

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

" ESTUDIO DE CEPAS DE E. COLI IMPLICADAS EN CASOS DE
DIARREA INFANTIL "

Nombre del sustentante: MARIA ELENA CORTES CUEVAS.

Carrera: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Orientación Bioquímico Microbiólogo

MEXICO, D.F.

1978.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

TESIS 1978

CLAS U. 144 108

ABO _____

FECHA _____

REC _____



Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE: OSCAR AMOR DODERO

VOCAL: LEONOR MARTINEZ SOTO

SECRETARIO: ELDA PENICHE QUINTANA

1er SUPLENTE: GUADALUPE VELAZQUEZ
LIZARDI

2do. SUPLENTE: CARMEN CORTES D.

Sitio donde se desarrollo en tema:

Clinica-Hospital # 25 del I.M.S.S.
Laboratorios de los Productos Veterinarios BAC, S.A. de C.V. y de la U.N.A.M.

Nombre Completo del Sustentante:

MARIA ELENA CORTES CUEVAS

Nombre Completo del asesor del tema:

Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA

A MIS PADRES:

Con cariño, respeto, agradecimiento; pero sobre todo con la alegría de tenerlos conmigo.

A MIS HERMANOS:

Rosa, Raymundo, Juan Pablo, Eduardo
Clara, Florina y José Cuauhtémoc.

A MI FAMILIA:

Con agradecimiento por su constante
apoyo.

A MIS AMIGAS de infancia,
adolescencia y de toda la vida
Alicia, Amada, Laura y Lourdes

A todas las personas que con su valiosa
ayuda hicieron posible la realización
de este trabajo.

INDICE

I.-	INTRODUCCION	1
II.-	GENERALIDADES	4
III.-	PARTE EXPERIMENTAL	30
	Cepas Utilizadas	30
	Caracterización	32
	a) Aislamiento de las cepas	33
	b) Pruebas bioquímicas	33
	c) Serotipificación	33
	d) Prueba de sensibilidad a los antibióticos	34
	Pruebas de Virulencia	35
	a) Invasividad	35
	b) Prueba del factor de permeabilidad	36
	c) Resultados	38
IV.-	RESUMEN Y COMENTARIOS	57
V.-	CONCLUSIONES	61
VI.-	BIBLIOGRAFIA	62

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

La diarrea es una de las causas principales de muertes infantiles sobre todo en recién nacidos en diferentes partes del mundo, principalmente en países de vías de desarrollo como México. Hasta el presente no hay medios eficientes para controlar totalmente esta enfermedad.

Aunque inicialmente se consideraba a Escherichia coli exclusivamente como un habitante normal del tracto intestinal del hombre y de otros mamíferos, se ha visto ahora que E. coli no es solamente miembro de la flora normal intestinal, sino la causa de problemas entéricos en niños y adultos; de tal manera que constantemente se tiene conocimiento de personas extranjeras con problemas entéricos después de visitar la República Mexicana o algún otro país con condiciones alimenticias similares; por ejemplo, personas que viajan de los Estados Unidos y del norte de Europa a Latinoamérica y Asia desarrollan diarrea frecuentemente, en ocasiones el agente etiológico no es identificado pero en otras se aísla exclusivamente Escherichia coli. Este fenómeno es conocido con el nombre de "Enfermedad del Viajero".

La mayoría de los estudios realizados para - - -

cepas de E. coli de origen humano, tienen su base en otros previamente efectuados en animales jóvenes como: lechones, cabritos y becerros. (22), (23), (26).

Sakazaki y colaboradores(2), han observado sobre bases clínicas, que algunas cepas de Escherichia coli pueden causar un síndrome similar a la disentería; es decir -- mostrando poseer propiedades invasivas como las atribuidas a cepas de Shigella. Trabajos más recientes en animales y en el hombre sugieren que algunas cepas no sean invasivas, pero sí produzcan una enterotoxina asociada con un síndrome diarreico. En aspecto, la patología de esta enfermedad puede parecerse a la del cólera.

Hasta antes de 1960 (23), el conocimiento de -- Escherichia coli como patógeno era limitado; sin embargo esto cambió gracias a la semejanza del mecanismo de acción de este microorganismo con el de Vibrio cholerae (7), (22), -- (23).

El objetivo principal de este trabajo, es buscar una relación entre las pruebas comunmente usadas en el laboratorio de diagnóstico bacteriológico y las pruebas más recientemente empleadas a nivel de laboratorio de investigación, para detectar el mecanismo de virulencia de esta enterobacteria. Asimismo, detectar la presencia de cepas ente-

rotoxigénicas productoras de toxina lábil al calor, en un pequeño número de cepas aisladas a partir de niños hospitalizados en la ciudad de México, con cuadros clínicos -- característicos de diarrea. Detectar, también en este -- grupo, cepas con características invasivas, calculando el porcentaje de éstas y de cepas toxigénicas productoras - de toxina lábil con propiedades similares a la toxina de V. cholerae.

GENERALIDADES

Escherichia coli es un microorganismo que se encuentra normalmente en el intestino del hombre y otros vertebrados. Fué aislado inicialmente por el profesor -- Theodor Escherich a partir de heces de niños lactantes. Se encuentra en heces de niños y adultos y es ocasional-- mente patógena para el hombre causando diarreas, enteri-- tis, peritonitis; especialmente en niños además esta bac-- teria es causa de infecciones del tracto urinario como -- cistitis. La presencia de E. coli en el agua o en cual-- quier alimento indica contaminación fecal.

Clasificación

E. coli pertenece a la familia Enterobacteria-- ceae que agrupa microorganismos con caracterfsticas morfo-- lógicas y bioquímicas similares. De acuerdo a la mayor - o menor similitud entre sus caracterfsticas se puede divi-- dir en los siguientes géneros:

Género ESCHERICHIA.

En este grupo se encuentran bacilos que miden aproximadamente 1.1 micra de ancho y de 2 a 6 micras de largo. Se presentan solos o en pares, generalmente móviles. Crecen fácilmente sobre medios simples de cultivo, existen formas coloniales lisas y rugosas. Usan el acetato como fuente de carbono, no así al citrato. Fermentan la glucosa y otros azúcares con producción de piruvato y ácido láctico. Algunas cepas son anaerogénicas. Pertenece a este género la especie Escherichia coli.

Género EDWARDSIELLA.

Bacilos móviles con flagelos peritricos, no encapsulados. No utilizan el malonato y el citrato como fuente de carbono. Producen H_2S a partir de agar TSI e indol. Poseen descarboxilasas para la lisina y la ornitina. No fermentan el manitol. La principal especie de este género es Edwardsiella tarda.

Género CITROBACTER.

Bacilos móviles con flagelos peritricos, no encapsulados. Usan el citrato como fuente de carbono. Fermentan la glucosa y otros azúcares con producción de áci-

do y gas, en el caso especial de la lactosa la fermentación pueden ser muy lenta o no llevarse a cabo. Forman trimetilenglicol a partir de glicerol. El crecimiento no se ve inhibido en presencia de KCN. Las principales especies de este género son: Citrobacter freundii y Citrobacter intermedius.

Género SALMONELLA.

Bacilos generalmente móviles por la presencia de flagelos peritricos, habiendo dentro de este grupo dos especies inmóviles como S. gallinarum y S. pullorum. Las colonias miden aproximadamente de 2 a 4 mm. de diámetro. Dentro de los medios de cultivo utilizados para su crecimiento es necesario adicionar ciertos factores de crecimiento específicos. En este género se encuentran bacterias que emplean el citrato como fuente de carbono. La mayoría de las cepas son aerogénicas.

Género SHIGELLA.

Bacilos inmóviles no capsulados. No requieren de factores especiales de crecimiento, éste se ve inhibido en presencia de sulfito de bismuto. No usan citrato ni malonato como fuentes de carbono. No producen H_2S , fermentan la glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido pero no de gas. Normalmente producen catalasa.

Género KLEBSIELLA.

Bacilos inmóviles capsulados, se presentan sim ples, en pares o formando pequeñas cadenas. No requieren de factores especiales de crecimiento, pero sí amoníaco, como fuente de nitrógeno. Al fermentar la glucosa producen ácido y gas. La mayoría de las cepas producen 2, 3 - butanodiol como producto final en la fermentación de la glucosa. La reacción de Voges-Proskauer normalmente es positiva. No hay formación de H_2S a partir de agar TSI u otro similar. Generalmente producen gelatinasa e indol.

Género ENTEROBACTER.

Móviles con flagelos peritricos, algunas cepas son encapsuladas, como fuente de carbono pueden usar tanto al acetato como al citrato, a $37^{\circ}C$ fermentan la glucosa con producción de ácido y gas; pero no producen gas cuando se incuba a $44.5^{\circ}C$. Generalmente la prueba de Voges - Proskauer es positiva y la del rojo de metilo negativa.

La mayoría de las cepas licuan ligeramente a la gelatina. No producen H_2S a partir de agar TSI o similar ni fermentan el dulcitol.

Género HAFNIA.

Móviles con flagelos peritricos, no encapsula-

dos. Pueden usar en acetato y el citrato como fuente de carbono. Fermentan la glucosa con producción de ácido y gas; pero no producen ácido a partir de citrato. La prueba del rojo de metilo generalmente es negativa a 37°C. y la prueba de Voges-Proskauer positiva a 22°C. pero negativa a 37°C. No producen H₂S a partir de agar TSI, tampoco producen lipasa, ni DNasa.

Género SERRATIA.

Móviles con flagelos peritricos algunas cepas son capsuladas. Pueden usar tanto acetato como citrato -- como fuente de carbono. Producen pigmentos de color rosa, rojo o magenta, fermentan la glucosa con pequeña producción de gas. La prueba del rojo de metilo es negativa y la prueba de Voges-Proskauer es negativa. Normalmente no descompone la urea. Producen DNasa y el pigmento llamado "Prodigiosina".

Género PROTEUS.

Bacilos que se presentan en pares o en cadenas no encapsulados, móviles por la presencia de flagelos peritricos. Forman ácido a partir de glucosa pero más ligeramente de fructosa, galactosa y glicerol. La prueba del rojo de metilo es positiva. No forman ácido a partir de - -

arabinosa, dulcitol, inulina, lactosa, rafinosa y sorbitol. Los nitratos se reducen a nitritos y generalmente no forman indol. Producen ureasa.

Género YERSINIA.

Células ovoides, inmóviles a 37°C. pero móviles a temperaturas superiores a ésta por poseer flagelos peritricos. No encapsulados, generalmente no fermentan la lactosa pero sí a la fructosa, glucosa, maltosa, manitol, manosa y trealosa con producción de gas. No fermentan al dulcitol, inositol y rafinosa. La prueba del rojo de metilo es positiva y la Voges-Proskauer negativa a 37°C. para dos especies Y. pestis y Y. pseudotuberculosis. Hay buen crecimiento en agar con extracto de carnes. No utiliza al citrato ni al malonato como fuente de carbono. No reduce al tetrionato. No hay hidrólisis de la gelatina. Reducen los nitratos excepto una variedad de este grupo. No hay descarboxilación de la lisina ni desaminación de la fenilalanina. Normalmente no producen indol.

Género ERWINIA.

Bacilos Gram negativos, móviles por la presencia de flagelos peritricos. Producen ácido a partir de glucosa fructosa, galactosa, sacarosa y beta-metilglucosidasa; pero

rara vez de adonitol y dulcitol. Utiliza el acetato, fumarato, gluconato, malonato, y succinato como fuente de carbono y energía, pero no oxalato, benzoato ni propionato. Al final de la fermentación de la glucosa por estos microorganismos se obtiene CO_2 y diferentes combinaciones de succinato, lactato, formato y acetato. No hidroliza al almidón más allá que a dextrinas. No presentan descarboxilación del ácido glutámico y la desaminación de arginina, lisina u ornitina solo se puede detectar en algunas cepas. Rara vez producen ureasa y lipasa. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 27 y 30°C. Anaerobios facultativos. Son catalasa positivos pero no producen oxidasa. Saprofitos o parásitos de plantas.

Características de la especie Escherichia coli

A).- Morfológicas y Coloniales.

Escherichia coli se incluye dentro de los bacilos entéricos y son conocidos como bacilos del colon porque son especies facultativas predominantes a los largo del intestino. Miden normalmente 0.5 por 1.0 a 3.0 micras variando de forma cocoide a larga, se pueden presentar en pares o cadenas cortas. Móviles o inmóviles, las cepas móviles poseen flagelos peritricos y pilis. Normalmente no capsulados, pero hay algunas cepas que desarrollan cápsula o microcápsula. No forman esporas y son Gram negativos. Cuando crecen en caldo producen una turbiedad uniforme y si se encuentran por debajo de sus condiciones óptimas de crecimiento pueden formar lasrgas cadenas filamentosas que causan un crecimiento granular. Las colonias lisas (S) sobre agar, son brillantes convexas e incoloras; pero cuando se hacen resiembras constantes en medios de cultivo se vuelve rugosas. Las variedades capsuladas producen colonias mucoides, particularmente cuando se incuban a bajas temperaturas y cuando los medios de cultivo tienen bajas cantidades de nitrógeno y fosfato pero altas cantidades de carbohidratos. Algunas cepas son hemolíticas sobre gelosa sangre y sobre medios sólidos tiene un olor fétido.

Colonias en gelatina.- Opacas, húmedas, blanco grisáceo,-
enteras.

Crecimiento por picadura.- Blanco grisáceo que se extiende en forma ondulatoria, no hay licuefacción.

Colonias en agar.- Normalmente blancas y en algunas ocasiones blanco amarillentas, enteras y onduladas; frecuentemente hay formas atípicas.

En agar inclinado.- Normalmente blancas, algunas veces blanco amarillento, húmedas, brillantes y crecimiento extendido.

Crecimiento en caldo.- Turbio, denso, con sedimento grisáceo, no forma película .

En leche tornasolada.- Producción rápida de ácido con desprendimiento de gas normalmente coagula la leche. No hay peptonización del coagulo , el tornasol puede o no ser reducido.

Se pueden establecer subdivisiones de Escherichia coli de acuerdo a sus propiedades antigénicas, la actividad de -

fagos en este tipo de bacterias y a la producción de colifaginas.

B).- Características Bioquímicas.

El grupo de Escherichia coli se compone de bacterias con reacciones bioquímicas similares pero calificadas con serotipos diferentes de acuerdo con métodos serológicos adecuados. A continuación se da un cuadro con las principales pruebas bioquímicas y sus resultados para cepas de E. coli aisladas de cultivos.

Propiedades bioquímicas de Escherichia coli

<u>Prueba</u>	<u>Resultado</u>	<u>Prueba</u>	<u>Resultado</u>
Movilidad.....	d	Manitol.....	+
Catalasa.....	+	Rhamnosa.....	d
Crecimiento en KCN.....	-	Salicina.....	d
Crecimiento en 4% de selenito.....	+	Sorbitol.....	d
Citrato como fuente de carbono.....	-	Sacarosa.....	d
Malonato.....	-	Trihalosa.....	+
Gas a partir de glucosa.....	+	Xilosa.....	d
<u>Acido a partir de:</u>		Indol.....	+
Adonitol.....	-	Ureasa.....	-
Arabinosa.....	+	H ₂ S a partir de TSl.....	-
Dulcitol.....	d	Arginin dihidro- lasa.....	d
Lactosa.....	+		
Maltosa.....	+		

<u>Prueba.</u>	<u>Resultado</u>	<u>Prueba</u>	<u>Resultado</u>
Lisin descarboxi- lase.....	+	Rojo de metilo.....	+
Ornitin descarbo- xilase.....	d	Voges-Proskauer.....	-
Fenilalanina de - aminasa.....	-	Gelatina (22°C.).....	-

+ = Resultado positivo después de realizar la prueba .

- = Resultado negativo después de realizar la prueba .

d = 16 - 84 % de las cepas presentan resultado positivo.

Escherichia coli no utiliza el ácido úrico como fuente de -
nitrogeno. Catalasa positiva. Aerobias o anaerobias facul-
tativas.

Resistencia al calor.- Normalmente mueren después de someter
las a 60°C. durante 30 min.; pero ciertas cepas termoresis-
tentes pueden soportar esta temperatura. Requerimientos pa-
ra su crecimiento. Buen crecimiento sobre medios ordinarios-
de laboratorio. Temperatura óptima de crecimiento entre 30°
a 37°C., teniendo límites de temperatura de crecimiento en-
tre 10° a 45°C. Producen gas a partir de glucosa a 45° y --
46°C.

Variedades de Escherichia coli

E. coli var. communis.- Incluye cepas de Escherichia coli que no fermentan la sacarosa ni la salicina. Aislada a partir de heces.

E. coli var. acidilactici. Incluye cepas de E. coli que no fermentan la sacarosa ni la salicina. Aisladas a partir de leche.

E. coli var. neapolitana. Cepas de E. coli que fermentan la sacarosa y la salicina, aisladas a partir de pacientes con cólera y cadáveres; por esta razón se pensaba eran causa de cólera.

E. coli var. commu- -
nior. Cepas de E. coli que fermentan la sacarosa pero no la salicina. Aisladas a partir de heces.

C).- Propiedades antigenicas.

E. coli es una especie bacteriana serológica-- mente terogénea ya que hay un gran número de tipos seroló gicos, los cuales parecen diferir en patogenicidad. Al - igual que Salmonella y Shigella, E. coli, se divide en gru pos basados en su antígeno somático termoestable (O) que a su vez se encuentra relacionado para la clasificación -- con el antígeno capsular (K) el cual tiene la propiedad de inhibir la aglutinación del antígeno (O). Esta inhibición puede eliminarse por calentamiento a 100°C. ó a 120°C inac tivando el antígeno K sin que el antígeno O se vea altera do . El antígeno K se divide en tres variedades (L, B, y- A) de acuerdo con sus propiedades físicas particulares como por ejemplo: capacidad para inhibir la aglutinación del - antígeno O, resistencia a las altas temperaturas, etc.

Caracterfsticas de las variedades del antígeno capsular (K)

(según Edwards y Ewing)

Variedad.

Caracterfsticas

L

- 1.- Capacidad aglutinante del antígeno L con antisuero L inactivado por calen tamiento a 100°C. durante una hora.
- 2.- En suspensión da aglutinación con el

- antisuero 0 si se calienta a 100°C.- -
durante una hora.
- 3.- El poder de unir anticuerpos se inac -
tiva por calentamiento a 100°C. duran -
te una hora.
 - 4.- Se inactiva su antigenicidad por calen -
tamiento a 100°C. durante una hora.
 - 5.- Se presenta como envoltura de la célula
y ocasionalmente como capsula.
-
- 1.- Capacidad aglutinante del antígeno A --
con antisuero A inactivado por calenta -
miento a 120°C., durante dos horas y me
dia.
 - 2.- En suspensión da aglutinación con anti -
suero 0 si se calienta a 120°C. durante
dos horas y media.
 - 3.- El poder de unir anticuerpos se inacti -
va por calentamiento a 100°C. durante -
dos horas y media, a 121°C. durante dos -
horas.
 - 4.- Su antigenicidad se inactiva por calen -
tamiento a 120°C. durante dos horas y -

media .

B

5.- Se presenta como cápsula

1.- Capacidad aglutinante del antígeno B con antisuero B inactivado por calentamiento a 100°C. durante una hora.

2.- En suspensión da aglutinación con antisuero O si se calienta a 100°C. durante una hora.

3.- El poder de unir anticuerpos se inactiva por calentamiento a 100°C. durante dos horas y media o 121°C. dos horas.

4.- Se inactiva su antigenicidad por calentamiento a 100°C. durante una hora.

5.- Se presenta como envoltura de las células o como cápsula.

Finalmente este microorganismo puede clasificarse serológicamente de acuerdo con su antígeno flagelar (H). De acuerdo con estudios serológicos realizados por Kauffmann y sus colaboradores, se han encontrado más de 145 diferentes antígenos (O) designados como : 055, 0111, etc.; aproximadamente 86 diferentes antígenos capsulares-

(K) y cerca de 50 antígenos flagelares (H). Estos antígenos pueden encontrarse en diferentes combinaciones y es -- obvio que el número de serotipos existentes dentro de la especie es muy grande.

En los últimos años se incremento el interés - de la serología de E. coli, debido a la asociación de - - ciertos serotipos con diarrea infantil severa, de la que no se aislo' otro tipo de patógenos como Salmonella sp. - Shigella etc. y sí microorganismo pertenecientes a este - grupo, con reacciones bioquímicas similares pero seroti-- pos diferentes.

SEROTIPOS DE ESCHERICHIA COLI REPORTADO EN DIARREAS .
(Edwards y Ewing)

ANTIGENO "O"	ANTIGENO "K"	ANTIGENO "H"
26	60 (B6)	NM (inmóvil)(E893), 11,32,
44	74 (L)	12, 18, 34.
55	59 (B5)	NM, ,2,4,6,7,8,10, 21,27,32,34.
86	61 (B7)	NM (E990), 7,8,9,- 10,11,34.
86	62 (L)	2
111	58 (B4)	NM, 2(D433),4,6,11 12,16,21,25,27,40.
112a 112c	66 (B11)	NM (Guanabara)
119	69 (B14)	NM,6(Aberdeen 537- 52),9,18,27(W34)
124	72 (B17)	NM, 16,19,30,32,
125a 125b	70 (B15)	19 (Canioni) 21
125a 125c	70	6, 11, 21, 25
126	71 (B16)	NM,2(E611),27
127a	63 (B8)	NM(Holcomb)
128a, 128b	67 (B12)	2(Cigleris),8,9,12.
128a, 128c	67	NM, 8, 10, 12.

D).- Virulencia en cepas de *Escherichia coli* enteropatógena.

Escherichia coli.- Es un microorganismo habitante normal del tracto intestinal, siendo ésta la causa, en muchas ocasiones, de reportes benignos por parte del laboratorio bacteriológico; sin embargo, muchos casos de diarrea en niños menores de dos años de edad están asociados a cepas de E. coli pertenecientes a un pequeño grupo serológico. La colonización se ve facilitada debido al pH sumamente alcalino que en un principio existe en el intestino del recién nacido poco después del nacimiento y antes de que se absorba el calostro, conteniendo anticuerpos ricos en IgA, se repite el período de susceptibilidad una vez que ha finalizado la etapa de lactancia.

La importancia del estudio de Escherichia coli como agente causal de enfermedades, se vio favorecida por los estudios realizados sobre la patogénesis del cólera, de ellos surgió la determinación de la existencia de una enterotoxina productora de la diarrea en infantes.

En algunos casos de individuos con diarrea, los síntomas clínicos era similares a los del cólera, pero al examinar bacteriológicamente las heces sólo se encontró E. coli y no Vibrio cholerae.

Escherichia coli se encuentra normalmente en el -

La secreción de anticuerpos y la barrera ácida del estómago impide el paso de E. coli a esta región.

Cuando alguno de estos mecanismos normales se encuentra dañado, se puede presentar la invasión de microorganismos. Dentro de las causas de modificación de estos medios de defensa, se encuentra todos aquellos que proporcionar en medio adecuado para el desarrollo de agentes patógenos tales como un cambio en la dieta normal, la producción de un antagonismo microbiano o la predisposición del huésped.

Se ha encontrado que el mecanismo de virulencia de Escherichia coli puede ser de dos tipos; hay cepas invasivas muy similares en acción a Shigella ó Salmonella y cepas productoras de enterotoxina con características bioquímicas parecidas a la toxina del V. cholerae, a estas últimas se les conoce con el nombre de cepas enterotoxigénicas.

Cuando el huésped se ve afectado por cepas de E. coli invasivas, el cuadro clínico predominante es el típico de disenterfa, debido a la destrucción de la mucosa y tejido intestinal por las bacterias. Al atravesar la pared intestinal, son la causa de septicemia y proliferación en otras regiones del organismo.

Las cepas enterotoxigénicas, producen una toxina estimulante de la producción del fluido secretado por el intestino; por esta razón se ve favorecida la acumulación de líquido en esta región manifestandose como un cuadro clínico de diarrea y no de disentería. Este tipo de cepas de Escherichia coli son el motivo más reciente de estudios bacteriológicos, genéticos, bioquímicos e inmunológicos de este microorganismo ya sea de origen humano o aislado de animales.

Las cepas de E. coli enterotoxigénicas han sido probadas de la misma manera como se ha hecho para la toxina de V. cholerae. (7), (22), (23).

Dentro de los mecanismos de estudio encontramos el modelo biológico del asa ligada de fleón de conejo, -- permite además, poner de manifiesto cepas de tipo invasivo por las lesiones causadas en la región del intestino -- donde fueron inoculadas; por lo tanto no se trata de una prueba exclusiva para cepas enterotoxigénicas pero sí de gran utilidad.

Las cepas invasivas pueden ser identificadas -- como tales por medio de otro modelo animal donde se puede probar la capacidad de este tipo de cepas para producir queratoconjuntivitis en cuyos, (modelo del ojo de cuyo o prueba de Sereny (7), (22), (23).

Características de las enterotoxinas de E. coli.

Para el estudio fisiológico, bioquímico y genético de las enterotoxinas de E. coli se han empleado métodos utilizados en anteriores estudios de la enterotoxina del V. cholerae. De esta forma se han encontrado dos tipos de enterotoxinas : una lábil al calor (TL) y otra estable al calor (TE), ambas controladas por medio de un plásmido, (15), (20), (23), así las cepas de E. coli son productoras cuando menos de dos tipos de enterotoxinas. De hecho casi todas las cepas de origen humano han demostrado en minuciosos estudios, ser productora de ambos tipos, sin embargo hay informes que aceptan la existencia de cepas productoras exclusivamente de enterotoxina lábil al calor y otras productoras de enterotoxina estable al calor.

De acuerdo con las condiciones de cultivo se ve favorecida la producción de uno u otro tipo de enterotoxina, así por ejemplo, en condiciones de aereación se encuentra en mayor cantidad enterotoxina termoestable, mientras que en condiciones de cultivo estático se encuentra aumentada la concentración de enterotoxina termolábil.

La enterotoxina TE soporta temperaturas de 100°C. durante 15 min. mientras que la enterotoxina TL -

se destruye a una temperatura de 60°C. aplicada durante - 30 min. La enterotoxina termoestable es de menor peso molecular y aparentemente no antigénica; por otra parte la enterotoxina termo-lábil es de peso molecular mayor y con propiedades inmunogénicas.

En personas adultas con enfermedad similar al cólera, de las cuales no fué posible aislar V. cholerae - se aislo E. coli enterotoxigénica, la única diferencia clínica era la duración de la diarrea, significativamente menor en E. coli que en los casos de cólera; los cambios bacteriológicos y fisiológicos eran sorprendentemente similares a los causados por agente causal del cólera. Sin embargo, al aislar y purificar la enterotoxina se pudo -- determinar que se trataba de la enterotoxina lábil que, - al igual que en la toxina de V. cholerae, existe un enlace entre ésta y la actividad de la adenil ciclasa, ya que esta última se ve favorecida por la presencia de enterotoxina termolábil en las células grasas y en la mucosa intestinal de conejo, además de que estimula la producción de AMP cíclico en células adrenales y óvaricas. No se ha encontrado claramente esta misma propiedad la posee la enterotoxina termoestable, ya que se requiere de una purificación óptima de ambas enterotoxinas para evitar resultados falsos positivos o negativos por mezcla de las dos.

La explicación bioquímica al fenómeno de acumulación del líquido dentro del intestino, causado por la-

enterotoxina de E. coli es la misma que ha sido dada para la toxina de Vibrio cholerae. La acumulación de Ifqui es máxima alrededor de las 18 hrs. después de haber-- sido inoculadas las cepas en el fleon del conejo.

Caracterfsticas del medio de cultivo empleado en la pro--
ducción de enterotoxina.

A partir de los primeros estudios de cepas de E. coli relacionadas con diarreas y específicamente con la producción de enterotoxina se ha empleado el medio -- " SINCASE" útil para obtener tanto la toxina lábil al calor como la estable, dependiendo de las condiciones de -- aereación. También se puede utilizar otros medios siem-- pre y cuando se les adicione un dializado de peptona o -- extracto de levadura. La temperatura de incubación recomendada por la literatura es de 37°C. apareciendo la ente-- rotoxina en la fase logarftmica de crecimiento. Poste-- riormente se puede aislar por filtración, centrifugación, dialisis, etc. de la preparación que es estable a tempera-- turas de refrigeración por varios meses. Se han encontra-- do que las preparaciones guardadas en refrigeración duran-- te 5 o 6 años con pocas resiembras no han perdido su acti-- vidad para producir enterotoxina, pero tambien se han en-- contrato casos de cultivos relativamente recientes pero --

con resiembras sucesivas que han perdido dicha propiedad.

Usos de modelos animales empleados en la detección e identificación de enterotoxinas

- I.- Prueba del ileon ligado de conejo.- Se emplean de preferencia conejos de 7 a 9 días, es una prueba que detecta tanto enterotoxina de V. cholerae como ambos tipos de enterotoxinas de E. coli (TL y TE). (1), (8).
- II.- Prueba de ratón recién nacido.- Prueba - - útil en la detección de enterotoxina (TE), se requiere de ratones de uno a cuatro - - días de edad a los que se le inyecta directamente en la pared abdominal la preparación bacteriana, cuatro horas más tarde -- los animales son sacrificados y por relación del peso intestino / ratón se puede - - determinar la concentración del líquido -- (18), (23).
- III.-Prueba del factor de permeabilidad o de la piel de conejo.- Es también de utilidad -- para la toxina de V. cholerae. Se inyecta por vfa intracutánea la preparación de enterotoxina y a las 24 horas se aplica --

intravenosamente un colorante como por ejemplo, azul de Evans o alguno similar. Las áreas de coloración aparecen aproximadamente dos horas más tarde. Esta es una prueba que detecta principalmente enterotoxina lábil -- al calor (TL) (14), (17), (23).

IV.- Prueba en cultivo de tejidos.- Se emplea para detectar enterotoxina (TL) en células adrenales de ratón o bien células ováricas de hamster chino, ya que estas células responden re-
dondeándose y secretando esteroides en el medio de cultivo, características que facilitan la identificación de la enterotoxina. También han sido utilizadas en pruebas de cultivo de tejidos las células intestinales de ratón y de embrión humano, así como las células de timo de ratón dando resultados satisfactorios. (9), (23).

PARTE EXPERIMENTAL

1.- Cepas utilizadas.

47 cepas de Escherichia coli aisladas de heces de niños que presentaban diarrea.

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar Mac Conkey (Difco)

Agar especial de la siguiente composición:

Base agar sangre.....	20 g.
peptona.....	2.5g.
extracto de carne.....	1.5g.
agar.....	15 g.

Medio de SIM (DIFCO)

Citrato de Simmons (BBL)

Caldo cerebro corazón (BBL)

Agar Muller Hillton (DIFCO)

Agar TSI (DIFCO)

Agar de soya tripticasa (BIOXON)

Caldo de soya tripticasa

Gelosa sangre

Medio Sincase (para producción de enterotoxina) con -
la fórmula :

Casamino-ácidos.....	2%
Extracto de levadura.....	0.15%
Cloruro de sodio.....	0.25%

Fosfato de potasio dibásico (0.05M).....	0.871%
Sulfato de magnesio.....	0.005%
Cloruro de manganeso.....	0.005%
Cloruro férrico	0.0005%

Se ajusta el pH con una solución 0.1N de Na OH.

REACTIVOS.

Peróxido de hidrógeno.

Reactivo de Erlich.

Solución de acriflavina al 0.1 %

Antisueros polivalentes para E. coli (marcas Difco e Instituto Bhering) •

Sensidicos de antibióticos para microorganismos Gram negativos (marca Bioclín).

Colorante azul tripano al 2% en solución salina.

Tranquilizante "Combelen" (marca Bayer)

MATERIAL BIOLÓGICO.

25 cuyos para efectuar la prueba de invasividad.

13 conejos de 1.5Kg. de peso para efectuar la prueba de toxigenicidad.

Para la realización de este estudio se emplearon 47 cepas de Escherichia coli aisladas de niños con edades diferentes, que habían sido clasificados por su edad dentro de los siguientes grupos: lactante, pre-escolar y escolar. Los cuadros clínicos que presentaron eran característicos de diarrea.

Después de aislar las cepas se realizaron pruebas bioquímicas y se tipificaron con sueros para E. coli anti O y anti OK (BL). Esta prueba tiene como finalidad, auxiliar en la identificación de cepas de E. coli asociadas con diarrea, se probó cada una de las cepas con sueros polivalentes I y II que dan aglutinación positiva frente a aquellas más comunmente encontradas en esta enfermedad. Dentro del grupo de cepas se encontraron algunas que presentaron aglutinación específica frente a un tipo de antisuero y otras que presentaron aglutinación frente a ambos antisueros.

Posteriormente se sembró cada una de las cepas con la finalidad de aislar una colonia y realizar pruebas bioquímicas y de serotipificación.

Aislamiento de las cepas.

Todas las cepas fueron sembradas en agar Mac. - Conkey e incubadas durante 24 horas. Posteriormente se -- aisló una colonia en agar soya tripticaseina. Con el crecimiento de la colonia aislada se realizaron las pruebas - bioquímicas, serológicas y de sensibilidad a los antibióti - cos.

Pruebas bioquímicas

Para determinar la producción de ácido sulfhídrico y movilidad, se sembró en medio de SIM; igualmente - se empleó el crecimiento obtenido en este medio para probar la producción de indol por las cepas. La fermentación de azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa se pudo obtener sembrando los microorganismos en medio de agar TSI. La utilización de citrato como fuente de carbono se determinó empleando agar citrato de Simmons, además de las pruebas anteriormente mencionadas se buscó la presencia de la enzima catalasa con peróxido de hidrógeno y la propiedad hemolítica en gelosa sangre.

Serotipificación.

Después de las pruebas bioquímicas se probaron las cepas en presencia de antisueros para E. coli grupos -

polivalente I, polivalente II, A, B y antiseros monovalentes, obteniendo resultados negativos para algunas de las cepas; por lo tanto se procedió a calentar todas éstas a una temperatura de 120°C. durante 10 min. con la finalidad de destruir el antígeno K que tiene la propiedad de inhibir la aglutinación con el antígeno O. Después del calentamiento indicado se determinó la aglutinación tomando una gota de cultivo y poniendola en presencia de los antiseros anteriormente mencionados, en esta ocasión aquellas cepas que dieron resultados negativos frente a los antiseros polivalentes antes del calentamiento fueron positivas frente alguno de ellos.

Prueba de sensibilidad a los antibióticos.

Para esta prueba se sembró a los microorganismos en tubos de ensayo conteniendo cuatro mililitros (4 ml.) de caldo de soya tripticaseina. Se incubaron durante 5 hrs. comparando el crecimiento bacteriano después de este tiempo con el estandar de Mc. Farland (0.5ml. de cloruro de bario adicionado a 99.5 ml. de una solución de H_2SO_4 al 1 %) que es equivalente a una concentración de 10^8 bacterias por mililitro; con esta suspensión se sembraron placas de agar Muller Hinton e inmediatamente se depositó sobre cada una de ellas los discos de papel filtro impregnados con antibióticos específicos para bacte--

rias Gram negativas (de marca comercial Bioclín). Después de incubar las cajas durante la noche (aprox. de 15- a 18 hrs.) a 37°C., se interpretaron los resultados midiendo los halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

Pruebas de virulencia.

Se usaron en estas pruebas dos tipos de modelos animales, uno de ellos, el de la conjuntiva de cuyo o - - prueba de Sereny (20) para la determinación de invasividad de las cepas en los tejidos, y el otro modelo, en la piel del conejo o del factor de permeabilidad para determinar la producción de enterotoxina lábil al calor.

A).- Prueba de Sereny o de invasividad.

Se emplearon 25 cuyos ; cada una de ellos fué inoculado por vía ocular con una gota de cultivo bacteriano a una concentración de 0.5×10^8 bacterias por mililitro. El inóculo se probó en el ojo derecho de cada animal mientras que en el ojo izquierdo se inóculo una gota de caldo, con la finalidad de comparar los resultados frente a un testigo negativo. Se observó a los animales durante los 5 días posteriores a la inoculación, esperando encontrar queratoconjuntivitis en los casos positivos y un as-

pecto normal en los casos negativos.

B).- Prueba del factor de permeabilidad o de la piel del conejo.

Preparación del inóculo.- Para la prueba del factor de -- permeabilidad se hizo crecer cada cepa en un matraz conteniendo 50ml. de medio "Sincase", se incubaron durante 72- horas a 37°C. y se centrifugó el contenido de cada matraz con la finalidad de determinar en el sobrenadante la presencia de enterotoxina lábil al calor. La cantidad de enterotoxina producida fué poca, por este motivo fué necesario concentrarla por medio de liofilización, reconstituyendo posteriormente 10 ml. del sobrenadante liofilizado con solo un mililitro de solución salina. El líquido obtenido de cada cepa se esterilizó a través de membranas - "Sartorius" para ser probadas después en la piel del lomo de conejo.

La prueba del factor de permeabilidad o de la piel del conejo es una prueba encaminada a la búsqueda de enterotoxina lábil al calor, para su realización fué necesario el uso de 15 conejos de 1-1/2 Kg. de peso. Se depiló la piel del lomo de cada uno de los conejos para posteriormente cuadrangular la zona, en cada cuadro se inyectó 0.2 ml. de inóculo con la posible enterotoxina (un promedio de 10 cepas problema, un testigo positivo (*) y un --

testigo negativo). Después de 24 horas de inoculación -- se aplicó colorante azul tripano por via intravenosa observando a los conejos durante las 24, 48 y 72 horas siguientes.

Se consideró resultado positivo cuando la zona de inoculación presentó induración de la piel y ausencia de color azul.

(*) Se utilizó un testigo positivo que fué una cepa de origen porcino previamente estudiada.

Resultados

Resultado de las pruebas bioquímicas.

Todas las cepas aisladas coincidieron con las características de Escherichia coli

Resultados de la Serotipificación

Antes de realizar la prueba de serotipificación se probó cada cepa con acriflavina para conocer las formas coloniales lisas y rugosas.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos después de la tipificación inicial de las 47 cepas realizada en la clínica hospital No. 25 del I.M.S.S donde fueron aisladas de casos de diarrea infantil. La determinación se efectuó con sueros polivalente I y polivalente II. Esta misma tabla indica el grupo de edad en la que se incluyó a cada uno de los pacientes .

A continuación de la tabla anteriormente mencionada se presenta los resultados obtenidos en una segunda tipificación realizada con la finalidad de una mejor caracterización. Los antisueros utilizados fueron: A, B y algunos monovalentes de los grupos A y B (No. se probó -- aglutinación con todos los antisueros, por la dificultad de conseguirlos).

TABLA NO. 1

REACCION DE AGLUTINACION FRENTE A ANTISUEROS POLIVALENTE I
Y POLIVALENTE II

CLAVE DE LA CEPA	GRUPO	REACCION POSITIVA CON EL ANTISUERO POLIVALENTE.
1	LACTANTE	I
2	LACTANTE	II
3	LACTANTE	I
4	LACTANTE	I
5	LACTANTE	II
6	LACTANTE	II
7	LACTANTE	I
8	LACTANTE	I y II
9	PRE-ESCOLAR	II
10	LACTANTE	I
11	LACTANTE	II
12	LACTANTE	I y II
13	LACTANTE	II
14	LACTANTE	II
15	LACTANTE	I

CLAVE DE LA CEP A	GRUPO	REACCION POSITIVA CON EL ANTISUERO POLIVALENTE.
16	LACTANTE	I
17	PRE-ESCOLAR	II
18	LACTANTE	I
19	LACTANTE	II
20	ESCOLAR	I y II
21	LACTANTE	I
22	LACTANTE	I
23	LACTANTE	I
24	ESCOLAR	I
25	ESCOLAR	II
26	LACTANTE	II
27	ESCOLAR	I
28	LACTANTE	II
29	LACTANTE	I
30	LACTANTE	I
31	LACTANTE	I

CLAVE DE LA CEPA	GRUPO	REACCION POSITIVA CON EL ANTISUERO POLIVALENTE
32	LACTANTE	I
33	PRE-ESCOLAR	I
34	PRE-ESCOLAR	I
35	LACTANTE	I
36	LACTANTE	II
37	LACTANTE	II
38	LACTANTE	I
39	LACTANTE	II
40	LACTANTE	I
41	PRE-ESCOLAR	II
42	LACTANTE	I
43	LACTANTE	I y II
44	LACTANTE	I
45	LACTANTE	I
46	PRE-ESCOLAR	I
47	LACTANTE	I

RESULTADOS DE LA SEGUNDA TIPIFICACION

NO. DE CEPAS	ANTISUERO A	ANTISUERO B
1	-	serotipo (086)
2	-	serotipo (0119)
3	serotipo (0111)	-
4	+	-
5	-	+
6	-	serotipo (0126)
7	serotipo (0111)	-
8	serotipo (026)	serotipo (0128)
9	serotipo (0111)	-
10	serotipo (026)	-
11	-	serotipo (0125)
12	serotipo (0111)	serotipo (086)
13	-	serotipo (0126)
14	-	serotipo (0119)
15	serotipo (026)	-
16	serotipo (0111)	-
17	-	+

NO. DE CEPA	ANTISUERO A	ANTISUERO B
18	serotipo (055)	-
19	-	serotipo (0124)
20	serotipo (055)	+
21	serotipo (055)	-
22	serotipo (0111)	-
23	serotipo (0111)	-
24	serotipo (026)	-
25	-	serotipo (0126)
26	-	serotipo (0128)
27	serotipo (055)	-
28	-	serotipo (0125)
29	serotipo (026)	-
30	serotipo (0127)	-
31	serotipo (0111)	-
32	serotipo (0111)	-
33	serotipo (026)	-
34	+	-

NO. DE CEPA	ANTISUERO A	ANTISUERO B
35	serotipo (026)	-
36	-	serotipo (0125)
37	-	serotipo (0126)
38	serotipo (0111)	-
39	-	serotipo (0126)
40	serotipo (0111)	serotipo (0119)
41	-	serotipo (0126)
42	serotipo (0111)	-
43	+	serotipo (0125)
44	serotipo (0111)	-
45	+	-
46	+	-
47	+	-

+ = Reacción positiva solo con el antisuero polivalente.

- = Reacción negativa.

AGLUTINACION POSITIVA CON EL ANTISUERO POLIVALENTE "A"

Cepas número: 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24,
27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 40, 42, 43, 44, --
45.

AGLUTINACION POSITIVA CON EL ANTISUERO POLIVALENTE "B"

Cepas número: 1, 2, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 25, 26, 28,
36, 37, 39, 40, 41, 43.

AGLUTINACION POSITIVA CON LOS ANTISUEROS POLIVALENTES-
"A" Y "B"

Cepas número: 8, 12, 20, 40, 43.

Porcentaje de cepas con aglutinación positiva frente a
los antisueros polivalentes "A" y "B".

Antisero polivalente "A"	65.95%
Antisero polivalente "B"	44.68%

Resultados de la prueba de sensibilidad a los antibióticos.

Cada una de las cepas fué probada frente a doce antibióticos incluidos en sensidiscos comerciales recomendados para cepas Gram negativas. Los resultados se determinaron mediante el halo de inhibición del crecimiento; por lo tanto la siguiente tabla indica el diámetro obtenido en milímetros y la resistencia presentada por algunas cepas a ciertos antibióticos.

TABLA NO. 4

NO.DE CEPA AC.NALIDIX. T.SULFA. FURA. KANA. NEO. ESTREP. GENTA. CEFAL. CLORO. TETRA. AMPI. POLI.

1	14 mm.	R	14	16 m	16	R	20	20	30	26	R	10
2	14	R	16	R	R	R	18	R	R	R	R	10
3	20	R	14	R	R	R	20	R	R	R	R	10
4	18	14	16	20	18	16	20	20	20	20	18	8
5	20	R	20	18	20	R	18	20	30	R	R	10
6	18	R	18	R	R	R	18	16	R	R	R	10
7	18	R	18	R	R	R	20	18	R	R	R	10
8	20	R	18	R	R	R	20	20	R	R	R	10
9	18	R	18	18	18	R	22	R	R	18	18	10
10	16	16	14	16	16	16	18	20	22	18	16	R
11	20	R	18	16	16	R	20	18	30	R	R	10
12	14	R	16	16	20	R	18	18	R	R	12	10
13	21	R	20	23	10	20	22	R	25	R	R	10
14	20	R	14	R	12	R	18	18	R	R	16	10

NO.DE CEPA. AC.NALIDIX. T.SULFA. FURA. KANA. NEO. ESTREP. GENTA. CEFAL. CLORO. TETRA. AMPI. POLI.

15	16	R	12	R	R	R	20	R	R	R	R	10
16	20	R	20	R	R	R	20	18	R	R	R	10
17	16	R	16	R	R	R	18	16	R	R	R	8
18	22	R	18	18	18	16	20	16	30	R	R	10
19	20	R	16	R	R	R	20	R	R	R	R	10
20	20	20	20	R	R	R	20	28	30	R	22	12
21	20	R	16	10	R	R	20	18	R	R	R	8
22	20	R	10	R	R	10	20	R	R	R	R	10
23	18	R	16	18	18	16	20	R	R	R	R	10
24	20	R	20	R	R	R	18	R	R	R	R	10
25	18	R	16	20	18	12	20	R	R	R	R	8
26	18	R	18	R	R	R	20	16	R	R	R	10
27	18	24	18	16	18	R	18	26	28	R	22	10
28	23	R	20	20	15	13	25	19	25	10	R	11
29	20	R	16	18	18	R	20	20	26	R	20	18

NO.DE CEPA AC.NALIDIX T.SULFA. FURA. KANA. NEO. ESTREP. GENTA. CEFAL. CLORO. TETRA. AMPI. POLI.

30	16	R	18	20	20	18	20	18	28	22	16	10
31	18	R	12	20	18	R	18	20	R	16	R	10
32	20	14	18	20	10	18	22	R	R	22	16	10
33	19	R	20	24	10	R	20	R	R	R	R	15
34	20	R	16	18	18	14	18	22	R	20	16	10
35	24	R	20	R	R	R	18	R	R	R	R	8
36	18	R	14	16	18	8	20	18	R	R	18	10
37	20	R	16	R	R	R	16	R	R	R	R	10
38	16	20	20	24	24	24	26	18	26	20	18	12
39	18	R	14	R	R	R	16	R	R	R	R	10
40	20	R	18	R	R	R	18	R	R	R	R	10
41	18	R	16	R	R	R	26	22	20	R	R	8
42	22	R	20	R	R	R	16	18	R	R	R	18
43	18	R	15	10	10	R	R	10	R	R	R	11
44	19	R	17	R	12	R	23	R	R	R	R	12

NO.DE CEPA AC.NALIDIX. T.SULFA. FURA. KANA. NEO. ESTREP. GENTA. CEFAL. CLORO. TETRA. AMPI. POLI.

45	18	R	18	R	R	R	18	R	R	R	R	11
46	12	R	16	R	R	R	20	18	R	R	R	10
47	20	R	20	15	12	R	16	10	R	R	R	10

TABLA NO. 5

Esta tabla indica el porcentaje de cepas sencillas a doce de los antibióticos más comunmente empleados en el tratamiento de infecciones ocasionadas por gérmenes Gram negativos. También muestra el porcentaje de resistencia obtenido frente a dichos antibióticos, tomando como base el criterio de inhibición máxima para cada antibiótico considerado por los fabricantes de los sensidiscos utilizados.

PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A LAS CEPAS DE -
ESCHERICHIA COLI A LOS ANTIBIOTICOS

ANTIBIOTICOS	% DE CEPAS SENSIBLES	% DE CEPAS - RESISTENTES
AC. NALIDIXICO	100	CERO
TRIPLE SULFA	12.77	87.23
FURADANTINA	100	CERO
KANAMICINA	51.07	48.93
NEOMICINA	64.20	46.80
ESTREPTOMICINA	25.54	74.46
GENTAMICINA	97.88	2.12
CEFALOSPORINA	61.71	38.29
CLORANFENICOL	29.79	70.21
TETRACICLINA	21.28	78.72
AMPICILINA	27.66	72.34
POLIMIXINA	97.88	2.12

Resultados obtenidos para las pruebas de virulencia.

PRUEBA DE SERENY.

Después de inocular a la concentración adecuada cada una de las cepas de E. coli en la conjuntiva de cuyos; se observaron a éstos durante cinco días, obteniendo en todos y cada uno de los casos un resultado NEGATIVO.

Prueba del factor de permeabilidad en la piel de conejo.

Esta prueba se realizó tres veces con la finalidad de obtener un resultado más confiable. A continuación se indica los resultados obtenidos en las tres determinaciones.

CEPAS POSITIVAS: 4, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 21, -
22, 23, 25, 26, 27, 30, 37, 38,
40, 43, 46.

PRUEBA NO. 1

CEPAS NEGATIVAS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 15, 16,
18, 19, 20, 24, 28, 29, 31, 32,
33, 34, 35, 36, 39, 41, 42, 44,
45, 47.

CEPAS POSITIVAS: 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 17,
18, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 30,
33, 34, 36, 38, 37, 39, 40, 42,
43, 45, 46.

PRUEBA NO. 2

CEPAS NEGATIVAS: 1, 2, 3, 7, 9, 13, 15, 16, 19, -
20, 24, 28, 29, 31, 32, 35, 41,
44, 47.

CEPAS POSITIVAS: 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 17, 18, -
21, 22, 23, 25, 27, 33, 34, 36, -
37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46.

PRUEBA NO. 3

CEPAS NEGATIVAS: 1, 2, 3, 7, 9, 12, 13, 15, 16, 19
20, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, -
35, 41, 44, 47.

Cepas que presentaron en dos determinaciones resultados -
positivos

5, 6, 12, 18, 26, 30, 33, 34, 36, 39, 42, 45.

Cepas que presentaron en tres determinaciones resultados-
positivos

4, 8, 10, 11, 14, 17, 21, 22, 23, 25, 27, 37, 38, 40, 43,

PORCENTAJE DE CEPAS CON RESULTADOS POSITIVOS EN LAS TRES-
DETERMINACIONES:

34.04%

RESUMEN Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos en este trabajo para las pruebas bioquímicas de cada cepa mostraron las propiedades características de Escherichia coli ; sin embargo -- la necesidad de tenerlas perfectamente caracterizadas -- condujo a la prueba de serotipificación. Los resultados obtenidos en las pruebas anteriores se relacionaron con los obtenidos en otras pruebas, principalmente la de toxicidad del factor de permeabilidad.

Es conocido que en los laboratorios de diagnóstico bacteriológico se realizan muy comunmente ciertas -- determinaciones como son las pruebas con acriflavina y la serotipificación en la identificación de cepas patógenas. Por otra parte existen nuevos métodos de estudio que se realizan exclusivamente en los laboratorios de investigación con los que es posible conocer si la cepa es patógena o no, y en caso de serlo, cual es su mecanismo de virulencia.

Cuando en muestras de pacientes, con manifestaciones clínicas características de diarrea, se aísla únicamente Escherichia coli se realiza en el laboratorio de diagnóstico prueba de acriflavina, si existe aglutinación se descarta la posibilidad de que la cepa sea patógena; -

sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que no existe una relación marcada en la propiedad de aglutinar frente a la acriflavina, los serotipos comunmente implicados en casos de diarrea y el mecanismo de virulencia, ya que después de analizar los resultados, estos muestran que cepas como las numero: 8, 11, 14, 21, y 38 fueron positivas frente a la acriflavina y también enterotoxigénicas, ésto quiere decir que de los resultados obtenidos con la acriflavina en un laboratorio de diagnóstico se puede descartar la posibilidad de Escherichia coli como agente causal de enfermedad.

Algo similar se observa al relacionar los resultados obtenidos con la acriflavina y la serotipificación, ya que cepas con aglutinación positiva frente a la acriflavina, aparentemente no patógenas, fueron positivas a la serotipificación y quedaron incluidas dentro -- de los serotipos típicamente relacionados con la diarrea. Además no se observa relación entre el serotipo de la -- cepa con algún mecanismo de virulencia ya que todas las cepas fueron clasificadas dentro de los serotipos clásicamente patógenos, pero no todas fueron toxigenicas y -- más aún, ninguna fué invasiva.

Fué interesante analizar los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a los antibióticos --

sobre todo por la importancia terapéutica que éstos tienen. Los resultados revelaron una marcada resistencia a casi todos los antibióticos más comunmente utilizados en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por bacterias Gram negativas.

Uno de los objetivos de este trabajo fué el caracterizar a un grupo de cepas de Escherichia coli implicadas en casos de diarrea infantil; sin embargo a través de los estudios realizados se pudo establecer una relación entre las pruebas usadas normalmente en el diagnóstico y aquellas que en la actualidad básicamente se realizan en laboratorios de investigación. Probablemente entre las causas de que no sean utilizadas como pruebas de "rutina" se encuentre el poco conocimiento de ellas, debido a que E. coli - - había sido considerada exclusivamente como un habitante normal del hombre y otros animales. No es sino hasta hace poco tiempo cuando se le ha relacionado con enfermedades intestinales, ésto abrió las puertas a nuevas investigaciones que tienden a convertirse en pruebas ampliamente usadas en el futuro. También son de tomarse en cuenta algunos otros factores como costo y facilidad de realización, una solución a estos problemas se puede encontrar posiblemente a través de la constante experimentación dentro de este mismo campo ya que marca el camino a seguir indicando si los nue-

vos métodos pueden substituir más eficientemente a otros ya existentes o bien resulta innecesario implementarlos.

Es interesante apreciar a través de estudios recientes, como están siendo aclarados algunos misterios relacionados con la estructura, fisiología y mecanismo de virulencia de Escherichia coli.

Anteriormente se mencionó la importancia de -- este tipo de estudio dentro del diagnóstico, pero esto no es lo más importante ya que destaca también el aspecto -- preventivo en el control de grandes brotes de diarrea, -- por ejemplo a través de la elaboración de bacterinas. Este campo ha sido básicamente estudiado en cepas aisladas de otros mamíferos como cerdos, bovinos etc.

CONCLUSIONES

Después de analizar los objetivos de este trabajo y los -- resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- Las características coloniales y las pruebas bioquímicas de las 47 cepas dieron resultados típicos de E. coli
- 2.- Después de realizar la prueba de serotipificación se observó una marcada relación con los resultados obtenidos en la tipificación inicial efectuada en la clínica hospital donde fueron aisladas las cepas.
- 3.- No existió relación completa entre los resultados obtenidos de la prueba de aglutinación con acriflavina y el mecanismo de virulencia presentado por la cepa.
- 4.- No se observó relación directa apreciable entre el serotipo de cada cepa y su mecanismo de virulencia.
- 5.- Se observa una marcada resistencia a los antibióticos más comunmente usados.
- 6.- De las 47 cepas ninguna resultó ser invasiva y solo un 34.04% del total fueron toxigénicas.

B I B L I O G R F I A

- 1.- Appleton-Century-Grofts (1957) Bacteriology INC-New-York U.S.A.
- 2.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Seven edition.
- 3.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight edition.
- 4.- Cooke Mary E. and Susan P. Ewin.(1975) PROPERTIES - OF STREINS OF ESCHERICHIA COLI INSOLATED FROM A VARIETY SOURCES.J Med.Microbiol,8;107-111.
- 5.- Cowan and Steel (1975) Manual for the identification of medical bacteria.Cambridge University Press - second edition.Great Britain.
- 6.-Davis Dulbeco. Eisen Gersberg Wood (1968).Microbiology.Ed.Hoeber Medical Divison.U.S.A.
- 7.-DePont L.Herbet.(1971) PATHOGENESIS OFESCHERICHIA COLI DIARRHEA.The New England Journal of Medicine.285; 1-9.
- 8.-Difco (1973) EL ANTIBIOGRAMA.Información Técnica.
- 9.-Donta.Sam.T.et.al. (1977).ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI AND DIARRHEAL DISEASES IN MEXICAN CHILDREN.The-- Journal of Infectious Diseases 435 (3) 482-485.
- 10.-Dorner Friedrich.et.al(1976).ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIN: PURIFICATION, PARTIAL CHARACTERIZATION, AND IMMUNOLOGICAL OBSERVATIONS.The Journal of Infectious Dise

ases. 133-S 142-S156.

- 11.- Escheverria Petenet. al. (1977) VARIATION IN ENTEROTOXIGENICITY OF ESCHERICHIA COLI. The journal of infectious Disease. 135(2) 195-200.
- 12.- Edwards-Ewing (1967) Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company, U.S.A.
- 13.- Evans Doyle E. Jr. and Dolores G. Evans (1976). PURIFICATION OF POLYMYXIN-RELEASED HEAT-LABILE ENTEROTOXIN OF ESCHERICHEA COLI. The journal of Infectious Diseases. 133; 97-102.
- 14.- Evans G. Dolores et. al. (1973). IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI AND SERUM ANTITOXIN ACTIVITY BY THE VASCULAR PERMEABILITY FACTOR ASSAY. American Society for microbiology .8; No.(5) 731-735.
- 15.- Evans G. Dolores et. al. (1977) VIRULENCE FACTORS OF ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI. 136 S118 -- S123.
- 17.- Finkelstein Richard A et. al. (1976). INSOLATION- AND PROPERTIES OF HEAT-LABILE ENTEROTOXIN FROM ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI. The journal of Infectious Diseases. 133 S120-S136.
- 18.- Giannella R.A (1976). SUCKLING MOUSE MODEL FOR DETECTION OF HEAT-STABLE ESCHERICHEA COLI ENTERO

- TOXIN:CHARACTERISTICS OF THE MODEL.Infection and Immunity.American Society For Microbiology. 14;- (14) 95-99.
- 19.- Goldschmidt and Herbert L.DuPont. (1976).ENTEROPATHOGENIC ESCHERICHEA COLI:LACK OF SEROTYPEWITH PATOGENICITY.The jaournal of Infections Diseases 133 (2) 153-156.
- 20.- Gyles Carltom. et.al. (1974). THE ENTEROTOXIN--- PLASMIDS OF ESCHERICHEA COLI. The Journal of Infections Diseases.30: No. 140-49.
- 21.- Hill Alan W. et.al. (1976) INCREASED ANTIBACTE-- RIAL ACTIVITY AGAINST ESCHERICHEA COLI IN BOBINE SERUM AFTER THE INDUCTION OF ENDOTOXIN TOLERANCE. Infection and Immunity American Society For Micro biology. 14 (1). 257-265.
- 22.- Moon. W Harley. and Shannon C. Whipp. (1971).SYS- TEMS FOR TESTING THE ENTEROPATHOGENICITY OF ESCHE RICHEA COLI,Annals of New York Academy of Sciences 176; 197-211.
- 23.- Sack Bradley B. (1975) HUMAN DIARRHEAL DISEASES , - CAUSED BY ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHEA COLI. Jour- nal of Microbiology 25; 333-353.

- 24.- Sack Bradley B. et.al. (1977) ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI INSOLATED FROM FOODS. The -- Journal of Infectious Diseases. 133 (2) 313-317
- 25.- Salle Bacteriology. Ed. Gustavo Gite S.A. 4a- Edicion Barcelona.
- 26.- Smith Willams H. and Margaret A Linggood.(1972) FURTHER OBSERVATIONS ON ESCHERICHIA COLI ENTE-ROTOXINS PARTICULAR REGARD TO THOSE PRODUCED - BY ATYPICAL PIGLET STRAINS AND BY CALF AND -- LAMB SRAINS:THE TRANSMISIBLE NATURE OF THESE - ENTEROTOXINS AND OF A K ANTIGEN POSSESSED BY- CALF AND LAMB STRAINS. J.Med. Microbiol. 5; - 243-250.