

Universidad Nacional  
Autónoma de México

CAMPUS IZTACALA

**"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
EXTRACTOS VEGETALES CONTRA  
CEPAS DE *Escherichia coli*  
DE ORIGEN CLINICO"**

**T E S I S**

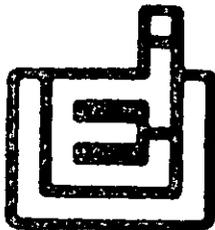
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:  
SANDRA VAZQUEZ ALATORRE**

**DIRECTOR DE TESIS:  
M. EN C. ROSARIO RUIZ DE ESPARZA VILLARREAL**

Los Reyes Iztacala, México, Edo. Méx.

Enero del 2001





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.

**DEDICADA A MIS PADRES Y HERMANOS QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO SU APOYO QUE GRACIAS A ELLOS AHORA HE CUMPLIDO UNA DE MIS METAS.**

**A TODOS MIS COMPAÑEROS DE CARRERA CON LOS CUALES COMPARTÍ MUCHAS EXPERIENCIAS INCLUYENDO SU AMISTAD.**

**A MIS PROFESORES DE QUIENES APRENDÍ MUCHO Y QUE AHORA SON MIS AMIGOS.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco al Dr. Carlos Eslava Campos por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis con su equipo de trabajo en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM.**

**A mi asesora M en C Rosario Ruíz de Esparza Villarreal y al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química UNAM por aceptar este trabajo como parte del proyecto de CONACYT 27991-M "Estudio químico y bacteriológico de plantas usadas para curar la diarrea".**

**Al Dr. José Molina López por su apoyo incondicional y guía que me brindó durante la realización de éste trabajo.**

**Al M en C Armando Navarro, por su asesoría otorgada durante este proyecto.**

**A Delia Licon, José Luis Méndez, Gabriel Pérez, Luis Antonio León (El Muerto), Juan Manuel Hernández y María Antonia Ramírez por sus consejos y los momentos agradables que me dieron durante mi trabajo.**

**De forma especial a ti Gabriel por tu valiosa ayuda técnica en la elaboración de este escrito, también a ustedes Delia y Pepe pues siempre estuvieron dispuestos a ayudarme con mi trabajo.**

**A mis amigos Laura Morán, Irma Murillo, Gabriela Buschbeck, Raymundo Sánchez y Eduardo Pérez, gracias por brindarme su amistad y apoyo.**

## ÍNDICE

I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN.....	2
Características de <i>Escherichia coli</i> .....	2
Clasificación.....	4
Mecanismos de adherencia de <i>E. coli</i> .....	4
Patrones de adherencia.....	5
<i>E. coli</i> como agente causal de diarrea.....	6
<i>E. coli</i> enteropatogénica.....	6
Mecanismos de diarrea.....	7
Epidemiología.....	7
Transmisión y reservorio.....	8
<i>E. coli</i> enterotoxigénica.....	8
Epidemiología.....	9
Consideraciones clínicas.....	10
<i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	10
<i>E. coli</i> enterohemorrágica.....	11
Epidemiología.....	12
Reservorio animal.....	12
Consideraciones clínicas.....	13
<i>E. coli</i> enteroagregativa.....	13
III ANTECEDENTES.....	15
Diarrea en México.....	15
El uso de plantas medicinales en México.....	15
Historia del uso de plantas medicinales en México.....	16
La herbolaria mexicana como recurso auxiliar en el tratamiento de las diarreas.....	17
Nanche.....	18
Gobernadora.....	18
Geranio.....	19
Guayaba.....	20
2 IV JUSTIFICACIÓN.....	21
3 V OBJETIVO GENERAL.....	22
3 VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 VII HIPÓTESIS.....	22
4 VIII MATERIAL Y MÉTODO.....	23
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS.....	23
IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL CLÍNICO.....	23
TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA.....	24

	Obtención de antígenos somáticos.....	24
	Tipificación de los antígenos somáticos.....	25
	Obtención de antígenos flagelares.....	25
	Tipificación de los antígenos flagelares.....	26
	MATERIAL VEGETAL.....	28
	PREPARACIÓN DE INFUSIONES.....	29
	ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	29
	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA.....	31
5	IX RESULTADOS.....	34
6	X ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41
	Serotipos y origen de las cepas de <i>E. coli</i> .....	41
	Actividad antibacteriana de las infusiones.....	41
	Inhibición de la adherencia.....	42
	Efecto de las infusiones en células HEp-2.....	43
	Posible actividad bactericida de las infusiones sobre las cepas tipo.....	44
	XI CONCLUSIONES.....	45
	XII APÉNDICE.....	46
	XIII BIBLIOGRAFÍA.....	49

## RESUMEN

Las enfermedades diarreicas representan en México, al igual que en muchos países en desarrollo, un problema de salud pública importante. *Escherichia coli*, rotavirus y *Shigella* son algunos de los patógenos de mayor importancia en etapas tempranas de la vida. En México existe, en la práctica, un sistema plural o mixto de atención a la salud en el que coexisten la medicina profesional, la tradicional y la doméstica o casera. Para amplios sectores de la sociedad mexicana y en particular para los indígenas, la medicina tradicional constituye el principal o único recurso para la atención a la salud; para otros, mucho más numerosos, la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la medicina profesional.

En este trabajo se probó la sensibilidad de 184 cepas de *E. coli* aisladas de 42 niños con diarrea a extractos acuosos de corteza de Nanche (*Byrsonima crassifolia*), hojas de Gobernadora (*Larrea tridentata*), hojas de Geranio (*Geranium mexicanum*), hojas y corteza de Guayaba (*Psidium guajava*), además se determinó el efecto de dichos extractos sobre la adherencia a células HEp-2. Las cepas se identificaron por pruebas bioquímicas y se tipificaron serológicamente con antisueros somáticos y flagelares específicos. Los extractos acuosos se prepararon por el método tradicional (té) y se probaron por el método de Bauer y cols. (1966) y Cáceres y cols. (1990). La inhibición de la adherencia se realizó siguiendo el método de Cravioto y cols. (1979) utilizando cepas de *E. coli* con los patrones localizado, difuso y agregativo. De los 5 extractos probados todos mostraron actividad bacteriostática y/o bactericida en diferente proporción observándose que la corteza de guayaba presentó el mayor porcentaje de actividad bacteriostática (74.2%) y la gobernadora el menor (34.5%). La actividad bactericida fue mayor con la gobernadora (14.9%) y menor con el nanche (8.2%). El estudio de inhibición de la adherencia mostró que las cuatro plantas estudiadas nanche, gobernadora, geranio, corteza de guayaba y hoja de guayaba inhiben la adherencia inespecíficamente cuando la concentración de la infusión es mayor disminuyendo dicho efecto al disminuir la concentración de la planta. Se puede concluir que las infusiones de estas plantas tienen componentes con actividad bactericida y bacteriostática y otros que interfieren con la capacidad de adherencia bacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Aunque son numerosos los microorganismos a los que están expuestos los humanos, muy pocos de estos producen enfermedad. La capacidad para inducir una enfermedad está determinada tanto por la virulencia de los gérmenes, como por factores específicos del hospedero. Así tenemos que, la exposición de un individuo a microorganismos virulentos, suele conducir a enfermedad. De modo similar, los pacientes con compromiso, en su estado inmune son susceptibles a ser infectados incluso por microorganismos de la microbiota humana. Dicha microbiota esta constituida por un gran número de microorganismos, algunos de los cuales viven en un estado óptimo de parasitismo realizando funciones importantes para el hospedero tales como digestión de alimentos, transporte de metabolitos e incluso protección contra la colonización por microorganismos patógenos. La fuente principal de los microorganismos patógenos es la exógena, estos entran al organismo a través de una de tres rutas: ingestión, inhalación o penetración directa (Murray, 1997).

Otros factores que determinan las consecuencias de la interacción entre patógeno y hospedero son la fuente de exposición y el tamaño del inóculo. Muchos microorganismos patógenos tienen un tropismo limitado de órganos o células en los que son capaces de replicarse, es importante tener presente que el inóculo necesario para provocar enfermedad puede variar mucho dependiendo de factores del hospedero (Murray, 1997).

La diarrea aguda es un síndrome caracterizado por el aumento en el número, volumen de las evacuaciones intestinales y disminución en la consistencia, con una duración menor de 14 días. La complicación más frecuente y mortal de la diarrea infecciosa infantil es la deshidratación, misma que esta en función de las pérdidas de agua y electrolitos; los casos más graves cursan con acidosis metabólica descompensada (Carrada y Avila, 1991).

### **Características de *Escherichia coli***

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos con importancia clínica. Los miembros de esta familia en general se encuentran

en el suelo, el agua y la vegetación, forman parte de la microbiota intestinal de la mayoría de los animales, incluyendo al hombre. Las enterobacteriáceas tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa, reducen el nitrato a nitrito y son catalasas positivas y oxidasas negativas. La ausencia de actividad citocromo oxidasa es una característica importante que permite diferenciar durante la identificación las enterobacteriáceas de otros bacilos Gram negativos fermentativos y no fermentativos (Murray, 1997).

*Escherichia coli* es una bacteria anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae* que se presenta en forma abundante en las heces en concentraciones de  $10^7$  a  $10^8$  bacterias por gramo de estas (Cravioto y cols 1996a).

*E. coli* puede ser recuperada fácilmente de una muestra clínica con un medio general o selectivo, cultivando a 37°C bajo condiciones aerobias, frecuentemente es recuperado en agar MacConkey, en el cual forma colonias de color rosado ya que es un organismo fermentador de lactosa o Agar eosin azul de metileno (EMB), en los cuales crecen selectivamente miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Para propósitos clínicos o epidemiológicos, las cepas de *E. coli* son seleccionadas de placas de agar después de una presuntiva identificación visual. Sin embargo, este método debe ser usado cuidadosamente, porque aunque cerca del 90% de las cepas de *E. coli* son lactosas positivas; existen biotipos no fermentadores de lactosa (Cravioto y cols 1996a).

Desde el punto de vista bioquímico las cepas de *E. coli* asociadas a la producción de diarrea no se distinguen de cepas no patogénicas presentes en el intestino. Por tal motivo las cepas de *E. coli* patógenas solo pueden diferenciarse siguiendo un sistema de tipificación serológica desarrollado por Kauffman en 1947, basado en la presencia de dos antígenos comunes a la mayoría de las enterobacterias, el somático (O) formado por la porción polisacárida de la molécula del lipopolisacárido, presente en la membrana externa de la bacteria. El otro antígeno es el flagelar (H), formado por flagelina que constituye el órgano de locomoción de esas bacterias. Actualmente el esquema para la tipificación de *E. coli* comprende 175 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H) (Orskov y Orskov, 1984).

## **Clasificación**

El desarrollo de modelos *in vivo* e *in vitro* así como las técnicas de biología molecular han facilitado la caracterización de las cepas de *E. coli* productoras de diarrea mismas que en la actualidad se clasifican en los siguientes cinco grupos (Levine, 1987, Nataro y Kaper 1998):

- 1) Enteropatógeno (EPEC)
- 2) Enterotoxigénico (ETEC)
- 3) Enteroinvasivo (EIEC)
- 4) Enterohemorrágico (EHEC)
- 5) Enteroagregativo (EAEC)

## **Mecanismos de adherencia de *E. coli***

Para que un microorganismo produzca enfermedad requiere establecerse en el epitelio de su hospedero. La adherencia es el primer evento que realiza el microorganismo para colonizar los tejidos del hospedero. La adherencia inicial puede ser inespecífica y realizarse mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, etc. y posteriormente a través de la interacción de estructuras de la superficie bacteriana conocidas actualmente como adhesinas. El proceso de adherencia a su vez requiere un receptor sobre la superficie celular del hospedero, el cual puede ser de naturaleza glucoproteínica o glucolípida (Murray, 1997).

Ciertas adhesinas juegan un papel significativo en infecciones a nivel de las superficies mucosas en el inicio del proceso patogénico y por lo tanto constituyen factores de virulencia. Sin embargo, su sola presencia en la superficie celular bacteriana no es suficiente para causar enfermedad; se requieren de otros factores responsables del daño (Beachey, 1981).

Las fimbrias o pili son estructuras filamentosas localizadas en la membrana de la bacteria que asemejan hebras que salen a varios nanómetros de la superficie (Duguid y Old, 1980). La composición, dimensión, estabilidad, expresión, antigenicidad y

especificidad de las fimbrias es muy variada. La presencia de adhesinas de morfología fimbrial en *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, y otros, se ha asociado con la capacidad de estas bacterias de adherirse y proliferar en las mucosas del intestino, tracto urinario, tracto respiratorio y genital respectivamente (Beachey, 1981).

Las cápsulas de algunos microorganismos Gram positivos y Gram negativos funcionan como adhesinas en la colonización de las mucosas del hospedero. El lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas parece también conferir atributos de adherencia a ciertos patógenos. Sin embargo, en un número de casos, el LPS purificado de varias especies bacterianas, bloquea competitivamente la adherencia de cepas virulentas de microorganismos heterólogos, sugiriendo una reacción enteramente inespecífica (Ofek y Beachey, 1980 y Sharon y cols 1981).

### **Patrones de adherencia**

Cravioto y cols (1979) desarrollaron un sistema *in vitro* utilizando líneas celulares de carcinoma faríngeo humano (HEp-2) con el cual pudieron establecer que diferentes cepas de *E. coli* asociadas con diarrea presentan distintos patrones de adherencia. Estos tipos de adherencia fueron definidos por Scaletsky y cols (1984) como: Adherencia localizada en donde microcolonias se pegan a una o dos pequeñas áreas sobre las células HeLa (células de cáncer cérvico uterino) o HEp-2; adherencia difusa donde la bacteria cubre a las células uniformemente. Nataro y cols (1987) describieron un tercer tipo de adherencia definido como agregativo, en éste la bacteria tiene un arreglo característico de empalizada sobre la superficie de la célula y sobre el vidrio de la preparación.

La producción de factores tóxicos, la capacidad invasiva del microorganismo o la interferencia con funciones vitales de las células del hospedero son algunos de los componentes de virulencia (Beachey, 1981).

*E. coli* ha resultado ser un buen modelo para entender la importancia de las adhesinas en la virulencia de la bacteria. Las cepas de *E. coli* productoras de diarrea se adhieren a receptores específicos en las células epiteliales del intestino delgado lo cual facilita la

multiplicación de los microorganismos y la liberación de toxinas bacterianas que inducen las alteraciones celulares (Murray, 1997).

### ***E. coli* como agente causal de diarrea**

El conocimiento sobre la frecuencia y distribución de la patología causada por *E. coli*, en especial la diarrea, es limitado cuando menos por dos hechos vinculados entre sí: por un lado la enfermedad no es de notificación obligatoria, y por otro a que su diagnóstico requiere la demostración de los factores de virulencia de estos gérmenes. Por tal motivo, la información sobre la distribución de infección y diarrea por cepas de *E. coli* proviene sólo de estudios epidemiológicos diseñados para tal fin. (Cravioto y cols 1996a)

*E. coli* como típicos patógenos de la mucosa, siguen un patrón de infección:

- 1) Colonización de un sitio en la mucosa.
- 2) Evasión de las defensas del hospedero.
- 3) Multiplicación.
- 4) Daño del hospedero.

Se han descrito tres factores principales por los cuales *E. coli* puede causar diarrea:

- 1) Producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC)
- 2) Invasión (EIEC)
- 3) Adherencia íntima y procesos de señalización celular (EPEC y EHEC)

### ***E. coli* enteropatogénica (EPEC)**

El sello de la infección por EPEC es dado por el fenómeno de adhesión y esfacelamiento A/E, éste se caracteriza por la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial y la destrucción de las microvellosidades de ésta. Cambios en el citoesqueleto que incluyen la acumulación de actina polimerizada, se observan directamente debajo del sitio de adherencia de la bacteria. Como parte del daño se observa en preparaciones de intestino la formación de estructuras denominadas en

pedestal (Nataro y Kaper, 1998).

Varios pasos son involucrados en la producción de la característica histopatológica A/E, marcando tres etapas:

- 1) Adherencia localizada.
- 2) Señal de transducción.
- 3) Adherencia íntima.

### Mecanismos de diarrea

Las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones producidas por EPEC, además de diarrea son la presencia de fiebre en cerca del 60% de los pacientes afectados y síntomas respiratorios hasta en el 50% de ellos.

El periodo de incubación en adultos voluntarios puede ser tan corto como 2.9 h entre la ingestión de la bacteria y la presencia de diarrea. Esta rapidez sugiere que un mecanismo secretor activo es involucrado en la diarrea causada por EPEC y que una variedad de mediadores intracelulares del transporte intestinal como el calcio, proteína cinasa C (PKC), inositol fosfatos y tirosina kinasa, son afectados por la infección de EPEC; lo cual sugiere que estimula o la afluencia de iones positivos o la efluencia de iones negativos a través de la membrana (Nataro y Kaper, 1998).

En la infección de células en cultivo, primero se observa que disminuye la resistencia de la monocapa, lo cual puede resultar en diarrea debido al decremento de la permeabilidad intestinal, algunos reportes clínicos refieren una respuesta local inflamatoria. La diarrea prolongada vista en algunos pacientes puede ser consecuencia de una mala absorción debido a la pérdida del borde en cepillo.

### Epidemiología

El rasgo más notable de la epidemiología de la enfermedad debido a EPEC es la edad de distribución. La infección por este grupo patógeno primariamente es una enfermedad de

infantes de menos de 2 años. Varios brotes de diarrea provocada por EPEC han sido reportados en adultos sanos, presumiblemente debido a la ingestión de un gran inóculo proveniente de un origen común. La enfermedad también ha sido descrita en adultos con una respuesta inmune deficiente.

#### Transmisión y reservorio

Como con otras cepas, la transmisión de EPEC es vía fecal-oral; manos contaminadas, alimentos o fórmula contaminada, sirven como vehículos de contagio. El reservorio de EPEC son los niños y adultos sintomáticos y asintomáticos, incluyendo madres y personas que conviven con los niños sanos.

EPEC es una de las principales causas de diarrea en infantes en ciudades del mundo. Numerosos estudios de casos en seis continentes han descubierto que EPEC se aísla con más frecuencia de niños con diarrea que de controles sanos. Estudios hechos en Brasil y Sudáfrica muestran que del 30-40% de los casos de diarrea en niños puede atribuirse a EPEC, y en algunos estudios de infección por EPEC excede en incidencia a la infección por rotavirus (Nataro y Kaper, 1998).

#### ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Las cepas de ETEC son una de las causas más frecuentes de diarrea en niños de los países menos desarrollados y son la principal causa de deshidratación en la población infantil. También son responsables de la diarrea del viajero y han sido involucradas en un síndrome coleriforme en áreas endémicas, así como en brotes epidémicos de diarrea en hospitales y estancias infantiles (Flores, 1994).

ETEC es definida como el grupo que contiene las cepas de *E. coli* que elaboran por lo menos uno de dos grupos definidos de enterotoxinas, conocidas como termoestable (ST) y termolábil (LT).

**Toxina lábil al calor (LT):** Esta toxina oligomérica está estrechamente relacionada en estructura y función a la enterotoxina colérica (CT) expresada por *Vibrio cholerae*. Las

enterotoxinas LT y CT comparten muchas características incluyendo la estructura de la holotoxina, la secuencia de la proteína (80% de identidad), identidad en el receptor primario, actividad enzimática y actividad en ensayos de cultivos de células animales. Algunas diferencias son vistas en el procesamiento de la toxina, la secreción y la respuesta en linfocitos Th. En adición a las propiedades enterotóxicas, la subunidad b de LT tiene la capacidad de servir como un adyuvante mucoso.

**Toxina estable al calor (ST):** Esta enterotoxina es un oligopéptido de aproximadamente 5.1 KDa, de la cual se conocen las variedades STa y STb.

Un elemento importante para la patogenia de ETEC son los factores de colonización (CFA) de los cuales existen varios tipos y cuya expresión génica se encuentra en el mismo plásmido en el que se localizan los genes de ST. De esta característica se desprende la importancia epidemiológica que tienen las cepas ETEC productoras de enterotoxina ST.

## Epidemiología

Las cepas de ETEC están asociadas con dos principales síndromes clínicos.

Diarrea en niños en países en vía de desarrollo y la diarrea de los viajeros. Los patrones epidemiológicos de la enfermedad es determinada en gran parte por los siguientes factores:

- 1) Inmunidad de mucosas para la infección por ETEC desarrollada en individuos expuestos.
- 2) Individuos inmunes asintomáticos pueden liberar gran número de microorganismos virulentos de ETEC en las heces.
- 3) La infección requiere de una dosis infecciosa relativamente alta ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml).

Investigaciones epidemiológicas implican como los vehículos más comunes de infección: la comida y agua contaminadas. Muestras de comida y agua originarias de áreas de infección endémica han demostrado altos índices de contaminación de ETEC, la

contaminación fecal es la principal razón para la alta incidencia de infección de ETEC en países subdesarrollados.

### Consideraciones Clínicas

La enfermedad es típicamente abrupta con un corto periodo de incubación (14-15 h). La diarrea es acuosa, usualmente sin sangre, moco o pus, la fiebre y el vómito son presentados en una minoría de los pacientes. La diarrea puede ser leve, breve y limitándose por sí misma o puede resultar en una purga severa similar a la que se ve en infección por *V. cholerae*. Los viajeros provenientes de países desarrollados son a menudo involucrados en la diarrea del viajero, esta situación se puede evitar siguiendo algunas medidas de prevención:

- 1) Evitar el consumo de alimentos y bebidas potencialmente contaminados mientras viaja.
- 2) Subsalicilato de bismuto dado 4 veces diarias.
- 3) El uso de antibióticos si se desarrolla diarrea significativa.

### ***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque habitualmente menos severo, al que produce *S. 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 información disponible a partir del estudio de brotes reconoce la asociación de casos con el consumo de alimentos contaminados, aunque la forma más frecuente de infección es probablemente de persona a persona.

Estas cepas cuyo mecanismo de patogenicidad es la capacidad para invadir y reproducirse dentro del citoplasma celular, se caracterizan por pertenecer a un número relativamente pequeño de serotipos.

El primer paso en el proceso de patogénesis es la adherencia de la bacteria a las

microvellosidades de la mucosa intestinal y posteriormente al borde en cepillo del enterocito, en el cual se empieza a formar una vesícula en su membrana. Lo anterior da lugar a que se facilite la penetración de la bacteria, la cual se establece y multiplica en el interior de la célula intestinal para de ahí invadir otras células a través de su migración por el citoesqueleto. Los genes que codifican para estos factores de virulencia se ubican tanto en el cromosoma como en un plásmido de aproximadamente de 140 Mda. Los estudios epidemiológicos muestran a este grupo de *E. coli* como poco frecuentes (Cravioto y cols. 1988).

### ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

La infección por EHEC se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas que se acompañan de una descarga hemorrágica, la cual semeja un sangrado de tubo digestivo bajo. Este padecimiento infeccioso se distingue de una colitis inflamatoria por no acompañarse de fiebre y por la ausencia de leucocitos en las heces, estas cepas afectan tanto la mucosa del íleon terminal como la del colon a través de la liberación de citotoxinas.

La histopatología intestinal característica de infección por *E. coli* O157:H7 incluye hemorragia y edema en la lámina propia. El edema y la hemorragia submucosal en el colon ascendente y transversal puede manifestarse como un patrón definido. Las biopsias de colon de algunos pacientes también presentan necrosis e infiltración de neutrófilos.

Una sola cepa EHEC puede expresar uno o dos de los tipos de toxinas llamadas Stx. La Stx de EHEC es idéntica a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*.

El daño del epitelio intestinal por Stx, lipopolisacáridos bacteriales (LPS) u otros mediadores inflamatorios puede también ayudar a la transportación de la toxina a la corriente sanguínea. Esta posibilidad es supuesta por el hecho de que los pacientes con diarrea con sangre debido a *E. coli* O157:H7 son más propensos a desarrollar síndrome urémico hemolítico (HUS) que aquellos de diarrea sin sangre.

El plásmido 60-Mda comúnmente encontrado en cepas O157:H7 contienen genes que

codifican para una hemolisina llamada enterohemolisina, esta es encontrada en casi todas las cepas O157:H7, aunque también es extensamente distribuida entre cepas de *E. coli* no O157 productoras de Stx.

El único factor de adherencia potencial de *E. coli* O157:H7 que ha demostrado tener un papel en la colonización intestinal en vivo en modelos animales es la proteína de membrana externa (OMP) o intimina de 94-97 Kda.

## Epidemiología

Algunos estudios realizados en Estados Unidos y Canadá sugieren que O157:H7 puede causar del 50 al 80% de las infecciones de EHEC, ya que las cepas de otros serotipos no son habitualmente buscados, la incidencia general de infección de EHEC es muy difícil de estimar.

## Reservorio animal

*E. coli* productoras de Stx pueden encontrarse en la microbiota de una gran variedad de animales incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, gatos, perros y pollos. Sin embargo la gran mayoría de estas cepas son de serotipos diferentes a O157:H7 y es cuestionable su patogenicidad. La especie más importante en términos de transmisión a humanos es el ganado vacuno. Altos índices de colonización de *E. coli* Stx-positivo han sido encontrados en manadas bovinas en algunas ciudades; estos pueden ser tan altos como del 60%, pero son más comunes en proporciones del 10 al 25%.

El reservorio de EHEC en animales de granja está documentado por inspecciones seroepidemiológicas. Esto se ha determinado al observar niveles tres veces más elevados de anticuerpos contra el LPS de O157 en el suero de familias de granjas lecheras, que en familias urbanas en Canadá.

EHEC puede ser transmitida por alimentos, por el agua o de persona a persona. Muchos casos son ocasionados por ingestión de alimentos de origen bovino contaminados. La dosis de EHEC para producir infección ha sido estimada durante la investigación de

brotos. Se ha observado que el número de bacterias esta en el orden de 100 a 200 bacterias, este es similar al número requerido para la infección producida por *Shigella* y es consistente con numerosos reportes de transmisión de persona a persona en los brotes.

La mayoría de los brotes de infección por EHEC han sido causados por cepas O157:H7, sugiriendo que este serotipo es más virulento o mayormente transmisible que otros serotipos. Los otros serotipos de EHEC productores de Stx han sido implicados principalmente en enfermedades esporádicas. La estimación de la incidencia de la enfermedad debida a EHEC no O157:H7 es complicada dado que se requiere determinar la presencia de Stx o genes Stx, procedimiento que no se realiza de manera rutinaria.

### Consideraciones Clínicas

La mayoría de las observaciones clínicas relacionadas con EHEC se han obtenido de cuadros desencadenados por *E. coli* O157:H7. Sin embargo, cepas EHEC de serotipos no O157:H7 también son responsables de enfermedad clínica, aunque con diferencias como son cuadros de diarrea con sangre menos severas y HUS en proporción mucho menor. El periodo de incubación de la infección por EHEC es usualmente de 3 a 4 días, aunque los tiempos de incubación pueden ser tan largos como de 5 a 8 días o tan cortos como de 1 a 2 días como se ha descrito en algunos brotes.

### ***E. coli* enteroagregativa (EAEC)**

Las cepas enteroagregativas constituyen el grupo más recientemente descrito de cepas de *E. coli* causantes de diarrea. Estas bacterias, al parecer dañan las vellosidades del colon produciendo una necrosis hemorrágica. Los mecanismos patogénicos de estos gérmenes están empezando a identificarse. Epidemiológicamente se considera como una causa importante de diarrea persistente en niños (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas con adherencia agregativa presentan fimbrias cuya codificación genética se encuentra presente en plásmidos. Además de la adherencia se ha señalado que la producción de toxinas y la invasividad son posibles factores de virulencia de las cepas

EAEC. Con respecto a las toxinas hasta el momento se han descrito cuatro productos con estas características, el primero en ser identificado (Savarino, 1991) se denominó toxina termoestable de *E. coli* enteroagregativa (EAST-1 por sus siglas en inglés), posteriormente se reportó que algunas cepas EAEC producían una proteína de aproximadamente 120 Kda que inducía fosforilación de proteínas y que además presentaba homología con la hemolisina  $\alpha$  de *E. coli* (Baldwin, 1992). Más recientemente se reportó que este grupo de bacterias elabora dos toxinas de alto peso molecular denominadas Pet (108 Kda) y Pic (116 Kda) que en estudios epidemiológicos han sido identificadas en cepas aisladas de niños con diarrea (Eslava y cols 1998).

Existe falta de información precisa con respecto a las fuentes de infección de cepas enteroagregativas, aunque por su comportamiento endémico a un nivel comunitario puede suponerse que su fuente de transmisión sea por alimentos y agua contaminada (Cravioto y cols 1996a).

Las cepas agregativas de *E. coli* se han aislado también de niños con diarrea con sangre. Se desconoce aún si hay dos tipos de cepas agregativas, unas relacionadas con diarrea persistente y otras vinculadas con diarrea con sangre. Es evidente que las cepas agregativas tienen la propiedad de provocar lesiones hemorrágicas en modelos animales, lo cual tal vez explique la presencia de sangre y leucocitos en las evacuaciones de los sujetos; queda por determinarse si la duración de la diarrea, en cada caso, se relaciona 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 el hospedero ante una infección por gérmenes patógenos similares; es importante señalar, que las cepas agregativas de *E. coli* no pueden producir una lesión de adherencia y esfacelamiento similar a la que causan las cepas de EPEC, por ello la persistencia de diarrea en niños infectados con cepas agregativas no puede explicarse mediante este mecanismo (Cravioto y cols 1996b).

## ANTECEDENTES

### **Diarrea en México**

Las enfermedades diarreicas representan en México, al igual que en muchos países en desarrollo, un problema de salud pública importante. *E. coli*, rotavirus y *Shigella* son algunos de los patógenos de mayor importancia en etapas tempranas de la vida. Estas se transmiten por la vía fecal-oral, o bien, a través de los alimentos, el agua o los utensilios de cocina contaminados. En varias investigaciones se ha demostrado la alta frecuencia de *E. coli* enterotoxigénica (18-22%) como agente causal de diarrea. Los niños infectados con estos microorganismos pueden, en forma por demás variable, mantenerse asintomáticos o tener diarrea de leve a moderada, o presentar una enfermedad fulminante y diseminada (Carrada y Avila,1991). Principalmente en el grupo de menores de cinco de años, la deshidratación era la causa de aproximadamente 70% de las muertes atribuidas a la enfermedad. Sin embargo, aunque ésta ha dejado de ser un problema no así la enfermedad que continua afectando a dicha población. Esta problemática refleja las condiciones socioeconómicas de la población que imperan tanto en el país en su conjunto, como en cada entidad federativa en particular. Dentro del grupo de menores de cinco años, los niños menores de un año son los más susceptibles para que las diarreas evolucionen hasta la muerte de no ser atendidos oportuna y adecuadamente (Sepúlveda,1994)

### **El uso de plantas medicinales en México.**

En México existe, en la práctica, un sistema plural o mixto de atención a la salud en el que coexisten la medicina profesional, la tradicional y la doméstica o casera. Para amplios sectores de la sociedad mexicana, y en particular para los indígenas, la medicina tradicional constituye el principal o único recurso para la atención a la salud; para otros, mucho más numerosos, la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la medicina profesional (Sepúlveda,1994).

Desde tiempos remotos la población del mundo ha recurrido a las plantas con el fin de curarse de alguna enfermedad. Los datos sobre las características vegetales, formas de

uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de numerosas plantas medicinales en México, se consignan en las fuentes más antiguas, tales como los códices precolombinos, las crónicas y relaciones coloniales, los estudios y colectas de los siglos XVIII y XIX y su permanencia a sido una constante en las culturas indígenas y populares del país (Viesca, 1979; Menéndez, 1987 y Argueta, 1987).

### **Historia del uso de las plantas medicinales en México**

De acuerdo a Lozoya y Lozoya (1982) podemos considerar como plantas medicinales indígenas a aquellas que: son originarias de México, son especies características para el territorio nacional; fueron consideradas medicinales por las culturas indígenas prehispánicas y en la actualidad siguen siendo utilizadas con propósitos curativos por la población del país.

Es indudable que en los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales en todo el mundo; la herbolaria medicinal recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que, con sus numerosos medicamentos había revolucionado la terapéutica. La química y su impresionante evolución de las últimas décadas, parecía augurar que en el futuro, todo recurso para la salud provendría de la síntesis de compuestos obtenidos en el laboratorio y que las plantas medicinales pasaban a formar parte de un capítulo de la historia de la medicina. Sin embargo, tal expectativa no era fácil de cumplirse, sin olvidar el alto grado de avance tecnológico que se ha alcanzado en todas las ramas de la ciencia, las plantas medicinales - vistas o no como materia prima - continuaban siendo el recurso fundamental de donde obtener los viejos y nuevos medicamentos, sin contar que la producción de fármacos era un procedimiento caro, que requería de una tecnología sofisticada y que los países pobres, no obstante que eran los depositarios de la tradición herbolaria y dueños de la materia prima, no tenían acceso a los productos farmacéuticos elaborados o su adquisición se hallaba determinada por una dependencia económica, tecnológica y política de los centros de producción químico-farmacéutica (Argueta, 1994).

En nuestro país también existe la costumbre de emplear plantas medicinales y muchas de éstas son utilizadas para tratar diversos padecimientos incluidos las diarreas. Al

respecto existe una gran tradición por el uso de las plantas como remedios medicinales, se ha calculado que cerca del 37% de los habitantes curan con hierbas sus dolencias más comunes (Baytelman, 1981).

### **La herbolaria mexicana como recurso auxiliar en el tratamiento de las diarreas**

Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional (Lozoya, 1976; 1984). Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país. Tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental en lenguas y culturas distintas (Williams-Linera y cols 1992; Mayer y Masferrer, 1978 y Argueta, 1993).

En México se estima que existen alrededor de 220 familias de fanerogamas en las cuales se encuentran 2410 géneros y 22000 especies (Rzedowski, 1993). Se estima que la flora medicinal en uso en México contiene alrededor de 5000 plantas y que el 95% de éstas son especies silvestres (Lozoya y Lozoya, 1982); se conocen registros en los cuales se mencionan alrededor de 3103 especies diferentes empleadas como medicinales y de éstas 1024 son usadas para curar enfermedades del aparato digestivo (Argueta, 1994).

La terapia antibacteriana presenta métodos alternativos, particularmente la aplicación de extractos acuosos de plantas medicinales, los cuales se han usado en el tratamiento de diarreas infecciosas. Sin embargo, los mecanismos de acción de dichas plantas todavía no han sido esclarecidos (Turi y cols. 1997).

Lo anterior plantea la necesidad de realizar estudios que permitan caracterizar tanto los compuestos activos de las plantas que se utilizan con mayor frecuencia para el tratamiento de las diarreas así como el mecanismo de acción de estos sobre los microorganismos causantes del padecimiento.

En este trabajo se analizaron diferentes plantas que fueron seleccionadas por ser las más comunes en el tratamiento de las diarreas.

## **Nanche**

***Byrsonima crassifolia*** (L) Kunth

Arbusto o árbol de la familia *Malpighiaceae*, mide de 5 a 10 m de altura, con la corteza parda oscura y rugosa. Tiene las hojas más largas que anchas, rígidas, provistas de vellos amarillos en el reverso de la hoja. Las flores están en racimos de color amarillo o rojizo y son vistosas. Los frutos son globosos, amarillos o rojizos, en racimos con sabor agridulce.

Su uso medicinal es con mayor frecuencia contra la diarrea, aunque también se indica en otros desórdenes de tipo digestivo como disentería, dolor abdominal, empacho, etc. En el tratamiento de estos padecimientos se emplea la corteza en cocimiento, por vía oral.

Se utiliza en problemas ginecológicos como infección de la matriz e inflamación de los ovarios, evita el aborto y facilita el parto y se aplica en afecciones de la piel, contra la sarna, granos y clavillos.

Su aplicación como antidiarreico y antipirético se ha validado históricamente, aunque no existen estudios farmacológicos que corroboren esta acción biológica (Argueta, 1994).

## **Gobernadora**

***Larrea tridentata*** (DC.) Cav.

Dentro de la familia *Zygophyllaceae* encontramos este arbusto de 60 cm a 3 m de altura, ramificado, sus hojas se encuentran divididas en hojuelas, que al tocarlas se sienten como cuero, están cubiertas de vellos y resina. Las flores son amarillas y solitarias. Los frutos son unas cápsulas con vellos largos.

Son diversos los padecimientos en los que se aplican las propiedades medicinales de la gobernadora, siendo su uso más común en padecimientos de origen urinario, entre ellos, cálculos renales o de vejiga, tomando como agua de uso la cocción de ramas o de toda la planta.

Con frecuencia se le emplea en problemas ginecológicos, como esterilidad femenina

contra la cual se dan lavados vaginales con el cocimiento de las hojas o se toma un té durante 9 días antes y 9 después de la regla, durante tres meses seguidos.

También se utiliza contra la anemia, catarro, diabetes, dolor de cabeza, tos, úlcera, uretritis, presión sanguínea e infecciones en los pies, para estos casos se recomienda tomar el cocimiento de las raíces, ramas o corteza. Se menciona ser útil en dolores musculares y contra el paludismo.

El extracto etanólico obtenido de las ramas ejerció una actividad antibiótica sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis* y ausencia de ésta actividad sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*. En las aplicaciones en que se utiliza como antiséptico se ha comprobado su efectividad (Argueta, 1994).

## **Geranio**

### ***Geranium mexicanum* Kunth**

Hierba perteneciente a la familia *Geraniaceae* mide aproximadamente unos 50 cm de altura muy peludita con los tallos rojizos, las hojas son de forma triangular con hendiduras que la parten casi en tres, son color verde claro y los bordes de color café, marcando unas pequeñas ondulaciones. Sus flores son de color rosa pálido a lila, a veces presentan una especie de venitas púrpuras que hacen verse como si tuvieran rayitos. Los frutos son pequeños en forma de alfiler y peludos.

Su uso más común es para el tratamiento de trastornos digestivos como vómito y diarreas. Para adultos se da un vaso del cocimiento de las hojas, pero antes se agrega unos gramos de sal (pizcacha), si es para niños, se endulza con azúcar y se les dan dos o tres cucharadas. Como purgante, se ingiere solo la infusión de las hojas. En forma externa se ocupa el cocimiento de toda la planta para dar baños contra el salpullido y sarna.

Esta es una planta de origen mexicano de uso muy antiguo que coincide con el actual en su aplicación contra la diarrea y el vómito; en la actualidad no existen muchos estudios químicos o farmacológicos que convaliden sus otras aplicaciones terapéuticas tradicionales (Argueta, 1994).

## **Guayaba**

### ***Psidium guajava* L**

De la familia *Myrtaceae* es un arbusto o árbol de 4 a 10 m de altura, con la corteza lisa y de color café. Tiene las hojas duras, más anchas en su punta que en el centro y por la parte del envés la hoja es vellosa y con sus nervios realzados. Las flores son solitarias, blancas o cremosas y olorosas, con muchos estambres. Sus frutos son globosos, con olor fragante y la pulpa es de color amarillo o rosa, con numerosas semillas.

Esta planta medicinal considerada de calidad caliente, tiene gran importancia en la actualidad, se ha encontrado que es utilizada con frecuencia en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, principalmente la diarrea; el tratamiento más usual consiste en hacer una cocción o infusión con las hojas del guayabo y administrarla por vía oral tres veces al día o como agua de uso. El fruto comido en ayunas o preparado en cocción actúa como desparasitante, contra lombrices y amibas. También se utiliza en padecimientos como el "empacho" (Michoacán) y en algunos trastornos de la piel.

El uso de las hojas, raíces y corteza de la guayaba para combatir la diarrea y la disentería se remonta a la época prehispánica. Se ha demostrado que extractos de las hojas, inhiben el peristaltismo, además de ejercer un efecto antibacteriano contra algunos microorganismos que provocan infecciones gastrointestinales como *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhi* entre otras. Ambas acciones, la antiespasmódica y la antibiótica, deben incidir en el efecto antidiarreico global ejercido por la guayaba. No existen registros a nivel popular ni científico de que la guayaba provoque algún efecto tóxico, así que es muy probable que esta planta pueda emplearse con margen de seguridad en cuanto al uso medicinal (Argueta, 1994).

## JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional es una alternativa poco explorada desde el ámbito científico, sin embargo, con grandes expectativas. Aunque no existen estudios epidemiológicos y aún se conoce muy poco de los compuestos activos de las plantas utilizadas para el tratamiento de la diarrea, éstas se utilizan porque se sabe que quitan las molestias y en un gran número de casos curan la enfermedad.

Al final de la década de 1960 se demostró que en pacientes con diarrea al administrarse una solución electrolítica por vía oral, a la que se le agregaba glucosa, hacía que disminuyera considerablemente la pérdida de agua por las evacuaciones, esta terapia de rehidratación oral es importante para prevenir o corregir la deshidratación causada por la diarrea, ya que es poco recomendable el uso de antimicrobianos, pues éstos en algunos casos pueden contribuir a la selección de microorganismos resistentes y favorecer que la diarrea dure más tiempo. Las infusiones hechas a partir de las plantas medicinales juegan un papel importante dentro de la rehidratación oral ya que a estas se le agregan azúcares y se le da de beber al paciente como agua de uso.

En los últimos quince años los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente y comienzan a establecerse programas y proyectos, para la investigación, aplicación e industrialización de los productos.

Se han reportado estudios como el de Verástegui y cols, (1996) en donde se observa el efecto que tienen algunos vegetales (entre ellos la gobernadora) como antimicrobianos contra cepas tales como *S. dysenteriae*, *E. coli*, *P. vulgaris* y *S. Typhimurium*, mostrando en sus resultados que éstas tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias

Se ha considerado que la medicina tradicional y las plantas medicinales (su recurso material visible), serán de mayor importancia en los años venideros, llevando a cabo así, su complementación y articulación respetuosa, dentro de los sistemas nacionales de salud (Argueta. 1994).

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de compuestos de origen vegetal en la inhibición del crecimiento y en el proceso de adherencia a células HEp-2 de cepas de *E. coli* causantes de diarrea, como una alternativa en el tratamiento y/o prevención del padecimiento.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Utilizar cepas de *E. coli* aisladas de casos clínicos para conocer su sensibilidad a infusiones de: Corteza de Nanche (*Byrsonima crassifolia*), hojas de Gobernadora (*Larrea tridentata*), hojas de Geranio (*Geranium mexicanum*), hojas y corteza de Guayaba (*Psidium guajava*).
- 2.- Estandarizar la técnica de difusión en disco, para evaluar la actividad antimicrobiana de las infusiones de diferentes plantas.
- 3.- Evaluar si los compuestos presentes en estas infusiones contribuyen a inhibir la capacidad de adherencia de *E. coli* a células HEp-2 cultivadas.

## HIPÓTESIS

Los compuestos contenidos en las infusiones de diferentes plantas participan inhibiendo el crecimiento así como la adherencia de bacterias de *E. coli* causantes de diarrea a células HEp-2.

## MATERIAL Y MÉTODO

### OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de 40 niños con cuadros de diarrea grave, enviadas del Centro Médico Nacional, en viales con agar especial. Estas cepas fueron tomadas de diferentes hospitales de la Cd. De México.

De cada vial en condiciones de esterilidad se tomó una muestra bacteriana con el asa bacteriológica y fue sembrada en cajas petri con agar MacConkey y en otra con agar Sangre, estriándose muy bien para obtener colonias aisladas, una vez realizado lo anterior se incubaron a 37°C por 24 h. Después de este tiempo las cajas fueron observadas para distinguir colonias lactosas negativas en agar MacConkey, se tomó una colonia aislada de la placa con agar Sangre, y fue sembrada en un tubo de 13 x 100 con rosca con agar de soya con tripticaseína (TSA) y medios de conservación de Dorset en los cuales se almacenaron; esto se hizo con cada muestra; al existir colonias lactosas negativas y lactosas positivas en una misma muestra se aislaron las dos colonias y se sembraron por separado en tubos con TSA; los tubos se incubaron a 37°C por 24 h, y estos serían las copias con las cuales trabajamos durante los ensayos de sensibilidad e inhibición de la adherencia. **(DIAGRAMA 1)**

### IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL CLÍNICO

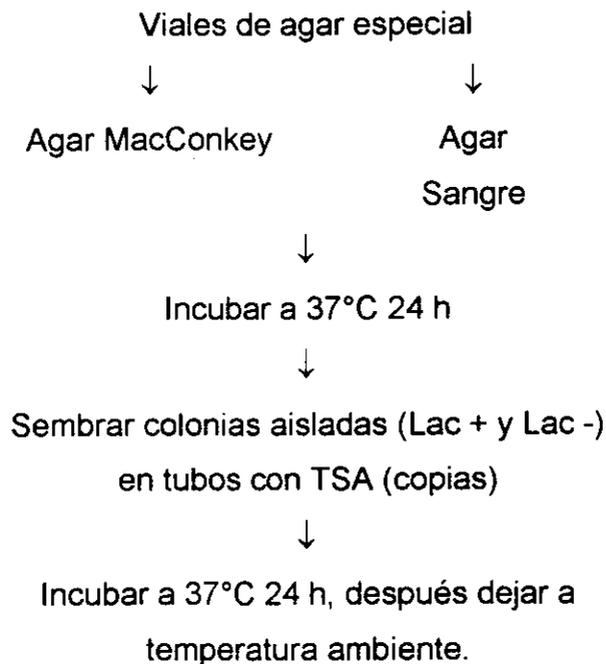
Dichas cepas se identificaron hasta nivel de especie utilizando pruebas bioquímicas con el sistema automatizado Vitek. De las copias se tomó una asada, la cual se homogeneizó en 1.8 ml de solución fisiológica, ajustándose a una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  de la cepa con un colorímetro, después esta solución fue introducida en tarjetas especiales las cuales se colocaron en el VITEK dejándose toda la noche, al terminar el tiempo de lectura, las tarjetas son desechadas.

Para realizar las pruebas de indol de los tubos de 13 x 100 con TSA se tomó otra asada la cual se homogeneizó con 3 ml de agua peptonada en tubos de 13 x 100 sin rosca, incubando a 37°C durante 48 h, posteriormente a cada tubo se le agregó de 5-6 gotas de

reactivo de Ehrlich Kovach, inmediatamente se leen. Cuando la prueba fue positiva, es decir que fuera una cepa de *E. coli*, se formó una banda roja en la parte superior del agua peptonada, de esta forma también fue confirmado el resultado del informe del VITEK.

## DIAGRAMA 1

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS DE *E. coli*



## TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA

Para realizar la tipificación serológica de cada una de las cepas se utilizó el esquema de tipificación propuesto por Kauffman con 175 sueros contra el antígeno somático y 56 para el antígeno flagelar.

### Obtención de antígenos somáticos

Una vez más de las copias se tomó una asada la cual fue sembrada en tubos de 16 x 150 sin rosca con TSA, con el fin de obtener los antígenos somáticos, los tubos fueron

tapados con algodón e incubados a 37°C por 24 h, al cabo de este tiempo a cada tubo se le agregaron 10 ml de solución salina, agitando por separado hasta obtener un homogeneizado, esta mezcla se vació (cada muestra) en tubos de 16 x 150 sin rosca rotulados con masking, posteriormente se taparon con algodón y se hirvieron en olla de presión sin válvula a 100°C por una hora, después de ello los tubos se llenaron con formalina y se taparon con parafilm, por último se mezclaron bien y se dejaron a temperatura ambiente.

### **Tipificación de los antígenos somáticos**

Una vez obtenidos los antígenos somáticos, se procedió a la tipificación serológica. Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos, las cuales se marcaron por triplicado, los pozos fueron llenados con 50 µl de cada uno de los 175 sueros de conejo contra los antígenos somáticos, después se agregó en el pozo correspondiente 50 µl del antígeno somático obtenido, las placas fueron envueltas con plástico adherible y se incubaron a 50°C durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura observando si hubo o no aglutinación. Se escogieron los sueros puros homólogos de los que aglutinaron en las placas y se hizo una dilución seriada con solución salina en otras placas, después se agregaron 50 µl de nuestro antígeno, esto con el propósito de obtener el título de aglutinación y compararlo con el título registrado del suero puro.

### **Obtención de antígenos flagelares**

Para obtener los antígenos flagelares, de las copias se tomó otra muestra y se inocularon tubos de 16 x 150 con rosca con medio semisólido, el asa de siembra con la muestra se introduce en la varilla de vidrio hasta llegar a la mitad aproximadamente del medio semisólido, las muestras se incubaron a 30°C por 14 días, pasado este tiempo, se tomó la lectura de los tubos, observando si existe movilidad de las bacterias reflejada por la diseminación de la bacteria en el medio. Se seleccionaron las muestras de *E. coli* móviles, de cada muestra se tomó una asada y se inocularon tubos de 16 x 150 sin rosca con 10 ml de Caldo Biotriptasa, cada tubo fue tapado con algodón, incubando 30°C por 24 h, después de ello a cada tubo se agregó 10 ml de formalina, se taparon con parafilm mezclando perfectamente por separado y dejándose a temperatura ambiente.

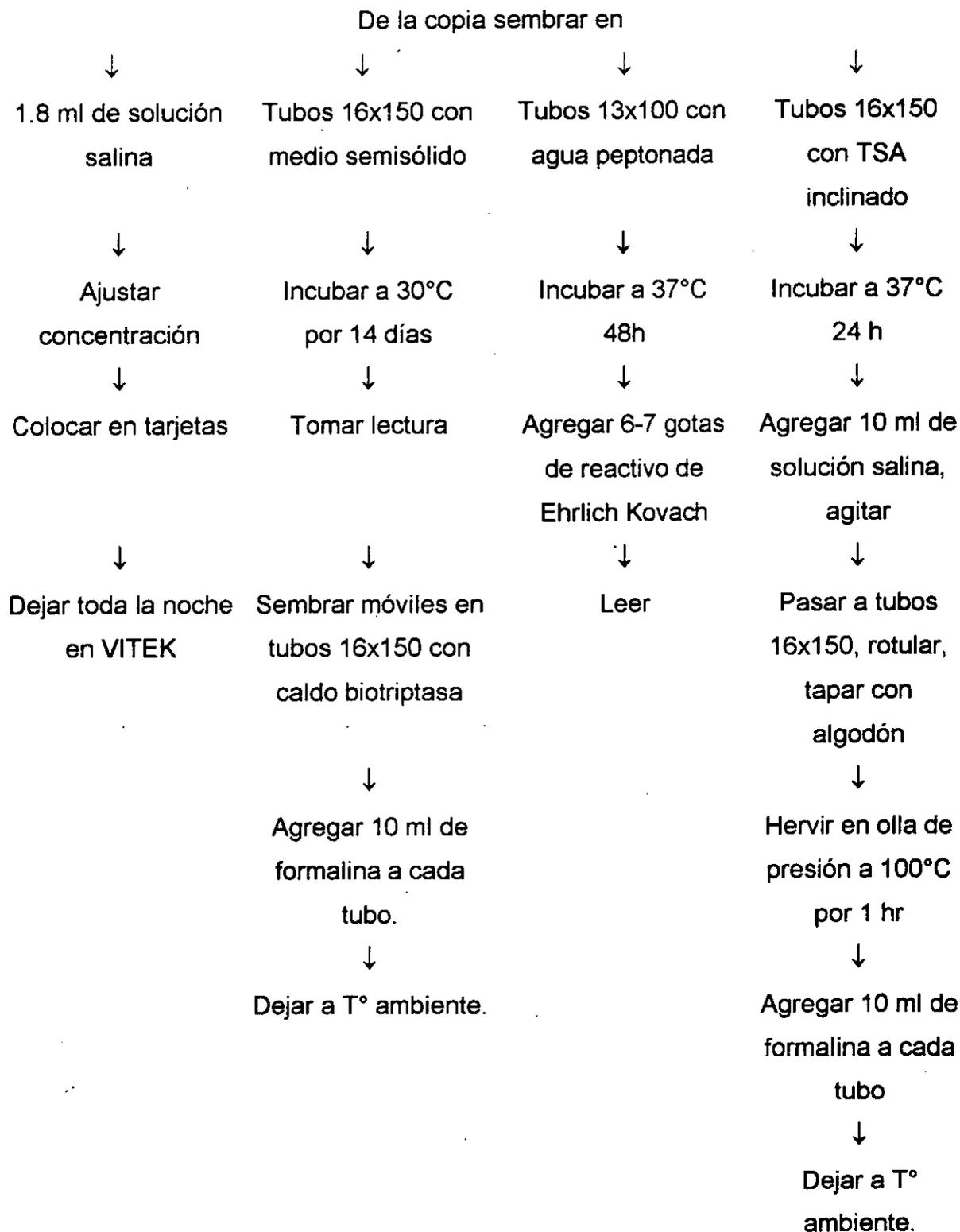
## **Tipificación de los antígenos flagelares**

Finalizado lo anterior se continuó con la tipificación serológica siguiendo el mismo sistema. Se utilizaron también placas de ELISA de 96 pozos, cada pozo fue llenado con 50  $\mu$ l de cada uno de los 56 sueros para los antígenos flagelares, agregándose después 50  $\mu$ l del antígeno flagelar obtenido, las placas fueron envueltas con plástico adherible e incubándose a 50°C durante 24 h. Posteriormente se procedió a la lectura observando si hubo o no aglutinación.

Se escogieron los sueros puros homólogos a los que aglutinaron en las placas y se hizo una dilución seriada con solución salina en otras placas, después se agregaron 50  $\mu$ l del antígeno correspondiente, esto con el propósito de obtener el título de aglutinación y compararlo con el título registrado del suero puro. **(Diagramas 2 y 3)**

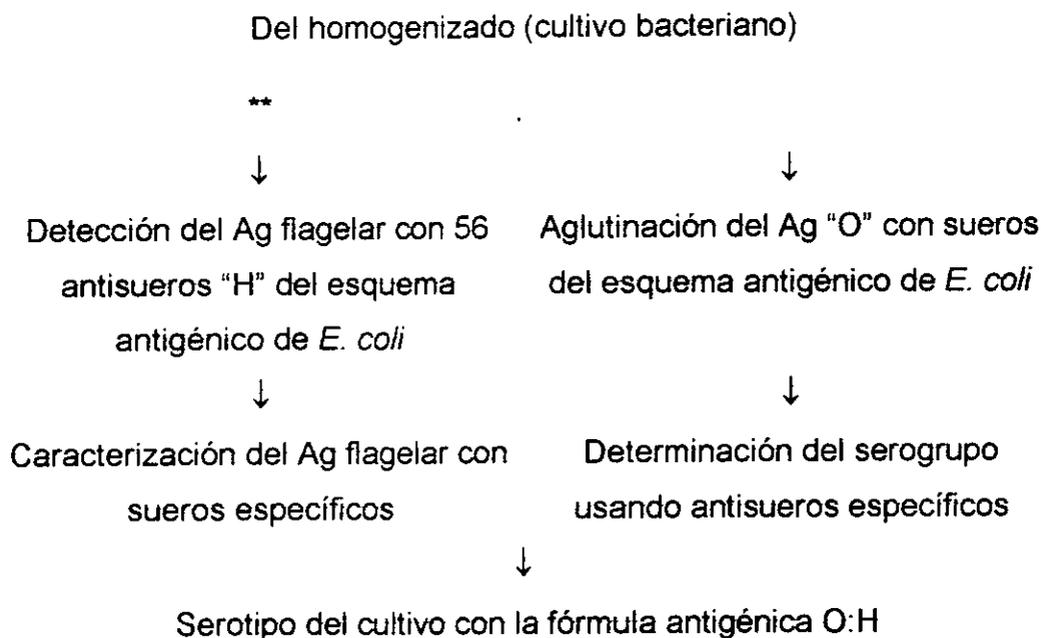
## DIAGRAMA 2

### IDENTIFICACIÓN DE CEPAS CLÍNICAS DE *E. COLI* CLÍNICAS



### DIAGRAMA 3

#### IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS DE *E. COLI*



#### MATERIAL VEGETAL

Se prepararon extractos acuosos (infusiones), con cuatro especies vegetales diferentes, mismas que se seleccionaron de un total de nueve que previamente se estudiaron con cepas de referencia:

Corteza de nanche, hoja de geranio, hoja de gobernadora, corteza de guayaba y hoja de guayaba.

Las cuatro plantas escogidas para realizar el presente trabajo fueron colectadas en los siguientes lugares:

Corteza de nanche fue colectada en septiembre de 1998 en el Cañon del Lobo, Cuernavaca, Morelos. El ejemplar presentaba flores y frutos.

Hoja de geranio fue colectada en septiembre de 1998 en campo abierto cerca de la carretera México-Cuernavaca. La planta presentaba flores.

Hoja de gobernadora fue colectada en Diciembre de 1998 en la localidad Cerro del Campestre en Gómez Palacio Durango.

Corteza y hoja de guayaba fueron colectadas en septiembre de 1998 cerca de la carretera a la salida de Cuernavaca hacia México. Ejemplar estéril.

Cada ejemplar identificado se depositó en el Herbario del Jardín Botánico y el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (Aún por confirmar los números de catálogo).

## **PREPARACIÓN DE INFUSIONES**

En un vaso de precipitado de 500 ml se calentaron 250 ml de agua destilada, al estar en ebullición se retiró del fuego y se agregaron 5 g de la planta seca, el vaso fue tapado con papel aluminio y se dejó reposar durante 1.5 h, transcurrido este tiempo en condiciones de esterilidad se colocó con unas pinzas una gasa estéril con 4 dobleces en la boca de un frasco estéril y se filtró el líquido, después de ello se agregaron 10 ml del extracto, en otros frascos estériles, tapándolos con parafilm, se guardaron, previamente etiquetados, a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h, para su posteriormente liofilización.

## **ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Para la preparación de los discos, se cortaron círculos de 6 mm de diámetro de papel filtro del No. 3 éstos se marcaron con la clave del extracto y se esterilizaron. Después en un área estéril a cada vial con el liofilizado de la planta se le agregó 1 ml de agua destilada estéril, mezclando muy bien, se pusieron 20  $\mu\text{l}$  del extracto en cada disco, dejando secar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 h y después a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.

Una vez hecho lo anterior se procedió a probar la actividad antibacteriana siguiendo la metodología propuesta por Bauer y cols. (1966), modificada por Cáceres y cols. (1987). Según se muestra en el **Diagrama 4**.

## DIAGRAMA 4

### ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ACUOSOS EN CEPAS CLÍNICAS DE *E. coli*

Sembrar en agar sangre un inóculo  
para evaluar su pureza  
incubar a 37°C, 24 h



Con el cultivo puro inocular un tubo  
con 5 ml de agua peptonada al 1%, pH 7.2,  
incubar a 37°C, 24 h



Tomar 1 ml, inocular un tubo  
con 10 ml de agua peptonada al 1%, pH 7.2,  
incubar a 37°C, en agitación 3 h



Ajustar en el nefelómetro a 0.5 de MacFarland  
concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml



Diluir 1:20 en solución salina



Sembrar confluyente con 100  $\mu$ l en cajas Petri  
con agar Muller-Hinton



Colocar dos discos de cada extracto  
sobre la superficie del agar,  
incubar a 37°C, 24 h



Observar y medir los halos de inhibición.

Para la realización de este ensayo se probaron únicamente 184 cepas del lote de 194 muestras clínicas que se identificaron ya que 10 de los cultivos se perdieron en el proceso de este ensayo. Se sembraron las cepas problema y un control en agar sangre, dejando incubar por 24 h a 37°C, posteriormente se tomó una colonia aislada y se inoculó un tubo con 5 ml de agua peptonada pH 7.2, incubando a 37°C por 24 h, después de cada tubo se tomó 1 ml de la solución y se depositó en un tubo con 10 ml de agua peptonada pH 7.2 incubando en agitación durante 3 h. Transcurrido el tiempo en una área estéril la solución fue ajustada con un nefelómetro de MacFarland a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, después se hizo una dilución 1:20 con solución salina estéril 0.15 M, de esta dilución se tomaron 100  $\mu$ l y el inóculo fue extendido en una caja petri con agar Muller Hinton con ayuda de un rastrillo estéril, al terminar se colocaron los discos sobre la superficie del agar, (2 discos por cada extracto) teniendo cuidado de que el disco quedara bien adherido al agar, la caja fue colocada durante 30 min a 4°C posteriormente se dejó 10 min a temperatura ambiente y por último se mantuvo en incubación a 37°C por 24 h. Terminado este tiempo se midieron los halos de inhibición con una regla. En cada ensayo se utilizó como control positivo, *Staphylococcus aureus*.

## **ENSAYO DE INHIBICION DE LA ADHERENCIA**

Se realizó un ensayo para conocer si las infusiones utilizadas inhiben la adherencia de algunas cepas de *E. coli* a células HEp-2; utilizando el método propuesto por Cravioto y cols (1979) con algunas modificaciones para el presente trabajo (**Diagrama 5**).

Cada cepa a probar fue inoculada durante un periodo de 18 h a 37°C en agitación en tubos con 3 ml de caldo triptona al 1% y D-manosa al 1%; el cultivo fue centrifugado 15 min a 3000 rpm, retirándose posteriormente el sobrenadante, el botón bacteriano fue resuspendido en 1 ml de solución buffers de fosfatos (PBS), el inóculo se preparó adicionando 800  $\mu$ l de medio mínimo esencial (MEM) sin suero y sin antibiótico más 100  $\mu$ l de cada una de las diferentes infusiones usando tres concentraciones distintas, más 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana quedando a una concentración final de  $1.5 \times 10^8$ /ml.

La monocapa de células HEp-2 fue preparada en una placa de propileno de 24 pozos,

cada pozo con un cubreobjetos redondo estéril (lenteja) y sobre él células HEp-2, la placa se dejó incubando a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 85% de humedad durante 24 h. Para obtener una monocapa del 90 al 95% de confluencia; posteriormente a cada pozo se le retiró el medio con una pipeta Pasteur se lavó con PBS para quitar los residuos de medio y antibiótico, después se procedió a agregar 100 µl del extracto con una concentración de 10x a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000, después se agregó 100 µl de la suspensión bacteriana de la cepa tipo correspondiente, incluyendo por supuesto los tres controles positivos y uno negativo. El ensayo se realizó con cepas de *E. coli* de referencia con los distintos patrones de adherencia conocidos: agregativa, localizada y difusa. Para los ensayos de alteración celular en los pozos con células sólo se agregó el extracto a una sola concentración (10x); y para los ensayos de viabilidad bacteriana se dejaban pozos sin células en donde se agregaba MEM con 100 µl de bacteria y el extracto con una sola concentración (10x).

Las placas se incubaron por 3 h a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, después de este periodo, de los pozos que sólo tenían la bacteria con el extracto se tomaron 100 µl y se sembraron en cajas de Petri con agar sangre. En los otros pozos se descartó el MEM y se lavó tres veces cada pozo con 1 ml de PBS, con la finalidad de quitar las bacterias no adheridas a las células, éstas se fijaron con 1 ml de metanol por 1 min, posteriormente se adicionó 1 ml de colorante Giemsa dejando teñir durante 20 min; cada pozo se lavó tres veces con 1 ml de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante.

Las lentejas con la monocapa adherida a ellas se quitaron de los pozos y se pasaron 30 seg. en cada una de las siguientes soluciones: acetona 1; acetona 2; acetona/xileno (vol/vol); xileno 1; xileno 2.

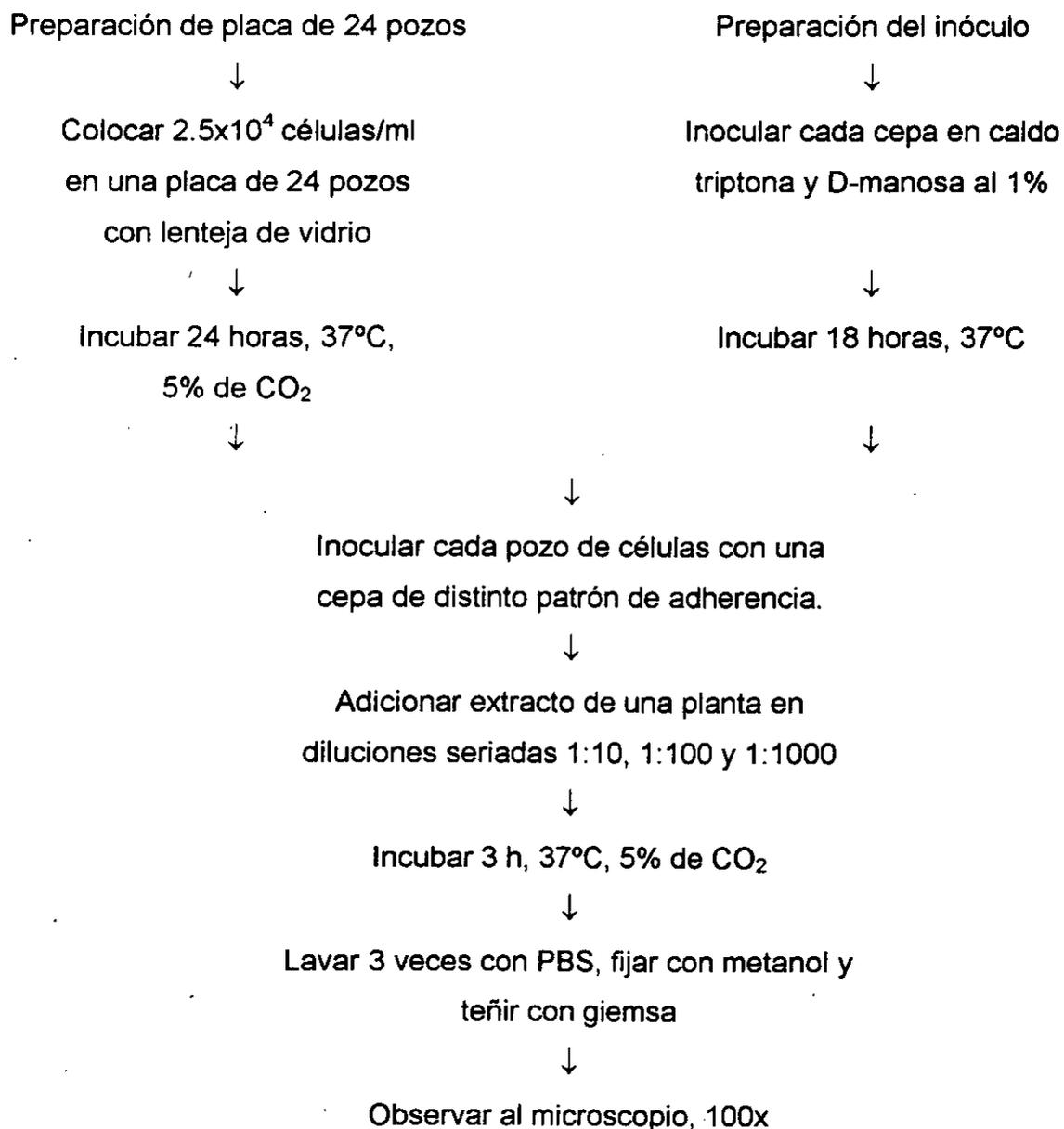
Para la observación al microscopio de los resultados, se marcaron los portaobjetos con la clave de la cepa y sobre ellos se colocaron 3 gotas de bálsamo de Canadá, sobre las cuales se puso la lenteja correspondiente, con la monocapa celular hacia abajo, las preparaciones una vez secas fueron observadas con el objetivo de inmersión.

Se calculó el porcentaje de adherencia de las cepas de referencia utilizadas con la

finalidad de determinar el grado de inhibición de la adherencia de la siguiente forma: La inhibición se evaluó determinando el porcentaje de células que no presentaban bacterias adheridas y comparando este resultado con el control de adherencia positiva. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### DIAGRAMA 5

#### ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ADHERENCIA DE *E. coli* A CÉLULAS HEP-2



## RESULTADOS

Al realizar la tipificación serológica de un lote de 194 cepas clínicas se identificaron 54 serotipos y 3 serogrupos (**CUADRO 1**)

**CUADRO 1. SEROGRUPOS Y SEROTIPOS ENCONTRADOS EN CEPAS CLÍNICAS DE *E. coli* ESTUDIADAS.**

Serotipo	Número de cepas	Serotipo	Número de cepas
O1:H-	3	O75:H-	1
O1:H1	2	O75:H5	10
O1:H45	1	O77:H18	2
O7:H-	5	O86:H-	1
O7:H18	1	O86:H18	2
O8:H8	1	O88:H25	8
O8:H9	10	O89	1
O11:H-	4	O89:H-	5
O11	1	O92:H10	1
O12:H4	1	O92:H33	1
O15:H-	1	O102:H-	4
O15:H1	1	O102:H6	1
O15:H47	1	O125ab:H18	8
O17:H18	2	O125ab:H45	4
O18:H7	1	O125ac:H-	4
O21:H-	5	O125ac:H12	2
O21:H2	1	O127:H8	1
O21:H10	5	O127:H9	6
O23:H15	2	O128	1
O23:H25	6	O130:H18	1
O25:H-	1	O131:H4	1
O25:H4	7	O153:H45	2
O33:H19	2	O155:H-	2
O38:H-	1	O155:H19	13
O39:H34	4	O159:H34	2
O40:H-	1	O162:H-	1
O41:H-	8	O168:H-	1
O44:H18	2	O169:H41	4
O73:H18	1	S/identificar	23

Los serotipos se determinaron utilizando sueros de conejo (SERUNAM) contra los 175 antígenos somáticos (O) y 55 flagelares (H) de *Escherichia coli*.

De los serotipos identificados fue posible relacionar 15 serogrupos (obtenidos de 62 cepas) a algunos grupos diarreogénicos (**CUADRO 2**)

**CUADRO 2. SEROGRUPOS Y GRUPO DIARREOGÉNICO AL QUE PERTENECEN 62 DE LAS CEPAS DE *E. coli* ESTUDIADAS.**

serogrupo	Grupo diarreogénico	No. cepas	Serogrupo	Grupos diarreogénico	No. cepas
O7	EAEC	6	O86	EPEC-EAEC	3
O8	ETEC	11	O125ab	EPEC	12
O11	ETEC	5	125ac	EPEC	6
O15	ETEC-EAEC	3	O127	EAEC-EPEC	7
O18	EPEC	1	O128	ETEC-EPEC-EAEC	1
O25	ETEC	8	O153	ETEC	2
O44	EAEC	2	O159	EPEC-ETEC-EIEC	2
O77	EAEC	2	TOTAL		62

Los grupos diarreogénicos relacionados con los serogrupos mostrados aquí fueron considerados de acuerdo a varios autores. (Nataro y Kaper 1998; Levine 1987; Law 1994; Lior 1994)

Los serogrupos se distribuyen entre 4 de los 5 grupos diarreogénicos descritos, obteniendo los siguientes porcentajes:

**CUADRO 3. PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LOS GRUPOS DIARREOGÉNICOS ENCONTRADOS EN LAS CEPAS ESTUDIADAS.**

GRUPO DIARREOGÉNICO	TOTAL DE CEPAS	PORCENTAJE (%)
ETEC	26	41.93
EPEC	10	16.12
EAEC	10	16.12
EPEC EAEC	10	16.12
ETEC EAEC	3	4.83
EPEC ETEC EIEC	2	3.22
ETEC EPEC EAEC	1	1.61

Los porcentajes fueron obtenidos tomando en cuenta solamente las 62 cepas, de las cuales su serogrupo fue asociado con algún grupo diarreogénico.

La observación de la actividad antimicrobiana en las 184 cepas analizadas empleando sensidiscos con cada una de las infusiones se realizó considerando 2 efectos: a) bacteriostático y b) bactericida.

**CUADRO 4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS 5 EXTRACTOS ACUOSOS CONTRA CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA.**

Plantas	Actividad				Resistentes	
	Bacteriostática		Bactericida		cepas	%
	cepas	%	cepas	%		
Nanche	118	60.8	16	8.2	60	30.9
Gobernadora	67	34.5	29	14.9	98	50.5
Geranio	69	35.5	23	11.8	102	52.5
Guayaba, corteza	144	74.2	22	11.3	28	14.4
Guayaba, hoja	133	68.5	25	12.8	36	18.5
<b>TOTAL</b>		<b>54.7</b>		<b>11.8</b>		<b>33.3</b>

Se consideró efecto bacteriostático a la inhibición parcial del crecimiento bacteriano y efecto bactericida a los halos sin crecimiento mayores de 7mm.

El estudio de la inhibición de la adherencia de los extractos acuosos fue realizado utilizando cepas tipo con los tres patrones de adherencia.

**CUADRO 5. INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE LAS CINCO INFUSIONES OBTENIDAS DE LAS 4 PLANTAS**

EXTRACTO	Inhibición de Adherencia Agregativa.	Inhibición de Adherencia Difusa	Inhibición de Adherencia Localizada	TOTAL
Nanche	82%	72%	80%	<b>78%</b>
Gobernadora	97%	88%	84%	<b>90%</b>
Geranio	97%	83%	26%	<b>69%</b>
Guayaba, corteza	91%	63%	45%	<b>66%</b>
Guayaba, hoja	95%	98%	63%	<b>85%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>92%</b>	<b>81%</b>	<b>60%</b>	

Los porcentajes mostrados se obtuvieron del promedio de 3 repeticiones para cada ensayo.

**CUADRO 6. EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS  
SOBRE CÉLULAS HEp-2.**

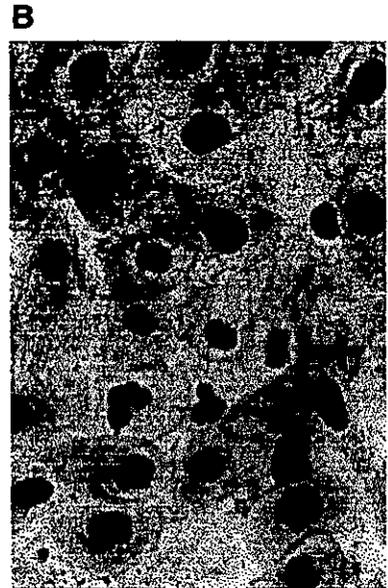
EXTRACTO	ALTERACION CELULAR
Nanche	Citoplasma extendido, formación de vacuolas.
Gobernadora	Muy teñido el núcleo formación de vacuolas.
Geranio	Formación de pequeñísimas vacuolas
Guayaba, corteza	Formación de vacuolas de diferentes tamaños y algunos restos de citoplasma
Guayaba, hoja	Tinción muy acentuada, presenta algunos grupos de vacuolas muy pequeñas.

Todos los extractos acuosos ocasionaron alteraciones en las células HEp-2, pero sin considerarse como daño celular

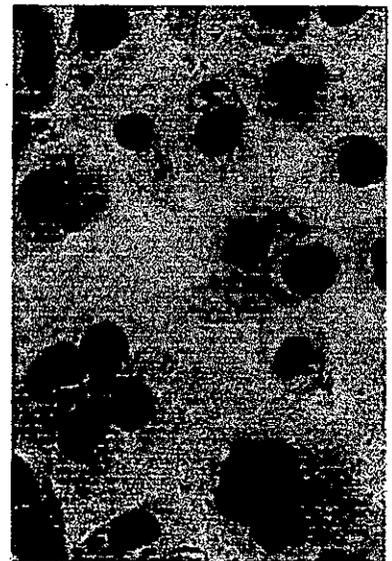
**CUADRO 7. VIABILIDAD DE LAS CEPAS TIPO DE ADHERENCIA AGREGATIVA,  
ADHERENCIA DIFUSA Y ADHERENCIA LOCALIZADA.**

EXTRACTO	ADHERENCIA AGREGATIVA	ADHERENCIA DIFUSA	ADHERENCIA LOCALIZADA
Nanche	80%	100%	100%
Gobernadora	70%	70%	70%
Geranio	100%	100%	100%
Guayaba, corteza	100%	100%	80%
Guayaba, hoja	100%	100%	100%

Aquí se muestra la viabilidad bacteriana para cada cepa de referencia con los extractos acuosos probados, algunos de estos inhibieron el crecimiento de las bacterias en ciertos tipos de adherencia.



**Fig.2** A) Bacterias con patrón de adherencia agregativa en células HEp-2. B) Inhibición de la adherencia agregativa en células HEp-2 tratadas con extracto acuoso (10x) de corteza de guayaba.



**Fig.3** C) Bacterias con patrón de adherencia difusa en células HEp-2. D) Inhibición de la adherencia difusa en células tratadas con extracto acuoso (10x) de geranio.

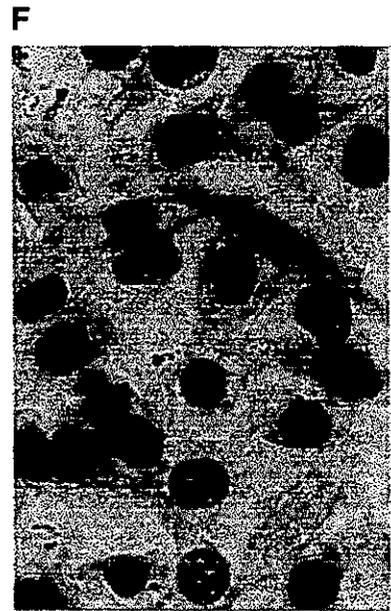
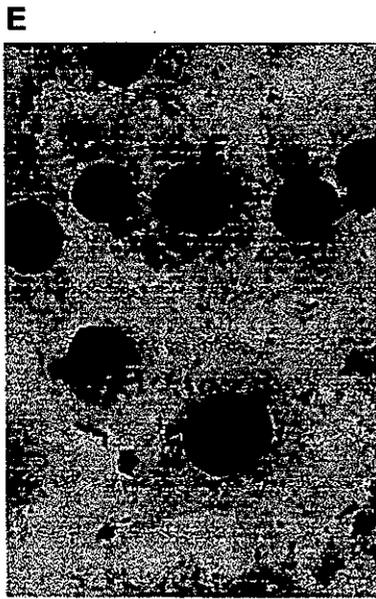


Fig.4 E) Células HEp-2 con bacterias de adherencia localizada. F) Inhibición de la adherencia localizada en células tratadas con extracto acuoso (10x)de geranio.

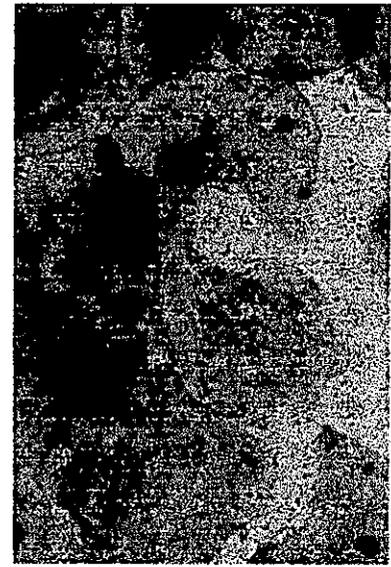
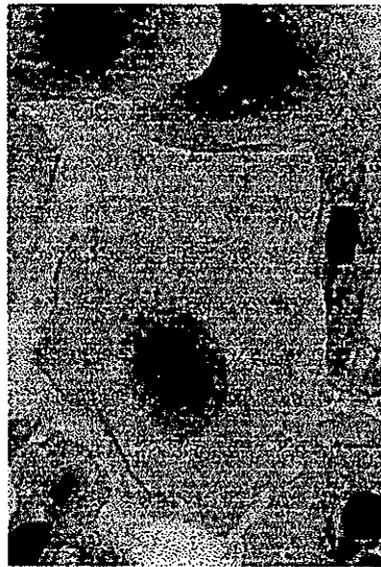


Fig.5 Efecto tóxico de algunos extractos acuosos (10x) en células HEp-2 G) Extracto acuoso de gobernadora. H) Extracto acuoso de nanche.

## ANALISIS DE RESULTADOS

### Serotipos y origen de las cepas de *E. coli*.

Se estudiaron 194 cepas de *E. coli* (**CUADRO 1**) que fueron aisladas de 42 niños, que presentaron un cuadro clínico de diarrea, la edad de estos pacientes fue entre los 0 y 5 años. Se identificaron 57 serotipos de *E. coli* de los cuales fue posible relacionar 15 de los serogrupos (62 cepas) a algunos de los grupos diarreogénicos (**CUADROS 1 Y 2**). Los tipos diarreogénicos más frecuentemente identificados fueron EPEC y ETEC, aunque también se encontraron cepas EAEC y EIEC (**CUADRO 2**).

De los serogrupos identificados estos se distribuyen entre 4 de los 5 grupos diarreogénicos descritos (**CUADRO 3**). El mayor número de estas cepas (26) las cuales representan el 41.93 % pertenecen al grupo enterotoxigénico (ETEC), lo anterior coincide con Flores (1994) en donde se refiere a este grupo como una de las causas más frecuentes de diarrea. En este análisis también se muestran cepas enteropatógenas (EPEC) que conforman el 16.12% (10 cepas), así como del grupo enteroagregativo (EAEC) con el mismo porcentaje; estos porcentajes podrían en un momento dado parecer bajos dado por el número de cepas estudiadas pero no olvidemos que en algunos estudios de infección por EPEC excede en incidencia a la infección por rotavirus (Nataro y Kaper, 1998) y EAEC epidemiológicamente se considera como una causa importante de diarrea persistente en niños (Cravioto y cols, 1996a). Hasta aquí se esta considerando únicamente a cada grupo por separado. Como se puede observar en el **CUADRO 2**, cinco de los serogrupos corresponden a dos ó tres grupos diarreogénicos, considerando esto, los porcentajes de incidencia serían mayores. Las cepas enteroinvasivas solo correspondieron a uno de los serogrupos de las cepas estudiadas, el O159, representando únicamente el 3.22% del total relacionado, lo que coincide con Cravioto y cols.(1988) en donde se menciona que es un grupo epidemiológico poco frecuente.

### Actividad antibacteriana de las infusiones.

Las infusiones de las diferentes plantas fueron concentradas por liofilización (10x) para ser probadas contra 184 cepas clínicas de *E. coli*. En este ensayo se observó que las

infusiones inducían un efecto bacteriostático o bactericida (**CUADRO 4**). Al realizar el análisis por planta se observó que la corteza de guayaba tenía principalmente actividad bacteriostática (74.2 %) y la gobernadora actividad bactericida (14.9%). Por otro lado se encontró que el geranio no era muy activo ya que fue la planta contra la que se observó mayor resistencia (52.5%). Con respecto a la infusión preparada con hoja de guayaba se encontró que esta induce efecto bactericida y bacteriostático y fue un/ de las plantas en las que se observó menor resistencia.

Analizando la sensibilidad de las bacterias a los diferentes extractos, observamos que *S. aureus* (utilizado como control) fue la única bacteria cuyo crecimiento fue inhibido por la mayoría de los vegetales.

### **Inhibición de la adherencia**

Considerando que otro posible mecanismo de acción de los productos contenidos en las plantas pudiera interferir la colonización de las bacterias se procedió a evaluar si los extractos acuosos inhiben la adherencia de las bacterias. Para tal se realizó un ensayo de adherencia utilizando cepas tipo con los patrones agregativo, difuso y localizado. Analizando los resultados obtenidos con cada una de las plantas se observó que las distintas infusiones mostraron un efecto diferente para cada tipo de adherencia (**CUADRO 5**). La infusión con gobernadora y geranio tuvieron el mayor porcentaje de inhibición (97%) en la cepa con adherencia agregativa y la que causó el menor efecto fue el nanche (82%). Sin embargo, la diferencia entre ambas plantas no fue muy grande. Para la cepa con adherencia difusa la infusión hecha con hoja de guayaba causó mayor inhibición (98%), sin embargo, la infusión de corteza de guayaba fue menos activa. Esta observación sugiere que los componentes activos pueden variar de una parte a otra de la misma planta. Finalmente la cepa con adherencia localizada fue inhibida principalmente por la infusión con gobernadora (84%), y el menos activo fue el geranio (26%). Con esta planta los porcentajes de inhibición fueron más marcados con respecto a los presentados en la adherencia agregativa y difusa. Analizando el promedio total de inhibición de la adherencia para cada cepa tipo con los cinco extractos se puede observar que la cepa de adherencia agregativa presentó el mayor porcentaje (92%) de inhibición y la cepa con patrón de adherencia localizada fue la menos susceptible (60%). Por otro lado el extracto

acuoso con mayor actividad de inhibición para las tres cepas tipo fue la gobernadora (90%) y el menos activo (corteza de guayaba) con un 66% de inhibición.

### **Efecto de las infusiones en células HEP-2**

Al observar las preparaciones para calcular los porcentajes de inhibición de la adherencia se notó que las células sufrían algunos cambios en su morfología. Para evaluar el posible daño celular se procedió a realizar algunas pruebas en donde, sólo se incubaban las células HEP-2 con el extracto (concentración 10X). El resultado de este ensayo mostró que existen diferentes alteraciones en las células que esta dado por cada extracto. Sin embargo, no obstante las alteraciones observadas se puede considerar que no inducen daño letal que pudiera estar asociado con la inhibición de la adherencia **(CUADRO 6)**.

Haciendo el análisis con cada planta se encontró que el extracto de nanche cambia la morfología de la célula, el citoplasma se encuentra extendido o expandido sobre la preparación, también se aprecia la formación de vacuolas, la tinción se intensifica y resalta más los núcleos de las células tanto que los nucleolos no se notan. **(Fig. 5)**

Con la gobernadora se observó que la célula se encuentra muy teñida, de igual forma en el núcleo no se notan los nucleolos, también se aprecian vacuolas, la morfología de la célula cambia un poco. (es semejante a lo observado con el nanche). **(Fig. 4)**

En referencia al extracto con geranio lo que provoca en la célula son pequeñísimas vacuolas, se aprecia un poco sucia la preparación (detritus) incluso la tinción no es tal como en los anteriores.

De acuerdo a lo observado con el extracto de corteza de guayaba las células se encuentran un poco más teñidas de lo normal pero no es tan marcada como en otros extractos, se pueden observar la formación de vacuolas de diferentes tamaños y algunos restos de citoplasma, la morfología de la célula se encuentra un poco modificada.

Por último con el extracto de hoja de guayaba se aprecia que la célula se encuentra muy teñida, con algunos grupos de vacuolas muy pequeñas.

## **Posible actividad bactericida de las infusiones sobre las cepas tipo**

También fueron hechas pruebas para observar si el extracto o infusión tenía un efecto bactericida sobre las cepas tipo con lo cual por consecuencia provocara una inhibición de la adherencia. Para tal, las cepas se sembraron en cajas petri con agar sangre con cada uno de los extractos para observar la viabilidad bacteriana (**CUADRO 7**). Los resultados mostraron que con el extracto de nanche las bacterias de adherencia agregativa crecieron en un 80% y sin ningún efecto en las cepas de adherencia difusa y localizada. Para la gobernadora se observó que en las tres cepas tipo se obtuvo una inhibición del 30% de la viabilidad. Para el geranio y la hoja de guayaba no hubo ningún efecto sobre la viabilidad de las bacterias y con la corteza de guayaba sólo con las cepas del tipo de adherencia localizada la viabilidad fue del 80% con lo cual se descarta que éste pudiera ser la razón de la inhibición de la adherencia (**CUADRO 5**). Este resultado nos permite considerar para estudios posteriores aquellos extractos acuosos que no tuvieron efecto en la viabilidad bacteriana y sí una inhibición de la adherencia.

## CONCLUSIONES

Algunos de los serotipos identificados en las cepas estudiadas están asociados con grupos diarreogénicos tales como ETEC, EPEC, EAEC y EIEC con lo cual podemos inferir que estos serogrupos fueron los posibles causantes de la diarrea presentada en los niños.

En este trabajo se muestra como los extractos acuosos de plantas empleadas tradicionalmente para curar la diarrea, ejercen actividad antibacteriana contra bacterias causantes de la enfermedad. La hipótesis propuesta se puede considerar que fue confirmada dado que se observaron efectos bacteriostático y/o bactericida, aunque éstos dependen de la especie de la planta y del microorganismo. También es importante señalar que algunos de los extractos de estas plantas inhiben la adherencia de las bacterias, está aunque no se dio en el 100% podemos considerar que los porcentajes de inhibición obtenidos fueron altos principalmente para las cepas de adherencia agregativa y difusa. Nuestro objetivo principal se cumplió y ahora se plantea la necesidad de caracterizar completamente los compuestos involucrados en la actividad antimicrobiana y en la inhibición de la adherencia ya que su efecto puede ser utilizado para prevenir la colonización bacteriana y por lo tanto utilizarse como alternativa para la prevención del padecimiento.

Tal vez este cambio en la morfología de la célula, tenga cierta relevancia ya que si afecta alguno de los receptores de membrana los cuales son necesarios para la adherencia de la bacteria, pues esta no tenga otra forma de adherirse y por tanto de causar la infección o tal vez pueda ser lo contrario afectando los receptores de la membrana bacteriana, como ya ha sido reportado por Turi y cols (1997) donde muestra en sus experimentos que algunas plantas medicinales pueden cambiar las propiedades de la superficie de bacterias Gram negativas.

## BIBLIOGRAFÍA

Argueta, V.A. Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol: I, II y III. Inst. Nac. Indig. México. 1994.

Argueta, V.A. "Medicina y cultura popular en México", en A. Argueta (ed) : El futuro de la medicina tradicional en la atención a la salud de los países latinoamericanos. México, CIESS, 1987, p.153-162.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path. 1966;36:493-496.

Baytelman, B. Etnobotánica en el Estado de Morelos. Facsimil editado en 1990, Acerca de plantas y curanderos por el Inst. Nac. Antrop. Hist. México. 1981

Beachey, E.H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 1981;143:325-345.

Carrada, T., y Avila, I. Diarrea en la Infancia. Artículos de revisión. Rev. Mex. Pediatr. 1991;58:57-76

Cáceres, A., Girón, L.M., Alvarado, S.R. y Torres, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J. Ethnopharmacol. 1987;20:223-237.

Cravioto, A., García, J.J. y Eslava, C. Diarrea por *Escherichia coli*. Rev. Fac. Med. UNAM. 1996a;39:14-18, 45-49, 98-103.

Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M. y Rowe, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 1979;3:95-99.

Cravioto, A., Molina, J., Eslava, C. "Diarrea causada por cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*" en: Torregrosa, L., Santos, J.I., y Rodríguez, R. Enfermedades diarreicas en el niño. 1996b 10ª. Edición. McGraw-hill. México. p.163-170.

Cravioto, A., Reyes, R.E. y Ortega, R. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiol. Rev. 1988;101:123.

Duguid, J. and Old, D. Adhesive properties of enterobacteriaceae. In: E.H. Beachey (ed). Bacterial Adherence. Chapman and Hall Publish., London. 1980. p.187-217.

Eslava, C., Navarro-García, F., Czeczulin, J.R., Henderson, I.R., Cravioto, A. y Nataro, J.P. Pet an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1998;66:3155-3163.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Eslava, C., Villaseca, J., Morales, R., Navarro, A. y Cravioto, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105 p.44. In a Abstracts of the 93<sup>rd</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology. 1993. Washington. D.C.

Flores, J. *Escherichia coli* enterotoxigénica asociada a diarrea aguda en niños. Rev. Mex. Pediatr. 1994;61:68-72.

Law, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clín. Microbiol. Rev. 1994;7(2):152-173.

Levine, M. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 1987;155 (3):377

Lozoya, X.(Ed) Estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. México, IMEPLAM, 1976.

Lozoya, X. Bibliografía básica sobre la herbolaria medicinal de México. SEDUE, 1984.

Lozoya, X. y Lozoya, M. Flora Medicinal de México. Primera Parte: Plantas Indígenas. IMSS. México. 1982.

Mayer, E. y Mansferrer, E. La población indígena de América en 1978. Amér. Indíg. 1978;39:217-254.

Menéndez, E. "Medicina tradicional o sistemas práctico-ideológicos de los conjuntos sociales, como primer nivel en atención", en: El futuro de la medicina tradicional en la atención a la salud de los países latinoamericanos, México, CIESS, 1987.

Mirabal, M. Detección de *Escherichia coli* enteropatógena por hibridación de colonias y perfiles de adherencia a células HEp-2 en diarreas infantiles. Tesis. Facultad de Química. 1995. p. 19-20.

Murray, P., Kobayashi, G., Pfaller, M. y Rosenthal, K. Microbiología Médica. Ed. Harcourt Brace. 2da edición. Madrid. 1997. pp.755.

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

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

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

Orskov, F. and Orskov, I. Serotyping of *Escherichia coli*. Met. Microbiol. London. 1984;14:43-113.

Rzedowski, J. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. New York. 1993. p. 129

Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C. y Levine, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. J. Clin. Invest. 1991;87:1450-1455.

Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M. y Trabulsi, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cell. Infect. Immun. 1984;45:534-536. En Scaletsky, I. C. A., Pedrosa, M., Oliva, C., Carvalho, R., Moraes, M. y Fagundes-Neto, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cell that is associated with infantile diarrhea. Infect. Immun. 1999;67:3410-3415.

Sepúlveda, J. (Coordinador) Diarreas y Cólera. Cuadernos de Salud. Secretaria de Salud. México. 1994.

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

Turi, M., Turi, E., Koljalg, S. y Mikelsaar, M. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. APMIS. 1997;105:956-962.

Verástegui, M.A., Sánchez, C.A., Heredia, N.L. y Santos, J. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. J. Ethnopharmacol. 1996;52:175-177.

Viesca, C. Problemática y vigencia de la medicina tradicional. Medicina tradicional, alternativa para la salud, ceestem, 1979.

Williams-Linera, G; Halffter, G y Excurra, E. "Estado de la biodiversidad en México" en: Halffter, G. (Comp.) La diversidad biológica de Iberoamérica, I. CYTED-D-Instituto de Ecología, A.C. SEDESOL, 1992.

## APÉNDICE

### AGAR MacCONKEY

Disolver 50 g de agar en 1L de agua destilada  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Vaciar 20 ml en condiciones de esterilidad en cajas de petri  
Esperar que se gelifique  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

### AGAR SANGRE

Diluir 40 g de base agar sangre en y 1 L de agua  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Colocar en baño maría a 45°C  
Agregar en condiciones de esterilidad 50 ml de sangre de carnero desfibrinada  
Agregar en condiciones de esterilidad 20 ml de agar sangre en cajas de petri  
Esperar que gelifiquen  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

### AGAR DE SOYA TRIPTICASEÍNA

Disolver 40 g en 1 L de agua destilada  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Ajustar pH a 7.2  
Colocar 4 ml del agar en tubos de 13x100 con rosca  
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Inclinar los tubos y se espera a que solidifique  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

### AGAR SEMISÓLIDO CON FÓRMULA DE BHI Y GELATINA

Peptona de caseína.....	10 g
Extracto de carne.....	3 g
Agar Agar.....	4 g
Cloruro de sodio.....	5 g

Gelatina bacteriológica..... 80 g  
Agua destilada..... 1 L

Calentar 750 ml de agua destilada vaciar poco a poco la gelatina bacteriológica y mover constantemente para disolver completamente  
Disolver los demás ingredientes en 250 ml de agua destilada calentando para disolver  
Mezclar ambos medios y calentar de nuevo para homogeneizar  
Dejar enfriar un poco y ajustar el pH a 7.2  
Distribuir 10 ml en tubos de 16 x 150 con rosca  
Colocar dentro del tubo una varilla de vidrio  
Tapar los tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

### **AGAR MULLER HINTON**

Diluir 21 g de Muller Hinton en 1 L de agua destilada  
Agregar 15 gr de agar agar  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Vaciar 20 ml en condiciones de esterilidad en cajas de petri  
Esperar que se gelifique  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

### **SOLUCIÓN SALINA 0.15 M**

Disolver 8.75 g de cloruro de sodio en 1 L de agua destilada  
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **FORMALINA**

Por cada litro de solución salina agregar 6 ml de formaldehído al 37%

### **AGUA PEPTONADA AL 1%**

Disolver 1 g de peptona de caseína en 100 ml de agua destilada  
Ajustar pH a 7.2.  
Para la prueba de indol preparar peptona de caseína al 2% pH 8.

## **SOLUCION D-MANOSA AL 10%**

Diluir 10 g de D-manosa en 100 ml de agua destilada  
Esterilizar por filtración con membrana de 0.22  $\mu$   
Guardar a 4°C.

## **TRIPTONA**

Diluir 1 g de triptona en 100 ml de agua destilada  
Distribuir 3 ml en tubos de 13 x 100 con rosca  
Tapar los tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos  
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

## **MEDIO EAGLE DULBECCO MODIFICADO (DMEM)**

Disolver perfectamente un sobre de DMEM en un 1 L de agua estéril desionizada  
Agregar 10 ml de L-glutamina 200 mM  
Agregar 10 ml de Bicarbonato de sodio 7.5%  
Agregar 10 ml de HEPES (regulador de pH)  
Distribuir en frascos de 400ml y 300 ml esterilizando por filtración con membrana de 0.45  $\mu$   
Dejar a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C  
Guardar a 4°C.

Para utilizar el DMEM en células HEp-2 se debe complementar agregando 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 U/mcg/ml en solución de cloruro de sodio al 0.85%