

11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Handwritten signature and the number '250'.

**FALLA DE ORIGEN**

**CARACTERIZACION DE CEPAS DE**  
**Escherichia coli ENTEROPATOGENA**  
**CON CAPACIDAD INVASIVA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**JOSE MOLINA LOPEZ**

**ASESOR ACADEMICO:**

**DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA**

**MEXICO, D.F.**

**1995**



## **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.

DEDICATORIA

A GRACIELA Y CITLALLI POR SER FUENTE DE MI INSPIRACION.

A MIS PADRES QUE YA NO ESTAN

A MIS HERMANOS POR SU APOYO SILENCIOSO

A LA FAMILIA IBARRA POR LA AMISTAD QUE ME BRINDAN

A G R A D E C I M I E N T O S

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y PARASITARIOS DEL C.M.N SIGLO XXI.

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE LA DRA. KAETHE  
WILLS MANNING DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y  
PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.N.A.M.

A TODOS Y CADA UNO DE LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE  
SALUD PUBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA U.N.A.M.

J U R A D O

DR. JAVIER TORRES LOPEZ

DRA. YOLANDA LOPEZ-VIDAL

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO Q.

DR. ANGEL MANJARREZ HERNANDEZ

DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS

## I N D I C E

	PAGINA
I. INTRODUCCION	
A. EPIDEMIOLOGIA DE LA DIARREA .....	1
B. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <u>Escherichia coli</u> .....	7
C. IMPORTANCIA CLINICA Y EPIDEMIOLOGICA DE <u>Escherichia</u> <u>coli</u> ENTEROPATOGENA .....	11
D. FACTORES GENETICOS IMPLICADOS EN PROPIEDADES DE VIRULENCIA .....	17
II. OBJETIVOS .....	20
III. MATERIAL Y METODOS .....	21
IV. RESULTADOS .....	27
V. DISCUSION .....	38
VI. REFERENCIAS .....	45

## RESUMEN

En la actualidad esta plenamente aceptado la existencia de cuatro grupos de Escherichia coli capaces de causar diarrea en humanos; enteropatógena (EPEC), se postula que éstas cepas producen diarrea porque se adhieren y destruyen las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado; enterotoxigénica (ETEC), sintetizan enterotoxinas ya sea termolábil y/o termoestable; enteroinvasiva (EIEC), invaden y se multiplican dentro de la célula infectada y enterohemorrágica (EHEC) produce citotoxinas y se asocia a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. El objetivo del presente estudio fué determinar los factores de patogenidad de cepas de Escherichia coli aisladas de diarrea en niños menores de dos años.

Se estudiaron 91 cepas de Escherichia coli aisladas de niños menores de dos años con diarrea secretora aguda. Las cepas fueron identificadas hasta especie por pruebas bioquímicas y tipificadas serológicamente para identificar sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) por el método de microaglutinación en placa.

Conocida la especie bacteriana, se determinó la capacidad para expresar factores de virulencia como: adherencia, invasividad y la del lesionar el citoesqueleto de la célula infectada. Se determinó también la susceptibilidad a 22 antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias gramnegativas.

Los resultados mostraron que el 43% de las cepas estudiadas se adherieron en forma localizada a células HEp-2 en cultivo y el 81% de éstas fueron capaces de lesionar el citoesqueleto de las células infectadas. El 18% de las cepas presentaron adherencia difusa y el 7% adherencia agregativa, ninguna de éstas cepas fué capaz de lesionar el citoesqueleto (FAS negativo). Únicamente nueve cepas de las 91 estudiadas presentaron la capacidad de internalizarse en células HEp-2 en cultivo. Tres con adherencia difusa, tres con adherencia localizada, una con adherencia agregativa y dos negativas a la adherencia. Ninguna de éstas cepas en embargo no produjeron queratoconjuntivitis en el ojo de cobayos (Serény negativas).

Los resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos obtenidos por la técnica de microdilución en placa y de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria, mostraron que 40% de las cepas fueron resistentes a diferentes derivados de las penicilinas, presentando como patrón de resistencia más frecuente: ampicilina, cefoperazona, ampicilina/sulbactam, cefalotina, ampicilina/clavulánico, piperacilina-mezlocilina, mientras que el 100% fueron sensibles a ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, cefotaxima, cefoxitina, imipenem y ceftriaxona.

## I. INTRODUCCION

### A. EPIDEMIOLOGIA DE LA DIARREA

Por sus características de desarrollo en los países industrializados las enfermedades infecciosas han dejado de ser un problema importante de salud; sin embargo éstas aún constituyen un problema de salud pública en países en vías de desarrollo. México no es la excepción y las enfermedades infecciosas representan una de las primeras causas de morbi-mortalidad (1). Las que presentan mayor prevalencia son aquellas asociadas con deficiencias en el saneamiento ambiental y con condiciones climáticas que favorecen la subsistencia de los agentes infecciosos en sus reservorios naturales. Dentro de las 10 primeras causas de mortalidad para México se incluyen: la influenza y neumonía, así como las enfermedades gastrointestinales (1).

Se estima que anualmente ocurren 1647 millones de episodios diarreicos en niños menores de cinco años de países subdesarrollados y a nivel mundial se presentan cinco millones de muertes a consecuencia del mismo padecimiento (2).

La tasa de mortalidad por diarrea en México, en los últimos 50 años ha mostrado un descenso sostenido y durante los últimos 10 años se ha reducido a la mitad. Para 1990 se registraron 22,196 muertes por ésta causa, con una tasa de 27 muertes por 100,000 habitantes; la cual representa 5% del total de defunciones



registradas en el país para esos años (3). No obstante el descenso observado, el padecimiento continúa representando un severo problema de salud pública.

Durante los últimos 10 años se han realizado en México cuatro estudios sobre la etiología de diarrea en niños, utilizando diferentes estrategias. Entre 1982 y 1985, Cravioto y colaboradores estudiaron una cohorte de niños nacidos en una población rural del Estado de Morelos, encontrando como agentes etiológicos responsables de diarrea a ETEC en 33.5%, EPEC en 8.1%, Salmonella en 6.2%, Campylobacter en 5.6% y Shigella en 3.8% (4). Sepúlveda y colaboradores efectuaron en 1984 un estudio de casos y controles en una área del sur de la Ciudad de México, encontrando los siguientes agentes: EPEC 28%, Campylobacter 15%, ETEC 15%, Shigella 9%, rotavirus 6% y Salmonella 0.8% (5). El más reciente de estos estudio patrocinado por la Organización Mundial de la Salud y publicado en 1991 (6) incluyó niños de 0 a 35 meses de edad asistentes a la consulta externa del Hospital Infantil de México, encontrándose que en el 70% de los casos de diarrea y en 31% de los controles se identificaba algún microorganismo enteropatógeno. Los agentes identificados más frecuentemente en el estudio fueron Escherichia coli enterotoxigénica (17% casos/7% controles), Shigella (11% casos/1% controles), rotavirus (13% casos/2% controles), Campylobacter (15% casos/10% controles) y Escherichia coli enteropatógena (10% casos/9.1% controles) (6).

El síndrome de disentería aguda con sangre y pus en las heces fue descrito primeramente por Hipócrates. Este puede acompañarse de tenesmo y dolor a la defecación como resultado de la invasión inflamatoria de la mucosa colónica debido a bacterias, parásitos y/o acción de citotoxinas (7). En México de acuerdo a la encuesta sobre práctica y prevalencia de la terapia de hidratación oral, se estimó que 9.5 % de los casos de diarrea tienen sangre macroscópica (2). Tradicionalmente los agentes etiológicos bacterianos que mas frecuentemente se asocian con disentería pertenecen a los Géneros Shigella, Salmonella, Campylobacter, Escherichia (E. coli enteroinvasiva y enterohemorrágica).

Las cepas EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque habitualmente menos severo, al que produce Shigella dysenteriae tipo 1. Las manifestaciones clínicas asociadas con esta infección son evacuaciones en poca cantidad acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre. La enfermedad generalmente es autolimitada y las muertes asociadas con ella son poco comunes (8).

Diversos estudios utilizando la prueba descrita por Serény han mostrado que las cepas EPEC no son invasivas (9). Sin embargo es importante considerar que la capacidad para causar queratoconjuntivitis en el cobayo y la invasividad a células en cultivo observada en cepas de Shigella y EIEC no siempre estan asociadas. Al respecto es importante señalar que otras bacterias

invasivas como es el caso de Salmonella son Serény negativas. Lo anterior ha dado lugar a considerar que aunque EPEC no produzca la queratoconjuntivitis en el cobayo no elimina la posibilidad de que posean la capacidad invasiva (9,10). Por otro lado se ha observado en estudios histopatológicos que algunas cepas EPEC se encuentran intracelularmente en tejidos de animales infectados y en muestras de biopsias de humanos infectados con EPEC. Donnenberg y col. (11) utilizando el ensayo de células HEP-2 con gentamicina analizó el potencial invasivo de diferentes grupos patógenos de E. coli, concluyendo que aún no existen datos suficientes para establecer la capacidad de EPEC de invadir células HEP-2.

A pesar de los esfuerzos realizados par establecer la capacidad invasiva de EPEC y su participación en la patogénesis de la diarrea, aún falta conocer los factores involucrados en la relación bacteria-célula, así como la participación de los diferentes genes que se han identificado en estas cepas con respecto a su capacidad invasiva.

## B. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE E. coli

El grupo ETEC es responsable de diarrea en humanos y animales, estas cepas se caracterizan por la producción de una o dos diferentes enterotoxinas codificadas por plásmidos llamadas toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) (13). La LT se asemeja antigénica y biológicamente a la toxina producida por Vibrio

cholerae. Está compuesta de una subunidad tóxica A y cinco subunidades B. Las subunidades B se mantienen unidas por enlaces no covalentes, arregladas en forma de anillo sobre el cual descansa la subunidad A. La toxina se une al receptor específico GM1 localizado en la membrana celular vía las cinco subunidades B, seguida por la traslocación de la subunidad A, a través de la membrana. Una vez en el citosol, la subunidad A activa el complejo de la adenilciclasa lo que resulta en la acumulación de AMP cíclico intracelular, favoreciendo la salida de agua y electrolitos de la célula. La toxina ST es un péptido, rico en cisteína que activa la guanidilciclasa de las células epiteliales intestinales promoviendo el flujo de agua hacia el lumen intestinal (14). Las manifestaciones clínicas de la infección por ETEC son diarrea acuosa, náusea, dolor abdominal y fiebre de bajo grado (13).

Para que una cepa enterotoxigénica sea patógena, es necesario la presencia de factores de colonización que permiten a ETEC adherirse a la mucosa ileal, en donde las enterotoxinas secretadas entran en proximidad con los sitios blanco en las células epiteliales. Evans y col. reportaron en 1975 (15) y más tarde en 1978 (16) la presencia de fimbrias en cepas ETEC del serotipo O78H:11, las cuales fueron denominadas: factores de colonización I y II (CFA/I y CFA/II), respectivamente. Años más tarde se demostró que la presencia de antígenos fimbriales en ETEC no se limitaba a los CFA/I y CFA/II.

Cravioto y col., (17) y Smith (18) demostraron que las cepas de ETEC que eran identificadas como CFA/II con base al patrón de hemaglutinación eran en realidad combinaciones elaboradas de tres antígenos distintos denominados CS1 (16.3 kDa), CS2 (15.3 kDa) y CS3 (14.7 kDa); los cuales son codificados en un solo plásmido (17,18). Dependiendo del serotipo y del biotipo, se han encontrado cepas que expresan los antígenos CS1 y CS3, CS2 y CS3 ó solo CS3. No se han observado cepas con CS1 y CS2 simultáneamente. El CFA/1, CS1 y CS2 son adhesinas que corresponden a fimbrias rígidas de 6-7 nm de diámetro, mientras que CS3 posee una estructura delgada y flexible de 2-3 nm de diámetro. Los antígenos CS1, CS2 y CS3 se encontraron en un número limitado de serogrupos (15).

El grupo enteroinvasivo de E. coli presenta reacción antigénica cruzada con serogrupos de Shigella (19). EIEC se caracteriza por tener la capacidad de invadir y proliferar dentro de células del epitelio intestinal causando su muerte, favoreciendo el acúmulo de leucocitos polimorfonucleares, y desencadenando un cuadro de disentería bacilar, semejante al producido por Shigella. La capacidad invasiva de la bacteria esta relacionada con la presencia de plásmidos de alto peso molecular (mayor de 140 mDa), los cuales codifican para la expresión de proteínas de membrana externa involucradas en el proceso (13). Nicoletti y col. (19) reportaron en algunas cepas de E. coli lactosa negativa la capacidad de producir otros factores asociados con virulencia tales como eran la capacidad para

producir hemolisinas, y la de aglutinar eritrocitos de diferentes especies (19). En la mayoría de los estudios epidemiológicos se ha dado mayor atención a organismos fermentadores de lactosa, menospreciando la capacidad patógena de bacterias no fermentadoras de éste azúcar.

Debido a la proximidad genética entre EIEC y Shigella, así como por la similitud del cuadro clínico que desencadenan, las infecciones por EIEC pueden confundirse fácilmente con las causadas por Shigella. En ambas la enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, dolor abdominal, toxemia, diarrea acuosa seguida de evacuaciones sanguinolentas con moco y presencia de abundantes polimorfonucleares (20).

El grupo EHEC fué propuesto inicialmente por Levine basado en la descripción de Riley y col. (21) de un brote de colitis hemorrágica en los Estados Unidos en 1982 (28). El síndrome clínico se caracterizaba por diarrea profusa acompañada de sangre sin leucocitos en pacientes sin fiebre. El serotipo O157:H7 de E. coli fue el organismo causal de éste primer brote, el cual se relacionó posteriormente con cuadros de síndrome urémico hemolítico. Recientemente se ha observado que además de éste serotipo existen otros involucrados en cuadros similares al producido por cepas O157:H7 (21). Las cepas EHEC elaboran dos citotoxinas distintas, ambas codificadas por fagos en estado lisogénico. El efecto de las citotoxinas se observa en células HeLa o Vero. Una de éstas

toxinas, conocida como tipo 1 es semejante a la producida por Shigella dysenteriae 1 por su efecto tóxico sobre células Vero que inicialmente se le denominó como toxina Vero 1 (VT-1). Su actividad citotóxica se neutraliza con anticuerpos contra toxina producida por Shigella dysenteriae 1. La otra citotoxina, conocida como SLT-II o VT2 produce un efecto que no se neutraliza con anticuerpos contra toxina shiga. Las cepas EHEC tienen la capacidad de adherirse a células intestinales tipo Henle 407, propiedad que está relacionada con la presencia de un plásmido de 60 mDa. Este plásmido codifica para la expresión de una estructura fimbriada. En el intestino, la infección por EHEC esta confinada al ciego y colon, a diferencia de otros tipos de E. coli cuya infección involucra todo el intestino (19).

### C. IMPORTANCIA CLINICA Y EPIDEMIOLOGICA DE EPEC

En la actualidad los casos de diarrea por cepas EPEC en cuneros de países industrializados son poco frecuentes (22,23). Por el contrario, en los países en desarrollo, la prevalencia de diarrea por EPEC sigue siendo muy alta, en especial durante los primeros seis meses de vida (24,25). Se ha reportado también la asociación entre infección por cepas EPEC y la presencia de diarrea persistente (26). La persistencia de síntomas en éstos pacientes por más de 14 días se debe probablemente al tipo de lesión intestinal que producen estos germenés, y no necesariamente a su permanencia durante tiempo prolongado en el intestino.

Casi al mismo tiempo que Levine y col. (27) confirmaron la capacidad de virulencia de cepas EPEC. A través de sus estudios en voluntarios humanos, Cravioto y col. (28) reportaron que a diferencia de otras cepas de E. coli, las de EPEC presentaban la capacidad de adherirse formando microcolonias en células epiteliales mantenidas en cultivo. La formación de estas microcolonias fue denominada como adherencia localizada por Scaletsky y col. (29). La capacidad para adherirse en forma localizada era compartida por todas las cepas EPEC independientemente de su serotipo, y estaba asociada con la presencia de un plásmido con peso molecular entre 50 y 70 megadaltones (mDa). Aunque la adherencia localizada es una característica principalmente de EPEC, Cravioto y col. (30) y Scotland y col. (31) han mostrado que existen cepas no pertenecientes a éstos serotipos enteropatógenos capaces de adherirse también en forma localizada a células HEP-2.

La importancia de la adherencia localizada de cepas de E. coli a células HEP-2 ha sido demostrada en estudios humanos. Nueve de 10 voluntarios adultos en un estudio realizado por Levine y col. (27), presentaron diarrea secretora severa después de ingerir por vía oral una dosis elevada de una cepa EPEC capaz de adherirse en forma localizada a células HEP-2; en contraste, sólo dos de nueve voluntarios desarrollaron una diarrea leve después de ingerir la misma dosis de una mutante de la misma cepa EPEC, que cual había perdido su capacidad para adherirse a las células en cultivo. El



suero de los voluntarios inoculados con la cepa adherente mostró una respuesta a una proteína de 94 kilodaltones (kDa), de la cual adujeron los autores, estaba relacionada con la capacidad de cepas EPEC para adherirse a células epiteliales. Se conoce en la actualidad que esta proteína es el producto de varios genes presentes en el cromosoma de cepas EPEC, los cuales probablemente bajo control de genes presentes en plásmidos, regulan la interacción entre estas bacterias con sus receptores a nivel de las células del huésped (32).

Se han propuesto varios modelos para explicar la naturaleza molecular de la adherencia localizada que muestran cepas de E. coli. El más aceptado en la actualidad es un modelo de dos fases propuesto por Knutton y col. (33). La primera fase comprende el acercamiento y acumulación de las bacterias a las células epiteliales a través de la formación de haces de fibras que se han denominado como BFP (34,35). Las BFP tienen una secuencia terminal de aminoácidos muy similar a la de fimbrias producidas por Vibrio cholerae O1 y Neisseria gonorrhoeae (34,35), indicando que se trata de proteínas bacterianas que median adherencia fundamentalmente a células humanas. Estas fimbrias permiten a las bacterias unirse unas con otras para formar microcolonias a través de las cuales van a interactuar con las células epiteliales (34).

Una vez formadas estas colonias comienza una segunda fase de adherencia, con la destrucción de las microvellosidades

intestinales, proceso al que se ha denominado esfacelamiento y del cual se aduce esta asociado a un incrementos de calcio intracelular (36). La falta de microvellosidades permite a la bacteria adherirse en forma íntima a receptores de la membrana presentes en la célula epitelial. Por estudios en modelos animales y con voluntarios humanos se sabe que esta segunda fase de adherencia esta mediada por loci cromosómicos en la bacteria, denominados eaeA y eaeB (32,36), los cuales codifican para la producción de la proteína de membrana externa (PME) de 94 kDa, llamada íntima, la cual es reconocida por suero de voluntarios humanos desafiados con una cepa EPEC (32).

El ensayo de adherencia a células HEp-2 descrito por Cravioto y col. (28) ha sido utilizado para estudiar la capacidad de adherencia en cepas de E. coli aisladas de pacientes con diarrea en diferentes países del mundo (37,38,). Los resultados de dichos estudios muestran diferencias significativas en el aislamiento de cepas de E. coli con capacidad para adherirse a células en cultivo en niños con diarrea y en controles apareados por edad y sexo.

Se acepta en la actualidad que, además de la adherencia localizada, existen otros dos patrones descritos en cepas de E. coli. Uno de ellos, denominado difuso se caracteriza por la presencia de bacterias adheridas a todo la superficie celular; y el otro, denominado agregativo se caracteriza por la formación de agregados bacterianos los cuales se adhieren tanto a las células en cultivo como al vidrio de la preparación.

Las cepas de E. coli con adherencia de tipo localizado se han aislado con frecuencia significativamente mayor en niños con diarrea secretora aguda (37,38). A diferencia de lo anterior, fuera de un estudio realizado en niños del Estado de Chiapas en México (39), las cepas con adherencia de tipo difusa se han aislado con frecuencia similar en niños con diarrea y en sus controles apareados por edad y sexo (37,38). En el caso de las cepas con adhesividad agregativa, estudios en la India y en México, han mostrado que el aislamiento de estas bacterias se asocia significativamente a la presencia de diarrea persistente en niños (37,38).

Los mecanismos por medio de los cuales las cepas agregativas son capaces de producir diarrea durante 14 días o más, no se conocen aún. Tanto cepas con adhesividad difusa como cepas con adhesividad agregativa son capaces de producir fimbrias cuya codificación genética se encuentra presente en plásmidos (40). En el caso de la adhesividad de tipo difusa, la producción de estas fimbrias no parece mediar la adherencia de las bacterias a la mucosa intestinal para producir diarrea (38). En el caso de la adhesividad de tipo agregativo, además de la producción de fimbrias, se ha reportado recientemente la producción de toxinas capaces de inducir secreción intestinal en modelos experimentales (37,38). Queda por demostrarse si las fimbrias producidas por cepas agregativas median adherencia a células intestinales y si existe producción en el intestino humano de las toxinas descritas, como mecanismos para la producción de diarrea.

La primera aportación en este sentido ha sido realizada en fecha reciente por Eslava y col. (41), al encontrar que el suero de niños infectados en forma natural por cepas agregativas de E. coli muestra una respuesta a una toxina de 116 kDa secretada por las bacterias al medio de cultivo. Baldwin y col. (42), describieron una proteína de aproximadamente 120 kDa en una cepa EggAEC la cual cruzaba antigénicamente con la hemolisina alfa de E. coli sin embargo, la relevancia de este trabajo fue demostrar que las toxinas producidas por cepas agregativas estimulan la liberación de calcio intracelular, faltó por determinar la respuesta a la misma en el suero de humanos. La inoculación de la toxina de 116 kDa, purificada por Eslava y col., en asas ligadas de intestino de rata, indujo una lesión de tipo hemorrágico-inflamatorio, muy similar a la encontrada en el intestino de niños fallecidos a consecuencia de diarrea severa asociada con el aislamiento de cepas EAggEC como germen único.

Las cepas agregativas de E. coli se han aislado también de niños con diarrea sanguinolenta. En este caso, la duración promedio de la diarrea ha sido de siete días (43,44). Se desconoce aun si existen dos tipos de cepas agregativas, unas relacionadas con la presencia de diarrea persistente y otras relacionadas con la presencia de diarrea con sangre. Evidentemente las cepas agregativas tienen la capacidad de producir lesiones hemorrágicas en modelos animales (44), lo cual pudiera explicar la presencia de sangre y leucocitos en las evacuaciones de los niños; queda por

determinarse si la duración de la diarrea, en cada caso, esta relacionada con diferentes mecanismos de patogenicidad producidos por bacterias que comparten un mismo patrón de adherencia a células HEp-2, o si se trata de diferencias en la respuesta del huésped ante una infección por germenes similares. Es importante señalar, sin embargo, que las cepas agregativas de E. coli no son capaces de producir una lesión de adherencia y esfacelamiento similar a la que producen cepas EPEC (30,44), por lo que la persistencia de la diarrea en niños infectados con cepas agregativas no puede explicarse a través de este mecanismo.

#### D. FACTORES GENETICOS IMPLICADOS EN PROPIEDADES DE VIRULENCIA

Los plásmidos son secuencias de ADN extracromosomal que albergan bacterias y que tienen la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma bacteriano y aunque no son necesarias para la subsistencia de la bacteria si tienen funciones importantes como es capacitar a las bacterias con algunas propiedades asociadas a la patogenicidad: resistencia a drogas antibacterianas, resistencia a metales pesados; plata y mercurio, síntesis de exotoxinas, codifican tanto para adhesinas

relacionadas a la adherencia de la bacteria a su receptor como para proteínas de membrana externa encargadas de la internalización de la bacteria al citoplasma de la célula infectada (45).

Las drogas antibacterianas se administran para tratar infecciones en el humano, aunque también se pueden utilizar como profilácticos. Los plásmidos que codifican para resistencia a antibióticos se han denominado plásmidos R, los factores que promueven la permanencia de estos plásmidos en la bacterias es la utilización por tiempo prolongado de antibióticos en infecciones virales o en gastroenteritis leves esto ejerce una presión de selección de cepas cada vez mas resistentes a varios antimicrobianos (46).

La selección de cepas bacterianas resistentes esta estrechamente asociado a el uso de agentes antimicrobianos. En Japón durante 1951, seis años después de la introducción clínica de la sulfonamida, aproximadamente el 80% de cepas de Shigella estudiadas sueron resistentes a dicho antimicrobiano. Se han detectado incidencia de resistencia a drogas similares en Gran Bretaña y en Estados Unidos. En México Olarte y col. han reportado incidencia de resistencia a antibióticos en cepas de Shigella, Salmonella y Escherichia coli enteropatógena y han observado un aumento en la frecuencia de cepas multirresistentes (47).

Cuando a un paciente se le administra oralmente dosis de tetraciclina las cepas que predominan de sus heces son E. coli que se tornan resistentes a este antibiótico en una semana, si el tratamiento se prolonga un periodo mas el número de cepas resistentes aumenta considerablemente y algunas ocasiones las cepas siguen siendo resistentes al antimicrobiano en cuestión varios meses después de que el tratamiento antimicrobiano se haya terminado (47).

El rápido aumento en la proporción de cepas resistentes en las personas que reciben tratamiento con antibióticos, se debe principalmente a la selección de cepas R que son parte ya sea de la flora normal del individuo o que se ingieren en los alimentos poco tiempo después de iniciar el tratamiento antibacteriano. Ya se ha demostrado la transferencia de plásmidos R en el tracto intestinal, particularmente cuando se administran antibióticos para seleccionar cepas receptora R, sin embargo, la tranferencia conjugativa de plásmidos R en el intestino no es responsable del rápido incremento de bacterias R que se observa después del tratamiento antimicrobiano (45,47).

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Conocer los mecanismos de patogenicidad de cepas de Escherichia coli causantes de cuadros diarreicos en niños.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la capacidad de adherencia e invasividad a células HEP-2 de cepas de E. coli aisladas de niños con diarrea secretora aguda.

Determinar la capacidad de lesionar el citoesqueleto de células HEP-2 por parte de las cepas de E. coli en estudio

Conocer los patrones de resistencia a diferentes antimicrobianos para utilizarlos como marcadores de cepas de E. coli con diversos patrones de adherencia a células HEP-2.

Evaluar si existe asociación entre la prueba de FAS positiva con las pruebas de virulencia determinadas.



### III. MATERIAL Y METODOS

#### Población estudiada

Se estudiaron 91 cepas de Escherichia coli asociadas con diarrea de aguda, obtenidas de la materia fecal de 75 niños de una comunidad rural del Estado de Morelos, seguidos longitudinalmente durante los primeros dos años de vida, entre 1985 a 1988. La diarrea aguda se definió como cuatro o mas evacuaciones en 24 horas de consistencia líquida o semi-líquida o la presencia de moco y/o sangre. La diarrea se definió como persistente cuando tuvo una duración de 14 días o mas días.

#### AI SLAM I EN T O E I D E N T I F I C A C I O N

A partir de la muestra de materia fecal se sembró un inóculo en cajas de agar MacConkey, Tergitol 7 (Merck) y Xilosa-Lisina-Desoxicolato. Las muestras se enriquecieron con caldo tetratonato y selenito y se incubaron a 37° C toda la noche. También el caldo de enriquecimiento se sembró en agar MacConkey, verde brillante xilosa-lisina-desoxicolato y agar Salmonella-Shigella (Merck) incubandose toda la noche a 37° C. Todas las colonias diferentes que crecieron en los medios directos y de enriquecimiento se identificaron por métodos bioquímicos. Para la búsqueda de cepas de E. coli se seleccionaron un mínimo de cinco colonias lactosa positivas de cada caja y se caracterizaron bioquímicamente (48).

## TIPIFICACION SEROLOGICA

Todas las cepas identificadas bioquímicamente como E. coli, se aglutinaron por dilución en microplaca con antisueros preparados en conejo contra los 175 antígenos somáticos conocidos. Los antígenos flagelares se determinaron usando 56 antisueros monovalentes, para tal propósito las cepas se crecieron en agar semisólido en tubos de Craig (49).

## ENSAYO DE ADHERENCIA

Como controles positivos a la adherencia se utilizaron para el patrón localizado: la cepa EPEC E2348/69, serotipo O127:H7; para adherencia difusa la cepa 52MC1 serotipo O91:H6 y para adherencia agregativa la cepa O42 serotipo O44:H18. El control negativo utilizado para la adherencia fué la cepa K12 serotipo OR:H11. Se empleó la técnica descrita por Cravioto y col. (28). La prueba se desarrolló colocando una lenteja de vidrio de 1 cm. de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno, a las cuales se les agregó una suspensión de células HEP-2 a una concentración de  $2.5 \times 10^6$ /ml, se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para formar una monocapa con 80% de confluencia. Después de este tiempo, se eliminó el medio de cultivo de los pozos y se lavaron con un amortiguador de fosfatos pH 7.2, se le agregó un ml de una suspensión de la cepa en estudio previamente crecida

durante 18 h en caldo triptona con 1 % de D-manosa, la concentración final de bacterias es de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. Las placas se incubaron durante 3 h, transcurrido el tiempo, se eliminó el medio y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos, las preparaciones se fijaron con metanol y se tiñeron con colorante Giemsa durante 20 min, y se lavaron con agua destilada para quitar el exceso de colorante. La lenteja con células se deshidrató pasandola por acetona, acetona-xileno y xileno, la preparación se colocó en un portaobjetos fijandola con bálsamo de Canada para observarla posteriormente en microscopio de luz. Para considerar una cepa positiva, esta debería presentar adherencia en por lo menos el 40% de las células. La prueba de adherencia a 6 horas consistió en lavar tres veces cada uno de los pozos de la microplaca con amortiguador de fosfatos después de incubar las células con la cepa a probar, los siguientes pasos se siguen como se describió en la adherencia a tres horas.

#### ENSAYO DE INVASIVIDAD *in vitro* e *in vivo*

Como control positivo se utilizo la cepa de E. coli enteroinvasiva ES273/0 serotipo O28ac:NM. En el ensayo en células se empleó la técnica descrita por Melhman y col. (50), para esto se procedió de manera similar a lo descrito en el ensayo de adherencia, excepto que después de la primera incubación de 3 h, se eliminó el medio MEM se lavó tres veces la monocapa celular y se cambió el medio por otro suplementado con gentamicina (100 µg/ml) y lisozima (300

$\mu\text{g/ml}$ ), incubándose por 3 horas más. Al finalizar el tiempo las preparaciones se fijaron y se tiñeron como ya se describió en la prueba de adherencia. Se consideró que una cepa era invasiva cuando el 1% de las células infectadas tenían por lo menos cinco bacterias dentro del citoplasma. El ensayo cuantitativo se hizo al contar 400 células en 50 campos diferentes de la preparación, determinando el porcentaje de células con bacterias internalizadas. El control positivo para esta prueba fue una cepa de Shigella dysenteriae 1. Se utilizó la técnica descrita por Serény et al. (51) que consiste en infectar cobayos Hartley. Con las cepas de E. coli crecidas durante la noche en caldo triptona al 1% a una concentración final de  $6 \times 10^8$  UFC/ml en solución salina isotónica, se instilaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana en el saco conjuntival del ojo derecho de los animales y en el izquierdo 100  $\mu\text{l}$  solución salina estéril. La prueba se consideró positiva al observarse evidencia de conjuntivitis, ulceración u opacidad de el ojo derecho hasta después de tres días de observación.

#### SISTEMA DE ACTINA FLUORESCENTE (FAS)

La cepa control positiva utilizada fue EHEC 933 serotipo O157:H7 y como control negativo se utilizó la K12 serotipo OR:H11. Se realizó de acuerdo a lo descrito por Knutton y col. (36). Siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de invasividad. Para la tinción fluorescente las células se fijaron con formalina al 8% durante 10 min, posteriormente se trataron con triton X100 al

0.1% durante 4 min a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos y se tñieron con 10  $\mu$ l de FITC-faloidina (Sigma) a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml. La placa se mantuvo protegida de la luz. Después de 30 min se lavó con amortiguador de fosfatos (tres lavados de 10 min cada uno). Las preparaciones se fijaron con 10  $\mu$ l del medio de montaje en un portaobjetos y se observaron inmediatamente por microscopio de contraste de fases y de fluorescencia.

#### SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Se utilizaron cepas de referencia con un patrón definido de resistencia a los antimicrobianos ensayados: E. coli ATCC 25922, E. coli ATCC 35218 y Pseudomonas aeruginosa 27853. Se utilizó la técnica de microdilución seriada en placa, con un sistema comercial UNISCEPT MIC/TYPE 3 (Merck). Este consta de una placa de plástico de 120 pozos con diferentes diluciones de los siguientes antimicrobianos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ac. clavulánico, norfloxacin, cefalotina, cefuroxima, gentamicina, cefoperazona, tobramicina, ciprofloxacina, amikacina, ticarcilina/ac. clavulánico, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, piperacilina, oxacilina, imipenem, mezlocilina, aztreonam, cefazolina, cefoxitina, ceftazidima y ceftriaxone.

Las bacterias se crecieron en agar sangre de carnero al 5% durante 18 h a 37° C, de este cultivo se tomaron tres colonias y se resuspendieron en solución salina al 0.85 %, para obtener una turbidez semejante a la del tubo 0.5 de MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). De esta suspensión bacteriana se hicieron diluciones de 1:10 en solución salina y se colocaron 50  $\mu$ l en cada uno de los pozos que contenían los antimicrobianos liofilizados. Se incubó a 35° C durante 18 h, la interpretación se realizó observando a simple vista y determinado la concentración mínima inhibitoria (MIC) la cual se definió como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (52).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa EPIINFO-5, la asociación entre la adherencia localizada y serogrupo así como con la adherencia localizada y lesión al citoesqueleto se analizó por medio de la prueba de Chi cuadrada.

#### IV. RESULTADOS

De las 91 cepas de Escherichia coli aisladas y caracterizadas por serología, 42 (46%) pertenecieron a alguno de los serogrupos "O" patógenos ya descritos. 50 cepas (54%) fueron inmóviles y no se logró determinar el antígeno flagelar (Cuadro 1)

En el ensayo de adherencia se encontró que de las 91 cepas analizadas 52 (58%) fueron adherentes, de las cuales 31 (34%) presentaron el patrón de adherencia localizado, 16 (17%) fueron adherentes difusas y 6 (7%) mostraron adherencia agregativa. La tipificación serológica de estas cepas mostró que las adherentes con patrón localizado incluyen a los grupos EPEC clásicos: 055:NM, 0111ab:NM, 0114:H2 y 0126:NM, aunque también se encontraron serotipos como: 04:NM, 075:NM, 090:NM y 0151:NM que no pertenecen a los serotipos clásicos de EPEC. Las cepas con el modelo de adherencia difusa dieron serotipos no asociados a ninguno de los grupos patogénicos (03:NM, 011:NM, 039:NM, 044:H18, 0135:NM y 0164:NM). Finalmente las cepas con adherencia agregativa se identificaron en los serotipos 01:NM, 011:NM, 044:H18 y 0107:H10, éstos serotipos no están asociados con alguna de las categorías de E. coli diarrogénicas (Cuadro 1, Figuras 1, 2, 3).

Las cepas del estudio que resultaron invasivas en el ensayo en células HEp-2 con gentamicina fueron nueve y pertenecieron a los serotipos 011:NM, 075:NM, 0111:NM, 0114:H2 y 0126:NM. Al asociar

adherencia localizada con FAS positivo encontramos un valor de P menor de 0.05 lo cual es estadísticamente significativo, no resultó significativa la asociación entre invasividad y adherencia localizada a células HEp-2 (Cuadros 3 y 4).

Se observó una asociación directa entre adherencia a células HEp-2 y e invasividad, ya que de las nueve cepas que resultaron invasivas en el ensayo *in vitro*, solo dos no fueron adherentes. Ninguna de estas cepas invasivas en células HEp-2 fué capaz de producir queratoconjuntivitis en el cobayo (Figura 4)

En la prueba de FAS (Figura 5) se encontró relación entre ésta y adherencia de tipo localizado en el 87% de las cepas con este patrón. La asociación entre adherencia localizada y lesión al citoesqueleto, mostró un valor de P menor de 0.05. La relación entre serotipo y prueba de FAS se muestra en el cuadro 4 no encontrándose algún serotipo que predomine.

La frecuencia de resistencia de las cepas de E. coli a los 22 antimicrobianos ensayados se resume en el cuadro 5. En general las cepas resistentes a mas de dos antimicrobianos fueron 70 (78%) y las sensibles a todos los antibióticos fueron 21 cepas (23%). El 100% de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, cefoxitina, imipenem, cefotaxima y ceftriaxona.



Al relacionar sensibilidad a antimicrobianos con el tipo de adherencia a células HEP-2 se encontró que el promedio de antimicrobianos a los que fueron sensibles las cepas adherentes difusas fué del 40%, lo mismo que para las adherentes localizadas, mientras que las cepas con adherencia agregativa mostraron un 90% de sensibilidad a 10 antimicrobianos (Figura 6).

Al agrupar las cepas de acuerdo a la resistencia que mostraron a 10 antimicrobianos con el modelo de adherencia a células HEP-2, se encontraron cuatro patrones de resistencia mas frecuentes. El patrón de resistencia número 1 lo mostró el 16% de las cepas con adherencia localizada, el patrón de resistencia 3 fué mas frecuente en las cepas agregativas (66%) y finalmente el patrón número 4 estuvo asociado con cepas con adherencia difusa en un 12% (Cuadro 5).

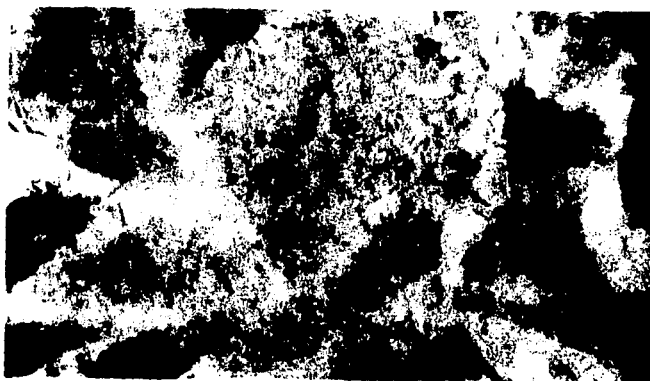
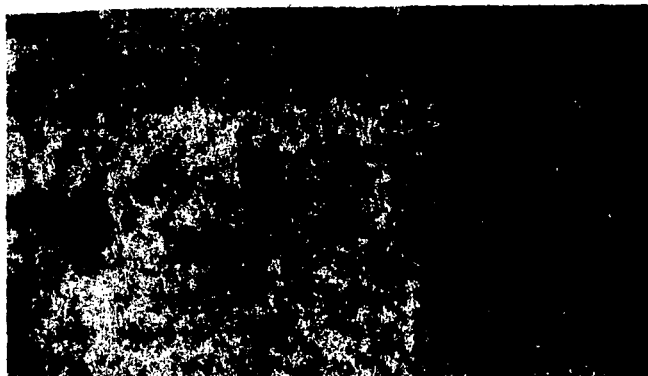


FIGURA 1. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli. A) se aprecia la microcolonia típica de adherencia localizada. B) se observan las bacterias pegadas en empalizada tanto a la célula como al vidrio de la preparación, que corresponde a la adherencia agregativa. Técnica según Cravioto y col.

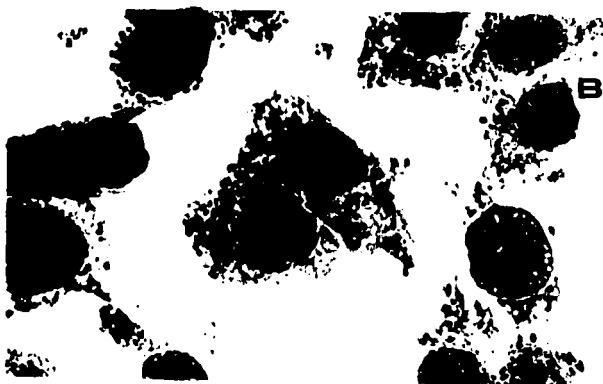
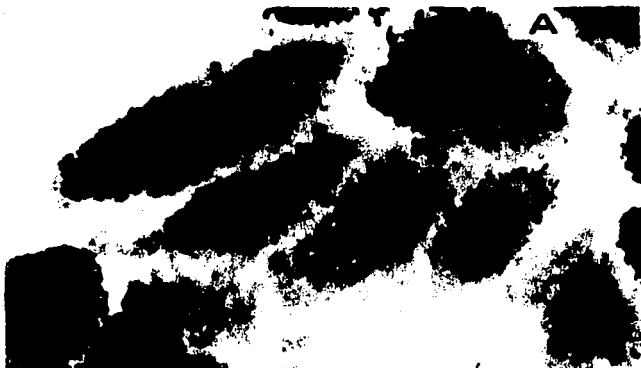


FIGURA 3. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli . A) se aprecian las bacterias distribuidas en toda la superficie celular, típica de adherencia difusa. B) se observan las bacterias dentro de la célula. Técnica según Mehlman y col.

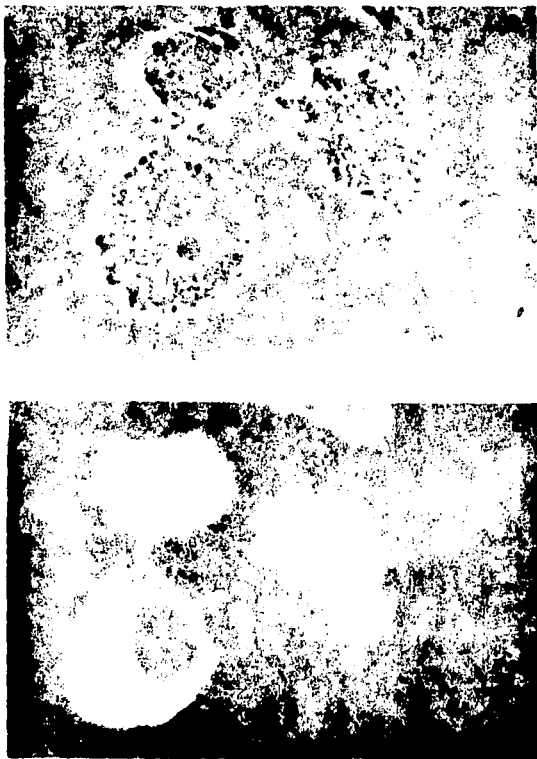


FIGURA 6. Monocapa de células Hep-2, inoculada con Escherichia coli. Por microscopia de contraste de fases en la parte superior se aprecian las bacterias adheridas a la superficie de la membrana celular. En la parte inferior por microscopia de fluorescencia se observa el daño al citoesqueleto, que consiste en la actina polimerizada

**CUADRO 1**

**SEROTIPOS IDENTIFICADOS EN 91 CEPAS DE  
ESCHERICHIA COLI AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA**

<b>EPEC</b>	<b>(No %)</b>	<b>Otros Serotipos</b>	<b>(No / %)</b>
055: H6	(3)	01: H4	(1)
086	(1)	01: H15	(3)
0111	(7)	09ab	(1)
0114: H4	(4)	012: H12	(2)
0119: H11	(3)	033	(1)
0126	(4) (22 / 24)	037	(1)
<b>ETEC</b>		044: H18	(5)
011	(4)	051	(1)
015	(1)	058	(1)
020	(1)	060	(1)
0148: H45	(2)	064: H47	(2)
0166	(1) (9/7)	075	(1)
<b>EIEC</b>		080	(1)
039	(2)	086	(1)
0136: H45	(2)	088	(1)
0164: H42	(2) (6/7)	089	(1)
<b>EHEC</b>		0107: H10	(1)
04	(3)	0110	(1)
0125	(1)	0130	(1)
0145	(1) (5/4)	0151	(1)
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	07	(4)
		OR	(17)
			<b>49</b>

**CUADRO 2**  
**ASOCIACION ENTRE SEROGRUPOS DE ESCHERICHIA COLI Y**  
**FACTORES DE PATOGENICIDAD EN CELULAS HEP-2**

SEROGRUPOS	ADHERENCIA		PRUEBAS DE VIRULENCIA				
	LOCALIZADA (%)	P	DIFUSA (%)	AGREGATIVA (%)	FAS (%)	P	INVASI- VIDAD (%)
EPEC (n=22)	(14/63)	.001	(2/9)	(0/0)	(13/59)	.007	(2/9)
ETEC (n=7)	(1/14)	NS	(1/14)	(1/14)	(0/0)	NS	(0/0)
EIEC (n=6)	(0/0)	NS	(2/33)	(0/0)	(0/0)	NS	(0/0)
OTROS (n=56)	(13/23)	.03	(11/19)	(5/9)	(21/37)	NS	(7/12)
TOTAL	28 (30)		16 (17)	6 (6)	34 (37)		9 (10)

NS = NO SIGNIFICATIVA VALOR DE P > .05

CUADRO 3

RELACION ENTRE SEROTIPO, ADHERENCIA Y LESION AL CITOES-  
QUELETO DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI A CELULAS HEP-2.

SEROGRUPO	ADHERENCIA	LESION AL CITOESQUELETO
OR (1)	DIFUSA	+
O7 (1)	DIFUSA	+
O7 : H45 (5)	LOCALIZADA	+
04 (2)	LOCALIZADA	+
039 (1)	NEGATIVA	+
055 (1)	LOCALIZADA	+
075 (1)	LOCALIZADA	+
075 (1)	LOCALIZADA	-
080 (1)	LOCALIZADA	+
0111 (4)	LOCALIZADA	+
0111 (1)	LOCALIZADA	-
0111 ab (1)	LOCALIZADA	-
0111 ab (1)	LOCALIZADA	-
0111 ac (1)	LOCALIZADA	+
0114 (4)	LOCALIZADA	+
0119 (1)	LOCALIZADA	+
0119 (1)	DIFUSA	+
0126 (2)	LOCALIZADA	+
0126 (1)	NEGATIVA	+
0148 (1)	LOCALIZADA	+
0151 (1)	LOCALIZADA	+
0164 (1)	NEGATIVA	+

**CUADRO 5**  
**ASOCIACION ENTRE ADHERENCIA Y PATRON DE RESISTENCIA MAS**  
**EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI AISLADAS**  
**DE NIÑOS CON DIARREA**  
**(n = 53)**

PATRON DE RESISTENCIA	MODELO DE ADHERENCIA		
	LOCALIZADA (n=31)	DIFUSA (n=16)	AGREGATIVA (n=6)
1 AM, SAM, CZ, AM/C, CF, CFP MZ, PIP	5(16%)	0	0
2 AM, SAM, CZ, CF, CFP, ATM, PIP	3(10%)	0	0
3 AM, SAM, CZ, AM/C, CF, CFP MZ, TIM, ATM, PIP	5(16%)	0	4(66%)
4 CF, MZ, ATM, PIP	2(6%)	2(12%)	1(16%)

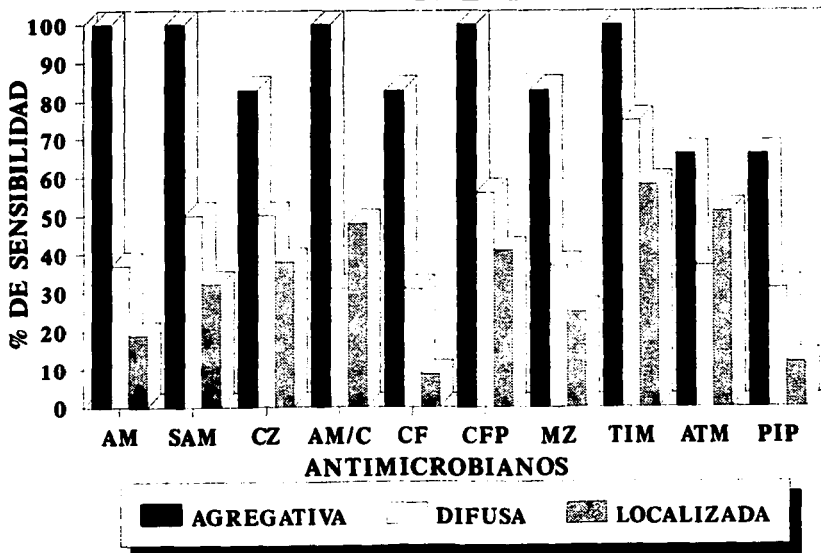
AM=AMPICILINA, AM/C=AMPICILINA MAS CLAVULANICO, CFP=CETOPERAZONA  
TIM=TICARCILINA MAS CLAVULANICO, SAM=AMPICILINA MAS SALBACTAM,  
CF=CEFALOTINA, MZ=MEZLOCILINA, ATM=AZTREONAM, PIP=PIPERACILINA



**CUADRO 4**  
**ADHERENCIA Y LESION AL CITOESQUELETO EN 9**  
**CEPAS ESCHERICHIA COLI INVASIVAS A CELULAS HEP-2**

ADHERENCIA	FAS N (%)	P	INVASIVIDAD N (%)	P
LOCALIZADA	4 (44)	.03	4 (44)	.27
DIFUSA	0	NS	3 (33)	NS
AGREGATIVA	0	NS	0	NS
NEGATIVA	0	NS	2 (23)	NS
<b>NS = NO SIGNIFICATIVO</b>				

**FIGURA 6**  
**SENSIBILIDAD A ANTIMICRONIANOS**  
**CEPAS DE *Escherichia coli***



MIC SEGUN MICRODILUCION SERIADA EN PLACA

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

Escherichia coli es una bacteria causante de cuadros diarreicos en niños y para su estudio se agrupa en cuatro categorías; enteropatógena, enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteroinvasiva. Estas cepas son un problema de salud pública principalmente en países subdesarrollados, debido a que se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, siendo el grupo de niños menores de cinco años los más frecuentemente afectados. Entre los factores de patogenicidad con los que cuentan estas bacterias para causar enfermedad diarreica se encuentran la adherencia e invasividad a la célula huésped, así como la producción de exotoxinas con efecto citotónico o citotóxico.

Las 91 cepas de E. coli del presente estudio se seleccionaron de acuerdo a los serogrupos que se habían identificado de un estudio previo realizado por Cravioto y col. (53) publicado en 1990 en donde se estudió la colonización por enteropatógenos específicos y el riesgo de padecer diarrea durante el primer año de vida de 75 niños seguidos longitudinalmente de una comunidad del Estado de Morelos.

En la presente investigación, a pesar de que se determinó el antígeno flagelar probando los 56 antisueros monovalentes, el

análisis de resultados se elaboró tomando en consideración sólo los serogrupos debido a que el 54% de las cepas fueron inmóviles (Cuadro 1).

14 de las 28 cepas que mostraron adherencia localizada correspondieron a los serogrupos EPEC establecidos por diversos autores (23,24). La asociación entre serogrupos EPEC y adherencia localizada fué estadísticamente significativa, presento un valor de P menor de 0.05. Los serogrupos con adherencia difusa no correspondieron a un grupo patógeno específico lo cual también ha sido reportado. De las cepas con adherencia agregativa que fueron seis solo se encontraron dos con el serogrupo O44 que algunos autores (24,54) han mencionado como mas frecuentemente relacionado EAggEC.

La relación entre cepas con adherencia localizada y la lesión al citoesqueleto que encontramos en este estudio fué significativa, mostrando un valor de P menor de .05, el 87% de las cepas adherentes del tipo localizado fueron capaces de lesionar el citoesqueleto; esto refuerza lo reportado en estudios previos (33,34). Sin embargo no todas las cepas con adherencia localizada son FAS positivo como comunmente se cree.

En algunos estudios la capacidad invasiva de EPEC es tan alta o aún mayor que lo observado en cepas EIEC (63,64); sin embargo se ha cuestionado mucho la metodología utilizada en algunos ensayos de

invasividad (65). En este trabajo se probaron dos métodos de invasividad; el ensayo en células HEP-2 con gentamicina y la prueba de Serény, para determinar la relevancia de la capacidad invasiva en células HEP-2 que tiene las cepas del serogrupo EPEC en este mecanismo de virulencia. Se encontro que en 22 cepas pertenecientes al grupo EPEC, sólo dos mostraron la capacidad invasiva, resultados que concuerdan con lo señalado por Robins-Browne y Bennet-Wood quienes sostienen que EPEC es menos invasivo que EIEC (65).

Nueve cepas de las 91 estudiadas fueron capaces de invadir las celulas HEP-2, sin embargo ninguno provocó la queratoconjuntivitis en el cobayo. Al respecto se sabe de la existencia de cepas de *Shigella* Serény negativas pero capaces de invadir células epiteliales (56). Por lo tanto, el hecho de que EPEC generalmente sea Serény negativa no excluye que estas cepas sean invasivas por otros sistemas.

Andrade y col. (67) apoyan la idea de que existe una relación estrecha entre la capacidad invasiva de las cepas de *E. coli* y la producción de la lesión de adherencia y esfacelamiento, sin embargo por los resultados obtenidos en este estudio no se puede señalar que exista mcorrelación entre ambos eventos ya que de las nueve cepas invasivas en el ensayo de células HEP-2 solo tres resultaron FAS positivas. Estos autores también mostraron que las cepas EPEC una vez adheridas a la membrana citoplasmática son rápidamente internalizadas. Y proponen que el mecanismo de endocitosis

involucra movilización activa de la membrana citoplasmática por interacción entre los filamentos de actina y miosina. Otros investigadores sugieren que la invasión puede surgir como resultado final del desarrollo de la lesión de adherencia y esfacelamiento.

En el ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos todas las cepas estudiadas resultaron sensibles a gentamicina a una concentración mínima inhibitoria de entre 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$ . sin embargo en el ensayo de invasividad de HEP-2 gentamicina se observaron bacterias adheridas a la superficie de la membrana citoplasmática de la célula infectada. La posible explicación a este fenómeno pudiera ser que el acúmulo de bacterias adheridas les confiere protección contra el efecto del antimicrobiano como ha sido señalado por Riley y col. (66).

Algunos autores cuestionan mucho el ensayo de invasividad HEP-2 con gentamicina, debido a que no pueden diferenciar claramente si las bacterias están intracelularmente o se encuentran adheridas a la membrana de la célula, sin embargo éste es un modelo *in vitro* útil que permite seleccionar gran número de bacterias que posteriormente se puede corroborar con un ensayo *in vivo* (prueba de Serény).

La enfermedad diarreica ocasionada por *E. coli* debe tener un manejo terapéutico similar a la diarrea causada por otros agentes etiológicos en donde la rehidratación y la reposición de

electrolitos son de importancia fundamental (70). En ocasiones tales medidas no resuelven completamente la enfermedad y con frecuencia se requiere utilizar principalmente en diarrea con sangre (71). Un ensayo de casos control en Etiopia mostró mejoría marcada con el uso de los antibióticos, los cuales llevaron a una resolución completa de la diarrea en 76% de los casos dentro de los tres primeros días mientras que solamente se curaron el 7% de los controles (72). Gorbach sostiene que no es necesario el tratamiento antibiótico en las enfermedades diarreicas excepto en neonatos (73). Existen evidencias de que los antimicrobianos tienen un efecto benéfico en niños infectados con cepas EPEC. En un reporte de tres niños entre siete y ocho meses de edad, con una historia de diarrea de tres a cuatro semanas, el tratamiento antimicrobiano de cinco días de duración resolvió el cuadro diarreico (74).

Tres factores influyen en el difícil manejo terapéutico de la enfermedad diarreica producida por agentes bacterianos: el uso inadecuado e indiscriminado de las drogas antibacterianas, la utilización de antimicrobianos para tratar infecciones diarreicas sin antes haber confirmado que el agente etiológico es realmente una bacteria y por último la relativamente alta frecuencia con la que se transfiere la información genética extracromosomal que codifica para la mayoría de las resistencias a los antimicrobianos (75).

Nuestros resultados sobre resistencia a antimicrobianos concuerdan con otros estudios realizados en diferentes partes del mundo, en donde se ha encontrado altas tasas de resistencia a los antibióticos utilizados (76,77). La relación entre los diferentes patrones de adherencia *in vitro* (localizada, difusa y agregativa) y la búsqueda de un marcador de resistencia a antimicrobianos específicos para cada patrón de adherencia no se ha reportado. Por tal motivo tratamos de identificar un marcador de resistencia a antimicrobianos con los diferentes fenotipos de adherencia que muestran cepas de *E. coli*. En el estudio se pretendía determinar si existe relación entre los diferentes plásmidos que codifican para la adherencia y los patrones de resistencia observados en cada patrón de adherencia.

En los tres fenotipos de adherencia se observaron cepas multirresistentes lo cual es apoyado por reportes previos. Los antimicrobianos derivados de la quinolonas como es ciprofloxacina y norfloxacina mostraron un marcado efecto inhibitorio a concentraciones bajas de 1  $\mu\text{g/ml}$  del antibiótico lo cual es consistente con otros reportes (78,79). Estos antibióticos pueden ser de los mejores agentes terapéuticos para bacterias productoras de diarrea en niños, sin embargo su uso necesita ser evaluado su uso en niños (80).



Recientemente se han utilizado inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam) para potenciar el efecto de los derivados de las penicilinas como son ampicilina, ticarcilina y amoxicilina. En diversos estudios (81,82) estos compuestos han mostrado una efectividad tanto clínica como bacteriológica superior a la amoxicilina sola; sin embargo, en este estudio in vitro no se observó ninguna diferencia al utilizar el antibiótico solo o en combinación con los inhibidores de las betalactámicos.

## REFERENCIAS

- 1.- López Acuña D. La salud desigual en México. Edit. Siglo XXI. 5a. Edición. México 1984. p.p. 48-90.
- 2.- SSA. Encuesta sobre practica y prevalencia de la terapia de rehidratación oral en 1987. (EPPTRO). SSA, México, 1988.
- 3.- Marine. Diarrea aguda. En: diagnóstico y terapéutica en medicina interna. G. Llamas Esperón (ed) México: Méndez Cervantes 1991, pp 571-74.
- 4.- Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernandez G, Hernandez R and Lopez D. Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los primeros dos años de vida de una cohorte de niños rurales. Bol Méd Hosp Infant Méx 1987;6:316-20.
- 5.- Sepúlveda J. Malnutrition and infection diseases. A longitudinal study of interaction and risk factor. Perspectivas en Salud Pública No. 9. Instituto Nacional de Salud Pública, México, 1990.
- 6.- Hullan S, Guang ZL, Mathan. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries; A multicentre study in five countries. Bull WHO 1991. 89:542.

- 7.- Guerrant IC. Inflammatory enteritis. In: Mandell GL, Douglas LC, Bennett EJ. Principles and practice of infectious diseases. 3ed. Churchill Livingstone. New York, 1990.
- 8.- DuPont H, Mathewson JJ. **Escherichia coli** Diarrhea. In: Evans AS, Brachman PS (ed) Bacterial infections of humans. Epidemiology and control. United States of America: Plenum Medical Book Company. 1991. pp. 239-254.
- 9.- Goldschmidt MC, and DuPont HL. Enteropathogenic **Escherichia coli**: lack of correlation of serotype with pathogenicity. J. Infect. Dis. 1976;133:153-156.
- 10.- Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young ChR and Sotman S. **Escherichia coli** strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1987;i:1119-22.
- 11.- Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A and Keusch GT. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic **Escherichia coli** (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. J Infect Dis 1989;160:452-59.
- 12.- Sussman M. **Escherichia coli** in human and animal disease. In: The virulence of **Escherichia coli**. M Sussman (ed). Academic Press, N. Y. 1985. p. 7-45.

- 13.- Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J Infect Dis 1987;155:377-89.
- 14.- Holmgren J. Toxins affecting intestinal transport processes. In The virulence of *Escherichia coli*. M. Sussman (ed). Academic Press, N.Y. p. 177-91.
- 15.- Evans DG, Silver RP, Evans Jr DJ, Chase DG and Gorbach SL. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. Infect Immun 1975;12:656-667.
- 16.- Evans DG, Evans Jr DJ, Tjoa WS DuPont HL. Detection and characterization of a colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect Immun 1978;36:722-36.
- 17.- Cravioto A, Scotland SM, and Rowe B. Hemagglutination activity and colonization factor antigen CFA/ II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* from humans. Infect Immun 1982;36:189-97.
- 18.- Smith CJ. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H-

isolated from travellers and infantile diarrhoea. J Gen Microbiol 1982;128:2081-96.

- 19.- Low D. Virulence factors of enteropathogenic **Escherichia coli**. J Med Microbiol 1989;26:1-26.
- 20.- Nicoletti FM, Superti F, Conti C and Zagaglia. Virulence factors of lactose-negative **Escherichia coli** strains isolated from children with diarrhea in Somalia. J Clin Microbiol. 1988;26:524-29.
- 21.- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Jhonson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare **Escherichia coli** serotype. N Engl J Med 1982;380:681-5.
- 22.- Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic **Escherichia coli** of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev 1984;6:31-51.
- 23.- Chatkaemorakot A, Echeverria P, Taylor DN, Bettelheim KA, Blackolow NR, Sethaburt J and Kaper J. HeLa cell-adherent **Escherichia coli** in children with diarrhoea in Thailand. J Infect Dis 1987;156:626-31.

- 24.- Gomes TAT, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of **Escherichia coli** strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J Clin Microbiol 1989;27:266-69.
- 25.- Bower JR, Congeni BL, Cleary TG, Stone RT, Wanger A, Murray BE, Mathewson JJ and Pickering LK. **Escherichia coli** O114:nonmotile as a pathogen in a outbreak of severe diarrhea associated with a day care center. J Infect Dis 1989;160:243-247.
- 26.- Fagundes-Neto U, Ferreria V, Patricio FRS, Mostaco VL and Trabulsi LR. Protracted diarrhea: the importance of the enteropathogenic **Escherichia coli** (EPEC) strains and **Salmonella** in its genesis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1989;8:207-11.
- 27.- Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML and O'Brien AD. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic **Escherichia coli** is depending on a plasmid-encoding an enteroadhesiveness factor. J Infect Dis 1985;152:550-9.
- 28.- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of **Escherichia coli** belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 1979;3:95-9.

- 29.- Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984;45:534-36.
- 30.- Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F and Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991;337:262-64.
- 31.- Scotland SM, Smith HR, Said B, Willshaw GA, Cheasty T and Rowe B. Identificacion of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as member of a subclass of attaching-and-effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. *J Med Microbiol* 1991;35:278-83.
- 32.- Jerse AE, Kaper JB. The *ea* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAE plasmid. *Infect Immun* 1991;59:4302-19.
- 33.- Knutton S, Phillips AD, Smith HR, Gross RJ, Shaw R, Watson P and Price R. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent actin test. *Infect Immun* 1991;59:365-71.

- 34.- Girón JA, Ho SY, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic **Escherichia coli**. *Science* 1991;254:710-13.
- 35.- Sohel I, Puente JL, Murray WJ, Vuopio-Varkila J and Schoolnik GK. Cloning and characterization of the bundle-forming pili gene of enteropathogenic **Escherichia coli** and its distribution in **Salmonella** serotypes. *Molec Microbiol* 1993;7:563-75.
- 36.- Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic **Escherichia coli**. *Infect Immun* 1989;57:1290-98.
- 37.- Levine MM, Prado V, Robins-Browne R, Lior H, Kaper JB, Moseley SL, Gicquelais K, Nataro JP, Vial P and Tall B. Use of DNA probes and HEp-2 cells adherence assay to detect diarrheagenic **Escherichia coli**. *J Infect Dis* 1988;158:224-8.
- 38.- Benz I, Schmidt MA. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-1) involved in diffuse adherence of enteropathogenic **Escherichia coli**. *Infect Immun* 1989;57:1506-11.
- 39.- Giron JA, Jones T, Millan-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zarate L, Frankel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB, Schoolnik GK and Riley LW. Diffuse-adhering **Escherichia coli** (DAEC) as a



- putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J Infect Dis* 1991;163:507-13.
- 40.- Nataro JP, Yikang D, Girón JA, Savarino SJ, Kothary MH and Hall R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun* 1993;61:1126-31.
- 41.- Eslava C, Villaseca J, Morales R, Navarro A and Cravioto A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by Enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstract B105. 93rd. General Meeting. Washinton D.C: American Society for Microbiology, 1993.
- 42.- Baldwin TJ, Knutton S, Sellers L, Manjarrez Hernandez HA, Aitken A and Williams PH. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. *Infect Immun* 1991;60:2092-95.
- 43.- Vial PA, Robins-Browne RM, Lior H, Prado V, Kaper-JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, and Levine MM. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1987;155:377-89.
- 44.- Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable

- enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. *J Clin Invest* 1991;87:1450-55.
- 45.- Broda P. Plasmids. Freeman and Company Limited (ed). United States of America 1978, pp 100-124.
- 46.- Olarte J, Filloy L and Galindo E. Resistance of *Shigella dysenteriae* type 1 to ampicilin and other antimicrobial agents isolated during a dysentery outbreak in a hospital in Mexico City. *J Infect Dis* 1976;133:572.
- 47.- Kupersztoch-Portnoy YM. Antibiotic resistance of Gram negative bacteria in Mexico relationship to drug consumption. In: Molecular Biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids, Stuart B, Royston C, Clowes and Koenig EL (eds). 1981. pp 529-37.
- 48.- Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. 1986.
- 49.- Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1975;155:595-600.

- 50.- Mehlman IJ, Eide EL, Sanders AC, Fishbein M and Aulisio CG. Methodology for Recognition of invasive potential of *Escherichia coli*. J OAC 1977;60:546-62.
- 51.- Serény B. Experimental Shigella keratoconjunctivitis; a preliminary report. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1955;2:293-6.
- 52.- Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures, in Lennete, Balows, Hausler y Shadomy (eds): Manual de Microbiología Clínica. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1987; pp 1206-12.
- 53.- Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, Dela Roca JM, Hernandez JM, Perez G and Vazquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol 1990;131:886-904.
- 54.- Smith HR, Scotland SM, Willshaw GA, Rowe B, Cravioto a and Eslava C. Isolated of *Escherichia coli* O44:18 of diverse origin are enteroaggregative. J Infect Dis 1995;170:1610-3.
- 55.- Staley TE, Jones EW and Corley LD. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. Am J Pathol 1969;56:371-92.
- 56.- Tzipori S, Robins-Browne RM, Gonis G, Hayes J, Withers M and MacCartney E. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. Gut 1985;26:570-8.

- 57.- Ulshen MH and Rollo JB. Pathogenic of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. N Engl J Med 1980;302:99-101.
- 58.- Andrade JRC and Santa Rosa RM. Investigation on an adhesive property (localized adherence) characteristic of classic enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli*. Rev Microbiol 1986;17:116-25.
- 59.- Andrade JRC and Santa Rosa RM. Attachment and intracellular penetration of classic enteropathogenic *Escherichia coli* into HEP-2 cells. Rev Microbiol 1986;17:53-7.
- 60.- Clausen CR and Christie DL. Chronic diarrhea in infant caused by adherent enteropathogenic. J Pediatr 1982;100:358-61.
- 61.- Rothbaum RJ, McAdams AJ, Gianella R and Partin JC. A clinico-pathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterol 1982;83:441-452.
- 62.- Rothbaum RJ, Partin JC, Saalfeld K and MacAdams AJ. An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in human infants. Ultrastruc Pathol 1983;4:291-304.
- 63.- Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A and Keusch GT. Epithelial cell invasion: An overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. J Infect Dis 1989;160:452-59.
- 64.- Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A and Keusch GT. A comparison of HEP-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 1990; 57:83-6
- 65.- Robins-Browne PM and Bennett-Wood. Quantitative assessment of the ability

- of *Escherichia coli* to invade cultured animal cell. *Microb Pathog* 1992; 12:159:64.
66. Riley LW, Junio LN and Schoolnik GK. HeLa invasion by a strain of enteropathogenic *Escherichia coli* that lacks the O-antigen polysaccharide. *Mol Microbiol* 1990;4:1661-66.
- 67.- Andrade JRC, da Veiga VF, Santa Rosa RM and Suassuna I. An endocytic process in HEP-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1989;28:49-57.
- 68.- Dupont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder M, Libonati JP, Sheahnan DG, La Brec EH and Kalas JP. Pathogenesis of *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1971;285:1-9.
- 69.- Sasakawa CH, Kamata K, Sakai T, Murayama SY, Makino S and Yoshikawa M. Molecular alteration of the 140-Megadalton plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1986;51:470-5.
- 70.- Boedeker EC Enteroadherent (enteropathogenic) *Escherichia coli*, p. 123-39. In M J G Farthing and G T Keusch (ed.), *Enteric infection*. Chapman and Hall, London. 1988.
- 71.- Boesman-Finkelstein JJ and Finkelstein RA. Antimicrobial effects of human milk:inhibitory effect on enteric pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 1985;27:167-74.
- 72.- Thoren A The role of enteropathogenic *Escherichia coli* in infantile

- diarrhoea: aspects on bacteriology, epidemiology and therapy. Scand J Infect Dis Suppl 1983;37:1-51.
73. - Gorbach SL. Bacterial diarrhoea and its treatment. Lancet 1987;ii:1378-82.
74. - Hill SM, Phillips AD, Walker-Smith JR, Sanderson RI and Miller PJ. Antibiotics for *Escherichia coli* gastroenteritis. Lancet 1988i;771-2.
75. - Hardy K. Bacterial plasmid. Thomas Nelson and Sons Ltd (eds). Hong Kong 1981, p.50-74.
76. - Raj P, Srivastava R, Bhandari N and Bhan MK. Antimicrobial susceptibility of enteroadherent *Escherichia coli* strains in infantile diarrhea. General meeting, Society American of Microbiology 1993.
78. - Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseley SL, Bopp CH A and Blake PA. Serotype, antimicrobial resistance and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the Unites States. J Clin Microbiol 1989;27:2234-39.
79. - Haberberger RL Jr, Milkhill IA, Ismail TF. Enteritis due to multiresistant enteroadherent *Escherichia coli*. Lancet 1991;337:235-6.
80. - Wolfson JS, Hooper DC. Overview of fluoroquinolones safety. Am J Med 1991;91:6A153S-6A161S93. - Beale AS, Gisby J, Sutherland R. Efficacy of augmentin amoxicillin/clavulanic acid) in experimental *Bacteroides/Escherichia coli* mixed infections. J Drug Develop 1989;2:59-62.
81. - Davies JG, Rose AJ, Walker GD. A comparison of augmentin and co-

trimoxazole in the treatment in adult infections in general practice. Brith  
J Clin Pract 1982;36:387-93.

82.- Ellis-Pegler, Lang SDR, Downey DJ, Anderson SDR. Augmentin treatment of  
bacterial infections in hospitalized patients. New Zealand Med J  
1988;95:542-5.