



25
20j.

Universidad Nacional Autónoma
de México



Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

**“CARACTERIZACION DE CEPAS DE Escherichia coli ENTEROINVASIVA
UTILIZANDO PRUEBAS DE INVASIVIDAD in vivo e in vitro”**

TESIS CON
FALLA DE GREEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
JOSEFINA LILIAN GUZMAN ZAVALA

Asesores: **DRA. SILVIA GIORO CEREZO**
DR. GERARDO APARICIO OZORES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

		pag
	Glosario	i
	Lista de Tablas	ii
	Lista de Figuras	iii
	Resumen	iv
I	Introducción	1
II	Objetivos	17
III	Materiales y Métodos	18
IV	Resultados	30
V	Discusión	40
VI	Conclusión	48
VII	Apéndice	48
VIII	Bibliografía	49

G L O S A R I O

- Actina F. La actina monomérica (actina G) que es una proteína globular, representa el 25 % en peso de la proteína muscular, en presencia de magnesio la actina G se polimeriza para formar un filamento de doble helice llamado actina F (actina fibrosa)
- BAB. Blood agar base, base de agar sangre, medio de conservación para cultivo bacteriológico.
- AD. Adherencia difusa, mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena Clase I caracterizado por la distribución homogénea de los organismos sobre la superficie celular.
- AL. Adherencia localizada, mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena Clase I, caracterizada por la formación de microcolonias en áreas circunscritas a la célula.
- AN. Adherencia negativa, mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena Clase I, caracterizada no solo por la adherencia a las células sino también al plástico o al vidrio.
- Célula M. Célula integrante de la estructura celular normal del intestino delgado la cual participa activamente en el proceso de fagocitosis.
- CFA. Factor fimbrial de adherencia o colonización, mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enterotoxigénica.

- Clase I. Subcategoría de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que presenta con frecuencia el factor de adherencia EPEC.
- Clase II. Subcategoría de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que rara vez presenta el factor de adherencia EPEC.
- Clatrina. Proteína de 180 KDa, constituyente de la membrana celular relacionada con el proceso de endocitosis.
- Crb* Gene plasmídico que codifica información para una prueba positiva de captación de rojo congo, fenotipo asociado con virulencia.
- DNAsa. Desoxirribonucleasa, enzima hidrolítica producida por bacterias, principalmente *S. marcescens* y *S. aureus*.
- EHEC. *Escherichia coli* enterotoxigénica, categoría propuesta por Levine, responsable del síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica.
- EIEC. *Escherichia coli* enteroinvasiva, categoría propuesta por Levine, considerada como causa de disentería.
- EPEC. *Escherichia coli* enteropatógena, categoría propuesta por Levine, reconocida como agente causal de diarrea infantil.
- ETEC. *Escherichia coli* enterotoxigénica, categoría propuesta por Levine, causante de la diarrea del viajero y diarrea infantil en países menos desarrollados.
- gal U. Región cromosomal localizada a 27 minutos en el mapa de restricción de *S. flexneri* 2a que codifica información para la síntesis de galactosa.

- H. Antígeno flagelar. Es un componente antigénico que se encuentra localizada solamente en los flagelos de las bacterias que poseen esta estructura (flagelo) y es de naturaleza protéica.
- igr^r. Gene plasmidico que codifica información para la inhibición del crecimiento del plásmido, fenotipo asociado con virulencia.
- inv^r. Gene plasmidico que codifica información para un ensayo de invasividad positivo, fenotipo asociado con virulencia.
- ipa A. Gene plasmidico asociado con virulencia, no necesario para la prueba de Sereny ni para invasión en tejido celular, función efectora aún desconocida.
- ipa B, C y D. Antígenos del plásmido de invasión asociados con adherencia e invasividad en la patogénesis de la disentería.
- Ipa B, C y D. Polipeptidos codificados por los genes ipa B, C y D respectivamente, relacionados con el proceso de entrada de la bacteria a la mucosa intestinal.
- ipa H. Gene plasmidico asociado con virulencia, función efectora aún desconocida.
- K. Antígeno capsular localizado en la parte más externa de las estructuras bacterianas formado comunmente de polisacáridos involucrado en procesos de virulencia es utilizado como un linaje de clasificación serológica.

- Kb. Kilobases. 1000 pares de bases púricas y pirimídicas.
- kcp A. Locus cromosómico asociado con la producción de queratoconjuntivitis en cobayos.
- KDa. 1000 Da. Dalton: Unidad de masa. Masa de un átomo de Hidrógeno = $1.68 \times 10^{-24}g$.
- LPS. Lipopolisacárido, envoltura compleja de organismos Gram (-) que consiste principalmente del lípido A y un centro compuesto de glúcidos, además grupos distales de polisacáridos o Antígeno O, los cuales son variables en su composición y por ende en su especificidad serológica.
- LT. Toxina termolábil producida principalmente por *V. cholerae* y ETEC, estimula la producción de AMP cíclico en el epitelio intestinal con la consecuente secreción de sodio y pérdida de agua y cloruro.
- mal A. Región cromosomal localizada a 27 minutos en el mapa de restricción de *S. flexneri* 2a que codifica información para la síntesis de maltosa.
- µl. Microlitros, unidad de volumen equivalente a $10^{-3}ml$.
- O. Antígeno que se presenta sobre la superficie de la bacteria formando parte de su pared celular. Su composición es de lipoproteínas..
- ompR-envZ. Locus cromosomal asociado con virulencia, disminuyendo la capacidad de invadir cultivo celular y produciendo prueba de Sereny negativa.

- p 18. Proteína de 18 KDa codificada por el gene *kcp A*, regula positivamente la expresión de los genes *ipa*.
- p 30. Proteína de 30 KDa codificada por el gene *vir F*, regula positivamente la expresión de los genes *ipa*.
- p 120. Proteína de membrana externa de 120 KDa codificada por el gene *vir G*, relacionada con el proceso de dispersión intra e intercelular de la bacteria.
- pur E. Región cromosómica de *E. coli* K-12 localizada también a 12 minutos en el mapa de restricción de *S. flexneri* 2a.
- pWR100 Plásmido de virulencia de *S. flexneri* tipo 5 relacionado con la capacidad de invadir células HeLa, que asociado con algunos genes cromosomales expresan un fenotipo completo de EIEC.
- SSF. Solución salina fisiológica, solución de NaCl (cloruro de sodio) al 0.85 %.
- ST. Toxina estable al calor producida por *V. cholerae* y ETEC, estimula la guanilato ciclasa aumentando los niveles de GMP cíclico, suprimiendo la captación de líquidos en células epiteliales del intestino y provocando cierto grado de secreción de cloruro.
- trp. Región cromosomal localizada a 27 minutos en el mapa de restricción de *S. flexneri* que codifica información para la síntesis de triptófano.
- TSA. Trypticasein soya agar, agar soya tripticaseína, medio de enriquecimiento para cultivo bacteriológico.

- TSB. Trypticasein soya broth, caldo soya tripticaseina medio de enriquecimiento para cultivo bacteriológico.
- UFC/ml. Unidad formadora de colonia en un ml., unidad de concentración en suspensiones bacterianas.
- Vinculina. Proteína que forma parte del citoesqueleto, asociada con la introducción de la bacteria a la célula distribuyéndose alrededor de la misma.
- vir F. Gene plasmidico de 40 Kb que actúa como regulador positivo en el proceso de entrada de la bacteria a la célula epitelial.
- vir G. Gene plasmidico relacionado con la diseminación intracelular del microorganismo dentro del epitelio de la córnea en la prueba de Sereny.
- vir R. Gene localizado a 27 minutos en el cromosoma de *Shigella*, actúa como un represor de los genes del plásmido de invasión y es dependiente de la temperatura.

L I S T A D E T A B L A S

	pág
Tabla No. 1. "Características relevantes de los grupos de cepas de <i>E. coli</i> que causan diarrea".	2
Tabla No. 2. "Genes cromosomales asociados con virulencia en <i>S. flexneri</i> ".	9
Tabla No. 3. "Genes plasmidicos asociados con virulencia en <i>S. flexneri</i> ".	10
Tabla No. 4. "Asociación de las pruebas de invasividad y las características clínicas generadas por cepas de <i>E. coli</i> ".	31
Tabla No. 5. "Comparación de las pruebas de Sereny y HEP-2 en cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas".	32
Tabla No. 6. "Tipificación por serología somática de cepas invasivas de <i>E. coli</i> diarreogénicas".	34
Tabla No. 7. "Criterio de caracterización bioquímica de cepas de <i>E. coli</i> propuesto por Crichton".	35
Tabla No. 8. "Biotipos obtenidos bajo los criterios de Crichton y Toledo en cepas invasivas de <i>E. coli</i> ".	36
Tabla No. 9. "Determinación de la captación de rojo congo y de la producción de 4 exoenzimas por cepas de <i>E. coli</i> ".	38
Tabla No. 10 "Comparación de las pruebas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> con cepas diarreogénicas y no diarreogénicas".	39

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura No. 1. "Etapas del proceso de invasividad".	4
Figura No. 2. "Niveles de regulación de los genes de invasión de <i>S. flexneri</i> ".	11
Figura No. 3. "Diagrama de flujo de metodología".	29

RESUMEN

Escherichia coli bacteria enteroinvasiva, se caracteriza por presentar mecanismos de patogenicidad muy similares a *Shigella*, la relación entre estas no es solo en cuanto a comportamiento bioquímico, sino que comparten características antigenicas y genéticas. La invasión de células intestinales es el factor predominante de virulencia responsable del cuadro disentérico, caracterizado por la presencia de moco y sangre en heces, como consecuencia de la destrucción de tejido intestinal, ocasionando un proceso inflamatorio que lleva a la formación de abscesos y úlceras en la mucosa colonica humana.

Esta capacidad invasiva se hizo evidente por medio de la prueba de Sereny y ensayo de penetración en células HEP-2, en las que no se obtuvo una correlación característica de las cepas estudiadas, así como en el esquema de biotipificación donde se observaron biotipos de cepas de *E. coli* invasiva diferentes a las cepas que no lo son. La capacidad de captar el colorante rojo congo y el patrón enzimático realizado no fueron determinaciones características para cepas EIEC, por lo que no fue posible considerarlas como factores de un perfil de virulencia. Por ende se considera necesario realizar dichas pruebas con cepas de primer aislamiento y ensayos de biología molecular para la identificación potencial de la capacidad invasiva de las cepas en estudio.

I. - INTRODUCCION

I.1. - ANTECEDENTES

Escherichia coli es una bacteria común como componente de la flora fecal en humanos, descrito por primera vez en 1888 por Paul Escherich, es un organismo aerobio y anaerobio facultativo.

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 40's, demostraron que cepas de *E. coli* eran responsables de diarrea endémica en niños (32).

La diarrea infecciosa es una enfermedad infantil muy común en países subdesarrollados. Estudios anteriores han mostrado que en centros urbanos los rotavirus y *Salmonella sp.* se encuentran entre los agentes causales más importantes, mientras que en áreas rurales especialmente donde los servicios públicos son deficientes, *Escherichia*, *Shigella sp.* y *Campylobacter sp.*, juegan un papel muy importante. Sin embargo, la etiología no ha sido dilucidada en el total de los casos (4).

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de las cepas de *E. coli* que pueden causar diarrea. Levine y cols en 1987 (27) propusieron una clasificación de cepas diarreogénicas que emplean uno o varios mecanismos de patogenicidad, con la que la mayoría de los investigadores están de acuerdo (TABLA No.1). Se reconocen 4 categorías de la etiopatogenia de cepas de *E. coli* en enfermedades diarreicas siendo éstas *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC) y enterohemorrágica (EHEC). Estas categorías están basadas en las diferencias en virulencia, interacción con la mucosa intestinal, presentación de cuadros clínicos, interacción epidemiológica y serotipos O : H.

Las cepas de *E. coli* enteroinvasivas se caracterizan por presentar mecanismos de patogenicidad muy similares a *Shigella*, entre estos destacan : la capacidad de invadir células epiteliales la cual se ha hecho evidente empleando modelos *in vivo* e *in vitro*.

TABLA Nº 1
CARACTERISTICAS RELEVANTES DE LOS GRUPOS DE CEPAS DE Escherichia coli QUE CAUSAN DIARREA

Categoría de E.Coli	Clases	Síndromes Clínicos	Síndromes epidemiológicos	Mecanismos de patogenicidad	Serogrupos O
EIEC Enteroinvasiva		Fiebre, dolores abdominales diarrea acuosa seguida de heces escasas, sangre y moco.	Afecta usualmente adultos, algunos brotes por alimentos en neonatos.	Invasión y multiplicación en células epiteliales.	O28ac, 029, 0112, 0115 0135, 0124, 0136, 0143 0144, 0152, 0164, 0167
EPEC Enteropatógena	Clase I Frecuente Presencia de factor de adherencia (EAF)	Diarrea infantil aguda y crónica. Fiebre y vómito.	Brotos de diarrea en guarderías, casos esporádicos y epidémicos de diarrea infantil en comunidades, rara en adultos	Adherencia localizada (AL)	026, 055, 086, 0111, 0119 0125, 0127, 0128 ab, 0142
	Clase II Rara vez presenta factor de adherencia (EAF)	Diarrea infantil ocasionalmente.	Brotos de diarrea	Adherencia difusa (AD). Adherencia negativa (AN)	018, 044, 0112, 0114 0158
ETEC Enterotoxigénica		Diarrea muy acuosa con gran pérdida de electrolitos.	Diarrea infantil en países menos desarrollados, diarrea del viajero en adultos.	Adherencia por CFA y producción de enterotoxinas LT y/O ST.	061, 08, 011, 015, 020 025, 027, 063, 078, 085 0114, 0115, 0126, 0128 ac 0148, 0149, 0159, 0166, 0167
EHEC Enterohemorrágica		Diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico.	Brotos por alimentos en neonatos y en adultos también.	Adherencia (?) Producción de citotoxina (s)	026, 0111, 0157

Adaptado de Levine (27),

1.2.- Factores de virulencia

La destrucción de tejido ocasionado por *Shigella* y por cepas 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 heces diarreicas. La relación entre *E. coli* invasiva y *Shigella* no es solo en cuanto a comportamiento bioquímico, sino que incluso comparten características antigénicas y genéticas (43).

Las citotoxinas y las enterotoxinas son dos factores de virulencia asociados a la presentación del síndrome clínico causado por EIEC (15). La shigelosis y la infección causada por EIEC puede dar diarrea acompañada de fiebre elevada, malestar, dolor abdominal y disenteria caracterizada por tenesmo con escasas heces conteniendo moco y sangre (36). La invasión de células intestinales es el factor predominante de virulencia responsable del síndrome disentérico, por analogía con *Shigella sp.* se asocia a la producción de citotoxinas que pueden influir en gran parte en la severidad de los síntomas disentéricos.

La diarrea acuosa precede a la disenteria en las infecciones por EIEC y se observa en casos individuales y en brotes esporádicos debidos a EIEC. A menudo se observa diarrea acuosa sin disenteria, esta observación clínica sugiere que EIEC produce una enterotoxina la cual es responsable de la diarrea acuosa (15).

Existen factores de virulencia dentro del proceso de invasión como son : antígenos somáticos de superficie que facilitan la adherencia de la bacteria al tejido epitelial, con la consecuente colonización y penetración del microorganismo a la célula huésped. La internalización y multiplicación del patógeno, con liberación del mismo dentro del fagosoma da lugar a su dispersión e invasión en células vecinas con destrucción del tejido intestinal (43). FIGURA 1.

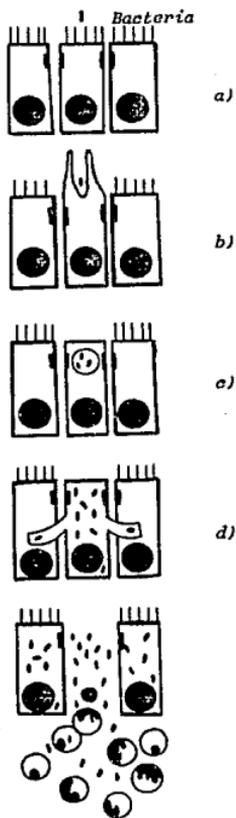


FIGURA 1. La invasión del epitelio intestinal inicia con la adherencia específica de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa (a), posteriormente, afecta el borde en cepillo formándose una vesícula con la membrana celular (b) terminando con permitir la entrada de la bacteria estableciéndose en su interior (c), para multiplicarse e invadir células adyacentes (d), destruyendo la célula hospedera causando absesos en la mucosa intestinal. (45)

La capacidad de invadir células epiteliales es importante en la patogénesis de la diarrea aguda causada por *Shigella sp.* y EIEC. Esta propiedad se investiga con la prueba de Sereny que se realiza en el ojo de un cobayo la cual señala la capacidad de causar una queratoconjuntivitis ulcerativa después de administrar un inóculo bacteriano de 10^{10} UFC/ml .

Las cepas EIEC y las especies de *Shigella* dan positiva la prueba de Sereny, por lo que se han realizado estudios para detectar los genes y los productos involucrados en este fenotipo (10). Sansonetti y cols. en 1988, (44) demostraron que cepas virulentas de *S. flexneri* perdían su capacidad para producir queratoconjuntivitis en cobayo, cuando el locus pur E de *E. coli* k-12 era reemplazada en la región homóloga presente en el cromosoma de *Shigella*, esto se atribuyó a que el locus kcp A que está íntimamente unido a esta región no estaba presente en *E. coli* (43). Otro segmento del cromosoma de *Shigella* ligado a los locus arg-mtl se necesita para la producción de líquido en el modelo de asa ligada y para producir una reacción positiva en la prueba de Sereny. Se obtuvo un híbrido virulento de *E. coli* k-12 utilizando las regiones cromosómicas asociadas a la virulencia de *Shigella*; sin embargo, los híbridos que fueron obtenidos no dieron una reacción positiva a esta prueba, aunque si fueron capaces de penetrar la mucosa intestinal, pero su capacidad de multiplicación fue limitada (44). Estos resultados llevaron a los investigadores a la conclusión de que se necesitaba un factor ajeno al cromosoma bacteriano que debería estar presente y participar en la producción de la enfermedad (19).

El lipopolisacárido (LPS) o antígeno somático juega un papel crítico en la patogénesis, esto puede ser inferido a partir de las cepas rugosas y avirulentas de *Shigella* en modelos animales tales como prueba de Sereny. Las cepas rugosas de *S. flexneri* retienen la capacidad de penetrar cultivos celulares y multiplicarse dentro de ellos. Sin embargo, estas mismas cepas rugosas no son capaces de dispersarse en a las células hospederas contiguas, o formar placas en monocapas de tejido celular. La

última observación sugiere que las características físicas impartidas por el LPS pueden afectar la interacción de *Shigella* con el citoesqueleto de la célula huésped (18, 20, 32).

El resultado de una infección por *Shigella* o cepas EIEC es una disentería bacilar, que se caracteriza por la degeneración del epitelio intestinal acompañado de colitis inflamatoria aguda en la lámina propia con descamación y ulceración de la mucosa causando pérdida de sangre y moco en el lumen intestinal (17).

El proceso invasivo involucra factores complejos como adherencia y colonización del epitelio, penetración a la célula huésped, multiplicación intracelular, dispersión a células adyacentes del tejido conectivo intestinal y destrucción del mismo FIGURA 1. (4,32).

1.3. - Mecanismo de Penetración de EIEC

La penetración de células epiteliales es parte del mecanismo de patogenicidad de bacterias entéricas invasivas incluyendo cepas de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Yersinia*. Las bacterias invasivas son capaces de producir enfermedades muy parecidas a la disentería o la diarrea inflamatoria, acompañada de leucocitos con moco y sangre (41).

El proceso de patogenicidad en la invasividad incluye la penetración a las células, para estudiarlo se utilizan sistemas de cultivos celulares, particularmente líneas celulares humanas como HeLa y HEP-2 (53). Nandasa y col. en 1981 (37) utilizando cepas EIEC aisladas de muestras diarreicas, demostraron que estas cepas eran capaces de adherirse a la superficie de células HeLa y HEP-2; esto permitió la utilización del cultivo de células para la estandarización de una prueba de penetración (37,43). Otra propiedad que deben compartir las cepas invasivas durante el proceso de penetración, es el evitar su destrucción al liberarse de la vacuola en la que fueron incluidas por la célula M. Después deben ser capaces de multiplicarse intracelularmente, y por último se liberan por rompimiento de la célula hospedera para penetrar células contiguas en la etapa final del proceso (24).

Inman y col en 1986 obtuvieron una cepa EPEC que por recombinación expresa los antígenos somáticos 3 y 4 de *Shigella*, los cuales participan en la adherencia específica inicial de estas bacterias a las células M. Estas últimas representan una ventana del sistema inmune en el intestino humano, se encuentra situado en forma intercalada con las células epiteliales y su borde en cepillo es bastante irregular. Estas células presentan actividad fagocítica, por medio de vacuolas que transportan el material fagocitado hacia las placas de Peyer, ahí un grupo de células del sistema inmune se encarga del reconocimiento y del procesamiento del antígeno para la inducción de la respuesta inmune (24).

I.4.-Genética de EPEC

Se ha sugerido que mutantes *kcp A* permanecen localizadas en el citoplasma de la célula hospedera porque ellas no pueden escapar de las vacuolas endocíticas (20). Existen dos niveles de regulación de la expresión del fenotipo del proceso de entrada. El gene *vir F* está en el plásmido de virulencia y actúa en posición *trans* como un inductor positivo del fenotipo invasivo (20).

El gene *vir R* se encuentra en el cromosoma y actúa en posición *trans* como un represor del proceso de penetración (20). El gene *vir F* de 40 Kb involucrado en el proceso de entrada, codifica una proteína de 30 KDa que regula positivamente la expresión de genes *ipa* a un nivel transcripcional. Esta proteína también regula positivamente la expresión de una proteína de membrana externa de 120 KDa codificada por los genes del plásmido de virulencia, un proceso que parece ser necesario para la dispersión intra e intercelular de la bacteria. Sin embargo se desconoce cuales son los factores involucrados en la activación de la expresión o función del producto *vir F* (45,47). El gene *vir R* está localizado entre *trp* y *gal U* a 27 minutos en el cromosoma de *Shigella*. Este gene actúa como un represor de los genes del plásmido de invasión en una forma dependiente de la temperatura, cuando la bacteria crece a 30° C no es invasiva y no codifica

la síntesis de polipéptidos Ipa o algún otro polipéptido codificado por el plásmido; así mismo cuando la bacteria se crece a 37° C es fuertemente invasiva y se sintetizan polipéptidos de 78, 82, 43, y 38 KDa. Aun no es claro si el gene vir R pudiera ser un represor específico para la expresión de la virulencia conferido por el plásmido o por un factor que afecta la transcripción de todos los genes en el plásmido.

TABLAS 2 y 3 (20).

Micrografías electrónicas de células infectadas con mutantes del gene vir G (ics A) de *S flexneri* indican que estos organismos pueden escapar de la vacuola endocítica. Los híbridos son por lo general incapaces de dispersarse entre las células y de formar placas en una monocapa de tejido celular, pero las variantes de *E. coli* k-12 que expresan la proteína de 120 KDa, como producto del gene vir G se pueden obtener aunque con baja frecuencia. El fenotipo para la formación de placas y la expresión del gene vir G están enlazadas al locus pur E en esos híbridos *E. coli*-*S flexneri* (30,38). Los genes cercanos a pur E (kcp A) y mal A (omp R-envZ) parecen ser necesarios para la regulación positiva de los determinantes codificados en el plásmido de virulencia. La inserción de transposones vir R, permite la expresión constitutiva del fenotipo invasivo a 30° C y a 37° C, este "locus " no es necesariamente un gene de virulencia pero participa en la regulación de ésta (20,34).

El gene vir F fue identificado por una eliminación espontánea del fragmento Sal I que resultó en pérdida simultánea de 4 fenotipos : Crb + (captación de rojo Congo), Inv + (invasión de cultivo celular), Ser + (prueba de Sereny) y Igr + (inhibición de crecimiento) (45). El gene vir F activa directamente la transcripción del gene vir G e indirectamente activa los genes ipa ABCD. FIGURA 2 (20,45).

**TABLA NO.2 GENES CROMOSOMALES ASOCIADOS CON VIRULENCIA
EN *Shigella flexneri*.**

LOCUS	ENLACE	MUTANTES DEL FENOTIPO DE VIRULENCIA.	FUNCIONES EFECTORA Y DE REGULACION.
kcp A	pur E	Sereny negativo con dispersion intra e inter celular limitado en monocapa celular.	Regulacion positiva del gene vir B (ics A) en el plasmido.
vir R	gal U	Invasiva en cultivo de tejido cuando crece a 30 C	Replecion del plasmido de invasion en el loci ipa ABCD en respuesta a temperatura.
iuc ABCD- iut- A	tna A	Decremento en la prueba de Sereny	Sintesis de aerobactina y proteina receptora de 76-KDa de aerobactina

Adaptado de Hale y col (20)

TABLA No. 3 GENE^S PLASMIDICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA
DE *Shigella flexneri*.

GENE	REGULACION	FUNCION EFECTORA O REGULADORA.
vir F	vir R	Regulacion positiva de vir R (inv E, ipa R) y vir G (ics A)
ipa D	vir B (invE, ipaR)	Puede mediar adherencia de <i>Shigella</i> a la membrana de celula huésped.
ipa A	vir B (invE, ipaR)	Relacionado con invasion y prueba de Sereny, al parecer no necesario.
vir G	kcpA y vir F	Asociado con dispersion intra e intercelular.
ipa H	desconocido	Desconocido.
crb	desconocido	Captacion de rojo congo

Adaptado de Hale y col (20)

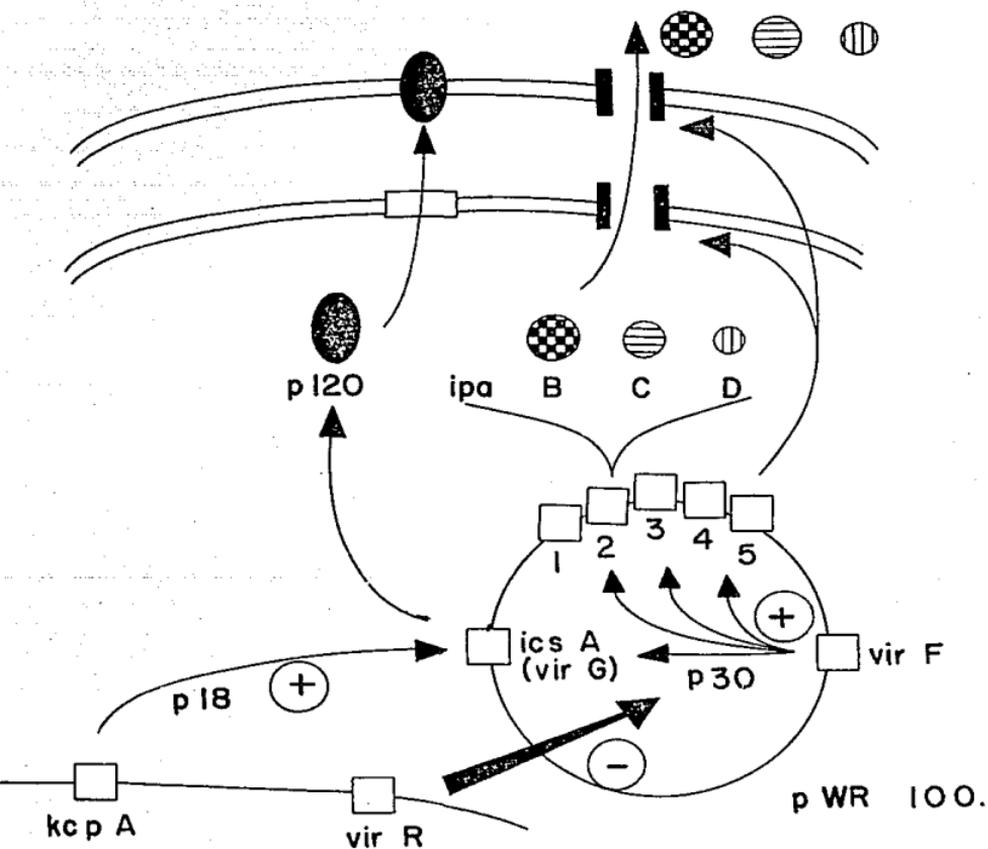


FIGURA 2. Niveles de regulación en los genes de invasión presentes en *S. flexneri*. (45)

La región clonada ipa BCD fué usada como una sonda de DNA específica para identificar organismos invasivos. Estas observaciones sugieren que el "locus ipa" se conserva en plásmidos en *Shigella*. La expresión de ipa B C y D está asociada con la adherencia e invasividad en la patogénesis de la disentería. La proteína Ipa H (60 KDa) es similar en tamaño a la proteína Ipa B (62 KDa) pero diferente a nivel inmunológico. En contraste en el loci "ipa B C D A", el gene ipa H está repetido y la expresión del antígeno ipa H no parece estar regulado por la temperatura (22,31).

La proteína Vir G produce una acumulación polar de actina F (filamentos de actina) alrededor de la célula en el citoplasma de células HeLa infectadas. Esta actina F algunas veces tiene la apariencia de una molécula alargada y sus filamentos a menudo se encuentran asociados con la bacteria produciendo proyecciones que sobresalen de la membrana plasmática de la célula hospedera (20). Estas deformaciones representan el primer paso en la dispersión intercelular de la bacteria (32,45) *Shigella* penetra a la célula huésped aparentemente sin que participe ningún componente celular de selección lo que sugiere que este proceso se lleva a cabo a través de un mecanismo muy similar al de la fagocitosis (8).

El proceso de fagocitosis ha sido estudiado usando células fagocíticas profesionales como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Durante el paso inicial de la fagocitosis los organismos se unen a la superficie de la membrana plasmática a través de un mecanismo denominado cierre o "zipper". La polimerización de actina queda localizada por debajo de la membrana en el citoplasma que queda en contacto con la partícula, la cual al ser ingerida produce una malla densa de filamentos de actina que aparecen en esta región produciendo acumulación de proteínas de enlace tipo actina y/o miosina (24,49). La endocitosis está mediada por un receptor, cuyo mecanismo entre células eucarióticas permite la internalización de las macromoléculas y partículas pequeñas tales como los virus. Este

camino requiere una membrana plasmática especializada denominada " coated pits ", que posteriormente son transformados en vesículas cubiertas con clatrina. La clatrina es una proteína de 180 KDa que constituye el componente principal de la membrana celular. La citocalasina B es un inhibidor potente de la fagocitosis y bloquea la penetración de *Shigella* en la célula, sugiriendo que los microfilamentos de actina están involucrados en el mecanismo de invasividad (6).

La polimerización de actina se produce solamente durante el proceso de entrada y la bacteria intracelular no es capaz de alterar el sistema de microfilamentos dentro de la célula durante la experimentación. Esta polimerización está asociada con la acumulación de miosina, la cual solo es requerida para el proceso fagocítico, por lo que se dice que en este modelo de la entrada de *Shigella* a la célula HeLa se hace por fagocitosis y no a través de endocitosis mediada por un receptor (6,20).

Hiller y cols (23) reportaron que la interacción de virus con las proteínas del citoesqueleto de la célula huésped está relacionada con las microvellosidades o proyecciones formadas en la célula infectada. La proteína llamada "vinculina" está presente en el citoesqueleto celular, ha sido observada una reorganización después de la infección de líneas celulares con virus productores de Sarcoma de Rous. La Vinculina es una proteína que se encuentra localizada en la parte central de las placas de adherencia en las áreas en donde las células se adhieren a la superficie de la botella de cultivo, producen un efecto de anclaje de los filamentos de actina unidos a la membrana plasmática y el producto es un un componente que pertenece al complejo fibronectina-actina (25).

1.5. - Serología y Biotipos de EIEC

Existen pruebas *in vitro* para facilitar la caracterización de cepas EIEC como la serotipificación "O" somática, la similitud en la captación de hierro requerido para el crecimiento intracelular mediante la prueba de rojo Congo y la producción de exoenzimas hidrolíticas producidas por la bacteria son necesarias para la liberación de la vacuola fagocítica (43).

La serología dentro de las pruebas *in vitro* probablemente es la forma más útil de subdivisión de *E. coli*, se basa en las propiedades de las diferentes estructuras de la superficie, las cuales en términos serológicos se expresan como antígeno O (somático), K (capsular) y F (flagelar) (27). Sin embargo el estudio serológico completo de *E. coli* no está disponible para la mayoría de los laboratorios, por lo que es útil disponer de un esquema de tipificación para la diferenciación de estas cepas. La capacidad de *E. coli* de causar infecciones intestinales es una característica asociada más bien con biotipos que con serotipos (28).

Toledo y col. en 1983 (48) proponen que cepas con el biotipo no móvil y lisina descarboxilasa negativo, son invasivas en la prueba de Sereny y con el biotipo lisina descarboxilasa positivo son Sereny negativo.

Otras pruebas como la fermentación de la lactosa, la utilización de acetato y mucato como fuente de carbono son consideradas típicas para *E. coli* invasiva. Silva y cols (1980) demostraron que la producción de lisina descarboxilasa era la más importante en EIEC (48).

1.6. - Captación del colorante rojo congo

La capacidad de unión al colorante rojo Congo es un marcador fenotípico fácilmente identificable asociado a la virulencia de *Shigella*, en este sistema se produce la síntesis y secreción de compuestos de bajo peso molecular que captan hierro llamados sideróforos, además de producirse proteínas de membrana externa (PME), algunas de ellas actúan como receptoras del complejo

sideróforo-hierro. Las cepas que captan dicho colorante a partir del medio de agar, se considera que son virulentas y deben de poseer el gene *crb+* mientras que la mutante que es incapaz de captar hierro no posee esa coloración y se califica como avirulenta (*Crb-*). La conversión de un organismo virulento a uno avirulento esta acompañado por la pérdida o eliminación de un plásmido de 220 Kb (8,32). Esta capacidad está regulada por la temperatura y se asocia a los sistemas de captación de fierro de alta afinidad cuando crecen en ambientes donde la concentración de hierro es deficiente tanto *in vivo* como *in vitro* o durante la infección (33, 40, 48).

Recientemente ha sido identificada una proteína de 101 KDa como un componente de membrana externa que es capaz de unir al grupo heme y que a su vez tambien es una proteína que se une al rojo congo. Aunque los fenotipos *Inv+* y *Crb+* son expresados independientemente, están relacionados sinérgicamente y son capaces de incrementar la invasividad a células HeLa cuando la bacteria recibe un tratamiento previo con rojo congo o hemina (9,50).

E. coli posee 2 sistemas potenciales para adquirir hierro que facilitan la supervivencia de este organismo en los tejidos humanos con cantidad limitada de este elemento; estos incluyen la producción de hemolisinas, las cuales destruyen la membrana de los eritrocitos y proveen una fuente de hierro en forma de hemoglobina; y el otro sistema es la generación de quelatos (sideróforos) los que solubilizan y sequestran el ión Fe^{2+} para que pueda ser usado en el crecimiento bacteriano. Estudios recientes sugieren que el sideróforo hidroxamato de aerobactina es el sistema más importante de asimilación o captación de hierro por *E. coli* (8).

1.7.- Enzimas Hidrolíticas

La producción de enzimas como parte del mecanismo de daño empleado por las bacterias es un factor de virulencia importante descrito en diferentes microorganismos (4,12,54). EIEC produce enzimas hidrolíticas como lipasa, lecitinasa y gelatinasa en gran cantidad en comparación con las cepas "no invasivas", este patrón de enzimas hidrolíticas es útil para especular mas en el mecanismo de invasividad involucrado por enzimas y PME (porinas) (40). Se cree que la lipasa participa en la degradación del fagosoma como lo hace la fosfolipasa A en *Rickettsia* lo que permite a las bacterias ser invasivas y liberarse del citoplasma celular (44). El plásmido relacionado con la actividad hemolítica por contacto en *Shigella* invasiva es un probable candidato para el fenotipo involucrado en la lisis del fagosoma (45). La muerte bacteriana rápida involucra un decremento en la concentración intracelular de ATP y un incremento en la concentración de piruvato y una disminución en la producción de lactato. Las bases moleculares relacionadas con la inhibición de la respiración y la fermentación en la célula hospedera no se conoce. Aún no es claro cuáles son los genes responsables de este efecto o cuál plásmido media la lisis de vacuolas fagocíticas que permite la difusión de productos tóxicos codificados por el cromosoma dentro del citosol (45,46).

Se observa de lo anteriormente descrito que las cepas EIEC presentan todavía varias características que están relacionadas con el proceso de invasividad; sin embargo, esto no se ha establecido de manera conjunta en cepas recuperadas de muestras clínicas.

II.- OBJETIVOS

II.1.- General

Caracterizar cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivas recuperadas de muestras clínicas por pruebas *in vivo* e *in vitro*.

II.2.- Específicos

Determinar la capacidad invasiva de *Escherichia coli* por las pruebas de Sereny y de cultivo en células HEP-2 de 94 cepas EIEC provenientes de niños con y sin diarrea.

Establecer si los biotipos característicos de cepas invasivas son diferentes a aquellos de cepas no invasivas.

Determinar la presencia de serotipos relacionados con invasividad.

Establecer la capacidad de captar el colorante rojo Congo.

Investigar el patrón enzimático (lipasa, lecitinasa, gelatinasa, caseinasa y DNasa) de las cepas en estudio.

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- Material Biológico

III.1.1.- Cepas

Se estudiaron 18 cepas provenientes de heces de niños con diarrea y 16 cepas aisladas de materia fecal de niños sin diarrea que fueron obtenidas en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del IMSS y que pertenecen al cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN).

Shigella flexneri proveniente de un caso de diarrea infantil aislada del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, *Shigella sonnei* y *Shigella boydii*; forman parte del cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología ENCB,IPN. Todas ellas fueron conservadas en medio nutritivo de Gelosa Especial (2) a temperatura ambiente y en la obscuridad y empleadas en el proyecto CONACYT, PCCBENA-021504 y DEPI : 862541.

III.1.2.- Animales

37 cobayos machos jóvenes (1 mes de edad) de la línea Harley pura.

III.2.- Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados en el crecimiento de cepas EIEC para las diferentes pruebas y ensayos fueron : caldo de soya tripticaseína (TSB), agar Mueller-Hinton, agar soya tripticaseína (TSA), base de agar sangre (BAB), agar McConkey, agar nutritivo, todo ellos de la marca Bioxon y gelatina de la marca Difco y preparadas según las recomendaciones del proveedor.

La preparación de los medios de gelosa especial, rojo congo, caseinasa, DNasa, lipasa, lecitinasa y gelatinasa se indican en el apéndice.

III.3.- Soluciones y Reactivos

- Solución reguladora de fosfatos (PBS) completo 0.01 M pH 7.2.
- Solución salina fisiológica estéril (SSF), cloruro de sodio al 0.85 % diluido en agua destilada.
- Solución salina formalinizada, 0.05 ml de formalina en 100 ml de solución salina estéril.
- Solución saturada de sulfato de cobre.
- Tripsina verseno 0.05 %, Tritón x-100, caseinasa y DNasa de la marca Sigma; Estreptomocina 100 mg/ml, Penicilina 100 U/ml, púrpura de bromocresol, rojo Congo y verde de metilo de Laboratorios Merck.

III.4.- Equipo

- Incubadora Napco modelo 322.
- Baño metabólico Lab-Line. Orbit.
- Microcentrifuga Beckman E.
- Micropipeta Gilson 95400.
- Microscopio estereoscópico Cenco modelo 237.
- Campana de flujo laminar Venco S.A. 01501.
- Autoclave. Olla de presión. Presto.

III.5.- METODOLOGIA

III.5.1.- PRUEBA DE SERENY (10)

III.5.1.1.-Preparación de la suspensión bacteriana

- a) Se siembran las cepas problema en 3 ml de caldo soya tripticaseína (TSB) e incubar a 37° C en agitación por 24 horas.
- b) Se resiembran 0.1 ml de cada una de las cepas problema en tubos con 3 ml de TSB, incubar a 37° C en agitación de 2 a 3 horas.
- c) Se centrifugan 1.5 ml de esta última suspensión de 2 a 3 minutos en una microcentrifuga Beckman E.
- d) Se desecha el sobrenadante y se resuspende el paquete con 75 µl de solución reguladora de fosfatos pH 7.2.

III.5.1.2. - Inoculación en el modelo experimental

- a) Se administran 25 μ l de la suspensión bacteriana en la conjuntiva del cobayo (previamente identificado) en el ojo derecho.
- b) Se administran 25 μ l de solución salina fisiológica estéril en el ojo izquierdo del mismo cobayo.
- c) Se examinan diariamente el desarrollo de la infección durante un periodo de 3 días.

Para identificar la positividad de las cepas a esta prueba, se considera el criterio propuesto por Sereny, el cual indica que la queratoconjuntivitis se manifiesta dentro de 48 horas cuando se inocula *S. felxneri* y en 72 horas cuando se estudian cepas EIEC, observándose en ambos casos enrojecimiento e inflamación de la zona parpebral y queratinización de la conjuntiva del cobayo.

III.5.2. - ENSAYO DE INVASIVIDAD (11, 52)

III.5.2.1. - Determinación del espectro de sensibilidad a kanamicina y amikacina de las cepas a ensayar

Para este ensayo se utiliza agar Mueller-Hinton que por sus características nutricionales y carencia de inhibidores, favorece la acción de los antimicrobianos a probar.

a) Preparación del inóculo bacteriano

Se siembran las cepas a probar en tubos con 3 ml de TSB a 37° C por 24 horas.

Se ajusta el inóculo con SSF estéril a una densidad óptica aproximadamente igual al tubo 0.5 del tubo No. 1 del Nefelómetro de MacFarland (150 x 10⁹ UFC/ml).

b) Realización del espectro

Se siembran masivamente las cajas de agar por triplicado, se colocó el sensibilizador de 30 μ g de cada antibiótico en la parte

central de la caja, y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Se utiliza la cepa de *Escherichia coli* 25292 como control positivo y sensidiscos de kanamicina y amikacina. Se mide el diámetro en mm del halo de inhibición y se consideraron como cepas sensibles, aquellas que reportaron halos mayores de 17 mm. para Amikacina y 18 mm. para Kanamicina (29).

III.5.2.2.- Preparación de la microplaca

- a) Se seleccionan 2 botellas de la marca Falcon (No de catálogo 15204) de 25 cm² que contenían 100 % de confluencia de células HEP-2 para preparar una microplaca con 96 pozos de fondo plano a razón de 8×10^4 cel/pozo.
- b) Se facilita el desprendimiento de las células del vidrio, adicionando 2 ml de tripsina-verseno al 0.05 % a cada una de las botellas. Se bañan las células con tripsina y descartar el líquido.
- c) Se adiciona nuevamente 2 ml de tripsina-verseno y se incuban durante 10 minutos hasta que la monocapa se observe traslúcida. Se descarta la mayor parte de la tripsina-verseno y se bajan las células con una varilla.
- d) Se resuspende y dispersa con 4 ml de M-199 (medio de mantenimiento) con Penicilina (100 U/ml) - Estreptomina (100 mg/ml) (PES). Se toma lectura en cámara de Neubauer leyendo los 5 cuadros centrales (factor 10^4 cels/ml) y se ajusta la concentración hasta obtener 4×10^3 cels/ml.
- e) Se adicionan 200 µl de medio de mantenimiento a cada uno de los pozos de la microplaca. Se incuba a 37° C con 5 % de CO₂ de 18 a 24 horas.

III.5.2.3. - Preparación del inóculo bacteriano

- a) Se crecen las cepas el día anterior al ensayo. Se siembran las cepas problema en tubos con 3 ml de TSB y se incuban a 37° C en agitación por 18 horas.
- b) Se resiembrá 0.1 ml de cada una de las suspensiones en tubos con 3 ml de TSB y se incuban a 37° C con agitación de 2 a 3 horas.
- c) Se centrifugan 1.5 ml de todos los crecimientos en microcentrifuga (Beckman E.) durante 3 minutos.
- d) Se resuspende con 50 μ l de PBS y se toman 20-30 μ l para diluirlos en tubos calibrados (en espectrofotómetro) que contienen 3 ml de PBS.
- e) Se toman lecturas en Espectronic 20 y ajustar a una D.O. = 0.02 Abs +/- 0.02 a una λ = 540 nm; esto representa aproximadamente 10 bact/ml .

III.5.2.4. - Ensayo de penetración en células HEP-2

- a) La misma microplaca se lava con PBS pH 7.2 (un solo lavado), con una pipeta graduada se llenan los pozos y se desecha el sobrenadante utilizando papel absorbente.
- b) Se adicionan 180 μ l de M-199 fresco sin antibiótico.
- c) Se observa la confluencia de las células en 30 pozos (por separado).
- d) Se inoculan 20 μ l de la suspensión bacteriana en el pozo correspondiente a la distribución de las cepas en la microplaca, previamente realizada.

- e) Se centrifuga la microplaca a 2500 rpm por 10 min asegurando la tapa de la misma con cinta adhesiva e incubar a 37° C con 5 % de CO₂ por 3 horas.
- f) Se desecha el sobrenadante en papel absorbente (una sola intención).
- g) Se lava 3 veces con 200 µl de PBS con multipipeta y puntas estériles y se desecha el sobrenadante.
- h) Se agregan 180 µl de medio fresco M-199 adicionado de 100 mg/ml de amikacina.
- i) Se incuba a 37° C por 1 hora y se lava (1 vez) con 200 µl de PBS por cada pozo.
- j) Se observa la confluencia de las cepas nuevamente.
- k) Se incorporan 200 µl de Tritón x-100 al 1 % por pozo, esperar 3-5 min, tomar 20 µl de cada uno de los pozos y adicionarlos al pozo correspondiente a la microplaca que contiene 180 µl de TSB para realizar 8 diluciones decimales (1 : 10).
- l) Se toman 10 µl de las 4 últimas diluciones y se suspenden en placas con TSA e incubar a 37° C de 24 a 36 horas.
- m) Se toman lecturas y se interpretan los resultados siguiendo el criterio propuesto por Donnenberg y col. (1989) quienes consideran que las cepas invasivas son aquellas en las que se observa crecimiento bacteriano en las 3 últimas diluciones logarítmicas.

III.5.3. - SEROTIPIFICACION SOMATICA (2).

III.5.3.1. - Preparación del antígeno

- a) Se siembran y aíslan las cepas en estudio en base de agar sangre (BAB) y se incuban a 37° C por 24 horas.
- b) Se seleccionan 3 colonias lisas y cada una se inocular en un tubo con 20 ml de TSB. Se incuban a 37° C de 4-6 horas.
- b') De las 3 colonias lisas se siembran masivamente cada una en BAE y se incuban a 37° C por 24 horas.
- c) Los tubos sembrados en (b) se someten a vapor fluyente (2-3 lb/60 min) enfriados a temperatura ambiente y se dejan sedimentar a 4 °C de 12-18 horas (2).
- d) Se seleccionan los tubos que en el fondo de los mismos se observa un botón (colonias lisas) y las cepas correspondientes a estas precipitaciones sembradas en (b') se inoculan en botellas con 45 ml de TSB y se incuban a 37° C de 4-6 horas.
- e) Estas botellas se someten a vapor fluyente, se enfrían a temperatura ambiente y se sedimentan en posición vertical a 4° C de 18 a 24 h.

III.5.3.2. - Preparación del antisuero

- a) Los antisueros fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), se diluyen 1 :20 en solución salina formalinizada al 6 % .

III.5.3.3.- Reacción antígeno - anticuerpo

- a) Se hace reaccionar 0.1 ml del antisuero con 0.9 ml del antígeno, se agitan suavemente los tubos y se introducen en un baño de agua a 50° C durante 24 horas.
- b) Se toman lecturas manifestándose la formación de malla como prueba positiva y la formación de un precipitado (botón) como prueba negativa.

III.5.4. - BIOTIPIFICACION (7, 48, 51).

III.5.4.1.- Preparación del inóculo

- a) Se siembran las cepas en estudio en agar MacConkey para examinar pureza de las mismas y se incuban a 37° C por 24 horas.
- b) Se inocula 1 colonia del aislamiento anterior en un tubo con 10 ml de TSB a 37° C por 24 horas. El crecimiento obtenido se ajustó con TSB estéril hasta obtener una densidad de 10 bact/ml.
- c) Se siembran las suspensiones bacterianas con asa calibrada (0.1 ml) en el medio sólido (púrpura de bromocresol y agar Mueller-Hinton) y se incuban a 37° C por 24, 28 y 72 h.
- d) De los resultados positivos en la prueba de fermentación que fueron indicados por medio del virre del indicador, púrpura a amarillo, se toman las lecturas a las 24 h para zorbosa, 48 h para dulcitol y 72 h para rafinosa (7).
- e) La prueba para descarboxilación se considera como positiva cuando el medio tomó una coloración púrpura a las 48 horas y el medio control permaneció sin cambio o amarillo, debido a la fermentación de glucosa que contiene el medio.

III.5.5. - PRUEBA DE ROJO CONGO (8, 9).

III.5.5.1. - Preparación del inóculo

a) Las cepas se siembran en TSB a 37° C por 24 horas y se ajustan con SSF para obtener una concentración de 10⁷ bact/ml.

III.5.5.2. - Realización de la prueba

a) Se siembran las cepas en TSA que incluía el colorante por estria cruzada para aislar las colonias que captan el pigmento y se incuban a 37° C por 24 horas.

b) La misma colonia aislada se siembra nuevamente en el agar rojo congo con una pequeña estria en forma de zig-zag.

c) Las cepas que fueron capaces de captar el colorante, presentan una coloración rojo intenso, mientras que las colonias toman un color blanco en las cepas negativas.

III.5.6. - ENZIMAS HIDROLITICAS (1, 13, 29, 35).

III.5.6.1. - Caseinasa

a) Se siembran las cepas en estudio en 3 ml de TSB y se incuban a 37° C por 24 horas, ajustando al tubo No. 1 del Nefelómetro de MacFarland (300 x 10⁸ UFC/ml).

b) Se siembran las cepas en agar caseinasa haciendo una pequeña estria (zig-zag) y se incuban a 37° C durante 24 horas.

c) La presencia de ésta enzima se observa mediante halos de actividad proteolítica alrededor de las colonias (1).

III.5.6.2. - Lipasa y Lecitinasa

a) Se inoculan placas de agar yema de huevo con un crecimiento bacteriano de 24 horas en TSB y se incuban 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 (29).

b) Para hacer mas evidente la producción de lipasa 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 bacterianas (29).

III.5.6.3. - DNasa

a) Las cajas conteniendo este agar se inoculan e incuban como en el punto No. 1.

b) Alrededor de las colonias positivas aparecen halos con tonalidad rosa que contrastan claramente con el fondo verde del agar. El tamaño e intensidad del color mostrado por los halos permite conocer de manera aproximada la cantidad de enzima secretada (13).

III.5.6.4. - Gelatinasa

a) Se siembran las cepas problema con la concentración indicada en la prueba de caseinasa, en tubos con tapón de rosca conteniendo 5 ml del medio aplicando un inóculo espeso y puncionando en el medio hasta una profundidad de 1.5 -2.5 cm. Se incuban a 37° C durante 7 días.

b) Para interpretar resultados, se mantienen los tubos a baja temperatura (2 - 4° C); una reacción positiva se manifiesta cuando el medio se observa licuado y en el testigo negativo el medio se mantiene sólido (13).

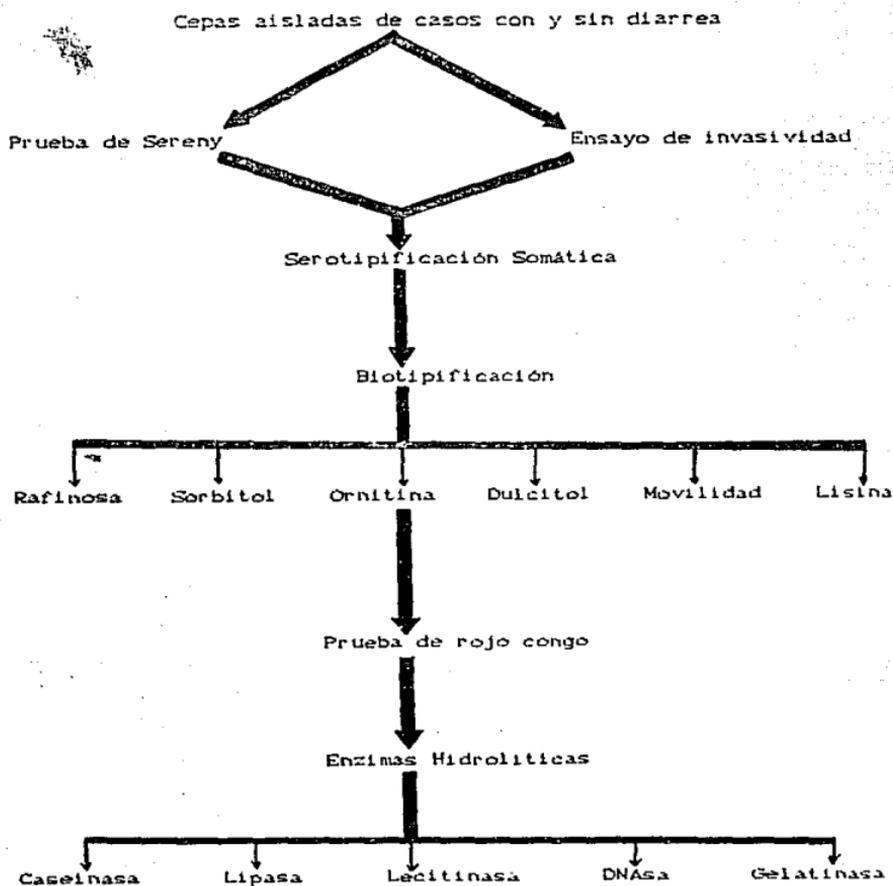


FIGURA 3. Diagrama de flujo de metodología.

IV. - R E S U L T A D O S

El Laboratorio de Bacteriología Médica cuenta con un amplio cepario que incluye mas de 1000 cepas de la especie *Escherichia coli* que fueron aisladas en el Centro Médico Nacional a partir de niños menores de 5 años con y sin diarrea antes de 1985. Este estudio se dedicó a ampliar la base de pruebas que identifican a las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), para lo cual se seleccionaron 34 cepas en base a signos clínicos y los resultados anteriores de las pruebas de invasividad de Sereny (30), o ensayo de penetración en células HeLa (29). La TABLA No. 4 muestra que 18 cepas eran provenientes de heces diarreicas y 16 de heces normales.

E. coli es un patógeno frecuente como causa de diarrea, las cepas EIEC presentan un mecanismo de patogenicidad muy similar al de especies del género *Shigella* por lo que la determinación de la capacidad invasiva suele realizarse en el laboratorio aplicando pruebas de invasión de tejido conectivo (Sereny) y de penetración en líneas celulares provenientes de células epiteliales (44). La TABLA No. 5 compara los resultados de la prueba de Sereny con los de HEp-2, observándose que solo 1 cepa dio positivo en ambos ensayos. La cepa 1098 que es no diarreogénica fue la otra que resultó positiva al ensayo de Sereny, aunque fue negativa al ensayo de las células HEp-2. Solo 4 (268, 1110, 1214 y 1257) de las cepas que demostraron con anterioridad que poseían la capacidad de penetrar células HeLa mantuvieron la capacidad de penetrar células HEp-2. (11). 8 de las 34 cepas seleccionadas que con anterioridad habían dado la prueba de Sereny en este ensayo fueron ahora negativas mientras que 21 cepas que demostraron penetración en células HeLa, resultaron no invasivas, en el ensayo con células HEp-2. La cepa testigo empleada de *S. flexneri* que se aisló recientemente a partir de un caso diarreico, *S. sonnei* y *S. boydii* que forman parte del cepario mencionado solo reportaron resultados positivos en la prueba de Sereny. Las cepas de *E. coli* H-30 y 939-J que son ETEC y EHEC respectivamente, resultaron ser no invasivas en este ensayo.

TABLA No.4 ASOCIACION DE LAS PRUEBAS DE INVASIVIDAD * , LAS CARACTERISTICAS CLINICAS GENERADAS POR CEPAS DE *Escherichia coli*.

CARACTERISTICAS CLINICAS	No. CEPAS SERENY	POSITIVAS Hela	A LAS PRUEBAS DE INVASIVIDAD AMBAS**
Diarrea	7/10	3/10	1/10
Diarrea con moco	1/5	4/5	0/5
Diarrea con moco y sangre	1/3	2/3	0/3
Sin diarrea	0/11	11/11	0/11
Sin diarrea con moco	0/5	5/5	0/5
Total	9/34	25/34	1/34

* Estos resultados se obtuvieron en ensayos anteriores.

** Solo a 1 de las 34 cepas se les realizaron ambos ensayos.

TABLA NO. 5 COMPARACION DE LAS PRUEBAS DE SERENY Y HEP-2 EN CEPAS *Escherichia coli* DIARREOGENICAS.

Clave de cepa	ANTERIOR		ACTUAL	
	SERENY	HELA	SERENY	HEP-2
DIARREOGENICAS				
268	+	@	+	+
1110	@	+	-	+
1214	@	+	-	+
12	+	@	-	-
14	+	@	-	-
19	+	@	-	-
37	+	@	-	-
70	+	@	-	-
776	+	@	-	-
786	+	@	-	-
801	+	@	-	-
1077	@	+	-	-
1103	@	+	-	-
1126	@	+	-	-
1154	@	+	-	-
1267	@	+	-	-
1284	@	+	-	-
1327	@	+	-	-
NO DIARREOGENICAS				
1098	@	+	+	-
1297	@	+	-	+
1427	@	+	-	+
1910	@	+	-	-
1912	@	+	-	-
1022	@	+	-	-
1023	@	+	-	-
1031	@	+	-	-
1034	@	+	-	-
1046	@	+	-	-
1064	@	+	-	-
1200	@	+	-	-
1282	@	+	-	-
1295	@	+	-	-
1296	@	+	-	-
1326	@	+	-	-
Total	9	25	2	5

@ = no se hizo

Existen estudios que conocen la relación existente entre los serotipos invasivos reportados con mayor frecuencia y la capacidad de penetrar al epitelio intestinal (TABLA No. 10). En la TABLA No. 6 se agrupan los resultados obtenidos de la serotipificación somática utilizando los antisueros que corresponden a los serogrupos invasivos mas comunes de acuerdo a la propuesta de Levine y col. en 1984 (28). Solo 21 de las 34 cepas mostraron ser lisas, requisito indispensable en la tipificación serológica de las bacterias, y se determinó que 5 de las cepas pertenecian a serogrupos no invasivos: O25, que formaba parte del grupo ETEC y O55 y O111 del grupo EPEC. Las 13 cepas restantes fueron rugosas por el método de vapor efluyente.

Crichton y col. en 1980 (7) (TABLA No. 7) propusieron esquemas de biotipificación como prueba de identificación de cepas patógenas de *E. coli* para los aislamientos de vias urinarias y Toledo y col. en 1983 (51) propusieron para cepas invasivas ETEC la prueba de Sereny positiva, lisina descarboxilasa negativa y movilidad negativa.

Los biotipos obtenidos en nuestro ensayo se muestran en la TABLA No. 8 en el que se observa que las cepas invasivas no pudieron ser diferenciadas de las no invasivas, ya que siguiendo el criterio de Crichton observamos que en las cepas invasivas 1 de ellas presentó el biotipo 6, 3 el biotipo 2 y 1 el biotipo 10, mismas que se compartieron con el 1, 11 y 13 que corresponden a cepas no invasivas , de acuerdo con este criterio, el biotipo 12 fue exclusivo de la cepa invasiva 268 y el 1 se observó en 2 cepas no invasivas (37 y 1200). El criterio de biotipificación fue por lo tanto de menor utilidad, ya que las 2 cepas con criterio bioquímico invasivo (según Toledo) no dieron positivos los ensayos de Sereny y células HEP-2.

Tabla No. 11. REPLICACION POR SEROTIPIA SOMÁTICA * DE CEPAS ENTEROPATÓGENAS DE *Escherichia coli*.

Cepas productoras de diarrea		
Clase de cepa	Serogrupo	Tipo de Colonia
12	0111	L
14	-	L
15	055	L
37	025	L
70	-	L
068	-	L
706	-	L
801	-	L
1077	-	L
1103	-	L
1110	0111	L
1126	-	L
1154	-	L
1267	-	L
1284	-	L
1377	-	L
Cepas no productoras de diarrea		
1010	-	L
1012	-	L
1022	-	L
1075	025	L
1071	-	L

* Se emplearon 12 antisueños enteropatógenos: 028ac, 029, 0112ac, 0115, 0124, 0135, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167, 5 ENTEROPATÓGENOS: 026, 086, 0125ac, 0126a, 0142 y 7 enterohemorrágicas: 020, 085, 0128ac, 0140, 0142 y 0155.

L= Colonia lisa, las cepas restantes fueron rugosas.

TABLA NO. 7 CRITERIO DE CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE CEPAS DE
Escherichia coli PROPUESTO POR CRICHTON.

Biotipo No.	Rafinosa	Sorbitol	Ornitina	Dulcitol
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-

Tomado de Crichton (7)

TABLA NO. 8 BIOTIPOS OBTENIDOS BAJO LOS CRITERIOS DE CARACTERIZACION DE CRICHTON Y TOLEDO EN CEPAS INVASIVAS DE *Escherichia coli*

CLAVE DE LAS CEPAS	BIOTIPO	
	CRICHTON	TOLEDO
CEPAS INVASIVAS		
258	12	NI *
1078	6	NI
1110, 124, 1257	2	NI
1427	10	NI
CEPAS NO INVASIVAS		
37, 1200	1	NI
12, 726, 1012, 1031, 1034		
1046, 1077, 1103, 1126		
1295, 1296	2	NI
1327	6	NI
1010, 1064	10	1**
14, 19, 20, 306, 801		
1022, 1023, 1154, 1267		
1282, 1281	10	NI

NI* = BIOTIPO NO INVASIVO

1** = BIOTIPO INVASIVO

En la búsqueda de marcadores fenotípicos de fácil identificación se emplearon la capacidad de unión al colorante rojo congo (9) y detección de la producción de exoenzimas hidrolíticas (12). Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA No. 9, en el que podemos observar que las cepas que no fueron invasivas no mostraron la capacidad de la prueba de captación de rojo congo o la producción de exoenzimas hidrolíticas.

En cambio 3 cepas que se comportaron como no invasivas fueron capaces de captar el colorante y producir caseinasa.

La producción de ésta última parece ser un carácter que se adquiere con facilidad por las cepas de *E. coli* de origen humano relacionados con diarrea, ya que se observó en 26 de las 34 cepas estudiadas. En la TABLA No. 10 se observa que tanto las cepas productoras de diarrea como las no productoras poseen la capacidad de sintetizar caseinasa, así como la capacidad de captación de rojo congo ya que solo 4 cepas son productoras de diarrea de un total de 6 cepas que unen el colorante. Por el contrario, la producción de DNasa solo se puso en evidencia en 1 cepa no invasiva por Sereny ni en células HEP-2 y las enzimas gelatinasa, lipasa y lecitinasa estuvieron totalmente ausentes.

TABLA No. 9.

TABLA NO. 9 DETERMINACION DE LA CAPTACION DE ROJO CONGO Y DE LA PRODUCCION DE 4 EXOENZIMAS POR CEPAS INVASIVAS DE Escherichia coli.

Clave de cepa	Sereny	HEp-2	R.Congo	Caseinasa	DNasa	Gelatinasa Lipasa Lecitinasa
CEPAS INVASIVAS						
1098	+	-	-	-	-	-
1214	-	+	-	-	-	-
1427	-	+	-	-	-	-
268	+	+	+	-	-	-
1110	-	+	+	+	-	-
1257	-	+	+	+	-	-
CEPAS NO INVASIVAS						
1010	-	-	+	+	-	-
1077	-	-	+	+	-	-
1267	-	-	+	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	+	-	-
37	-	-	-	+	-	-
70	-	-	-	+	-	-
776	-	-	-	+	-	-
786	-	-	-	+	-	-
801	-	-	-	+	-	-
1012	-	-	-	+	-	-
1022	-	-	-	+	-	-
1023	-	-	-	+	-	-
1031	-	-	-	+	-	-
1054	-	-	-	+	-	-
1046	-	-	-	+	-	-
1064	-	-	-	+	-	-
1103	-	-	-	+	-	-
1126	-	-	-	+	-	-
1154	-	-	-	+	-	-
1200	-	-	-	+	-	-
1282	-	-	-	+	-	-
1284	-	-	-	+	-	-
1295	-	-	-	+	-	-
1296	-	-	-	+	-	-
1326	-	-	-	+	+	-
1327	-	-	-	-	-	-
Total	2	5	6	26	1	0

Tabla No. 10 COMPARACION DE LAS PRUEBAS *in vivo* e *in vitro* CON CEPAS DIARROGENICAS Y NO DIARROGENICAS.

CEPAS CON DIARREA	SECRETIN ANTES	SECRETIN DESPUES	HeLa	HEp-2	Rojo Congo	DNA asa	Caseinasa
12	+	-	-	-	-	-	+
14	+	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	+
37	+	-	-	-	-	-	+
70	+	-	-	-	-	-	+
798	+	+	-	+	+	-	+
86	+	-	-	-	-	-	+
1267	-	-	+	-	+	-	+
1327	-	-	+	-	-	-	-
776	+	-	+	-	-	-	+
1110	-	-	+	+	+	-	+
1126	-	-	+	-	-	-	+
1154	-	-	+	-	-	-	+
1284	-	-	+	-	-	-	+
801	+	-	+	-	-	-	+
1077	-	-	+	-	+	-	+
1107	-	-	+	-	-	-	+
1314	-	-	+	+	-	-	-
SIN DIARREA							
1010	-	-	-	-	+	-	+
1021	-	-	+	-	-	-	+
1023	-	-	+	-	-	-	+
1046	-	-	+	-	-	-	+
1064	-	-	+	-	-	-	+
1098	-	+	+	-	-	-	-
1012	-	-	+	-	-	-	+
1031	-	-	+	-	-	-	+
1034	-	-	+	-	-	-	-
1200	-	-	+	-	-	-	+
1275	-	-	+	-	-	-	+
1282	-	-	+	-	-	-	+
1296	-	-	+	-	-	-	-
1257	-	-	+	+	+	-	+
1326	-	-	+	-	-	+	+
1427	-	-	-	+	-	-	-
Total	9	2	24	5	6	1	26

V. - D I S C U S I O N

La invasión de la mucosa del colon es el primer paso en la patogénesis de la disentería bacilar, la cual es causada por las 4 especies de *Shigella* y las cepas invasivas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) entre otras. Esta propiedad se ha relacionado en estas bacterias con la presencia de un plásmido de 120-140 MDa (43). La identificación experimental de éste fenómeno ha sido posible mediante el modelo *in vivo* de prueba de Sereny (10) e *in vitro* mediante el ensayo de penetración en cultivos celulares (11). La producción de queratoconjuntivitis es el resultado de la invasión del epitelio de la córnea, replicación y dispersión a células vecinas. En la penetración de cultivos celulares, el microorganismo requiere mecanismos de adherencia e internalización para residir eventualmente en el citoplasma de la célula huésped (38).

Harris y col. en 1982 (21) demostraron la presencia de un plásmido de alto peso molecular de 140 MDa en 31 cepas EIEC positivas a la prueba de Sereny, aunque también observaron la presencia del plásmido en algunas cepas Sereny negativas. Estos últimos resultados sugieren que pudo haber sufrido la eliminación de algún o algunos genes necesarios para producir el fenómeno de queratoconjuntivitis (21). De forma similar Gomes y col. en 1987 demostraron que las cepas EIEC que reciben varios pases en el laboratorio pierden eventualmente el plásmido y por consiguiente se tornan negativas a la prueba de Sereny (18). En nuestros resultados (solo 2 cepas positivas a la prueba de Sereny) es muy probable que se haya perdido el plásmido que confiere el carácter de invasividad a las cepas EIEC estudiadas; ya que con anterioridad Alcántar (1986) demostró la capacidad invasiva de 9 cepas en la prueba de Sereny (3).

Day y col. en 1988 (10) estudiaron el fenotipo invasivo de 30 cepas de *Shigella* y 15 cepas de EIEC, correlacionando las pruebas de Sereny e invasividad en células HEP-2. Encontraron que 29 de las 30 cepas de *Shigella* fueron positivas a las 2 pruebas y 1 fue negativa en ambas; solamente 8 de las cepas de EIEC fueron

positivas a ambas y las 7 cepas restantes fueron negativas en las dos pruebas. En nuestro ensayo obtuvimos resultados diferentes ya que solo 1 de las 34 cepas estudiadas correlacionó en ambas determinaciones. Sin embargo, nuestros resultados fueron similares a los de Sasakawa y col(1986) quienes reportaron que cepas mutadas de *Shigella flexneri* 2a en la región vir G del plásmido de 140 MDa son Ser- (negativas en prueba Sereny) pero Inv+ (positivas al ensayo de penetración en cultivo celular); este fenotipo de mutantes vir G, se debe a la incapacidad de la diseminación intracelular de los microorganismos dentro del epitelio de la córnea, sin embargo no tenemos la certeza de más características genéticas de las cepas con que trabajamos. (46).

Es posible que las cepas que reportamos positivas solo en el ensayo de penetración en células HEP-2 poseen alteración en los genes kcp A y vir G por lo que solo presentan la capacidad de penetrar la monocapa celular pero no así la producción de queratoconjuntivitis.

Es probable que las 18 cepas que anteriormente mostraron la capacidad de penetrar células HeLa y que ahora resultaron negativas al ensayo, presentan las características reportadas por Hale y cols. (1991) (20) relacionadas con la ausencia del gene que codifica una proteína de 30 KDa (gene vir F) que regula positivamente la expresión del gene vir G responsable de la dispersión de la bacteria intra e intercelular.

La cepa No. 1098 mostró una reacción retardada para la prueba positiva de Sereny y cuando se administró el inóculo en el cobayo, los resultados se obtuvieron hasta las 96 h. Esta reacción retardada la observaron también Sasakawa y col. (46) quienes sugieren que en estas cepas existen alteraciones en los genes ipa B, C y A.

Las cepas que fueron positivas para la prueba de Sereny o al ensayo de penetración en monocapa celular y que ahora resultaron ser negativas a ambas pruebas, creemos que perdieron el plásmido de alto peso molecular; evento que se demostraría si realizáramos la prueba reportada por Malabi y col. en 1989 (31) quienes usaron una sonda de DNA conteniendo el gene ipa C.

Okamura y col. en 1977 (39) observaron que la cepa lisa de *S. flexneri* 2a con el fenotipo Ser+ e Inv+ después de sufrir una mutación que la hizo pasar de fase lisa a rugosa (L-R), cambió el fenotipo a Ser- e Inv+. Al parecer el antígeno de superficie no es necesario para la penetración en cultivo celular, pero si es indispensable en la producción de la queratoconjuntivitis. Nosotros demostramos por la técnica de vapor fluente que 21 cepas son lisas por lo que no podemos atribuir la pérdida de un antígeno de superficie con la capacidad invasiva.

Levine y col. en 1987 (27) reportaron una relación estrecha entre ciertos serogrupos y la capacidad invasiva de cepas de *E. coli*. Las cepas estudiadas no probaron pertenecer a ninguno de los serogrupos invasivos propuestos por el autor, lo que bien podría deberse a la presencia de serogrupos locales diferentes, hecho que solo podrá ser demostrado si se hace la tipificación de cepas aisladas en nuestra localidad y si se tipifica la totalidad de serotipos (los cuales solo se llevan a cabo en el laboratorio de referencia de Dinamarca por los Doctores Orskov y Orskov (2)

Toledo y col. en 1983 (51) observaron que en cepas EIEC había una estrecha correlación entre dos características bioquímicas (lisina descarboxilasa negativo y movilidad negativo) y la prueba de Sereny; todas las cepas fueron lisina descarboxilasa negativo e inmóviles. Esta correlación no se obtuvo en nuestras cepas puesto que las 2 fueron lisina descarboxilasa negativo, dieron negativa la prueba de Sereny. La diferencia entre estos resultados puede deberse a las características presentes en las cepas cuando se inicia un estudio, es decir las cepas trabajadas por Toledo fueron aisladas a partir de heces de casos diarréicos recientes y las cepas que estudiamos provienen de casos con y sin diarrea pero a partir de un medio de conservación.

El sistema de biotipificación que presenta Crichton es altamente discriminatorio y define tipos de *E. coli* estables *in vivo* e *in vitro*, este esquema lo propone para pequeños laboratorios en los que una completa serotipificación es impracticable, pero de esta forma pueden experimentar en estudios

de tipo epidemiológico. Silva y col. en 1980 (48) reportan la identificación de cepas de *E. coli* invasivas al considerar las pruebas bioquímicas de utilización de lactosa, mucato y acetato además las pruebas de lisina descarboxilasa negativo y movilidad negativo (14, 34). La identificación de estos microorganismos por pruebas bioquímicas no es posible y muchos aislamientos que pertenecen a reconocidos serogrupos de EIEC son avirulentos (42) por lo que las EIEC pueden ser detectadas por pruebas bioquímicas y serológicas, pero el diagnóstico debe ser confirmado por ensayos biológicos y un procedimiento alternativo para identificar potencialmente la invasividad de *E. coli* son los ensayos de hibridación con sondas de DNA de 7.6, 11.5 y 17 Kb (41).

La capacidad de captar el colorante rojo congo (Crb +) se relaciona con la producción de queratoconjuntivitis en cobayos y este fenotipo se relaciona frecuentemente con alteraciones moleculares detectables en el plásmido de 230 Kb. (46). Gomes y col. en 1987 (18) estudiaron un grupo de 54 cepas EIEC de las cuales 5 fueron Crb+ y Ser+ mientras que las cepas restantes son Crb- y Ser-. Todas las colonias Crb+ fueron positivas en células HeLa, mientras que una sola colonia perdió la capacidad de invadir estas células; ellos encontraron que el pInv+ estuvo presente en colonias Crb- aunque en 2 cepas el tamaño del plásmido (120 - 140 MDa) fue disminuido sugiriendo que hubo alteraciones internas en el plásmido.

Hale y col. en 1991 (20) han revelado que la región xyl+/rha+ contiene el locus iuc ABCD que codifica para el sideróforo F hidroxamato de aerobactina y el gene iut A que codifica para un receptor proteínico de 76 KDa. En base a nuestros resultados no podemos afirmar la relación que existe entre la capacidad de captación del colorante y la producción de queratoconjuntivitis reportada por Sasakawa y col. en 46 y tampoco se puede asegurar si existe disminución en el tamaño del plásmido reportado por Gomes y col. (18).

Las cepas que poseen el fenotipo Crb+ fueron invasivas en células Hep-2 y las cepas restantes no fueron invasivas en Sereny ni en cultivo celular. Sería muy útil conocer si estas cepas

poseían alteraciones en los locus iuc ABCD que codifican para la producción de sideróforos, o si en el gene iut A que sirve en la expresión del receptor de dicho complejo, para explicar el porque las cepas reportadas por López en 1988 pierden capacidad de captación del colorante (29).

La producción de enzimas como factor de virulencia ha sido establecida en diferentes microorganismos como *Rickettsia* y *Shigella* (29, 53). Sansonetti y col. en 1988 (44) estudiando cepas de *E. coli* invasiva propusieron la producción de una enzima que destruía glóbulos rojos. Esta enzima probablemente sea una fosfolipasa, la cual altera la membrana eritrocítica. Clerc y col. en 1987 (6) por su parte, trabajando con la línea celular de macrófagos J774 demostraron que las cepas EIEC fagocitadas se liberaban del fagosoma por efecto de un factor de tipo metabólico que aparentemente no tiene relación con la producción de la citotoxina semejante a la toxina shiga (45).

En el patrón enzimático realizado, solo obtuvimos 2 cepas invasivas en el ensayo de penetración que solo fueron capaces de sintetizar caseinasa, ya que la producción de DNasa se observó en 1 cepa y las enzimas lipasa, lecitinasa y gelatinasa no estuvieron presentes en el ensayo. Estos resultados son totalmente diferentes a los obtenidos por López en 1988 (29) quien observó una elevada producción de lipasa y lecitinasa en el grupo invasivo, él señala que es posible establecer un patrón enzimático para EIEC como factor de caracterización y de virulencia de este grupo de bacterias basado en la producción de estas enzimas en cepas positivas a la prueba de Sereny y ensayo de invasividad en células HeLa y que posiblemente estas enzimas podrían participar en la degradación del fagosoma como lo hace la fosfolipasa producida por *Rickettsia* (53). Sin embargo, Sansonetti y col. en 1991 (45) reportaron que eventualmente la bacteria se libera y destruye la célula por un proceso de exocitosis que ha sido estudiado bloqueando la respiración y que da lugar a una rápida acidificación intrafagosomal antes que la producción de la toxina shiga o la producción de enzimas hidrolíticas (45).

VI.- CONCLUSIONES

No se encontró correlación entre la prueba de Sereny y el ensayo de penetración en células HEP-2, ya que solo se identificaron 2 cepas positivas en la primera prueba y 4 cepas capaces de penetrar la monocapa celular, únicas que mantuvieron esa capacidad reconocida desde su aislamiento.

El esquema de biotipificación propuesto para la identificación de EIEC no fue útil, ya que las cepas invasivas no poseían los biotipos característicos para diferenciarlas de las cepas no invasivas.

Se identificaron por serotipificación somática 5 cepas pertenecientes a los serogrupos no invasivos O25, O55 y O111.

Se estableció la capacidad de captar el colorante rojo congo en cepas que fueron no invasivas, ya que 32 cepas dieron negativa la prueba de Sereny y 29 cepas dieron negativo el ensayo de penetración en monocapa celular.

Se demostró que el patrón enzimático realizado no fue característico para cepas EIEC por lo que no se pudo aplicar en la determinación de un perfil de virulencia por la producción de enzimas hidrolíticas.

La caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, no fue posible, ya que no hubo correlación entre las pruebas *in vivo* e *in vitro* realizadas, por lo que se considera necesario: 1) Que se hagan dichas pruebas con cepas de primoaislamiento y 2) Llevar a cabo pruebas bioquímicas y serológicas para la identificación de estas cepas, pero confirmar el diagnóstico con ensayos biológicos y procedimientos alternativos para la identificación potencial de la invasividad de *E coli* tales como los ensayos de biología molecular utilizando sondas de DNA de 7.6 Kb, 11.5 Kb, 17 Kb y sondas " ipa A, B, C, D y H ".

VII.- A P E N D I C E

Preparación de medios de cultivo

a) Medio de descarboxilasa de Moller (35).

Bacto peptona	5g
Extracto de carne	5g
Púrpura de bromocresol	0.1g
Dextrosa	0.5g
Agua destilada	1000ml

Pesar y rehidratar como se indica en el prospecto, calentar suavemente hasta disolución y agregar 10 g de Diclorhidrato de LC(+)-Ornitina (1%). Ajustar el pH a 8 con hidróxido de sodio 10 N y esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

b) Prueba de Fermentación de Carbohidratos (35).

Bacto Peptona	1.5g
Púrpura de bromocresol	0.02g
Agua destilada	1000ml

Preparar los carbohidratos al 10 % (P/V), calentar hasta disolución y adicionar al medio basal en una concentración final de 0.5 % (P/V), esterilizar a 100° C por 10 minutos y distribuir 4 ml en tubos con tapón de rosca.

c) Agar rojo Congo (8).

Agar Nutritivo	
Rojo Congo al 0.01 %	

Pesar y rehidratar como indica el proveedor y adicionar el colorante hasta obtener una concentración final de 0.01 %.

d) Agar caseinasa (1).

Caseína	1.5g
Citrato diamónico	0.25g
Cloruro de sodio	0.1g
Fosfato monoácido de potasio	0.15g

Sulfato de magnesio	0.05g
Carbonato de sodio	0.15g
Glicerol	2.5ml
Agua destilada	100ml

Homogenizar lo mejor posible la caseina con el medio líquido mineral empleando un mortero de porcelana, ajustar pH a 6.5, esterilizar en la forma habitual y vaciar porciones de aproximadamente 15 ml en placas estériles.

e) Agar yema de huevo (29).

Agar de soya	
Tripticaseina	25g
Digerido pancreático de caseína	40g
Fosfato de sodio dibásico	5g
Fosfato de sodio monobásico	1g
Cloruro de sodio	2g
Sulfato de magnesio	0.1g
Glucosa	2g
Agua destilada	1000ml

Disolver y ajustar pH a 7.6 , esterilizar a 121° C durante 15 minutos, enfriar a 50-55° C. Lavar un huevo en etanol 95 % durante 30 minutos, aspirar y separar el huevo de su cascarón. Adicionar el huevo a 500 ml de la base y agitar hasta tener una suspensión homogénea. Distribuir de 15 a 20 ml en placas de Petri estériles.

f) Agar DNasa (13).

Agar nutritivo	2.3g
Verde de metilo	0.05g
DNA	0.03g
Casaminoácidos	0.1g

Pesar e hidratar como se indica en el prospecto, el verde de metilo se prepara disolviéndolo al 0.5 % en agua destilada y extrayéndolo repetidamente (8 a 10 veces) con un volumen igual de

cloroformo, hasta que éste último sale incoloro. De ésta solución se utiliza 1 ml para 100 ml del medio fundido estéril. Si se desea, el colorante puede esterilizarse por separado, o bien agregarlo desde antes de esterilizar el medio en la autoclave.

g) Prueba de licuefacción de gelatina (35).

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

Pesar e hidratar siguiendo las instrucciones del prospecto, distribuir en tubos con tapón de rosca 5 ml del medio, esterilizar a 121° C durante 15 min. Enfriar en posición vertical y refrigerar para su conservación. El medio debe estar solidificado al momento de su inoculación.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albores, Medina A. 1971. Obtención con posibles fines comerciales de la proteasa extracelular de *S. marcescens*. Tesis profesional. ENCB-IPN.
- 2.- Alcim-Orskov, F. y Orsov, I. Serotypes of ETEC, relationship with enterotoxin. 1979. *Infect Immun.* 23: 325-329.
- 3.- Alcántar, Curiel M. 1986. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de cepas de *E. coli*, en poblaciones abiertas y cerradas. Tesis profesional. ENCB-IPN.
- 4.- Binns, M. 1985. Molecular genetics of virulence in *Shigella*. *Microbiological Sciences.* 2 (9): 275-278.
- 5.- Hoielau, C. y Sansonetti, P. 1984. DNA Hybridization technique to *Shigella* species and EIEC. *J. Clin. Microbiol.* 20 (5): 959-961.
- 6.- Clerc, P. y Sansonetti, P. 1987. Entry of *S. flexneri* in to HeLa cells evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin acumulation. *Infect Imm.* 55 (11): 2681-2688.
- 7.- Crichton, P.B. 1980. Diffentiation of stains of *E. coli*. multiple typing approach. *J. Clin. Microbiol.* 11 (6): 635-640.
- 8.- Daskaleros, P.A. y Pine, S.M. 1986. Characterization of *S. flexneri* sequences Encoding congo red binding (Crb): conservation of multiple Crb sequences and role of ISL in loss of the Crb+ fenotipe. *Infect. Imm.* 54 (2): 435-448.
- 9.- Daskaleros, P.A. y Payne, S. 1987. Congo red binding phenotype is associated with hemin binding and increased infectivity of *S. flexneri* in the HeLa cell model. *Infect Imm.* 55: 1393-1398.

- 10.- Day, N. P., Scotland, S. M. y Rowe B. 1981. Comparison of an Hep-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella spp.* and *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 13 (3): 596-597.
- 11.- Donnenberg, M., y Donohue, A. . 1989 Epithelial cell invasion An overlooked property of EPEC associated with the EPEC adherence factor. *J. Infect. Dis.* 160 (3): 452-459.
- 12.- Doring, G., Ournesser, H.J., Botznhart, K. y Fanning, B. 1983. Proteases of *P. aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 147 (4): 744-750.
- 13.- Elder, B. L., Trujillo, I. y Blazavic, D. 1977 Rapid doxyribonuclease test with methyl green. *J. Clin. Microbiol.* 6: 312-313.
- 14.- Fandez, G., Figueroa, G., Troncoso, M. y Cabello F. 1988. Characterization of EIEC isolated from children with diarrhea in Chile. *J. Clin. Microbiol.* 26 (5): 928-932.
- 15.- Fasano, A., Kay, B. y Russell, R. 1990. Enterotoxin and cytotoxin production by EIEC. *Infect and Imm.* 58 (11): 3717-3723.
- 16.- Geiger, B. y Avnur Z. 1984. Microfilament organizing centers in ar cell contact; cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J. Cell. Biol.* 99: 89s-91s.
- 17.- Gemski, P. y Takeguchi, A. 1972. Shigellosis due to *Shigella dysenteriae* 1 : relative importance of mucosal invasion versus toxin production in pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 126: 523-530.
- 18.- Gomes, T., Regina, M., Toledo, F. y Trabulsi L. 1987. DNA probes for identification of EIEC. *J. Clin. Microbiol.* 25 (10): 2025-2027.

19. - Guth, B. E., Silva, R.M. y Toledo, R.M. 1989. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *E. coli* serogrup O29. *J. Clin. Microbiol.* 27 (10): 2161-2164.
20. - Hale, T. 1991. Genetic Bases of Virulence in *Shigella* species. *Microbiol Rev.* 55 (2): 206-224.
21. - Harris, J. y Cohen, M. 1982. High Molecular weight plasmid correlates with EIEC. *Infect and Imm.* 37 (3): 1295-1298.
22. - Hartam, A., Venkatesan, M. y Oaks, E. 1990. Sequence and molecular characterization of a multi copy invasion plasmid antigen gen. ipaH of *S. flexneri*. *J. Bacteriol.* 172 (12): 2687-2691.
23. - Hiller, G. y Weber, K. 1982. A phosphorylated basic vaccinia virio polypeptide of molecular weight 11,000 is exposed on the surface of mature particles and interacts with actin-containing cytoskeletal elements. *J. Virol.* 44: 647-657.
24. - Innam, R., Cantley, J. y Formal, S. 1986. Colonization virulence a mucosal interaction of an EPEC (strain, RDEC-1) expressing *Shigella* somatic antigen in the rabbit intestine. *J. Infect. Dis.* 154 (5): 742-750.
25. - Kadurugamuwa, J. y Rohde M. 1991. Intracellular spread of *S. flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. *Infect Imm.* 59 (10): 3463-3471.
26. - Lett, M., Sasakawa, C. y Okada, N. 1989. virG a plasmid-coded virulence gene of *S. flexneri* identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence. *J. Bacteriol.* 171: 353-59.
27. - Levine, M. 1987. *Escherichia coli* invasive. *J. Infect. Dis.*

- 28.- Levin, M. y Edelman, R. 1984. *E. coli* enteropatógena. *Epidemical Rev.* 6: 31-51.
- 29.- López, B. 1988. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de cepas de *E. coli* en poblaciones controladas. Tesis profesional. ENCB-IPN.
- 30.- Makino, S., Sasakawa, C., Kurata, T. y Yoshikawa, M. 1986. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *Cell* 46: 551-555.
- 31.- Malabi, M., Buisse, J. y Kopecko, D. 1989. Use of *S. flexneri* ipa C and ipa H genes sequences for general identification of *Shigella* sp and EIEC. *J. Clin. Microbiol.* 27 (12): 2687-91.
- 32.- Maurelli, A., Baudry, B., H., Hale, T. y Sansonetti, P. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Imm* 49 (1): 164-171.
- 33.- Maurelli, A. y Sansonetti, P. 1988. Genetic determinants of *Shigel* pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 127-150.
- 34.- Maurelli, A.T. 1990. Regulation of virulence genes in *Shigella*. *Mol. Biol. Med.* 6: 425-432.
- 35.- Mc Fadin, Jean F. 1976, *Biochemical test for identification of medical.* The Williams y Wilkins Co. Baltimore USA.
- 36.- Moyer, M., Dixon, P. y Rothman, S. 1987. Cytotoxicity of *Shigella* toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. *Infect. Imm.* 55 (6): 1533-35.
- 37.- Nandasa, H., Sargent, G. y Williams, P. 1981. De role of plasmids adherence of EIEC to mammalian cells. *J. Infect. Dis.* 143 (2): 286-90.

38. - Oaks, E., Wingfield, M., E. y Formal, S. B. 1985. Plaque formation virulent *S. flexneri*. *Infect. Imm.* **48**: 124-9.
39. - Okamura, N. y Nakaya, R. 1977. Rough mutant of *S. flexneri* 2a. That penetrates tissue culture cells but does not evoke keratoconjunctivitis in Guinea pigs. *Infect. Imm.* **17**: 4-8.
40. - Osborn, M. J. y Wu C.P. 1980. Protein of the outer membrane of Gram negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 369-422.
41. - Pal, T., Formal, S. y Hale, T. 1989. Characterization of virulence marker antigen of *Shigella spp.* and EIEC. *J. Clin. Microbiol.* **57** (3): 561-563.
42. - Pal, T., Newland, B. y Hale T. 1989. Intracellular spread of *S. flexneri* associated with the KcpA locus and 140 KDa protein. *Infect. Imm.* **27**: 477-486.
43. - Sansonetti, P. y Kopecko, D. 1982. Involment of a plasmid in the invasive ability of *S. flexneri*. *Infect Imm.* **35** (3): 852-860.
44. - Sansonetti, P., Pyter, A. y Maurelli, A. 1986. Multiplication of *S flexneri* with HeLa cells; lysis of the fagocitic vacuole and plasmid mediated contact hemolysis. *Infect Imm.* **51** (2): 461-469.
45. - Sansonetti, P. 1991. Genetic and molecular basis of epithelial cel invasion by *Shigella spp.* *Rev. Infect. Dis.* **13** (Supp 14): S285-92.
46. - Sasakawa, C., Kamata, K. y Sakai T. 1986. Molecular alteration of MD a plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *S. flexneri*. *Infect. Imm.* **51**: 470-475.

- 47.- Sekizaki, T. y Karayama, S. 1987. Localization of stx, a determinant essential for high level production of shiga toxin by *S. dysenteriae* serotype 1 near pyr F and generation of stx Tn mutant. *Infect. Imm.* **55**: 2208-2214.
- 48.- Silva, R.M., Toledo, R. F. y Trabulsi, L. 1980. Biochemical and cultural characteristics of EIEC. *J. Clin. Microbiol* **11** (5): 441-444.
- 49.- Stendahl, O.I. y Hartwing, H. 1980. Distribution of actin binding protein and miosin in macrofages during spreading and phagocytosis. *J. Cell. Biol.* **84**: 215-224.
- 50.- Slugard, C. y Daskaleros, P. 1989. A 101 KDa Heme binding protein associated with Congo red binding and virulence of *S. flexneri* and EIEC. *Infect. Imm.* **57** (11): 3534-3539.
- 51.- Toledo, F., Regina, M y Trabulsi, L. 1983. Correlation between biochemical and serological characteristics of *E. coli* and results of Sereny test. *J. Clin. Microbiol.* **17** (3): 419-421.
- 52.- Vesikari, T. y Bromirska, J. 1982. Enhancement of invasiveness of *Y. enterocolitica* and *E. coli* in Hep-2 cells by centrifugation. *Infect and Imm.* **36** (2): 834-836.
- 53.- Winkler, H. y Miller, E. 1982. Phospholipase A and the interaction of *R. prowasekii* and mouse fibroblast. (L-929). *Infect and Imm.* **38** (1): 109-113.