

78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

FENOTIPOS DE ADHERENCIA A CÉLULAS HEP-2 DE CEPAS
DE Escherichia coli AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA

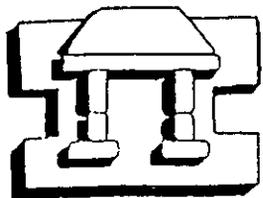
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

LINDA REYES DOMINGUEZ

20/11/00



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**El presente trabajo se realizó
bajo la asesoría del M. en C.:
José Molina López.**

DEDICADA A:

Judith

y

Aurora[†] (1937-2000).

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Carlos Eslava por haberme admitido en su equipo de trabajo y por haberme aceptado para la elaboración del presente trabajo de tesis.

Al M. en C. José Molina López por todo el tiempo dedicado en la elaboración de esta tesis.

A la Profra. de Primaria Hilda Domínguez (mi Madre) por haberme apoyado en el transcurso de mi carrera.

A la Profra. de Primaria Raquel Martínez (mi Abuela) por haberme apoyado en el transcurso de la elaboración de esta Tesis.

A mi mejor amiga Judith González por haberme impulsado a salir adelante, anímica y moralmente.

A la Sra. Aurora Saavedra, madre de Judith por toda su ayuda incondicional, mil gracias.

INDICE.

-Resumen.....	6
-Introducción.....	7
-Diarrea aguda líquida.....	10
-Diarrea con sangre.....	11
-Diarra crónica/Mala absorción.....	12
-Adherencia bacteriana.....	13
-Clasificación de <u>E. coli</u>	15
- <u>E. coli</u> enteropatógena (EPEC).....	15
-Tabla 1. Tipos de <u>Escherichia coli</u>	16
- <u>E. coli</u> enteroagregativa (EAggEC).....	18
- <u>E. coli</u> enterotoxigénica (ETEC).....	19
- <u>E. coli</u> enteroinvasiva (EIEC).....	21
- <u>E. coli</u> enterohemorrágica (EHEC).....	24
-Antecedentes.....	26
-Objetivo general.....	35
-Objetivos particulares.....	35
-Hipótesis.....	35
-Material y Método.....	36
-Cepas en estudio.....	36
-Aislamiento e identificación.....	36
-Origen de las células.....	37

-Ensayo de adherencia a células HEp-2.....	37
-Análisis estadístico.....	38
-Resultados.....	39
-Tabla 2. Diarrea y adherencia.....	41
-Tabla 3. Adherencia y serotipos.....	42
-Tabla 4. <u>E. coli</u> y otros patógenos.....	43
-Tabla 5. <u>E. coli</u> y virus.....	45
-Tabla 6. <u>E. coli</u> como único patógeno.....	46
-Ji-cuadrada.....	47
-Discusión.....	48
-Conclusiones.....	51
-Bibliografía.....	52
-Apéndice.....	62
-Fig. 1. Adherencia localizada.....	62
-Fig. 2. Adherencia difusa.....	63
-Fig. 3. Adherencia agregativa.....	64
-Agar inclinado; -Medio de huevo (Dorset).....	65
-Solución salina; -Tryptona; -D-manosa.....	66
-Solución buffer de fosfatos (PBS); - Medio DMEM para células HEp-2.....	67

RESUMEN.

Escherichia coli es uno de los agentes causales de diarrea severa en niños menores de cinco años. Entre los mecanismos de virulencia que tienen las cepas de E. coli para causar diarrea en humanos se encuentra la adherencia a células epiteliales, la invasión y multiplicación en el citoplasma de la célula infectada, producción de enterotoxinas termolábiles y/o termoestables. Las cepas de E. coli se han clasificado según sus características clínicas, serotipo, factores de virulencia y epidemiológicos en: enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAggEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) y enterohemorrágica (EHEC).

En este trabajo se estudiaron 365 cepas de E. coli aisladas de muestras fecales de 71 niños menores de 5 años, con diarrea. El objetivo fue determinar la capacidad de adherencia de dichas cepas a células HEp-2.

Los resultados fueron: 231 cepas (63%) fueron adherentes; 94 cepas (26%) mostraron adherencia agregativa; 17 cepas (5%) presentaron adherencia difusa; 11 cepas (3%) tuvieron adherencia localizada y 12 cepas (3%) mostraron desprendimiento celular. La adherencia de las cepas estudiadas fue un evento importante ya que se presentó en la tercera parte de las mismas siendo la de tipo agregativo la más común.

Por lo observado se puede considerar a E. coli como un patógeno importante implicado en la patogenia de la diarrea en niños menores de cinco años.

I. INTRODUCCION.

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo corto ($0.5 \times 4 \mu$), anaerobio facultativo, no esporulado, provisto de flagelos peritricos, de fimbrias y puede o no presentar cápsula. E. coli se ha subdividido con base a sus características bioquímicas (biotipos), serológicas (serotipificación de acuerdo a los antígenos: somáticos "O", capsulares "K" y flagelares "H"), a antígenos de las fimbrias F1-6, a la susceptibilidad a bacteriófagos (fagotipos), a la producción de bacteriocinas (colicinas) y a los mecanismos de patogenicidad (Levine, 1987; Sussman, 1985). Se conocen más de 1000 tipos antigénicos de E. coli. (Levinson, 1992). La especie de E. coli pertenece al género Escherichia y la familia Enterobacteriaceae.

E. coli fue inicialmente descrita por Escherich en 1885 bajo el nombre de Bacterium coli commune para indicar la presencia universal de este microorganismo en el intestino de individuos sanos (Sussman, 1985). A pesar que inicialmente fue descrita como un microorganismo no patógeno, fue Escherich quien demostró la presencia de E. coli en la orina de niñas con infecciones del tracto urinario y sugirió que los organismos alcanzaban la vejiga por la ruta ascendente. (Sussman, 1985; Robins-Browne, 1987).

Desde hace mucho tiempo E. coli es considerado un miembro de la flora normal intestinal del hombre y de los animales, y la colonización por este organismo se lleva a cabo inmediatamente después del nacimiento. E. coli es la especie predominante entre la flora normal aeróbica facultativa del intestino y juega un papel muy importante en mantener la

proveedor de vitaminas en algunos animales (Sussman, 1985). Sin embargo, representa tan sólo una pequeña fracción constituyente de la flora normal. La mayoría de las cepas de E. coli no son patógenas en el intestino y algunas pueden producir enfermedad por diferentes mecanismos de patogenicidad.

Las observaciones de diferentes investigadores con el suero de niños enfermos de diarrea epidémica, permitieron conocer que estos sueros sólo aglutinaban cepas aisladas del contenido intestinal de niños que habían muerto de gastroenteritis no diagnosticada y no aglutinaban con las cepas de niños sanos. Este hecho permitió plantear que el agente causal de diarrea epidémica y de gastroenteritis fuera el mismo. (Browner, 1987). Esto fue la base para que Kauffman (1947) distinguiera a estas cepas del resto de las E. coli utilizando un esquema serológico para su tipificación, el cual permitió establecer que sólo un grupo restringido de serotipos (combinaciones antigénicas somático-flagelares) de E. coli estaban claramente asociados con la enfermedad diarreica. Los estudios recientes de genética de poblaciones indican que estas bacterias son en realidad clonas adaptadas para colonizar preferencialmente el intestino humano, situación que probablemente favorece su permanencia en este hospedero y por ende su distribución mundial. (Wihttam, 1988; Orskov, 1990).

E. coli fue originalmente incriminado como un enteropatógeno por Bray (1945) tras demostrar que una cepa de E. coli era responsable de diarrea durante el verano causando brotes infantiles (Sussman, 1985; Robins-Browne, 1987). Varela y col. (1946) reportaron el aislamiento de E. coli de un caso mortal de diarrea. A mediados de los años 50s se

estableció una serie de diversos serogrupos de E. coli los cuales están formados por cepas incriminadas epidemiológicamente en diferentes partes del mundo como agentes etiológicos importantes de diarrea infantil.

Se reconoce a E. coli como causa importante de infección en el tracto urinario, en peritonitis, meningitis, neumonía y septicemia, cuando su localización es extraintestinal (Robins-Brown, 1987). E. coli es la causa más común de infección de vías urinarias en mujeres y sepsis por bacilos gramnegativos. Es uno de los dos más importantes agentes causantes de meningitis neonatal y el agente que más a menudo acompaña a la “diarrea del viajero”. E. coli es una de las bacterias aerobias facultativas más abundantes de colon y heces. (Levinson, 1992). La diarrea causada por E. coli es uno de los principales problemas en el mundo especialmente en niños menores de cinco años de edad (Embaye, 1996; Nataro, 1998).

La diarrea puede definirse como la disminución en la consistencia, y aumento en el número y la frecuencia de las evacuaciones en relación con el hábito intestinal normal de cada individuo. Se considera que una diarrea es crónica cuando persiste durante más de tres semanas. El padecimiento afecta a todas las edades y razas étnicas, constituyendo una causa importante de mortalidad mundial. En los países en vías de desarrollo la diarrea de origen infeccioso es una de las principales causas de mortalidad infantil. Las causas son muy diversas, pero pueden agruparse en:

- 1) Exógenas: la causa es extraintestinal: alimentos, tóxicos, gérmenes, parásitos, carencia de algunas vitaminas;

2) Orgánicas: se debe a lesiones de la pared intestinal, inflamación, degeneración, tumores;

3) Endógenas: la causa se encuentra en el mismo organismo pero no en el conducto intestinal, como alteraciones gástricas, pancreáticas, hepáticas, endócrinas, circulatorias, nerviosas.

Diarrea aguda líquida.

Se define así a aquellos cuadros diarreicos cuya duración es de 7 a 14 días. (Ramírez, 1996). Es la forma más frecuente de diarrea en México, alcanzando el 80%. (SSA, 1988). Los dos agentes que se aislan con más frecuencia son rotavirus y Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC). (Hullan, 1991). Algunas cepas solamente producen una toxina termolábil muy semejante a la producida por V. cholerae como la O6:K15:H16, O8:K40:H9 y O8:K25:H9; otras liberan tanto la toxina termolábil (LT) como la toxina termoestable (ST) tal como la O11:H27, O15:H22, O20:H11, O25:K7:H42, O27:H7, O63:H12, O80, O85, O139 y otras solamente tienen la ST como la O78:H11, O78:H12, O115:H40, O128:H7, O148:H28, O149:H10, O153, O159:H20, O166 y O167. La ETEC en nuestro medio es endémica y es una de las principales causas de diarrea en niños de países en desarrollo. (Guerrant, 1990).

La enterotoxina termoestable (ST) como su nombre lo sugiere es resistente al calentamiento. (Yoshimura, 1985). Y se denominada toxina termolábil (LT) por su labilidad al calor ya que se inactiva a 100°C durante 10 minutos. (Sprangler, 1992).

Diarrea con sangre.

El síndrome de disentería aguda con moco sangre y pus en las heces fue descrito desde Hipócrates. Puede acompañarse con dolor en la defecación y es el resultado de la invasión inflamatoria de la mucosa colónica debida a bacterias, parásitos y/o acción de citotoxinas (Guerrant, 1990).

Tradicionalmente los dos agentes etiológicos que más frecuentemente se asocian con disentería son: Shigella y Entamoeba histolytica. Sin embargo, se sabe que Salmonella (S. enteritidis, S. choleresuis, S. paratyphi), Campylobacter jejuni, E. coli enterohemorrágica, Shigella (S. flexneri, S. sonnei, S. boydii) Yersinia enterocolitica, Vibrio parahaemolyticus, Balantidium coli, Schistosoma (S. japonicum y S. mansoni) y Trichinella spiralis pueden causar sangrados. (Guerrant, 1990). En los Estados Unidos el agente que más frecuentemente se identifica en cuadros de diarrea con sangre es E. coli O157:H7 (Wells, 1983).

Algunos serotipos de E. coli enteroinvasivos (EIEC) pueden producir un cuadro de disentería bacilar semejante a Shigella, como los serotipos O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164 y O167 (Guerrant, 1990). En dos estudios en niños con disentería en México se encontró EIEC en 4 y 5% de los casos, respectivamente. (Benitez, 1991; Suarez, 1993).

Diarrea crónica/Mala absorción.

Es causada por diversos mecanismos, a menudo simultáneos, tanto infecciosos como por intolerancia a nutrimentos (azúcares, proteínas), desnutrición, como síndromes de mala absorción intestinal. (Valdespino, 1994). La diarrea crónica por E. coli, responsable de diarrea aguda se ha asociado con diarrea persistente y las E. coli del grupo O1, 2, 4, 7 y 75 se han aislado de pacientes con colitis ulcerativa. (Cook, 1968).

La asociación constante entre ciertos serotipos de E. coli con procesos diarreicos, permite plantear medidas de control por la búsqueda de los mecanismos de patogenicidad que comparte estas clonas bacterianas. Estos mecanismos corresponden fundamentalmente a tres tipos:

- 1) adherencia, indispensable para que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino;
- 2) producción de proteínas bacterianas (exotoxinas), liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino y con un efecto final en la estimulación de la secreción de agua y electrolitos;
- 3) internalización y multiplicación de la bacteria dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, lo cual permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero una vez que se encuentran en el interior de la célula (Eslava, 1994).

Adherencia bacteriana.

La adherencia bacteriana constituye el evento inicial en el establecimiento de la colonización de los tejidos epiteliales del huésped y dicho proceso conduce a la formación de verdaderos nichos ecológicos distintivos, que juegan un papel importante en la fisiología y defensa de las mucosas del huésped. Normalmente, las superficies mucosas y endoteliales están constantemente bañadas por secreciones (saliva, orina, sangre y moco) que son ricas en sustancias con actividad bactericida que junto con los productos metabólicos y las funciones mecánicas como el estornudo, la tos, el movimiento ciliar, la descamación y la peristalsis, limpian las superficies eliminando bacterias patógenas. (Beachey, 1981). Es lógico que los organismos de la flora normal así como los organismos patógenos deben de adherirse a las células del huésped para contrarrestar los mecanismos normales de limpieza.

El fenómeno de la adherencia no es un proceso dañino por si mismo pero favorece la interacción de factores de virulencia con sitios blancos en el huésped: por ejemplo, las toxinas producidas por microorganismos patógenos del tracto intestinal pueden interactuar más fácilmente con su receptor cuando previamente existe una interacción de la bacteria y la superficie celular intestinal. Así también los microorganismos capaces de invadir y multiplicarse dentro de las células, deben de adherirse primariamente a un sitio en la célula y posteriormente penetrar mediante mecanismos diversos.

Las bacterias patógenas no colonizan ni dañan los tejidos del huésped indiscriminadamente. De hecho, existe cierta selectividad de especie por: el huésped, edad

del mismo, tejido, células blanco. Se ha propuesto que esta selectividad esté determinada por el reconocimiento específico de moléculas presentes en la membrana celular eucariótica que actúan como receptores para estructuras complementarias de superficie bacterianas con actividad de lectinas llamados ligandos o adhesinas que permiten la unión de la bacteria a la célula mediante interacciones hidrofóbicas.

La colonización del intestino tiene lugar mediante un fenómeno de adherencia a la mucosa en la que intervienen ciertas estructuras o apéndices filamentosos que se proyectan de la superficie de la bacteria, denominados “fimbrias o pilis”. Estas estructuras son de naturaleza proteica, antigénicas y termolábiles. (Pérez, 1983).

Una vez adherida, la bacteria sintetiza enterotoxinas (exotoxinas codificadas por genes plasmídicos) que actúan sobre las células de esas áreas para causar diarrea. Las toxinas tienen una sorprendente especificidad de área de las células del colon, algunas células no son susceptibles quizá debido a que carecen de receptores para la toxina. (Levinson, 1992).

Existen cuando menos tres tipos de adherencia de E. coli a células HEp-2:

- 1) **Localizada**, caracterizada por la formación de microcolonias sobre la membrana citoplasmática de las células (Fig. 1 –Anexo-);
- 2) **Difusa**, cuando las bacterias se adhieren a todo el citoplasma celular (Fig 2) y
- 3) **Agregativa**, cuando las bacterias forman acúmulos tanto en la superficie celular como sobre el vidrio de la preparación (Fig. 3) (Scaletsky, 1984).

Clasificación de E. coli.

Se reconocen cinco categorías de E. coli diarrogénicas que son las siguientes: E. coli enteropatógena (EPEC), E. coli enteroagregativa (EAaggEC), E. coli enterotoxigénica, (ETEC) E. coli enteroinvasiva (EIEC) y E. coli enterohemorrágica (EHEC). Las clases de E. coli se distinguen con base a sus mecanismos de patogenicidad, características clínicas, propiedades epidemiológicas y cada una de estas clases esta confinada a un grupo diferente de ciertos serotipos O:H. (Levine, 1987; Sussman, 1985). En la Tabla 1 se resumen las características para clasificar a las cepas de E. coli en los grupos mencionados.

E. coli requiere de factores de virulencia codificados tanto en material genético extracromosomal (plásmidos) como en el propio cromosoma, los que la capacitan para vencer los mecanismos de defensa del hospedero

E. coli enteropatógena (EPEC).

En la década de los cuarenta se aislaron cepas de E. coli de niños con diarrea y una década después se comprobó experimentalmente su patogenicidad en voluntario humanos a los cuales se les administraron dosis elevadas de bacterias (10^8 - 10^9 /ml). Se encontró que desencadenaban diarrea y respuesta inmunológica sistémica contra sus antígenos somáticos y para designarlas Neter en 1950 propuso el término de E. coli enteropatógena (EPEC).

EPEC ha sido descrita como agente causal de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. EPEC se define como la clase de serogrupos de E. coli diarrogénica incriminados epidemiológicamente como patógenos pero cuyos mecanismos de patogenicidad no están relacionados a la producción de ST, LT, a la invasión del epitelio

Tabla 1. Características de las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos

	Enteropatógena (EPEC).	Enterotoxigénica (ETEC).	Enteroinvasiva (EIEC).	Enterohemorrágica (EHEC).	Enteroadesivante (EAggEC)
Mecanismos de patogenicidad.	Adherencia a células epiteliales y esfacelamiento de microvellosidades.	Enterotoxinas termolábil (LT) y termoestables (ST).	Internalización y multiplicación en células epiteliales.	Producción de citotoxina tipo siga (VERO).	Adherencia, alfa-hemolisina. Producción de una exotoxina (Pet).
Grupos de edad afectados.	Recién nacidos y lactantes.	Niños menores de cinco años, viajeros o turistas.	Todas las edades.	Todas las edades.	Niños menores de cinco años, adultos y pacientes con SIDA.
Distribución Geográfica.	Mundial.	Países en desarrollo.	Mundial.	Mundial.	Mundial.
Serogrupos	55, 86, 111, 114, 119, 125, 127, 128, 142, 158.	6, 8, 11, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 85, 114, 115, 126, 148, 149, 159, 166, 167.	28ac, 112ac, 115, 124, 135, 136, 143, 144, 152, 164, 167, 172.	2, 4, 7, 26, 45, 50, 111, 113, 121, 125, 145, 157, 173.	O44:H18

(Levine, 1985, modificado).

intestinal, ni a la producción de una diarrea distintiva con sangre. (Levine, 1987; Robis-Browne, 1987). EPEC involucra una infección del intestino entero. (Levine, 1987; Law, 1989). Baldini y col. en 1983 observaron que el 9% de las cepas pertenecientes a los serotipos clásicos de EPEC obtenidas de pacientes con diarrea poseen un plásmido de aproximadamente 60 MDa que codifica para la propiedad de adherencia a células HEp-2. El producto responsable de esta propiedad recibió el nombre de Factor de Adherencia de EPEC (EAF).

Estudios con microscopía electrónica, revelaron que las EPEC se adherían a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción de las vellosidades intestinales. (Knutton, 1987(b)).

La adherencia de cepas de EPEC al epitelio celular resulta de la fosforilación de algunas proteínas celulares del epitelio en residuos de treonina y serina. La activación de la PKC induce cambios en el citoesqueleto celular que contribuyen al movimiento de líquidos. La distribución de las microvellosidades intestinales por el proceso de adherencia y esfacelamiento es la causa de diarrea prolongada y la deshidratación de los niños. (Nataro, 1998).

E. coli enteroagregativa (EAggEC).

Nataro y col. en 1987 propusieron una quinta categoría de cepas diarrogénicas de E. coli, basados en la observación de un tercer patrón de adherencia a células HEP-2 llamada agregativa a de cepas de E. coli EAF-negativa asociadas con gastroenteritis infantil en Chile. Este patrón difiere de los patrones de adherencia difusa y localizada (AD y AL) reportados por Scalestky y col. en 1984. El patrón de adherencia agregativa formando agregados tanto sobre las células como sobre la superficie del vidrio.

Bhan y col. en 1989 reportaron la asociación de cepas de E. coli que presentan el patrón de adherencia agregativa con diarrea persistente en India y la clasificaron dentro de la categoría de Escherichia coli enteroagregativa (EAggEC). Estas bacterias dañan las vellosidades del colon produciendo una necrosis hemorrágica. Epidemiológicamente se considera como una causa importante de diarrea persistente en niños. En un estudio de cohorte realizado por Cravioto y col. en 1991 se reportó una frecuencia de 636 casos diarreicos durante los 2 años que duró el estudio, de los cuales el 9% tuvo una duración mayor a 14 días, encontrándose cepas EAggEC en el 51% de éstos y con menor frecuencia en casos de diarrea aguda o en las heces de niños sin diarrea. En los 78 cuadros de diarrea en los que se aislaron cepas EAggEC, en 25 de ellos se observaron heces con sangre, siendo estas bacterias el patógeno aislado con mayor frecuencia de un total de 71 eventos de diarrea con sangre.

Las cepas EAggEC son capaces de producir cuando menos dos tipos de toxina, una responsable de inducir secreción intestinal en modelos experimentales y otra que favorece

la expresión de proteínas fosforilantes responsables del movimiento de calcio extracelular. (Baldini, 1983).

En relación con las cepas que presentan adherencia agregativa, estudios en India, México y Brasil, han mostrado que su aislamiento se relaciona significativamente con la presencia de diarrea persistente en niños. (Bhan, 1989; Cravioto, 1991; Gomes, 1989).

E. coli enterotoxigénica (ETEC).

A partir de los estudios de De y col. en 1956 en los que observaron la distensión por edema de asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivos de ciertas cepas de E. coli, se demostró su capacidad para producir exotoxinas que al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero inducían aumento en la secreción de agua y electrolitos. Las cepas ETEC elaboran dos tipos diferentes de toxinas, la primera es una proteína dimérica de alto peso molecular (86,500 Da) similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por V. cholerae 01 y por su labilidad al calor (Se inactiva a 100°C durante 10 minutos) se denomina enterotoxina termolábil (LT). (Sprangler, 1992).

Las cepas ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en países en desarrollo y la más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas. Las cepas de ETEC causantes de diarrea en humanos y animales se caracterizan por la producción de una ó dos enterotoxinas codificadas en plásmidos, la

toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). La LT esta 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 la cual descansa la subunidad A. La toxina se une al receptor específico GM₁ localizado en la membrana celular vía las 5 subunidades B, seguido por la translocación de la subunidad A, a través de la membrana. Una vez en el citosol, la subunidad A activa el complejo de adenilciclase que forman AMPc a partir de ATP y el aumento de AMPc intracelular favorece la salida de agua y electrolitos de la célula (Holmgren,1985), con una consecuente disminución en la absorción en las vellosidades. El incremento en la secreción de líquidos a nivel del lumen intestinal y clínicamente se manifiesta como diarrea. (Eslava, 1994).

La otra familia de enterotoxinas producidas por cepas ETEC son las denominadas termoestables (ST) que como su nombre lo sugiere son resistentes al calentamiento. Estructuralmente son péptidos de bajo peso molecular (1000-6000 Da), no son inmunogénicos, solubles en metanol. El control genético de la producción de LT y ST reside en plásmidos transferibles. (Kupersztoch, 1990; Pickett, 1989)

La toxina ST es un polipéptido, rico en cisteína que activa la guanidilciclase de las células epiteliales intestinales promoviendo el flujo de agua hacia el lumen intestinal. (Holmgren, 1985). Las manifestaciones clínicas de la infección por ETEC son diarrea acuosa, nauseas, dolor abdominal y fiebre de bajo grado (Levine, 1987).

E. coli enteroinvasiva (EIEC).

EIEC se caracteriza por la capacidad de internalización y multiplicación dentro de las células epiteliales intestinales; de causar muerte celular y acumulación de polimorfonucleados (PMNs), produciendo disentería bacilar semejante a la producida por Shigella. La capacidad de invasividad esta asociada a la presencia de plásmidos de 140 MDa que codifican para la producción de varias proteínas de membrana externa involucradas en la invasividad (Levine, 1987).

Estos organismos pueden ser inmóviles, no fermentadores o fermentadores lentos de la lactosa y anaerogénicos (Sussman, 1985). Nicoletti y col. en 1987 reportaron que cepas de E. coli lactosa negativos son capaces de presentar factores asociados a la virulencia como son la capacidad de producir hemolisinas y hemaglutinación.

Las cepas EIEC están antigénicamente relacionados a los serogrupos de Shigella (Levine, 1987; Sussman, 1985). Debido a la proximidad genética entre EIEC y Shigella, y a la similitud del cuadro clínico que presentan ambos organismos, las infecciones por EIEC pueden ser confundidas fácilmente con las infecciones causadas por Shigella. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, dolores abdominales, toxemia, diarrea acuosa seguida de evacuaciones sanguinolentas, moco, y a la presencia de abundantes PMNs (Levine, 1987).

La carencia de flagelos las hace inmóviles al igual que las shigellas.(Formal, 1978). En las cepas EIEC es indispensable la presencia simultanea de un plásmido de 140 MDa (megadaltones) para conferirles el tipo invasivo. Son altamente virulentos, demostrado por el pequeño número de bacterias que se requieren para producir un cuadro clínico (10 a 100). (Sansoneetti, 1982). El primer paso en el proceso de patogénesis es la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa, posteriormente se afecta el borde en cepillo del enterocito al formarse una vesícula en su membrana y esto da lugar a que se facilite la penetración de la bacteria, la cual se establece y multiplica en el interior de la célula para de ahí infectar otras. (Binns, 1985).

EIEC no produce exotoxinas pero lesiona las células epiteliales del intestino delgado causando diarrea por destrucción de las células de la mucosa. En dos estudios en niños con disentería en México se encontró EIEC en 4 y 5% de los casos, respectivamente. (Benitez, 1991; Suarez, 1993).

E. coli enterohemorrágica (EHEC).

Fue descrita inicialmente en 1982 por Riley y col. en un brote de colitis hemorrágica en los E. U. A. El síndrome clínico se caracteriza por la producción de una diarrea abundante acompañada de sangre, sin leucocitos fecales en pacientes sin fiebre. El serotipo O157:H7 fue el organismo causal de este brote y también se le ha incriminado en el síndrome urémico hemolítico, en diarrea en guarderías infantiles, escuelas y centros de salud. (Levine, 1987).

Se han relacionado diferentes serotipos EHEC con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. (Karmali, 1983). Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania entre otros. Hasta el momento no existen reportes del aislamiento del serotipo O157:H7 en nuestro país. En un estudio de prevalencia de E. coli enteroinvasiva y O157 en niños con diarrea en el Hospital O'Horan de Mérida, Yucatán, México, se informó del aislamiento de una cepa de E. coli O157:H1 (0.7%) causante de un cuadro diarreico sanguinolento. Esta frecuencia es similar a la de E. coli O157 H:7 en los Estados Unidos.(Wells, 1983).

En cepas EHEC O157:H7, se ha reportado la presencia de dos citotoxinas potentes que son codificadas por fagos cuya actividad se ha demostrado en células HeLa y Vero. Una de estas, la toxina I semejante a Shiga ó también llamada toxina Vero I (VT I), es aparentemente idéntica a la citotoxina/neurotoxina/enterotoxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo I (toxina de Shiga) y su actividad citotóxica en células Vero es neutralizada por anticuerpos antitoxina de Shiga. La segunda citotoxina, toxina II semejante a Shiga ó toxina Vero II (VT II) no es neutralizable por este antisuero. La capacidad de adherencia a células intestinales Henle 407 del serotipo O157:H7, esta relacionado con la presencia de un plásmido de 60 MDa, que codifica para la expresión de una estructura fimbrial. En el intestino, la infección por EHEC está confinada solamente al ciego y al colon. (Levine, 1987; Law, 1989).

E. coli enterohemorrágica (EHEC).

Fue descrita inicialmente en 1982 por Riley y col. en un brote de colitis hemorrágica en los E. U. A. El síndrome clínico se caracteriza por la producción de una diarrea abundante acompañada de sangre, sin leucocitos fecales en pacientes sin fiebre. El serotipo O157:H7 fue el organismo causal de este brote y también se le ha incriminado en el síndrome urémico hemolítico, en diarrea en guarderías infantiles, escuelas y centros de salud. (Levine, 1987).

Se han relacionado diferentes serotipos EHEC con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. (Karmali, 1983). Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania entre otros. Hasta el momento no existen reportes del aislamiento del serotipo O157:H7 en nuestro país. En un estudio de prevalencia de E. coli enteroinvasiva y O157 en niños con diarrea en el Hospital O'Horan de Mérida, Yucatán, México, se informó del aislamiento de una cepa de E. coli O157:H1 (0.7%) causante de un cuadro diarreico sanguinolento. Esta frecuencia es similar a la de E. coli O157: H7 en los Estados Unidos.(Wells, 1983).

En cepas EHEC O157:H7, se ha reportado la presencia de dos citotoxinas potentes que son codificadas por fagos cuya actividad se ha demostrado en células HeLa y Vero. Una de estas, la toxina I semejante a Shiga ó también llamada toxina Vero I (VT I), es aparentemente idéntica a la citotoxina/neurotoxina/enterotoxina producida por Shigella dysenteriae tipo I (toxina de Shiga) y su actividad citotóxica en células Vero es

neutralizada por anticuerpos antitoxina de Shiga. La segunda citotoxina, toxina II semejante a Shiga ó toxina Vero II (VT II) no es neutralizable por este antisuero. La capacidad de adherencia a células intestinales Henle 407 del serotipo O157:H7, esta relacionado con la presencia de un plásmido de 60 MDa, que codifica para la expresión de una estructura fimbrial. En el intestino, la infección por EHEC está confinada solamente al ciego y al colon. (Levine, 1987; Law, 1989)

II. ANTECEDENTES.

Las propiedades adherentes de E. coli fueron inicialmente descritas por Guyton en 1908, quien observó la capacidad de ciertas cepas de aglutinar glóbulos rojos de especies animales. (Duguid, 1980).

Existían algunos datos sobre las altas cantidades de bacterias que tenían los enfermos en la parte proximal del intestino delgado, lo que hacía suponer la posesión de algún mecanismo adhesivo que permitiese colonizar y proliferar en dicha región del tubo digestivo, venciendo las acciones de lavado y el peristaltismo. (Dupont, 1971).

Evans y col. en 1975 descubrieron que la capacidad adhesiva de la cepa ETEC H1040, que había sido aislada de una paciente muerta a causa de una diarrea colérica en Bangladesh, era debida a la posesión de unas fimbrias que no estaban relacionada antigénicamente con el pili tipo I, el cual está presente en gran parte de las cepas de E. coli de todos los orígenes. Estos investigadores comprobaron que contrariamente a las fimbrias tipo I que están codificadas en el cromosoma bacteriano, las fimbrias de la cepa H10407 se hallaban codificadas en plásmidos que se perdían con gran frecuencia al cultivar las bacterias repetidamente en condiciones de laboratorio. Estas fimbrias fueron denominadas “factor antigénico de colonización I” (CFA/I). En 1978 Evans y col. descubrieron otro antígeno fimbrial al que denominaron CFA/II.

Para que una cepa enterotoxigénica sea patógena, es necesario la presencia de “factores de colonización” que permite a ETEC adherirse a la mucosa ileal, en donde las enterotoxinas secretadas entran en proximidad con sitios blancos en las células epiteliales. Evans y col. reportaron en 1975 y en 1978 la presencia de fimbrias en ETEC, serotipo O78:H11, las cuales fueron denominadas: factores de colonización I y II (CFA/I y CFA/II), respectivamente.

Hasta la fecha se han descrito cuando menos 15 tipos de factores adhesivos como los factores de colonización CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV. Al igual que las enterotoxinas, la producción de los factores de adherencia esta controlada genéticamente por plásmidos (De Graff, 1990). La elaboración de los factores adhesivos esta restringida a ciertos serotipos de E. coli, en los cuales coexisten genes estructurales y reguladores que controlan la producción de fimbrias y fibrillas. (Willshaw, 1990).

Cravioto y col. (1982) y Smyth (1982) demostraron que las cepas ETEC que eran identificadas como CFA/II en base al patrón de hemaglutinación, eran en realidad combinaciones elaboradas de 3 antígenos distintos denominados CS1 (16.3 kDa), CS2 (15.3 kDa) y CS3 (14.7 kDa), los cuales son codificados en un sólo plásmido. Dependiendo del serotipo y del biotipo, se han encontrado cepas que expresan antígenos CS1 y CS3, CS2 y CS3 ó sólo con CS3, no se han observado cepas con CS1 y CS2 simultáneamente. El CFA/I, CS1 y CS2 son adhesinas que corresponden a fimbrias rígidas de 6-7 nm de

diámetro, mientras que el CS3 posee una estructura delgada y flexible de 2-3 nm de diámetro. Los antígenos CS1, CS2 y CS3 se encontraron solamente en un número limitado de serogrupos. (Levine, 1987).

Cuando se presenta diarrea sucede con más frecuencia en niños infectados con cepas que sólo producen enterotoxina ST. Se identificó que entre el 60 y 70% de las cepas productoras de ST, el factor de adhesividad más frecuente fue CFA/I con los antígenos de superficie (proteínas fibrilares) CS1, CS2, CS4, CS5, a diferencia de las cepas que sólo producían LT, donde más de la mitad no tenían un factor de colonización y en las que si, sólo se detecto el antígeno de superficie CS6, proteína fibrilar que no parece mediar adherencia al enterocito. (Cravioto, 1991).

Knutton y col. en 1987 describieron un nuevo factor de colonización, en ETEC O148:H28 capaz de producir diarrea en voluntarios, diferente a los CFA/I y CFA/II. Este posible factor de colonización consta de fibrillas flexibles de 3 nm de diámetro que son expresadas cuando los microorganismos se subcultivan en un macerado de mucosa intestinal infectado con estos organismos. Después se encontró que la cepa ETEC E8775 presenta un complejo superficial denominado PCF8775 formado de 3 antígenos de diferentes a los anteriores que se denominaron CS4, CS5 constituido por fimbrias rígidas de 6-7 nm y CS6 que es una fibrilla. (Wolf, 1989). No se ha clarificado si estas nuevas fimbrias representan en realidad entidades diferentes, ó si son sólo variantes antigénicas ó morfológicas independientes. (Levine, 1987).

Las fimbrias ó pili son estructuras filamentosas que nacen de la pared celular bacteriana que asemejan hebras que emanan a varios nanómetros de la superficie (Dugid, 1980). La presencia de adhesinas de morfología fimbrial en E. coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae y otros se ha asociado a la habilidad de estos organismos a adherirse y proliferar en las mucosas del intestino, tracto urinario, tracto respiratorio y genital respectivamente (Beachey, 1981).

Adhesinas de naturaleza polisacárida: las cápsulas de algunos organismos grampositivos y gramnegativos funcionan como adhesinas en la colonización de las mucosas del huésped. El lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas parece también conferir atributos de adherencia a ciertos patógenos. (Ofek, 1980; Sharon, 1981). El glicocálix elaborado por microorganismos del tracto intestinal fue propuesto por Costerton y Cheng (1981) como un factor de adherencia y colonización del lumen intestinal protegiendo a las microcolonias de la acción de sustancias antibióticas, de anticuerpos, de bacteriófagos y además sirviendo como almacén ó fuente de nutrimentos.

Baldini y col. en 1983 muestra que la habilidad de linajes de EPEC E2348/69 (0127:H46) a adherirse de manera localizada fue dependiente de la presencia del plásmido 60-MDa. Este plasmido fue designado el factor adherente de EPEC (EAF).

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades, con alteración del

citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (EAE). (Moon, 1983).

Scaletsky y col. en 1985 reportaron que algunas cepas de EPEC se adhieren a células HeLa o HEp-2 en dos patrones diferentes llamados: adherencia localizada (AL) y adherencia difusa (AD). Estudios epidemiológicos sugieren que la capacidad diarrogénica de la mayoría de las cepas aisladas de casos clínicos de EPEC está asociada con los patrones característicos de adherencia a células HeLa ó HEp-2. (Levin, 1987; Scaletsky, 1985).

Mediante estudios en voluntarios, se sugirió el papel de una proteína de la membrana externa de 94 KDa y más aún, que estos anticuerpos reconocen a la proteína en otros serogrupos ETEC (O55, O111, O119 y O142). (Levine, 1985).

Knutton y col. en 1987 reportaron que el plásmido pMAR2 (60 MDa) codifica para una adhesina, posiblemente de naturaleza fimbrial de 7 nm de diámetro, que promueve la adherencia de la cepa E2348 (O127:H6) a células HEp-2.

Polotsky y col. en 1977 observaron mediante microscopía electrónica que las cepas de EPEC causan una lesión histopatológica ultraestructural distinta en intestino humano diferente a la causada por ETEC. Esta lesión ha sido observada también por otros autores en biopsias de casos clínicos de infecciones producidas por diferentes cepas de EPEC. (Ulshen, 1980; Rothbaum, 1982).

La producción de esta proteína es controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominado *eae*. Para la expresión de este locus se necesitan de ciertos genes presentes en el plásmido antes mencionado, en el cual posee la información que codifica para la adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas de EPEC. (Jerse, 1991).

Estudios realizados por Balswin y col. en 1991 han señalado que la adherencia íntima de las cepas de EPEC da lugar a que se polimerice la actina del citoesqueleto, como respuesta a un incremento de los niveles intracelulares de calcio y de la proteína cinasa C (PKC).

Batt y col. en 1988 demostraron que un sólo plásmido de 96.5 Kb en la cepa K798 de EPEC O111 ab:H- contiene genes que expresan productos relacionados no sólo con la adherencia, sino también con el daño característico producido por EPEC en las microvellosidades intestinales.

Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son lo que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. Las causas principales de la diarrea son el efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino. (Knutton, 1989).

Un estudio relacionado con la naturaleza del factor responsable a la AL de EPEC a células HeLa se realizó por Scaletsky y col. en 1989. Mediante experimentos de inhibición de la AL a células HeLa con diferentes mono-, di- ó trisacáridos, propusieron que el epítipo reactivo en las células HeLa contiene residuos de N-acetilgalactosamina. Este hallazgo fue clave en el aislamiento del posible factor de AL a partir de una preparación de la membrana externa mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna preparada con N-acetilgalactosamina unida a agarosa como soporte. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con antisuero preparado contra EPEC O111 ab:H- y absorbido con una variante homóloga no adherente. El análisis de los complejos inmunoprecipitados mediante geles de poliacrilamina reveló que el factor de AL aparentemente está localizado en la membrana externa y que posiblemente está formado por un par de proteínas de 29 y 32 kDa, siendo la segunda el componente predominante. Estos péptidos se reconocen por el antisuero absorbido, en un ensayo de electroinmunotransferencia realizada con las preparaciones de la membrana externa.

Girón y col. en 1991 encontraron que una cepa EPEC crecida repetidas veces en agar sangre, expresaba haces de fimbrias parecidos a los que elaboran por Vibrio cholerae y Neisseria gonorrhoeae. La codificación genética para la producción de estos haces estaba controlada por genes presentes en un plásmido que estaba relacionado tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada, como para causar diarrea en voluntarios. (Sohel, 1993).

La producción de esta proteína es controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominado *eae*. Para la expresión de este locus se necesitan de ciertos genes presentes en el plásmido antes mencionado, en el cual posee la información que codifica para la adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas de EPEC. (Jerse, 1991).

En 1980 fue descrito un mecanismo adhesivo en una cepa que puede presentar otra alternativa patogénica de las cepas de EPEC. Ulshen & Rollo aislaron una cepa de serotipo O125:H21 que no sintetizaba toxina termolábil (LT) ni toxina termoestable (ST), ni tampoco poseía capacidad enteroinvasiva pero que sin embargo había sido capaz de desencadenar una diarrea muy grave en una niña al adherirse y destruir los microvellosidades del epitelio intestinal.

La composición de las adhesinas es variable. Se reconocen adhesinas de composición proteica, polisacárida, lipídica y algunas quizá en forma compleja como glucoproteínas o glucolípidos (Ofek, 1980).

Adhesinas de naturaleza proteica: en este grupo se reconocen las fimbrias ó pili, proteínas de membrana externa y quizá antígenos flagelares.

Las cepas que se adhieren en forma localizada forman microcolonias definidas en ciertas áreas de la célula, mientras que las que muestran adherencia difusa, se adhieren en toda la

superficie celular indiscriminadamente. Nataro y col. en 1985 demostraron que dichos patrones de adherencia estaban mediados por plásmidos. La fase íntima de adherencia posterior al esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, estuvo relacionada con la producción de una proteína de 94 kDa denominada íntima.(Levine, 1985).

Además de la elaboración de estas toxinas, las cepas ETEC producen proteínas fimbriadas por las que se adhieren a receptores celulares específicos. (Eslava, 1994).

Knutton y col. en 1987(b) han propuesto que la adherencia de tipo localizado de las cepas EPEC al enterocito tiene dos fases: una inicialmente por adhesinas de tipo fimbriado que permite a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda fase de adherencia íntima. Esta última se relaciona con el esfacelamiento del epitelio, la pérdida de microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal.

OBJETIVO GENERAL.

-Determinar la capacidad y el patrón de adherencia a células HEp-2 (células de cáncer laríngeo humano) de 365 cepas aisladas de 71 niños menores de 5 años.

OBJETIVOS PARTICULARES.

-Adiestramiento en la preparación y utilización de medios de cultivo para crecer bacterias.

-Realizar el aislamiento y tipificación bioquímica de las cepas en estudio.

-Aprender el manejo y preparación de medios de cultivo para líneas celulares.

-Investigar el patrón de adherencia a células HEp-2 de las cepas de E. coli.

HIPÓTESIS.

-Las cepas patógenas de Escherichia coli asociadas a diarrea en niños, presentan algún tipo de adherencia: agregativa, localizada o difusa a células HEp-2, y estarán relacionados a algún tipo clínico de diarrea.

MATERIAL Y METODO.

A) Cepas en estudio.

Se trabajo con 365 cepas de Escherichia coli obtenidas de marzo a julio de 1998, de 71 niños menores de cinco años hospitalizados por cuadros diarreicos, internados en las unidades del IMSS: Tlatelolco, Gabriel Mancera y Villa Coapa en la Ciudad de México.

B) Aislamiento e identificación.

En el hospital de procedencia se usa el método siguiente: se toma una muestra y se siembra en agar MacConkey. A partir de esta caja de Petri se seleccionan colonias típicas de E. coli lactosa positivas. Se siembra cada cepa en tubos 13X100 con agar inclinado. En este medio se transportan las cepas al laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina en el cual a cada cepa se le corrobora la especie por medio del sistema de identificación automatizado (Vitek). Se conservan las cepas E. coli en medios de huevo (Dorset) a temperatura ambiente.

A partir de las muestras en frasco Dorset, se corrobora su pureza sembrándola en agar sangre y agar MacConkey incubándose a 37°C por 24 hrs. Del medio MacConkey se

siembra en tubo 13X100 mm. con rosca en agar soya tripticasa (TSA) de donde se toma una asada para el ensayo de adherencia.

C) Origen de las células.

La línea celular HEP-2 de tipo epitelial, procede de cultivos certificados por la American Type culture collection (ATCC), Rockville, Maryland, obtenidas de cáncer laríngeo humano.

D) Ensayo de adherencia a células HEP-2.

Se empleó la técnica descrita por Cravioto y col. en 1979. Del medio de TSA se toma una asada sembrándola en 3 ml. de caldo Triptona con D-manosa al 1% en tubos 13X100 mm. con tapa, se incubó a 37°C durante 18 hrs. en estufa con agitación.

La prueba se desarrolla colocando una lenteja de vidrio de 1 cm de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno a los cuales se les agregó una suspensión de células HEP-2 a una concentración de 2.5×10^6 células por ml aproximadamente. Posteriormente la placa se incubó durante un lapso de 18-24hrs a 37°C con CO₂ al 5%, hasta formar una monocapa al 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. Finalmente se le agregó un mililitro de medio DMEM conteniendo una suspensión de la

cepa en estudio previamente crecida por 18 hrs. en caldo Triptona, D-manosa al 1% y a una concentración de bacterias de 1.5×10^8 UFC/ml.

Las placas se incubaron durante tres horas, se eliminó el medio y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos, las lentes con células y bacterias se fijaron con metanol durante un minuto y se tiñieron con colorante Giemsa 20 minutos. Para quitar el exceso de colorante se lavaron con agua destilada tres veces. La lenteja con células y bacterias se deshidrató con acetona, acetona-xileno y xileno. Posteriormente se realizó el montaje directo de las lentes en un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá y permitiéndole un secado de 24 hrs. La observación se realizó en un microscopio óptico (Carl Zeiss) en campo claro en un aumento de 100X con aceite de inmersión. En los casos pertinentes se realizó un registro microfotográfico. Para considerar una cepa positiva, esta debía presentar bacterias adheridas en el 40% o más de las células de la preparación.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Ji-cuadrada en la búsqueda de significancia de la frecuencia de algún tipo de adherencia: agregativa, difusa y localizada.

cepa en estudio previamente crecida por 18 hrs. en caldo Triptona, D-manosa al 1% y a una concentración de bacterias de 1.5×10^8 UFC/ml.

Las placas se incubaron durante tres horas, se eliminó el medio y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos, las lentes con células y bacterias se fijaron con metanol durante un minuto y se tiñeron con colorante Giemsa 20 minutos. Para quitar el exceso de colorante se lavaron con agua destilada tres veces. La lenteja con células y bacterias se deshidrató con acetona, acetona-xileno y xileno. Posteriormente se realizó el montaje directo de las lentes en un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá y permitiéndole un secado de 24 hrs. La observación se realizó en un microscopio óptico (Carl Zeiss) en campo claro en un aumento de 100X con aceite de inmersión. En los casos pertinentes se realizó un registro microfotográfico. Para considerar una cepa positiva, esta debía presentar bacterias adheridas en el 40% o más de las células de la preparación.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Ji-cuadrada en la búsqueda de significancia de la frecuencia de algún tipo de adherencia: agregativa, difusa y localizada.

RESULTADOS.

En el presente trabajo se estudiaron 365 cepas de E. coli aisladas de 72 niños con síndrome diarreico grave que requirió su hospitalización.

El ensayo de adherencia se las 365 cepas mostro 37% de estas con alguno de los patrones de adherencia descritos, siendo la adherencia agregativa la más común observándose en el 26% (94/365) de las cepas (Tabla 2).

Analizando el patrón de adherencia con respecto al tipo de diarrea observamos que la adherencia de tipo agregativo fue más común en los casos de diarrea aguda con y sin presencia de sangre (Tabla 2).

La adherencia difusa se observó principalmente en niños con diarrea agua, sin embargo, en esto se identificó otro patógeno.

Resulta interesante que el grupo de E. coli que presentó adherencia localizada, se asocio únicamente a casos de diarrea aguda sin sangre (Tabla 2). Al establecer la relación entre serogrupos y adherencia localizada se encontro que algunas de estas sepas pertenecen a los serogrupos descritos clásicamente como EPEC (Tabla 3). Con respecto a los otros tipos de adherencia los serotipos fueron muy variados. Con respecto a las cepas no adherentes en estas se identificaron serotipos que corresponden a algunos de los grupos diarrogénicos de

E. coli. (Tabla 3). Las tablas 4a y 4b muestran la asociación de E. coli con otros patógenos, en estas se puede observar que Shigella sp. y rotavirus fueron los microorganismos con los que más frecuentemente se presentó asociación, sin embargo, es importante mencionar que el serotipo identificado se encontraba por lo menos 8 de las colonias analizadas. Lo anterior sugiere que el niño estaba colonizado por la sepa de E. coli identificada.

Las cepas de E. coli identificadas se asociaron principalmente con rotavirus en los casos de diarrea de tipo secretor y en menor proporción en cuadros de diarrea aguda con sangre (Tabla 5).

En el estudio se encontró que E. coli se presentó como único patógeno en el 15% de los niños, observándose tanto en casos de diarrea inflamatoria como de tipo secretor (Tabla 6), de manera interesante el 80% de estas cepas no fueron adherentes.

Tabla 2. Correlación entre el tipo clínico de diarrea y adherencia a células HEp2.

Tipo de diarrea.	No adherentes	Adherencia agregativa.	Adherencia difusa.	Adherencia localizada.	Desprendimiento celular.	Total:
Aguda sin sangre 44 pacientes (62%)	115	55	11	10	7	198
Aguda con sangre 24 pacientes (34%)	93	37	5	---	5	140
Diarrea persistente 1 paciente (1%)	3	1	---	---	---	4
Sin datos 3 pacientes (3%)	20	1	1	1	---	23
Total: 72 pacientes	231 (63%).	94 (26%).	17 (5%).	11 (3%).	12 (3%).	365

Total de cepas adherentes: 122 (34%).

Tabla 3. Relación entre el tipo de adherencia y los serotipos más frecuentemente encontrados.

Tipo de adherencia.	*Serotipo.		
No adherentes.	O7:H10	O27:H7	O6:H1
	O88:H25	O7:H-	O86:H-
Agregativa	O25:H4	O?: H-	O27:H7
	O7:H25	O73:H18	O75:H5
Difusa	O7:H-	O7:H10	O8:H32
Localizada	O125ab:H18	O92:H10	O7:H10
Desprendimiento celular	O8:H9	O7:H18	O86:H47

*Datos tomados de los registros del laboratorio de serología del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

Tabla 4a. Asociación de E. coli con otros patógenos.

SEROTIPO	TIPO DE DIARREA	*OTRO PATÓGENO
O86 H:-	Aguda con sangre	Rotavirus
O20 H:-	Secretora	<u>Salmonella enteritidis</u>
O25 H:-	Secretora	<u>Shiguella disenterae</u>
O175 H27	Secretora	Rotavirus
O146 H8	Aguda con sangre	Adenovirus
O44 H18	Inflamatoria	Rotavirus
O91 H:-	Secretora	Rotavirus
O146 H8	Aguda con sangre	<u>Salmonella enteritidis</u>
O86 H18	Secretora	Rotavirus
O89 H9	Secretora	Rotavirus
O88 H25	Secretora	<u>Shiguella sonnei</u>
O88 H25	Secretora	<u>Shiguella sonnei</u>

*Datos tomados de los registros del IMSS.

Tabla 4b. Asociación de E. coli con otros patógenos.

SEROTIPO.	TIPO DE DIARREA.	OTROS PATÓGENOS.
O155 H:-	Secretora	<u>Shigella flexneri</u>
O169 H41	Secretora	Rotavirus
O? H10	Secretora	Rotavirus
O125ac H:-	Secretora	<u>Aeromona caviae</u>
O7	Secretora	<u>Shigella sonnei</u> <u>Campilobacter jejuni</u> Rotavirus
O130 H18	Secretora	<u>Salmonella enteritidis</u>
O? H10	Secretora	<u>Shiguella sonnei</u>
O41 H:-	Inflamatoria	<u>Shiguella sonnei</u>
O25 H4	Inflamatoria	<u>Shiguella sonnei</u>
O23 H25	Secretora	Adenovirus
O21 H:-	Secretora	Rotavirus
O21 H10	Secretora	<u>Salmonella choleresuis</u>

Tabla 5. Asociación entre *E. coli* con virus y tipo de diarrea.

Serotipo.	Tipo de diarrea.	Virus.
O86 H:-	Aguda con sangre	Rotavirus
O44:H18	Inflamatoria	Adenovirus.
O91 H:-	Secretora	Rotavirus
O89 H:-	Secretora	Rotavirus
O169 H41	Secretora	Rotavirus
O? H10	Secretora	Rotavirus
O21 H:-	Secretora	Rotavirus
O21 H:-	Secretora	Rotavirus
O23:H25	Secretora	Adenovirus
O21 H:-	Secretora	Rotavirus
O146:H8	Aguda con sangre	Rotavirus
O146:H8	Aguda con sangre	Rotavirus

Tabla 6. Frecuencia en la E. coli se identificó como único patógeno en los diferentes tipos de diarrea.

Serotipo.	Tipo de diarrea.	Tipo de adherencia
O27:H7	Secretora.	A. (-)
O2:H6	Inflamatoria	A. (-)
O155:H19	Inflamatoria	A. (-)
O141:H26	Secretora	A. (-)
O21:H26	Secretora	A. (-)
O22:H1	Secretora	A. Localizada
O82:H8	Secretora	A. (-)
O162 H:-	Inflamatoria	A. (-)
O155:H19	Inflamatoria	A. (-)
O18 H7	Secretora	A. Agregativa
O75:H5	Inflamatoria	A. (-)

A. (-): Adherencia negativa (no adherentes).

PRUEBA ESTADÍSTICA (JI-CUADRADA).

Se realizó un estudio sobre ensayos de adherencia que tiene tres probabilidades de resultado en células HEp-2: adherencia agregativa, adherencia difusa y adherencia localizada. Para determinar este factor de virulencia, la adherencia de 365 cepas de Escherichia coli aisladas de 72 niños menores de 5 años, hospitalizados por diarrea. Se determinará por cual tipo de adherencia presenta más las cepas adherentes. Los resultados son los siguientes:

Frecuencia	Tipo de adherencia.		
	Agregativa	Difusa	Localizada
Observada	94	17	11
Esperada	40.66	40.66	40.66

¿Presentan estos datos una evidencia que indique alguna frecuencia por algún tipo de adherencia? Use un alfa $\alpha=0.05$

Ho: $P_1=P_2=P_3$ ($1/3=0.20$).

Ha: $P_1 \neq P_2 \neq P_3$

$P_i=0.20$ $n=122$ $nP_i=40.66$ que se esperará por tipo de adherencia.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(n_i - nP_i)^2}{nP_i} \quad K=3, \text{ grados de libertad } K-1=2$$

$$\chi^2 = \frac{(94 - 40.66)^2}{40.66} + \frac{(17 - 40.66)^2}{40.66} + \frac{(11 - 40.66)^2}{40.66}$$

$$\chi^2 = 105.37 \quad X^2 = 0.103$$

Estos datos si presentan evidencia para una frecuencia de algún tipo de adherencia, que por los datos arrojados es a las cepas agregativas.

Al realizar el análisis estadístico se encontró que la adherencia es un factor de patogenicidad importante.

DISCUSIÓN.

Existen evidencias epidemiológicas que incriminan a los diferentes serogrupos de Escherichia coli como agentes responsables de la patogénesis de la diarrea, observándose una tasa muy alta de morbilidad infantil en diferentes regiones del mundo, principalmente en países en desarrollo. (Levine, 1987).

En este estudio se trabajo exclusivamente con niños menores de 5 años que presentaban un cuadro clínico de diarrea. El análisis del tipo de diarrea confirma lo observado en otros estudios (Cravioto y col., 1988a) en los cuales se señala que la diarrea de tipo secretor es el más común en niños menores (Tabla 2), sin embargo, es importante señalar que la diarrea de tipo inflamatorio se presento en una tercera parte de los niños estudiados.

Cravioto y cols. (1979) observaron que el grupo enteropatógeno de E. coli se adherían a cultivos de células HEP-2, formando microcolonias. Posteriormente Nataro y col. (1985) describieron diferentes patrones de adherencia señalando como localizado al observado por Cravioto (1979) y otras dos más que denominaron difuso y agregativo.

Estos datos si presentan evidencia para una frecuencia de algún tipo de adherencia, que por los datos arrojados es a las cepas agregativas.

Al realizar el análisis estadístico se encontró que la adherencia es un factor de patogenicidad importante.

DISCUSIÓN.

Existen evidencias epidemiológicas que incriminan a los diferentes serogrupos de Escherichia coli como agentes responsables de la patogénesis de la diarrea, observándose una tasa muy alta de morbilidad infantil en diferentes regiones del mundo, principalmente en países en desarrollo. (Levine, 1987).

En este estudio se trabajo exclusivamente con niños menores de 5 años que presentaban un cuadro clínico de diarrea. El análisis del tipo de diarrea confirma lo observado en otros estudios (Cravioto y col., 1988a) en los cuales se señala que la diarrea de tipo secretor es el más común en niños menores (Tabla 2), sin embargo, es importante señalar que la diarrea de tipo inflamatorio se presento en una tercera parte de los niños estudiados.

Cravioto y cols. (1979) observaron que el grupo enteropatógeno de E. coli se adherían a cultivos de células HEp-2, formando microcolonias. Posteriormente Nataro y col. (1985) describieron diferentes patrones de adherencia señalando como localizado al observado por Cravioto (1979) y otras dos más que denominaron difuso y agregativo.

Las cepas de E. coli con capacidad de adherencia de tipo localizado se han aislado significativamente con mayor frecuencia de niños con diarrea secretora aguda. (Levine, 1984; Cravioto, 1991). Con respecto a la adherencia de tipo difuso se ha observado que no existe asociación entre este patrón de adherencia de diarrea en niños (Cravioto, 1991). En lo que se refiere a las cepas con adherencia agregativa, diversos estudios realizados en varias partes del mundo, muestran que las cepas enteroagregativas de E. coli se relaciona significativamente con cuadros de diarrea persistente en niños (Bhan, 1989; Cravioto, 1991).

En el presente trabajo se estudiaron cepas de E. coli aisladas de niños con síndrome diarreico grave que requirió de la hospitalización de estos niños. Al hacer el análisis de resultados para conocer si existía asociación entre el tipo clínico de diarrea y el patrón de adherencia, se encontró que los datos eran similares a los obtenidos previamente por Cravioto y cols. (1991), con la diferencia de que el patrón de adherencia más frecuentemente identificado fue el de tipo agregativo observándose en niños con diarrea aguda con y sin presencia de sangre. (Tabla 2).

La adherencia difusa se observó en niños con diarrea aguda en quienes se identifico otro patógeno, al respecto se puede señalar como ya ha sido reportado (Cravioto, 1991), que las cepas de E. coli con adherencia difusa no tienen importancia clínica en la patogénesis de la diarrea, nuestro estudio corrobora lo anterior y sugiere que la diarrea observada puede estar relacionada con los otros patógenos identificados.

El grupo de E. coli que presento adherencia localizada, se asocio principalmente a casos de diarrea aguda sin sangre, resultando que correlaciona con lo descrito para E. coli enteropatógena (Levine, 1985). Por lo tanto resulto relevante observar que algunas de estas cepas pertenecen a los serogrupos descritos clásicamente como EPEC sugiriendonos que probablemente en México existen serogrupos autóctonos que deben ser incluidos para tener un esquema más completo de este grupo de bacterias.

Resulta importante observar que el 86% de las cepas que presentan adherencia correspondiente a los patrones localizada y agregativa que se han relacionado en otros estudios de niños con cuadros de diarrea (Cravioto, 1991; Bhan, 1989). Con respecto a las cepas de E. coli que no fueron adherentes, se aislaron de niños en los que esta bacteria fue el único patógeno.

Este trabajo presenta información actualizada con respecto a la importancia de E. coli en la patogénesis de la diarrea, sin embargo, para tener información más completa se requiere además de la adherencia, determinar otras propiedades de virulencia como la producción de enterotoxinas y la identificación de cepas nocivas.

Conclusión.

- 1) El presente trabajo muestran datos importantes de la etiología y epidemiología de la diarrea.

- 2) Aunque sólo se analizó una de las propiedades relacionadas con la diarrea, se pudo observar que un porcentaje alto de las cepas presentan un patrón de adherencia característico de cepas patógenas.

- 3) Se requieren más estudios con respecto a otras propiedades de virulencia, sin embargo, los resultados obtenidos confirman que E. coli es uno de los patógenos bacterianos más frecuentemente relacionados con diarrea.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Baldini, M. M. ; J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. A. Candy, and H. W. Moon: 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2:534-538.
- 2.-Baldwin T. J. , Knuttons, Sellers L. 1991. Enteroaggregative Escherichia coli strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. *Infect Immun* 60:2092-2095.
- 3.-Batt R. M., C. A. Hurt, J. Fletcher, H. Embaye, B. Getty and J. R. Saunders. 1988. Genes responsible for localized adhesion and brush damage are encoded on a single 965 Kbp plasmid in enteropathogenic Escherichia coli O111. *Gastroenterol A28 Abstracts of papers.* 94:(5). Part. 2.
- 4.-Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143: 325-345.
- 5.-Benitez O., Uribe F., Navarro A., Hernández D., Ruiz J., and Cravioto A. 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Bol Med Hosp Inf Mex* 48:65-70.
- 6.-Bhan M. K., P. Raj M.M., Levine J. B., Kaper J., Bhandari N., Srivastava R., Kumar R. and Sazawals. 1989. Enteroaggregative Escherichia coli associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis* 159:1061-1064.
- 7.-Binns, M. M. 1985. Molecular genetics of virulence in Shigella. *Microbiol Scien* 2:275-278.
- 8.-Bray, J. 1945. Isolation of antigenically homogenous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. *J Pathol Bacteriol* 57:239-247.

- 9.-Browner R.M. 1987. Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis* 9:28-53.
- 10.-Cook E.M. 1968. Properties of strains of Escherichia coli isolated from the feces of patients with ulcerative colitis, patients with acute diarrhea and normal persons. *J Pathol Bacteriol* 95:101.
- 11.-Costerton, J.W.; R. T. Irvin and K. J. Cheng. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 35; 299-324.
- 12.-Cravioto A. Gross S., Scotland and Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3:95-99.
- 13.-Cravioto A., Scotland S. and Rowe B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens 1 y II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. *Infect Immun* 36:189-197.
- 14.-Cravioto. A. , Reyes, R.; Ortega, R. Fernández, G.; Hernández, R. and López. 1988(a). Prospective study of diarrhoeal disease in cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem Inf* 101:123-134.
- 15.-Cravioto A., Tello A. Navarro A., Ruiz J., Villafan H., Uribe F., Eslava, C. 1991. Association of Escherichia coli H₁₀-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337:262-264.
- 16.-De Graff F.K. 1990. Genetic of adhesive fimbriae of intestinal Escherichia coli. *Curr Top Microbiol Immunol* 151:29-53.
- 17.-De S. N., Bhattachary A. K., Sarkar J. K. 1956. A study of the pathogenicity of strains

- of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J Pathol Bacteriol* 71:201-206.
- 18.-Duguid, J. P. and D. C. Old. 1980. Adhesive properties of enterobacteriaceae. In: Bacterial Adherence. E. H. Beachey (ed.) Chapman and Hall Publish, London. pp 187-217.
- 19.-Dupont H. L., Formal S.B., Hornick R. B., Snyder M. J., Libotani J.P., Sheahan D. G., Labrec E. H. and Kalas J.P. 1971. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *N Engl J Med* 285:1-9.
- 20.-Embaye H., Odedra R.M, Fletcher J.N., Hart C.A., Geyid A., Ljungh A. 1996. Identification of potentially invasive Escherichia coli strains isolated from children in Ethiopia. *Gastroenterol* 110:A903.
- 21.-Eslava C., Villaseca J.M., Cravioto A. 1994. Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea. En: Giono C.S. y col. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. (INDRE). pp. 251-265.
- 22.-Evans, D. G.; R. P. Silver; Evans D. J., Chase D. G., and Gorbach S. L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. *Infect Immun* 12:656-667.
- 23.-Evans D. G., D. J. Evans Jr., W. S. Tjoa, and H. L. Dupont. 1978. Detection and characterization of a colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. *Infect Immun* 19:727-736.
- 24.-Formal S., Hornick R. B. 1978. Invasive Escherichia coli. *J Infect Dis* 137:641-647.
- 25.-Giron J. A., Joes T., Millan V. F. 1991. Dufusse adhering Escherichia coli (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in México. *J Infect Dis* 163:507-513.

- 26.-Gomez I.A.I., Blak P., Trabulsi L. 1989. Prevalence of Escherichia coli strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol* 27:266-269.
- 27.-González, E. y Blanco, J. 1987. Propiedades de los Escherichia coli causantes de diarrea en seres humanos. Universidad de Santiago de Compostela. pp. VII-VIII, 9-11, 71-72, 111-146.
- 28.-Guerrant R. 1990. Principles and syndromes of enteric infection. In: Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett, E.J. Principles and practice infectious diseases. 3 Ed. Churchill Livingstone. New York.
- 29.-Holmgren, J. 1985. Toxins affecting intestinal transport processes. In: The virulence of Escherichia coli. M. Sussman (ed). Academic Press, N. Y. p. 177-191.
- 30.-Hullan S., Guang Z.L., Mathan. 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: A multicentre study in five countries. *Bull WHO* 89:542.
- 31.-Jerse A. E., Kaper J. B. 1991. The eae gene of enteropathogenic Escherichia coli encodes a 94 kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* 59:4302-4309.
- 32.-Karmali M. A., Petric M., Steele B.T., Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools. *Lancet* i:619-620.
- 33.-Kauffman F. 1947. The serology of the coli group. *J Immunol* 57:71-100.
- 34.-Knutton S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic 23.-Escherichia coli to human mucosal enterocytes and cultured human intestinal mucosa.

Infect Immun 55:69-77.

- 35.-Knutton S. Baldwin T., Williams P. H., Mcneish A. S. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 57:1290-1298.
- 36.-Kupersztoch Y.M., Tachias K., Mooman C.R. 1990. Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STb): energy and-sec A-dependent conversion of pre STb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J Bacteriol* 172:2427-2432.
- 37.-Law, D. 1989. Virulence factors of enteropathogenic Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea in somalia. *J Clin Microbiol* 26:524-529.
- 38.-Levine, M. M. and Edelman, R. 1984. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 6:31-51.
- 39.-Levine M. M.; J. P. Nataro, H. Karch. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 152:550-559.
- 40.-Levine M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-388.
- 41.-Levinson, W.E. y Jawetz, E. 1992. Microbiología e inmunología Médicas. El Manual Moderno. México, D. F. pp. 135, 140-144.
- 42.-Moon H.W., Whipp S. C. , Argenzio, R. A. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestins. *Infect*

Immun 41:1340-1351.

43.-Nataro, J. P.; I.C. A., Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine and L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 48:378-383.

44.-Nataro J. P., Kaper J. B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M. M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis* 6:829-831.

45.-Nataro, J. P. Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.

46.-Neter E., Shuymaway C. 1950. Escherichia coli d 433: Occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. *Proc Soc Exp Biol Med* 75:504-507.

47.-Nicoletti M., Superti F., Conti C., Calconi A. and Zagaglia C. 1988. Virulence factors of lactose-negative Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea in Somalia. *J Clin Microbiol* 26:524-529.

48.-Ofek, I. and E. H. Beachey. 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: bacterial adherence. E. H. Beachey (ed). Chapman and Hall Publish. London. pp. 3-29.

49.-Orskov F., Whittam T.S., Cravioto A., Orskov Y. 1990. Clonal relationships among classic enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) belonging to different O groups. *J Infect Dis* 162:76-81.

50.-Pérez, G. 1983. Toxina termolábil (TL) de Escherichia coli. *Infectologia*. 5:223-232.

- 51.-Pickett C.L., Twiddy E.M., Coker C. 1989. Cloning nucleotide sequence and hybridization studies of the type IIA heat-labile enterotoxin gene of Escherichia coli. *J Bacteriol* 171:4945-4952.
- 52.-Polotsky, Y. U. E., E. M. Dragunskaya, V. G. Seliverstova, T. A. Avdeeva. 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic Escherichia coli and Escherichia coli causing infantile diarrhoea. *Acta Microbiol. Hung.* 24:221-236.
- 53.-Ramirez Z., L. F. 1996. Síndrome diarreico aguda. En: Restrepo M., A. y col. *Fundamentos de Medicina. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín, Colombia.* p. 150.
- 54.-Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Well, B. R. Davis. 1982. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med* 308:681-685.
- 55.-Robins-Browne R.M. 1987. Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis* 9:28-53
- 56.-Rothbaum, R. A. J. McAdam, R. Gianella, and J. C. Partin. 1982. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterol* 83:441-454.
- 57.-Sansone P., Kopecko D. A., Formal S. B. 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri. *Infect Immun* 35:852-860.
- 58.-Scaletsky, I.C. A., M. L. Silva and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *Infect Immun* 45:534-536.
- 59.-Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, M. R. F. Toledo, B. R. Davis, P. A. Blake, and L. R.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Trabulsi. 1985. Correlation between adheren to HeLa cell and serogroups, serotypes, and bioserotypes of Escherichia coli. *Infect Immun* 49:528-532.

60.-Scaletsky, I. C. A., S. R. Milani, L. R. Trabulsi and L. R. Travassos. 1989. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 56:2679-2683.

61.-Sharon, N., Y. Eshdt, F. J. Silverblatt and I. Ofek. 1981. Bacterial adherence to cell surface sugars. In.: Adhesion and microorganism pathogenicity. Pitman Medical, Tunbridge Wells. (Ciba Foundation Symposium 80) pp. 119-141.

62.-Smyth, C. J. 1982. Two mannose-resistant heamagglutinis which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. *Infect Immun* 55:86-92.

63.-Sohel I, Puente J. L., Murria W. J. 1993. Cloning and characterization of the bundleforming pili gene of enteropathogenic Escherichia coli and its distribution in Salmonella serotypes. *Molec Microbiol* 7:563-575.

64.-Sprangler B.D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heatlabile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56:662-647.

65.-SSA. 1988. Encuesta sobre práctica y prevalencia de la terapia de rehidratación oral (EPPTRO) en 1987. México.

66.-Suarez-Hoil G.J., Flores-Abuxapqui J.S., Heredia-Navarrete, M. 1993. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Bol Méd Hosp Infant Méx* 50:151.

67.-Sussman, M 1985. Escherichia coli in human and animal disease. In. The virulence of

Escherichia coli. M. Sussman (ed). Academic Press. N. Y. p. 7-45.

68.-Ulshen M. H. y Rolf J. L. 1980. Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man another mechanism. *N Engl Med* 302:99-114.

69.-Valdespino J., García, M., Der Río, A., Salcedo, A. 1994. Magnitud y trascendencia de las infecciones gastrointestinales. En: Giono C.S. y col. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). pp. 3-50.

70.-Varela G. A., Aguirre y J. Carrillo. 1946. Escherichia coli "Gómez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. *Bol Med Hosp Infant Méx.* 3:623-627.

71.-Wells J.G., Davis B.R., Wachmuth I.K., Riley L.W., Remis R. Sokolow R., Morris G.K. 1983. Laboratory investigation of haemorrhagic colitis outbreaks associated with rare E. coli serotype. *J Clin Microbiol* 18:512-520.

72.-Whittam T.S., Wachsmuth I. K., Wilson R. A. 1988. Genetic evidence of clonal descent of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 157:1124-1133.

73.-Willshaw G. A., McConell M. M., Smith H. R., Rowe B. 1990. Structural and regulatory genes for coli surface associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmids in enterotoxigenic Escherichia coli strains of serotype O25:H42. *FEMS Microbiol Lett* 68:225-260.

74.-Wolf, M. K., Andrews G. P., Tall B. D., McConnell, M. M., Levine M. M. and Boedeker E. C. 1989. Characterization of CS4 and CS6 antigenic components of PCF8775, a putative colonization factor from enterotoxigenic Escherichia coli E8775.

Infect Immun 57:164-173.

75.-Yoshimura S., Ikemura H., Watanabe H. 1985. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli *FEBS. Lett* 181:138-142.



FIGURA 1. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli durante 3 hrs. Se aprecia la microcolonia típica de la adherencia localizada.



FIGURA 2. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli durante 3 hrs. Se aprecia las bacterias distribuidas en toda la superficie celular típica de la adherencia difusa.



FIGURA 3. Monocapa de células HEp-2, inoculada con Escherichia coli durante 3 hrs. Se aprecia las bacterias pegadas en empalizada tanto a la célula como al vidrio de la preparación, que corresponde a la adherencia agregativa.

AGAR INCLINADO (MEDIO ESPECIAL).

Para un litro de agua destilada:

-Base de gelosa sangre: 20 g.

-Agar bacteriológico: 15 g.

-Extracto de carne: 1.5g

Ajustar el pH a 7.4.

Se esteriliza durante 20 min. a 15 lb de presión.

MEDIO DE HUEVO. (DORSET).

-1 Kg. de huevo.

-Sol. de iodo al 40%.

-3 litros de alcohol al 70%.

Se pone a esterilizar a 15 min. a 15 lb de presión lo siguiente:

-Matraz de 3 litros, con una pulgada de perlas de vidrio, 200 ml. de sol. salina y embudo puesto, envuelto para esterilizar.

-Guantes.

-200 frascos viales.

-Gasas.

-200 tapones para vial.

Con los guantes puestos se lavan los huevos en la solución de yodo. Se enjuagan y se meten en alcohol, al empaque del huevo se les pone las gasas estériles, para que no tengan contacto con el cartón. Bajo la flama de 2 mecheros se van vaciando los huevos en el embudo con solución salina y perlas. Se revuelven y se le pone a cada vial 5 ml. Se tapan envolviendo la tapa con cinta adhesiva. En la coaguladora a 85°C se dejan 12 min.

SOLUCIÓN SALINA.

8.75 grs. de cloruro de sodio para cada litro de agua destilada.

TRIPTONA.

Se prepara al 1%. En tubos 13X100 mm con rosca y tapa se les coloca 3 ml.

Se esteriliza 15 min. a 15 lb de presión. Se guardan en refrigeración.

D-MANOSA.

Se prepara al 10% con agua destilada. Se filtra con un poro de 0.25 micras vaciandolo en un contenedor estéril. Para que este al 1% en los tubos de triptona, se les agrega a estos bajo el mechero, 300 microlitros. Se guarda en refrigeración.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS).

-8 grs. de cloruro de sodio.

-0.2 grs. de cloruro de potasio.

-1.15 grs. de fosfato de sodio dibásico.

-0.2 grs. de fosfato de potasio monobásico.

Se diluyen los ingredientes en 1 litro de agua desionizada.

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza a 15 lb de presión durante 30 min.

MEDIO DMEM PARA LAS CÉLULAS HEP-2.

-1 litro de agua desionizada.

-Medio Mínimo Esencial (MEM) al 10%.

-Suero fetal bovino al 10%.

-Glutamina (2 mM) al 1 %.

-Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5%, concentración final al 1%.

-HEPES (10 mM) al 1%.

-Antibiótico (estreptomicina 100 mg/ml y penicilina 100 000 UI/ml) al 1%.

Se filtra con un poro de 2.5 micras.

Material para laboratorio en el manejo de las células se esteriliza durante 30 min. a 15

lb de presión.