</sup>	0
7	10 <sup>7</sup>	0	7	10 <sup>7</sup>	0	7	10 <sup>7</sup>	0
8	10 <sup>8</sup>	0	8	10 <sup>8</sup>	0	8	10 <sup>8</sup>	0
0	0	Inc.	0	0	Inc.	0	0	Inc.
1	10 <sup>1</sup>	Inc.	1	10 <sup>1</sup>	Inc.	1	10 <sup>1</sup>	Inc.
2	10 <sup>2</sup>	Inc.	2	10 <sup>2</sup>	Inc.	2	10 <sup>2</sup>	Inc.
3	10 <sup>3</sup>	397	3	10 <sup>3</sup>	116	3	10 <sup>3</sup>	221
4	10 <sup>4</sup>	44	4	10 <sup>4</sup>	28	4	10 <sup>4</sup>	26
5	10 <sup>5</sup>	5	5	10 <sup>5</sup>	3	5	10 <sup>5</sup>	6
6	10 <sup>6</sup>	0	6	10 <sup>6</sup>	0	6	10 <sup>6</sup>	0
7	10 <sup>7</sup>	0	7	10 <sup>7</sup>	0	7	10 <sup>7</sup>	0
8	10 <sup>8</sup>	0	8	10 <sup>8</sup>	0	8	10 <sup>8</sup>	0

(\*)- Sector de la placa de gelosa sangre . (\*\*) - dilución utilizada en cada sector.

Tabla 2 . Cantidad de S.pyogenes crecido en caldo Todd-Hewitt a 37°C/ 18-24 h con agitación a 150 rpm y ajustado a 0.4 de Abs. a 530 nm. Determinación realizada por el método de Miles-Minsra.



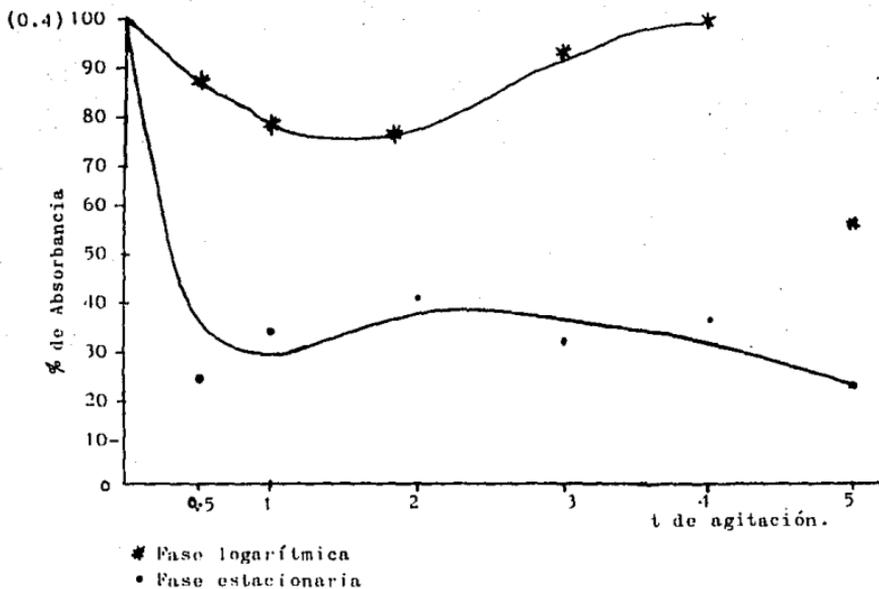
Grafica 2. Cantidad de S. pyogenes correspondiente a una Abs. 0.4 a 530 nm. crecida en caldo Todd-Hewitt a 37°C/18 h. determinada por el metodo de Miles-Minsra.

Tiempo de agitación(min)	<u>Fase logarítmica</u>		<u>Fase estacionaria</u>	
	% de Adherencia	% de Absorbancia	% de Adherencia	% de Absorbancia
.5	12.7	87.3	77.83	22.17
1	22.05	77.95	66.13	33.87
2	24.24	75.76	59.99	40
3	6.66	93.34	68.17	31.8
4	0	100	64.21	35.79
5	42.41	57.59	77.31	22.69

Tabla 3 .Adherencia de S.pyogenes M5 en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento utilizando diferentes tiempos de agitación en el ensayo de adherencia a n-hexadecano.

cantidad de n-hexadecano(ml)	<u>Fase logarítmica</u>		<u>Fase estacionaria</u>	
	% de adherencia	% de Absorbancia	% de Adherencia	% de Absorbancia
0.05	7.95	92.05	46.07	53.93
0.1	5.33	94.67	71.47	28.53
0.15	9.17	90.83	81.77	18.23
0.2	10.4	89.6	87.28	12.72
0.3	7.95	92	89.84	10.16
0.4	10.48	89.5	88.19	11.81
0.5	15.39	84.6	94.32	5.68

Tabla 4 .Adherencia a n-hexadecano de S.pyogenes M5 en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento utilizando diferentes cantidades de n-hexadecano en el ensayo.



Gráfica 3. Porcentaje de absorbancia de *S. pyogenes* M5 en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento en diferentes tiempos de agitación usados en el ensayo de adherencia a n-hexadecano.

De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar las bacterias en fase estacionaria de crecimiento, 0.3 ml de n-Hex utilizando 3 ml de suspensión bacteriana y 1 minuto de agitación de acuerdo con las condiciones que previamente han establecido algunos investigadores(2,9, 30,35).

Se midió la adherencia a n-hexadecano de las cepas de referencia de S.pyogenes M2, M3, M5 y M12 y de A.calcoaceticus RAG-1 y MR-481, y no se observó una diferencia significativa entre la adherencia a n-hexadecano de la cepa crecida en fase logarítmica y las cepas crecidas en fase estacionaria de crecimiento, Tabla N°5 y gráfica N° 5 en comparación con las observadas en las tablas N° 2, 3 y 4.

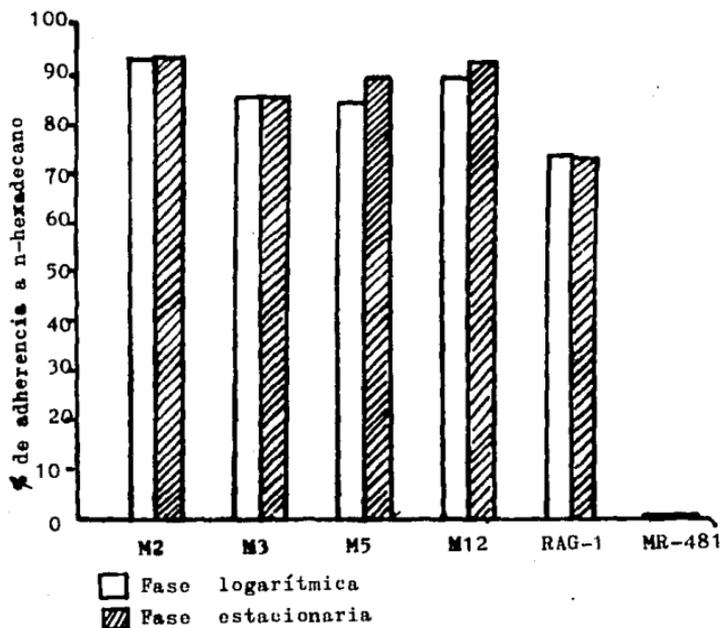
Las cepas de referencia de A.calcoaceticus presentaron un comportamiento esperado, ya que la cepa MR-481,mutante derivada de la cepa RAG-1, presentó una baja adherencia <1% comparada con la RAG-1 > 70 %. Ambas fueron utilizadas como testigos de referencia en los ensayos de adherencia a n-hexadecano actualmente descritos(9,30,35).

El porcentaje de adherencia a n-hexadecano de las cepas de referencia tanto de S.pyogenes como de A.calcoaceticus, como muestra la tabla N°6 y la gráfica N° 6 y 7, fue ligeramente favorecido por el uso de PBS pH 7.2 como regulador de pH y no se encontró una diferencia en el uso tanto de caldo Todd-Hewitt como de BHI como medio de crecimiento en fase estacionaria.

La tabla 7 y la gráfica 8 muestran las diferencias observadas en la adherencia a n-Hex de las cepas de referencia de S.pyogenes y de A.calcoaceticus cuando se incuban a 37°C y 32°C respectivamente con y sin agitación de 18-24 h. Todas las cepas de referencia de S.pyogenes mostraron una adherencia a n-hexadecano mayor del 80 % cuando se utilizó el cultivo en agitación a 150 rpm, en tanto que las cepas M3 y M5 crecidas sin agitación presentaron una adherencia menor al 80 %. Las diferencias de adherencia en cultivos con y sin agitación; las cepas S.pyogenes M2, M3 y M12 presentaron adherencia pequeña (< 7%). Sin embargo para las cepas M5 y RAG-1 las diferencias fueron muy superiores a las anteriores 88.9 y 72.8 % respectivamente con agitación y 56.9 y 34.5 % sin agitación. De acuerdo a las metodologías usadas por Ofek(30), Rosenberg(35), Courtney(9) y Babu(2); y de acuerdo a los resultados obtenidos se establecieron las condiciones para la re

Cepas	<u>Fase logarítmica</u> % de Adherencia	<u>Fase estacionaria</u> % de adherencia
<u>S.pyogenes</u>		
M 2	92.92	93.92
M 3	85.7	85.6
M 5	84.72	89.21
M 12	88.9	91.51
<u>A.calcoaceticus</u>		
MR 481	0	.04
RAG-1	73.61	72.18

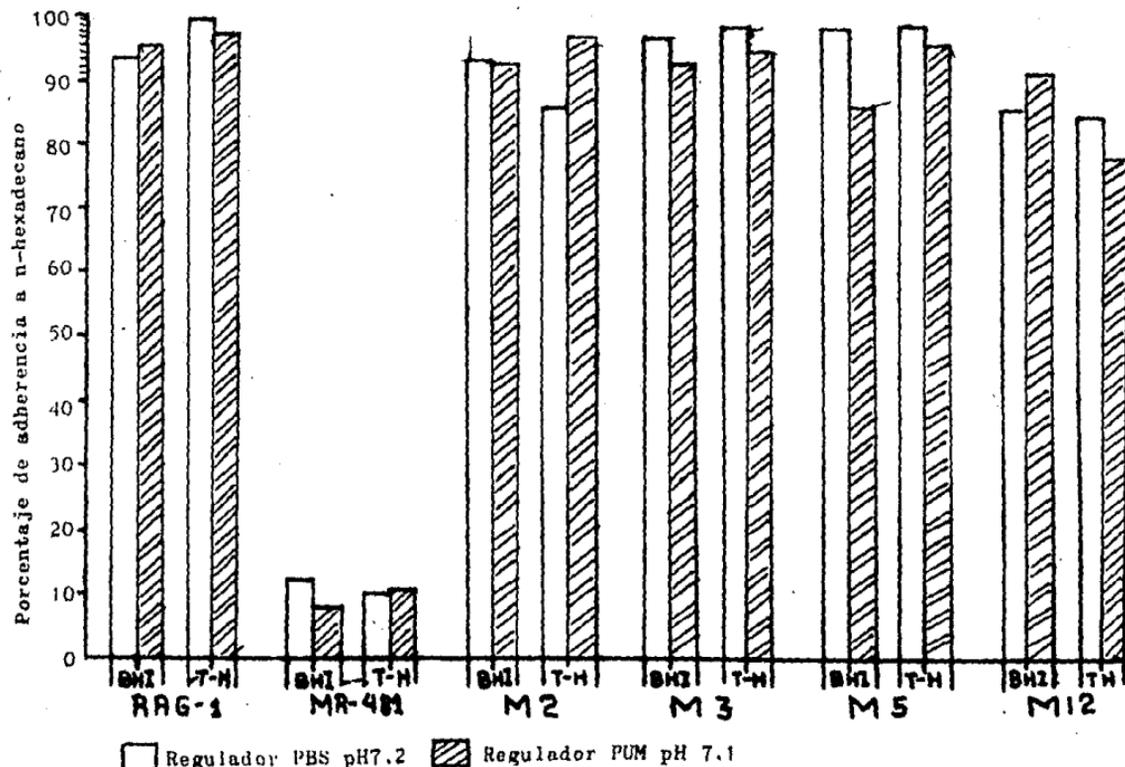
Tabla 5 .Adherencia a n-hexadecano de las cepas de S.pyogenes y A.calcoaceticus de referencia probadas en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.



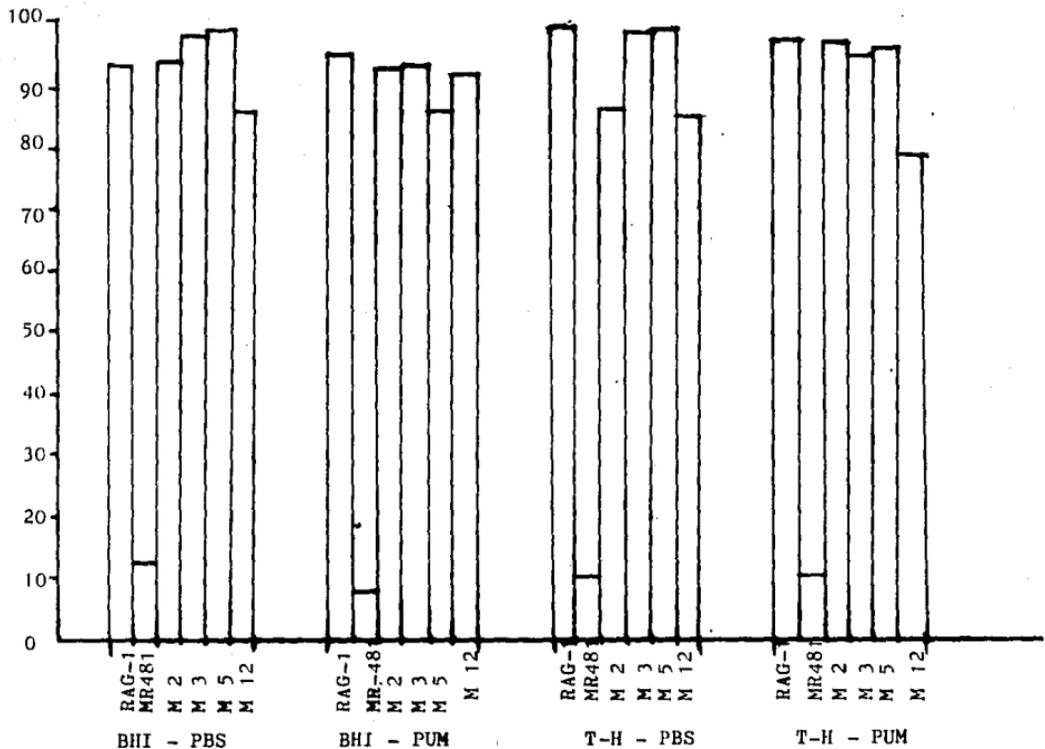
Gráfica 5. Adherencia a n-hexadecano de diferentes cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoaceticus (RAG-1 y MR-481) crecidas en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

C e p a	medio de cultivo.	regulador de pH.	% de adherencia a n-hexadecano.
<u>A.calcoaceticus</u>			
RAG-1	BHI	PBS	93.79
RAG-1	BHI	PUM	95.71
RAG-1	T-H	PBS	99.5
RAG-1	T-H	PUM	96.22
MR 481	BHI	PBS	12.84
MR 481	BHI	PUM	7.89
MR 481	T-H	PBS	11.54
MR 481	T-H	PUM	10.59
<u>S.pyogenes</u>			
M 2	BHI	PBS	93.62
M 2	BHI	PUM	92.07
M 2	T-H	PBS	85.26
M 2	T-H	PUM	97.67
M 3	BHI	PBS	97.18
M 3	BHI	PUM	92.61
M 3	T-H	PBS	98.96
M 3	T-H	PUM	79.03
M 5	BHI	PBS	98.75
M 5	BHI	PUM	85.78
M 5	T-H	PBS	98.91
M 5	T-H	PUM	95.95
M 12	BHI	PBS	84.98
M 12	BHI	PUM	91.18
M 12	T-H	PBS	83.61
M 12	T-H	PUM	78.12

Tabla 6. Adherencia a n-hexadecano de cepas de A.calcoaceticus y S.pyogenes ensayadas en fase estacionaria de crecimiento utilizando diferentes medios de cultivo y dos reguladores de pH.



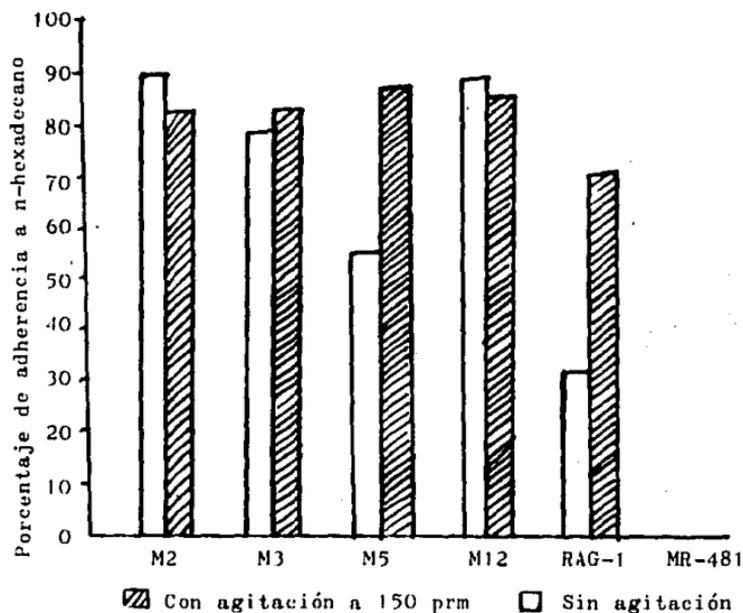
Gráfica N°6 . Adherencia de cepas de *A.calcoaceticus* y *S.pyogenes* de referencia a n-hexadecano utilizando diferentes medios de cultivo y reguladores de pH para la realización del ensayo en fase estacionaria de crecimiento .



Gráfica 7. Adherencia a n-hexadecano de cepas de referencia de *A. calcoaceticus* y *S. pyogenes* crecidas en diferentes medios de cultivo y utilizando diferentes reguladores de pH con cepas crecidas en fase estacionaria.

Cepa	% de adherencia con agitación(150rpm)	% de adherencia sin agitación.
<u>S.pyogenes</u>		
M 2	83.29	90.52
M 3	83.5	79.67
M 5	88.9	56.97
M 12	86.3	89.76
<u>A.calcoaceticus</u>		
RAG-1	72.8	34.55
MR 481	0	0

Tabla 7. Adherencia a n-hexadecano de cepas de S.pyogenes y A.calcoaceticus de referencia probadas en fase estacionaria de crecimiento con y sin agitación a -- 150 rpm.



Gráfica 8.- Adherencia a n-hexadecano de cepas de referencia de A.calcoaceticus y S.pyogenes, crecidas en caldo T-II con y sin agitación a 150 rpm.

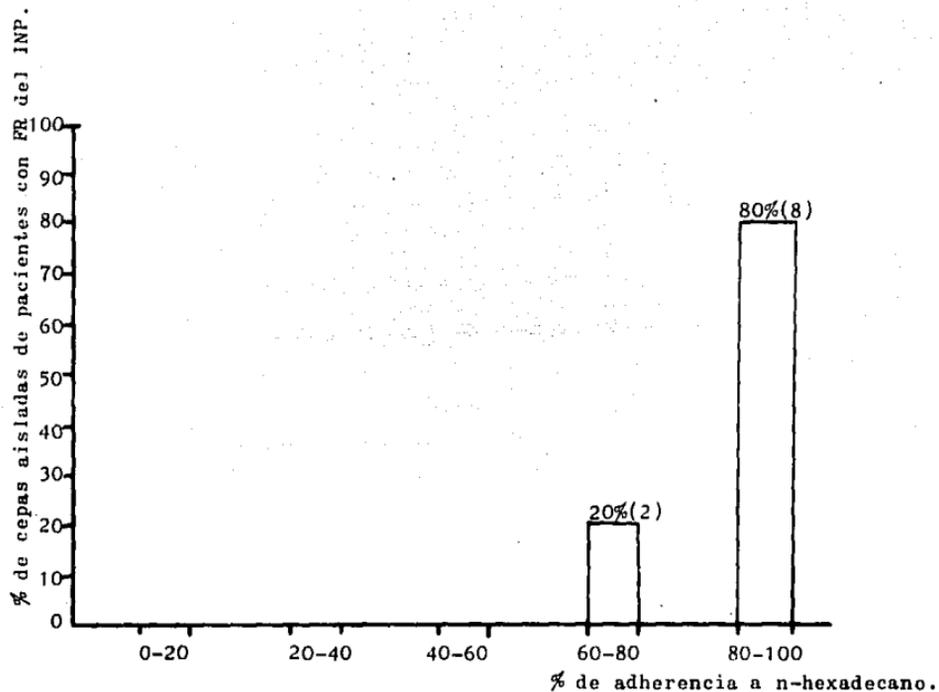
alización de los ensayos de adherencia a n-Hex para las cepas de referencia como para las cepas de estreptococos beta hemolíticos aislados de diferentes fuentes. Condiciones de trabajo que ya fueron descritas en la parte de adherencia a n-Hex de cepas de estreptococos beta hemolíticos aislados de niños con fiebre reumática, sus contactos familiares, portadores sanos y enfermos con faringitis estreptocócica.

La gráfica N°9 muestra la distribución de la adherencia a n-Hex de las cepas de estreptococos beta hemolíticos (EBH) aislados de pacientes con fiebre reumática (FR) del Instituto Nacional de Pediatría, donde el 20%(2) de las cepas presentaron una adherencia a n-Hex entre 60 y 80 % y el 80%(8) de las cepas una adherencia mayor al 80%.

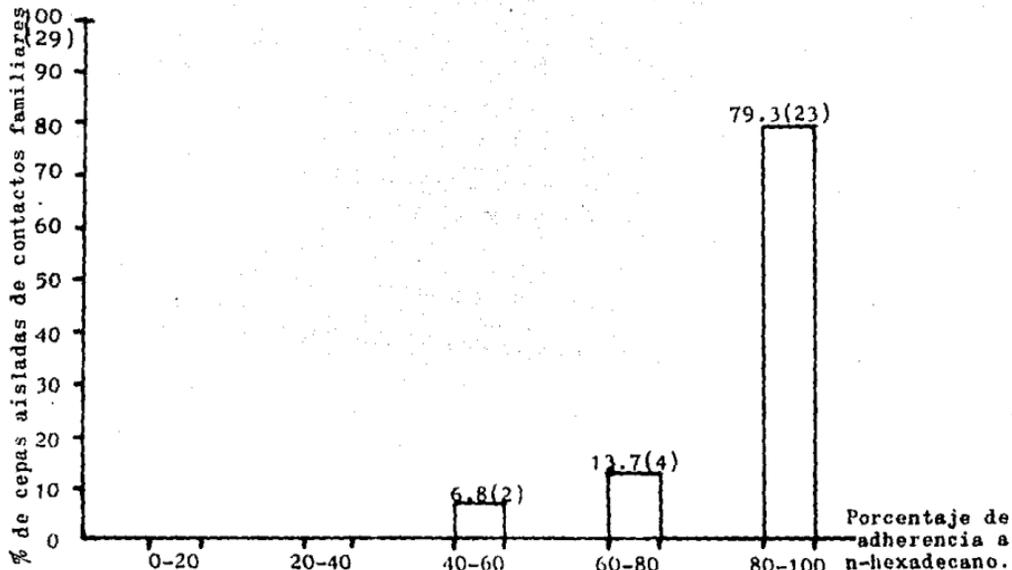
En la gráfica N°10 se observa que las cepas aisladas de los contactos familiares de los pacientes con FR (CF), el 79.3%(23) de las cepas presentaron una adherencia entre 80 y 100 %, el 13.7%(4) una adherencia entre 60 y 80%, y el 6.8%(2) de las cepas una adherencia a n-Hex entre 40 y 60 %.

La gráfica N°11 muestra la distribución de las cepas de S.pyogenes aisladas de escolares portadores (EP) donde el 77.7%(42) de las cepas presentaron una adherencia a n-Hex menor al 20%, el 9.25%(5) una adherencia entre 20 y 40 %, el 7.4%(4) una adherencia entre 40 y 60%, y el 5.5%(3) entre 60 y 80% de adherencia a n-Hex. Las cepas de EBH aisladas de enfermos con infección estreptocócica del IMSS (FE) como lo muestra la gráfica N° 12, el 93.5%(29) de las cepas presentaron una adherencia a n-Hex mayor del 80% y el 7.4%(2) una adherencia entre el 60 y 80%.

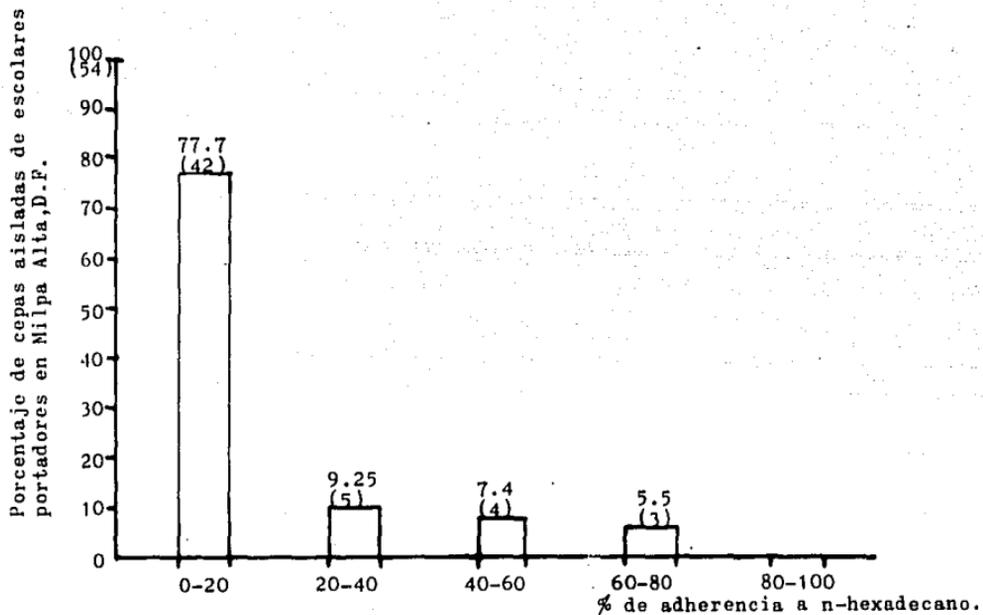
La gráfica N° 13 muestran la adherencia a n-Hex de las cepas de referencia (ENCB) de S.pyogenes y A.calcoaceticus; Todas las cepas de S.pyogenes presentaron una adherencia a n-Hex superior al 80% y las cepas de A.calcoaceticus RAG-1 y MR-481 (utilizadas como testigos positivo y negativo respectivamente en los reportes de adherencia publicados en la literatura) presentaron 72.1% y 0 % de adherencia respectivamente.



Gráfica 9. Porcentaje de adherencia a n-hexadecano de 10 cepas de estreptococo beta-hemolíticos aislados de pacientes con fiebre reumática del I.N.P.

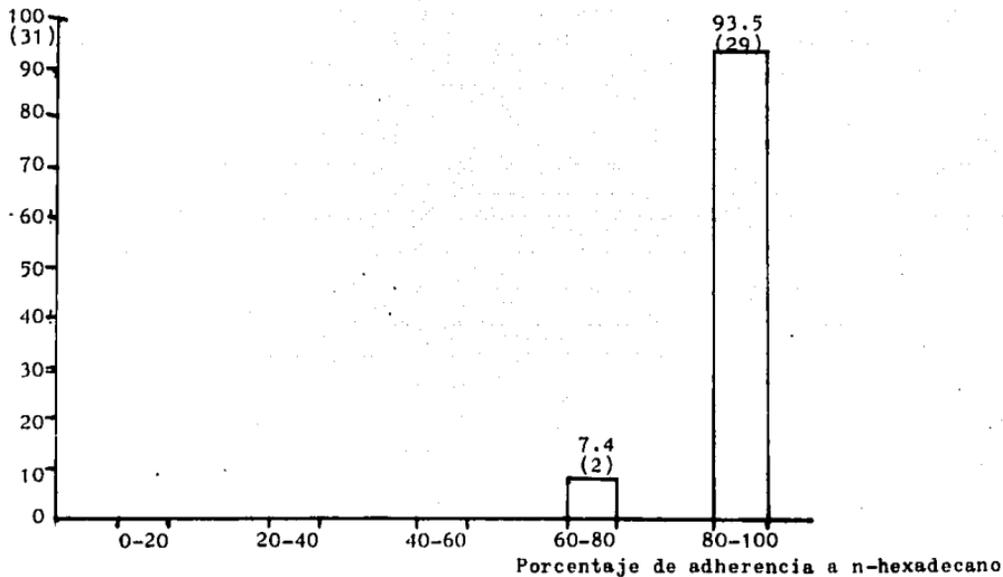


Gráfica 7D. Porcentaje de adherencia a n-hexadecano de 29 cepas de estreptococo beta-hemolítico aislados de contactos familiares de pacientes con fiebre reumática del I.N.P.

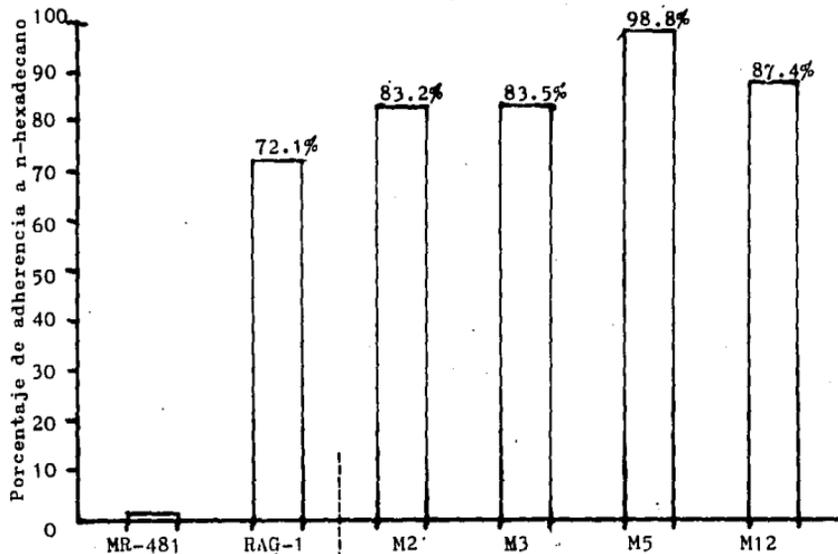


Gráfica 11. Porcentaje de adherencia a n-hexadecano de 54 cepas de S.pyogenes aisladas de escolares portadores de San Jerónimo Miacatlán, Milpa, D.F.

Porcentaje de cepas aisladas de enfermos con  
infección estreptocócica del I.M.S.S.



Gáfica 12. Porcentaje de adherencia a n-hexadecano de 31 cepas de estreptococos beta-hemolíticos aislados de enfermos con infección estreptocócica del I.M.S.S.



A. calcoaceticus

Streptococcus pyogenes

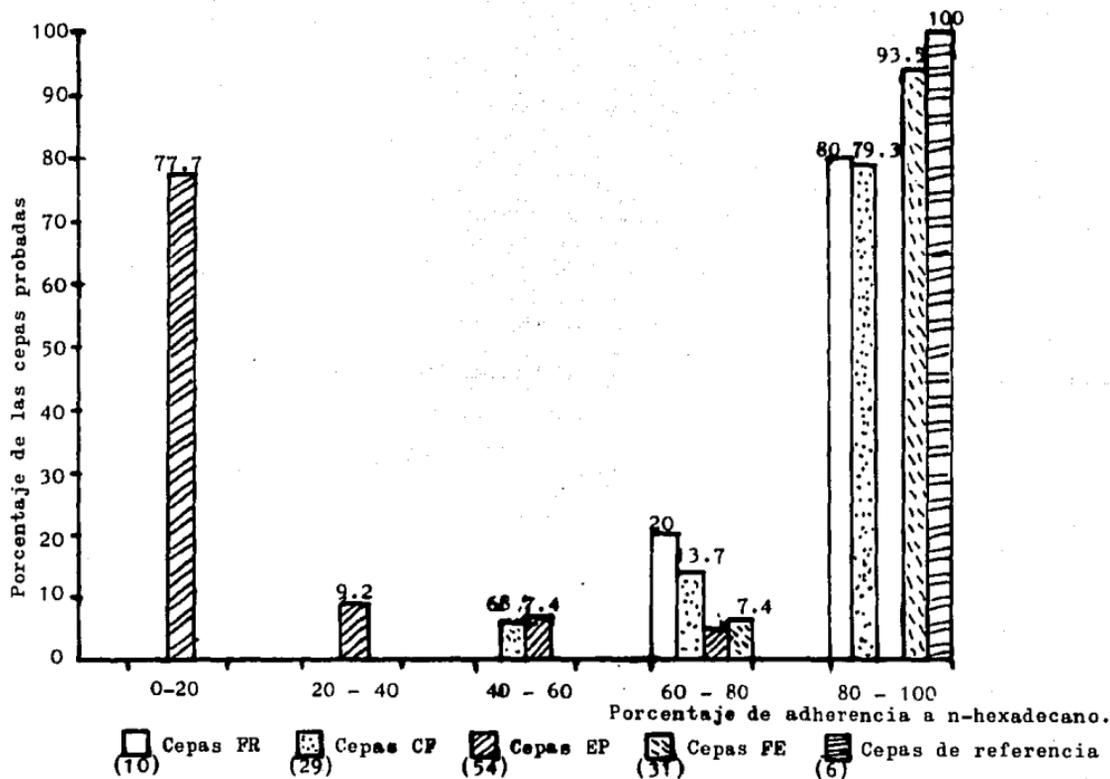
Grafica 3. Porcentaje de adherencia a n-hexadecano de 4 cepas de referencia de S. pyogenes y 2 cepas de referencia de A. calcoaceticus

La gráfica N° 14 muestra la distribución de adherencia a n-Hex de todas las cepas de EBH probadas, donde destacan las cepas de -EP, las cuales presentaron en su mayoría una adherencia a n-Hex menor al 20%, mientras que la mayoría de los otros grupos el porcentaje de adherencia fue mayor al 80%.

Los ensayos de adherencia a células Hep-2( tabla 9 y gráfica 15), muestran la cantidad aproximada de bacterias utilizada en los ensayos, la cual correspondió, por el método de Miles-Misra, a  $3.9 \times 10^6$  UFC/ml. De acuerdo al criterio de lectura establecido la gráfica 16 muestra el porcentaje de cada uno de los grupos de cepas probadas, que dio una adherencia a células Hep-2 igual o mayor al 80%, el 33.3% de las cepas aisladas de escolares portadores presentó este porcentaje de adherencia en comparación con las otras cepas en las que la mayoría( arriba del 80% ) son prueba positiva de adherencia a células Hep-2.

En la fotografía N° 1 se muestran células Hep-2 sin inocular; en las fotografías 2, 3 y 4 células Hep-2 con EBH adheridos en su superficie, la mayoría de las cepas que dieron una adherencia positiva a células Hep-2(arriba del 80 %) mostraron estos tipos de adherencia, los cuales semejan mucho a los patrones de adherencia localizada, descrita para algunas cepas de Escherichia coli enteropatógenas.

En la tabla N°10 se presentan los resultados positivos encontrados de acuerdo a los criterios de lectura, tanto para n-Hex como para células Hep-2, de las cepas de EBH probadas. Todas las cepas de referencia dieron una prueba positiva(100%). Ninguna cepa de escolares - portadores presentó una adherencia del 80% a n-Hex y solamente el - 33.3% de ellas se adhirió a células Hep-2. Las otras cepas dieron un alto porcentaje tanto a n-Hex como a células Hep-2, el 80% de FE, - 79.3% de CF y el 93.5% de FE para n-Hex y el 90%, 96.5% y 83.8% respectivamente para células Hep-2.



Gráfica 14. Distribución de la adherencia a n-hexadecano de las cepas de estreptococo beta-hemolíticos probadas.

tubo con 200 U.K.*		
(**)	(***)	# de
sector	Dil.	Colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	Inc.
5	10 <sub>6</sub>	49
6	10 <sub>7</sub>	2
7	10 <sup>7</sup>	1

tubo con 140 U.K		
sector	Dil.	# de
		Colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	126
5	10 <sub>6</sub>	21
6	10 <sub>7</sub>	3
7	10 <sup>7</sup>	0

tubo con 252 U.K.		
sector	Dil.	# de
		colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	56
5	10 <sub>6</sub>	6
6	10 <sub>7</sub>	1
7	10 <sup>7</sup>	0

tubo con 320 U.K.		
sector	Dil.	# de
		colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	Inc.
5	10 <sub>6</sub>	57
6	10 <sub>7</sub>	9
7	10 <sup>7</sup>	1

tubo con 82 U.K.		
Sector	Dil.	# de
		Colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	177
5	10 <sub>6</sub>	38
6	10 <sub>7</sub>	7
7	10 <sup>7</sup>	0

tubo con 252 U.K.		
sector	Dil.	# de
		Colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	70
5	10 <sub>6</sub>	74
6	10 <sub>7</sub>	7
7	10 <sup>7</sup>	0

tubo con 250 U.K.		
sector	Dil.	# de
		colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	Inc.
5	10 <sub>6</sub>	27
6	10 <sub>7</sub>	1
7	10 <sup>7</sup>	0

tubo con 335 U.K.		
sector	Dil.	# de
		colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	137
5	10 <sub>6</sub>	28
6	10 <sub>7</sub>	2
7	10 <sup>7</sup>	1

tubo con 396 U.K.		
sector	Dil.	(U.F.c) # de colonias
0	0 <sub>1</sub>	Inc.
1	10 <sub>2</sub>	Inc.
2	10 <sub>3</sub>	Inc.
3	10 <sub>4</sub>	Inc.
4	10 <sub>5</sub>	Inc.
5	10 <sub>6</sub>	78
6	10 <sub>7</sub>	7
7	10 <sup>7</sup>	0

\* U.K.- Unidades Klett,  
utilizando filtro rojo.

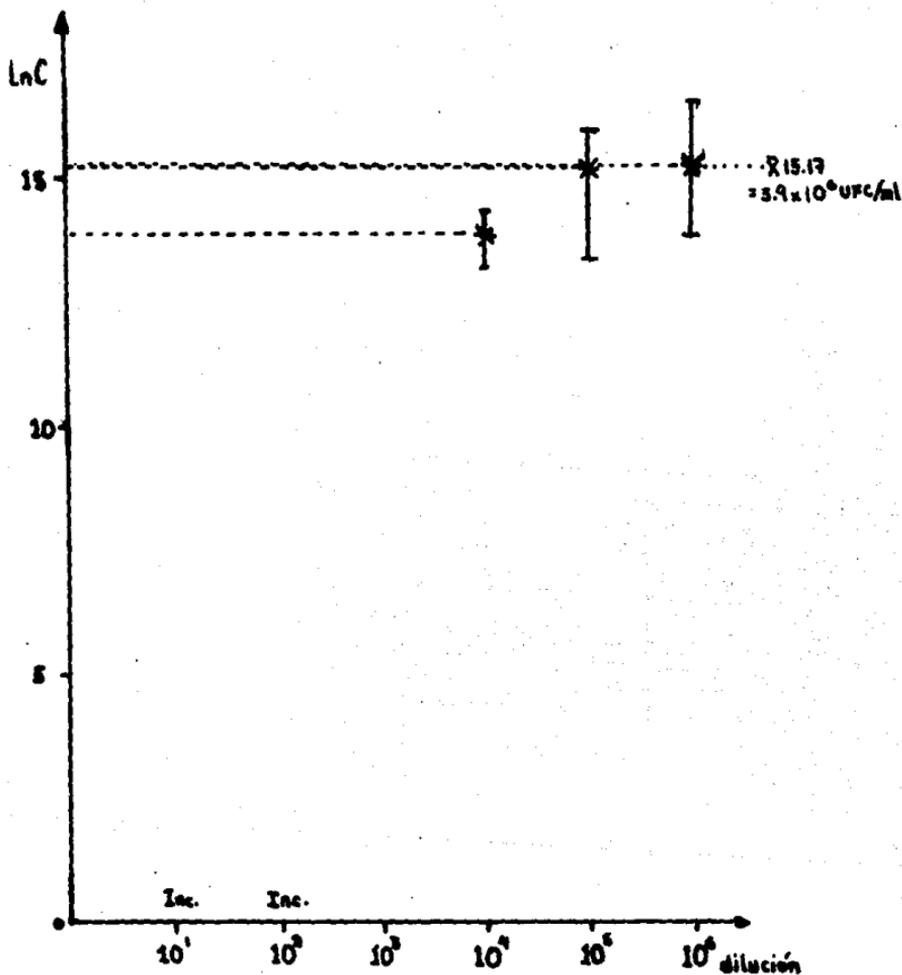
\*\* sector de la placa de  
gelosa sangre.

\*\*\* dilución utilizada

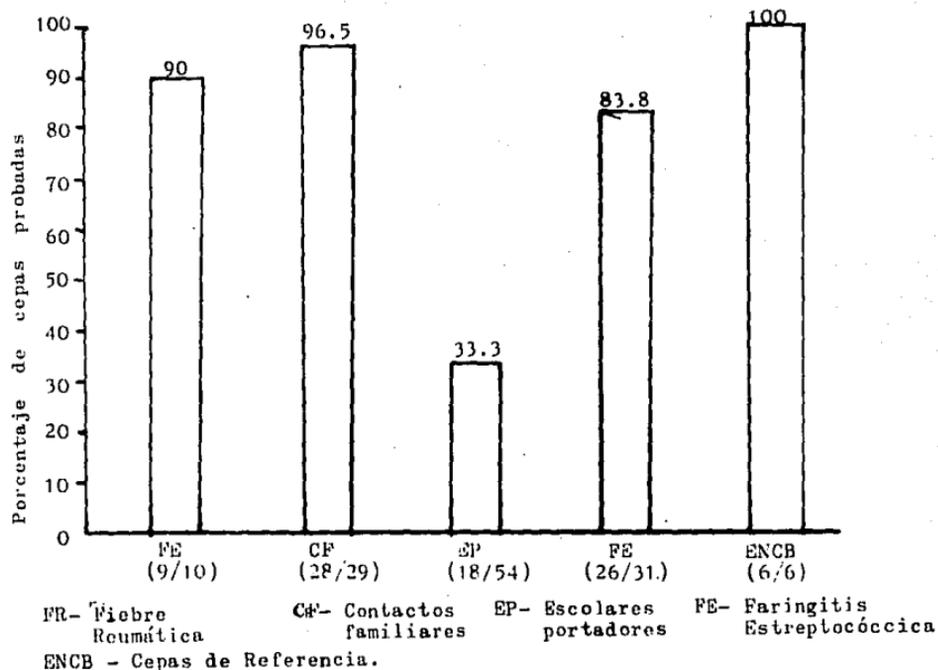
$\bar{X}$   $3.9 \times 10^6$  UFC/ml.

lnC 15.17

Tabla B. Cantidad de S. pyogenes utilizada en los ensayos de adherencia a células Hep-2, las cepas fueron crecidas en caldo Todd-Hewitt 18-24 h a 37°C. La determinación se realizó por el método de Miles-Minsra.



Gráfica 15. Cantidad de S. pyogenes utilizada en los ensayos de adherencia a células Hep-2. Determinada por el metodo de Miles-Minsra.



Gráfica 16. Distribución de cepas de *Streptococcus* beta-hemolíticos con una Adherencia mayor o igual al 80 % de células Hep-2 .



Fotografía 1 - Células Hep-2 sin inoculación.



Fotografía 2, Células Hep-2 con estreptococos beta hemolíticos adheridos en su superficie.



Fotografías 3 y 4 . Células Hep-2 con estreptococos bata hemolíticos adheridos en su superficie.

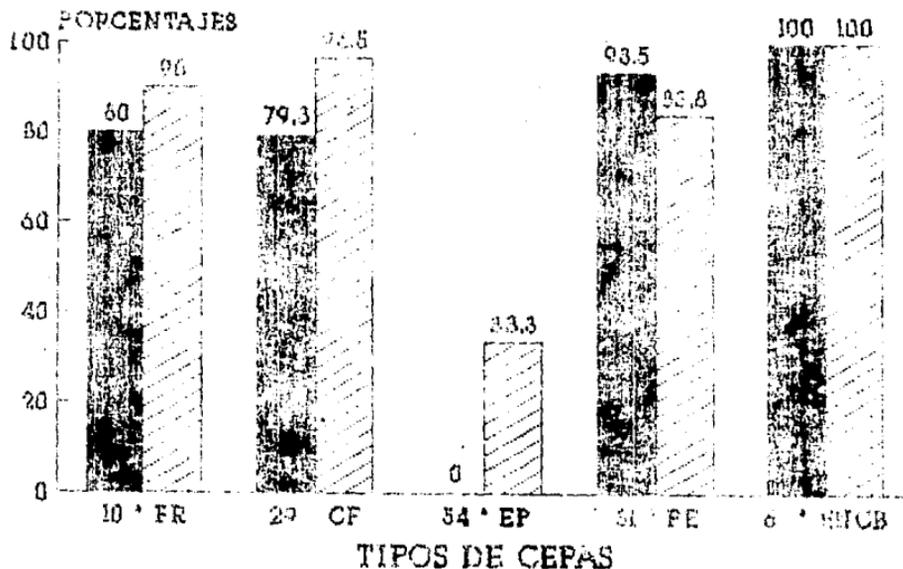
Total de cepas y origen.	n-hexadecano		células Hep-2	
	80% Adh.	%	80% Adh.	%
10 FR	8/10	80	9/10	90
29 CF	19/29	79.3	28/29	96.5
54 EP	0/54	0	18/54	33.3
31 FE	29/31	93.5	26/31	83.8
6 ENCB	6/6	100	6/6	100

FR - Fiebre Reumática      CF - Contactos Familiares  
 EP - Escolares Portadores    FE - Faringitis Estreptocócica  
 ENCB - Cepas de referencia de S.pyogenes

Tabla 8. Resultados positivos de adherencia a n-hexadecano y células Hep-2 de las cepas de estreptococos beta-hemolíticos probadas.

# % Adherencia de Strep-beta

## Ensayos n-Hex y Hep-2



\* Número de cepas

Gráfica N° 17 . Resultados positivos de adherencia a n-hecadedano y células Hep-2 de las cepas de estreptococos beta hemolíticos probados.

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

La cantidad de bacterias utilizadas en los ensayos de adherencia a n-hexadecano correspondió a aproximadamente  $3.5 \times 10^5$  UFC/ml para una absorbancia de 0.4 a 530 nm (tabla 2 y gráfica 2), la técnica utilizada se basó en la metodología usada por Courtney y cols.(9), la cual es una de las más recientes investigaciones en adherencia de S.pyogenes a n-hexadecano.

La cepa de S.pyogenes M5 crecida en fase estacionaria presentó una adherencia a n-Hex superior a la fase logarítmica de crecimiento tanto para las diferentes cantidades de n-hexadecano como para los tiempos de agitación utilizados en el ensayo (tablas 3 y 4). -- Ofek y cols(30), han reportado que la fase logarítmica de S.pyogenes presentó una adherencia a n-hexadecano menor del 50% para los diferentes tiempos de agitación probados por ellos ( 1, 2 y 3 min), y la adherencia en fase estacionaria es superior al 80% para todos los tiempos. Rosemberg y cols(35), observaron el mismo resultado cuando utilizaron diferentes cantidades de n-hexadecano.

La hidrofobicidad de la cápsula bacteriana es considerada como una de las principales causas de que en la fase logarítmica de crecimiento de S.pyogenes M5 se presente una adherencia a n-hexadecano menor al 50%, como lo han demostrado Ofek y cols.(30); apoyandose en que Rosemberg menciona que la adherencia entre la bacteria y el n-hexadecano esta basada en la capacidad hidrofóbica de la superficie bacteriana(34,36).

Se encontraron pequeñas diferencias en la adherencia a n-Hex de las cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoarcticus crecidas en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento, pero siempre obtuvimos una adherencia superior al 80% para S.pyogenes, Ofek encontró diferencias utilizando las mismas cepas de referencia, donde la adherencia en fase logarítmica fué menor al 40% y para la estacionaria mayor al 80%(30). Estas diferencias pudieran deberse a las condiciones del ensayo, Ofek utilizó caldo BHI, agitación de 3 minutos para la prueba y una concentración de bacterias de  $10^{10}$  UFC/ml. Para las

cepas de A.calcoaceticus Rosemberg reporta diferencias similares a las encontradas por Ofek con cepas de S.pyogenes, utiliza regulador de PUM pH 7.1, caldo BHI, realiza un ajuste de la suspensión bacteriana a 1.4-1.6 de Sbs. a 400 nm y una preincubación con n-Hex de 10 minutos(30).

En los ensayos de adherencia a n-Hex de A.calcoaceticus RAG-1 y MR-481 reportados por Rosemberg(35) y Ofek(30) se utilizó caldo BHI y regulador de PUM pH 7.1; Cuando lo comparamos con el uso de caldo Todd-Hewitt y PBS pH 7.2 no se encontraron diferencias entre el uso de uno u otro como lo muestran las gráficas 6 y 7 ,y la tabla 6, por lo que se decidió seguir utilizando caldo Todd-Hewitt debido a que es un medio óptimo para el desarrollo de estreptococos beta hemolíticos(14) y PBS pH 7.2 por que es el utilizado por Courtney(9) y Ofek(30) en reporte recientes.

Comparamos la adherencia a n-Hex de las cepas de referencia de S.pyogenes y A.calcoaceticus crecidas en incubación con agitación a 150 rpm y sin agitación, los resultados de la tabla 7 y de la gráfica 8 muestran que para la cepa M5 de S.pyogenes y A.calcoaceticus RAG-1 la agitación representó una diferencia en la adherencia a n-Hex, mientras que para las demás cepas no pareció influir de manera importante las condiciones de agitación. En ninguna metodología de adherencia a n-hexadecano se hace mención de la incubación en agitación, por lo que desconocemos si fué utilizada durante la incubación de las cepas.

La utilización de cepas de A.calcoaceticus RAG-1 y MR-481 (como testigos positivo y negativo respectivamente) nos permitió valorar los ensayos de adherencia realizados, debido a que la cepa RAG-1 siempre dio una adherencia a n-Hex superior al 70% y la cepa MR-481 menor del 5 %.

Cuando se ensayaron las cepas de EBH aisladas de diferentes fuentes se observó una adherencia a n-Hex mayor al 80% para la mayoría de los grupos probados, excepto el de escolares portadores donde la mayoría de las cepas presentaron una adherencia a n-Hex menor al 20%(gráficas 11 y 14). Los reportes de adherencia a n-Hex se han -

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

establecido con el uso de cepas de referencia, por lo que desconocemos el comportamiento que pudieran tener cepas de diferentes orígenes en los ensayos de adherencia a n-Hex.

La baja adherencia observada en las cepas de S.pyogenes aisladas de EP puede ser debida al tiempo tan prolongado de conservación en caldo Todd-Hewitt-sangre(1:1), al cual fueron sometidas de casi un año; un estudio utilizando cepas de reciente aislamiento podría ratificar esta información, así se podrá especular sobre la capacidad de adherencia de las cepas de portadores sanos y discurrir sobre la capacidad de adherencia mayor para poder estar al nivel de las cepas FR,CF y FE. La hidrofobicidad superficial del estreptococo pudiera estar relacionada con la capacidad para provocar enfermedad en un huésped determinado.

Se sabe que la hidrofobicidad en S.pyogenes favorece su adherencia a las células epiteliales del huésped(4,17,19), provocando la colonización y posterior daño del mismo(17,19).

No encontramos una relación entre la positividad o negatividad dada por los diferentes grupos de EBH( grupos A,B?C y G). Tampoco se observó una relación entre las cepas que presentaron una baja adherencia a n-Hex y células Hep-2 de cada grupo estudiado.

Las ventajas del estudio de la adherencia bacteriana a hidrocarburos líquidos(n-hexadecano) como un indicador de la hidrofobicidad bacteriana, tiene ciertas ventajas sobre otras técnicas y se pueden resumir en tres principalmente: 1) la superficie a la cual se adhiere la bacteria(hidrocarburo líquido) se encuentra bien definida. 2) no se requiere de equipo sofisticado y 3) la cuantitatividad de los resultados es rápida y fácilmente obtenida.(34,36).

Por otra parte, no se conoce el mecanismo de adherencia de S.pyogenes a células Hep-2; de acuerdo a nuestros resultados, debe estar relacionado con la capacidad hidrofóbica de la bacteria, debido a que el grupo de EP que presenta una baja adherencia a n-Hex, también da una baja adherencia a células Hep-2 ; y las demás cepas presentan altos porcentajes de adherencia a ambos sistemas. Esta capacidad hidrofóbica podrá ser un requisito ,pero creemos que además se requiere y se lleva a cabo un mecanismo específico de adherencia a las células Hep-2.

La adherencia a células Hep-2 de las cepas de A. calcoaceticus - RAG-1 y MR-481 no pudieron ser comparadas debido a que ambas mostraron adherencia al vidrio y agregados, la adherencia nunca fué superior al 50% para la cepa RAG-1, aunque siempre fué menor para la cepa MR-481. Rosemberg comparó la adherencia de A. calcoaceticus RAG-1 y MR-481 a células epiteliales (utilizando una técnica diferente a la nuestra) donde RAG-1 presentó un 60% y MR-481 3.6% de adherencia a células epiteliales (35).

El patrón de "adherencia localizada" que muestran la mayoría de las cepas de EBH, es similar al que se ha descrito para algunos serotipos de E. coli enteropatógenos, el cual se encuentra relacionado con la producción de una proteína de membrana externa de aproximadamente 92 kilodaltones de peso molecular, la cual se encuentra codificada por un plásmido de 60 megadaltones denominado pMar 2 (28,39). S. pyogenes es una bacteria gram positiva que no cuenta con una membrana externa, y los modelos de adherencia a células epiteliales (ej. figura 2) muestran la participación de la región hidrofóbica del ALT en su unión a la región amino terminal de la molécula de fibronectina localizada sobre la célula epitelial. Resultara de futuro interés estudiar el mecanismo de adherencia a células Hep-2. No se cuentan con reportes sobre la adherencia de S. pyogenes a líneas celulares Hep-2. La caracterización de las estructuras superficiales de la bacteria responsables de la adherencia a estas células puede aportar información en relación a la capacidad patógena que puede presentar S. pyogenes en su relación con el huésped. Proponemos realizar como trabajo a futuro ensayos de inhibición de la adherencia a células Hep-2, preincubando a las células Hep-2 con ALT, proteína M y carbohidrato C de S. pyogenes y con anticuerpos contra fibronectina. Así como probar la inhibición preincubando a la bacteria con fibronectina y anticuerpos contra ALT, proteína M y carbohidrato "C", y fibronectina. Comprobar si este patrón de adherencia se presenta en células epiteliales obtenidas de raspados bucales de individuos con y sin infección estreptocócica; verificar utilizando otras líneas de cultivos celulares si este fenómeno de adherencia es exclusivo para células Hep-2.

La adherencia a células Hep-2 puede ser un modelo de gran utilidad para el estudio de los mecanismos de adherencia de S.pyogenes y otros microorganismos de interés médico, presenta ventajas sobre los cultivos de células epiteliales a partir de raspados bucales debido a: su facilidad de manejo, eliminación de flora asociada a estas células, la cantidad de células que se pueden utilizar en mayor y estas son más homogéneas. Para lo cual debemos evaluar la adherencia a células Hep-2 con respecto a células epiteliales.

## CONCLUSIONES .

Las cepas de Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 y MR-481 empleadas durante la estandarización de la técnica de adherencia a n-hexadeca no nos permitió validar la eficiencia del ensayo.

Las 10 cepas de pacientes con FR, 29 de contactos familiares y 31 de FE, presentaron una adherencia del 80%, 79.3% y 93.7% a n-Hex y 90%, 96.5% y 83.8% a células Hep-2 respectivamente, lo que señala a la adherencia como un factor de patogenicidad importante.

Las 54 cepas de EP presentaron una adherencia menor al 20% en el 77 % de los casos y menor al 80% en células Hep-2 en el 33% de los casos. Tomados así este grupo presentó un porcentaje bajo de adherencia.

Las diferencias encontradas en la capacidad de adherencia de las cepas de EBH pueden estar relacionadas con la capacidad para adherirse, invadir y causar daño en el huésped.

La técnica de adherencia a células Hep-2 puede servir como un modelo alternativo para el estudio de la interacción de S.pyogenes con la célula huésped.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aguirre, E.L.. 1986. La adherencia de Streptococcus pyogenes. - Infectología. 6(9):333-334.
- 2.- Babu, J.P., E.H. Beachey, and W.A. Simpson. 1986. Inhibition of the interaction of Streptococcus sanguis with hexadecane droplets by 55- and 60- Kilodalton hydrofobic protein of human saliva. Infect. Immun. 53(2):278-284.
- 3.- Bascom, F.A. and H.R. Hill. 1988. Gram-positive bacteria; An overview and summary of session. Rev. Infect. Dis. 10(Suppl.2): S345-S350.
- 4.- Beachey, E.H.. 1981. Bacterial adherence: Adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal -- surfaces. J. Infect. Dis. 143(3):324-345.
- 5.- Beachey, E.H., T.M. Chiang, I. Ofek, and A.H. Kang. 1977. Interac- - tions of lipoteichoic acid of group A Streptococci with - human platelets. Infect. Immun. 16(2):649-654.
- 6.- Beachey, E.H., W.A. Simpson and I. Ofek. 1980. Interaction of sur- - face polymers of Streptococcus pyogenes with animal cells. p. 389-405. In R.C.W. Berbeley J.M., Lynch, J. Melling, P.R. Rutter, and B. Vincent (sd). Microbial adhesion. Ellis Horwood Chichester.
- 7.- Bertelt, M.A., and J.L. Duncan. 1978. Adherence of group A strepto- - cocci to human epithelial cells. Infect. Immun. 20(1):200-208.
- 8.- Ceja Cardenas S. 1988. Características bacteriológicas e immuno- - génicas de cepas de Streptococcus pyogenes aisladas de pa- - cientes con fiebre reumática y sus contactos familiares. Tesis Esp. en Lab. de Inf. en Sal. Pub. Secretaria de Salud. 70 pp.
- 9.- Courtney, H.S., I. Ofek, W.A. Simpson, E. Withack and E.H. Beachey. 1985. Human plasma fibronectin inhibits adherence of - - Streptococcus pyogenes to hexadecane. Infect. Immun. 47(1): 341-343.
- 10.- Courtney, H.S., W.A. Simpson and E.H. Beachey. 1983. Binding of -- streptococcal lipoteichoic acid to fatty acid-binding site on human plasma fibronectin. J. Bacteriol. 153( ):763-770.

- 11.- Courtney,H.S., L.Stanislawski, I.Ofek, W.A.Simpson, D.L.Hasty, and E.H.Beachey. 1988. Localization of a lipoteichoic acid binding site to a 24-kilodalton NH<sub>2</sub>-terminal fragment of fibronectin. Rev. Infect. Dis. 10(Suppl.2):S360-S362.
- 12.- Ellen,R.P. and R.J.Gibbons. 1972. M-protein associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. Infect. Immun. 5(5):826-830.
- 13.- Ellen,R.P. and R.J.Gibbons. 1973. Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. 9(1):85-89.
- 14.- Facklam,R. 1978. Aislamiento e identificación de estreptococos. Manual de procedimientos. Ed. Departamento de Educación y Bienestar de los Estados Unidos. EUA.
- 15.- Fischetti,V.A. 1988. Structure, function and genetics of streptococcal M protein. Rev. Infect. Dis. 10(Suppl.2):S356-S359.
- 16.- Flores Briseño,M.A. 1990. Validación de la prueba de coagulación para el diagnóstico rápido de faringoamigdalitis, estreptocócica. Tesis Lic. Q.B.P. E.N.C.B.-I.P.N. México.
- 17.- Gibbons,R.J. 1980. Adhesion of bacteria to the surfaces of the mouth. p.351-388. In R.C.W.Berkeley, J.M.Lynch, J.Melling, P.R.Rutter and B.Vincent(ed). Microbial adhesion to surfaces. Ellis Horwood. Chinchester.
- 18.- Giono,S., Barraza-Sandoval y Castro-Avitia. 1974. El estreptococo y la fiebre reumática. Rev. Lat-amer.Microbiol. 16(2): 111-122.
- 19.- Giron Ortiz,J.A. 1983. Mecanismo e importancia de la adherencia bacteriana en colonización y patogénesis. Tesis Lic. Q.F.B. F.E.S.-C. U.N.A.M. México.
- 20.- Golub,E.E., M.Thaler, C.Daxis and Malanud. 1979. Bacterial aggregation activity in human saliva. Infect. Immun. 26(3):1028-1034.
- 21.- Hardie,J.M. 1986. Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884 ,p.1043-1071 In PeterH.A.Sneath(ed). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.2. The Williams & Wilkins, Baltimore.
- 22.- Krause,R.M. 1980. A cartographer survey of streptococcal topography, p.97-109. In S.E.Read & J.B.Zabriskie(ed). Streptococcal diseases and immune response. Academic Press, New York.

- 23.- Lapage S.P. and J.E. Shelton. 1970. Culture collections and the preservation of bacteria p.136-228. In J.R. Morris and D.W. Ribbons (ed). Methods in Microbiology .Volume 3A. Academic Press, London.
- 24.- Liljemark, W.F., C.G. Bloomquist. 1979. Agregation and adherence of Streptococcus sanguis: Role of human salivary immunoglobulin A. Infect. Immun. 26(3):1104-1110.
- 25.- López Bermudes, J.A. 1988. Diarreas bacterianas: Estudio de los mecanismos de patogenicidad de cepas de Escherichia coli en poblaciones controladas. Invasividad y patrón de producción de lipasas, lecilipasa, proteasa y hemolisina. Tesis Lic. Q.F.B., F.E.S.-C. U.N.A.M. México.
- 26.- Lindahl, M., A. Faris, T. Wadström, and Hjerténs. 1981. A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. Bioch. Biophys. Acta 677 : 471-176.
- 27.- Loyola Cazares, P.M. 1989. Aislamiento de S. pyogenes en escolares de San Jerónimo Miacatlán, Milpa Alta, Mex., D.F. y su relación con la fiebre reumática. Tesis Lic. Q.B.P. ENCB, I.P.N. México.
- 28.- Nataro, J.P., I. C. Skalytáky, J.B. Kaper, M.M. Levine, and L.R. Traub-Dizdalski. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. Infect. Immun. 48(2):378-383.
- 29.- Mörner, H., G. Johansson and G. Kronvall. 1983. Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. Infect. Immun. 39(1):336-343.
- 30.- Ofek, I., E. Witnack and E.H. Beachey. 1983. Hydrophobicity interactions of group A streptococci with hexadecane droplets. Infect. Immun. 54(1):139-145.
- 31.- Platt, A.F. 1985. Faringitis bacteriana en adultos. Infectología. 5(12):332-337.
- 32.- Rosenau, A. 1988. L'adhesion microbienne. La lettre de l'infectiologue tome III. 14:501-507.
- 33.- Rosemberg, M. 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of creening for bacterial hydrophobicity. Appl. Environ. Microbiol. 42(2):375-377.
- 34.- Rosemberg, M., D. Gutnick and E. Rosemberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Letts. 2:29-33.

- 35.- Rosemberg, M., A.Perry, E.A.Bayer, D.L.Gutnick, E.Rosemberg and I.Ofek. 1981. Adherence of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. Infect. Immun. 33(1):29-33.
- 36.- Rosemberg, M., E.Rosemberg and D.Gutnick. 1980. Bacterial adherence to hydrocarbons. p.541-542. In R.C.W. Berbeley J.M.Lynch, J.Melling, P.R.Rutter and B.Vincent(ed). Microbial Adhesion to surfaces. Ellis Worwood. Chinchester.
- 37.- Rouslahti, E. 1988. Fibronectin and its receptors. Ann. Rev. -- Biochem. 57:375-413.
- 38.- Ruiz, S.P. 1986. Pruebas para la identificación de estreptococos. Infectología. 6(9):373-383.
- 39.- Scaletsky, I.C.A., M.L.M.Silva, and L.R.Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. Infect. Immun. 45( ):534-536.
- 40.- Sharon, D., R.Bar-Ness and M.Rosemberg. 1986. Measurement to the kinetics of bacterial adherence to hexadecane in polystyrene cuvettes. FEMS Microbiol. Lett. 36:115-118.
- 41.- Simpson, W.A., H.S.Courtney and I.Ofek. 1987. Interactions of fibronectin with streptococci: The role of fibronectin as a receptor for Streptococcus pyogenes. Rev. Infect. Dis. 9 (Suppl.4):S535-S539.
- 42.- Simpson, W.A., D.L.Hasty, J.M.Mason and E.H.Beachey. 1982. Fibronectin-mediated binding of group A streptococci to human polymorphonuclear leucocytes. Infect. Immun. 37(2):805-810.
- 43.- Stanislawski, L., H.S.Courtney, W.A.Simpson, D.L.Hasty, E.H.Beachey, Robert, and I.Ofek. 1987. Hibridoma antibodies to the lipid-binding site(s) in the amino-terminal region of fibronectin inhibits binding of streptococcal lipoteichoic acid. J. - Infect. Dis. 156(2):344-349.
- 44.- Taranta, A. y M.Markowitz. 1984. Fiebre reumática. Ed. El Manual Moderno. México.
- 45.- Wichen, A.J.; and K.W.Knox. 1975. Lipoteichoic acid : a new class of bacterial antigen. Science. 187:1161-1167.
- 46.- Whitnack, E., J.B.Dale and E.H.Beachey. 1983. Streptococcal defenses against host immune attack: The M-protein fibrinogen interaction. Trans. Assoc. Am. Physicians. 96:196-202.

" He agotado todo lo que la palabra puede decir  
... y aun permanezco en silencio "