



24
4

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“ADHERENCIA DE Escherichia coli A
ERITROCITOS DE DISTINTOS ORIGENES”



T E S I S

EXAMENES PROFESIONALES
FA. DE QUÍMICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P r e s e n t a :

María Del Rocío Arana Vergara



México, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
CAPITULO I INTRODUCCION.	1
CAPITULO II OBJETIVOS	3
CAPITULO III GENERALIDADES	4
3.1. Características de la Bacteria	4
3.2. Clasificación de <u>Escherichia coli</u> patóge nas.	5
3.3. Estructura Antigénica.	9
3.4. Patogenicidad.	11
3.5. Infección Urinaria	13
3.6. Adherencia.	18
3.7. Fimbrias.	22
3.8. Clasificación, Tipos y Características - de Fimbrias.	23
3.9. Hemaglutinación	29
CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1. Material.	32
4.2. Método	33
CAPITULO V RESULTADOS.	58
CAPITULO VI DISCUSION	75

	Pág.
CAPITULO VII CONCLUSIONES.	80
ANEXO.	82
CAPITULO VIII BIBLIOGRAFIA.	87

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

La especie Escherichia coli es el organismo más frecuentemente involucrado en infecciones de vías urinarias (80%), afectando a lactantes y embarazadas así como a pacientes con lesiones obstructivas, con procesos neurológicos que afectan a la migración.

La capacidad de la bacteria para adherirse a la superficie de la mucosa, es el requisito inicial para tener éxito en la colonización del tracto urinario con excepción de los pacientes con reflujo.

Las estructuras de superficie conocidas como adhesinas, constituyen el factor principal en la colonización de esta bacteria a un sustrato determinado. Estas adhesinas han sido divididas en dos clases, con base en la capacidad de la manosa para inhibir la adherencia; manosa sensible (MS) o pili tipo 1 y manosa resistente (MR), predominando los pilis tipo P. Este último reconoce un receptor de naturaleza glicolípida en eritrocitos humanos y células epiteliales.

Entre las adhesinas presentes en E.coli que la capacitan para adherirse en vías urinarias, se encuentra la fimbria tipo 1, la cuál puede ser puesta de manifiesto a través de la adheren

cia de la bacteria a distintos tipos de líneas celulares, así -
como, por ser inhibida con el empleo de D-manosa, sin embargo, -
esta no es la única fimbria presente en esta bacteria.

La capacidad de E.coli para aglutinar eritrocitos de dife-
rentes especies animales se ha correlacionado con la presencia -
de factores adhesivos en la superficie de la bacteria, su unión -
a las células epiteliales, así como la hemaglutinación que es ca -
paz de realizar, las que se encuentran mediadas por una fimbria -
o pelos accesorios.

Tomando en consideración la alta frecuencia de aislamiento
de cepas de Escherichia coli a partir de muestras de orina, su -
capacidad de adherencia a distintos tipos de células y su sensi -
bilidad o resistencia a manosa. El siguiente trabajo tiene como
finalidad determinar el tipo de fimbria más frecuente en las ce -
pas estudiadas.

O B J E T I V O S

1. Aislamiento e identificación bioquímica de E.coli obtenida de muestras de orina.
2. Determinación de adherencias MS y MR con el empleo de eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos y orígenes.
3. Purificación de adhesinas más frecuentemente observadas por hemaglutinación.
4. Obtención de anticuerpos antifimbria.
5. Realización de aglutinación con los productos obtenidos, (antisueros CFA/1 e IgG).
6. Visualización de la fimbria por microscopía electrónica.

GENERALIDADES

3.1. Características de la Bacteria.

Escherichia coli.- Bacilo que se encuentra usualmente como organismo predominante en el intestino del hombre y otros animales, desde los primeros días de su vida. Fue descrito por Buchner en 1885 y estudiado con detalle por Escherich en 1886. Esta bacteria llega al intestino poco después del nacimiento y persiste durante toda la vida (45,46).

Se encuentra en grandes cantidades en la región de la válvula ileocecal y disminuye en número hacia el duodeno y el recto.

E.coli es un bacilo grueso, corto, de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 u de longitud. Es un bacilo gram negativo, no forma esporas, una pequeña porción de las cepas presentan cápsulas o microcápsulas, su movilidad es por flagelos periféricos, algunos son inmóviles, anaerobio facultativo, con metabolismo respiratorio y de tipo fermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, las colonias en agar nutritivo son lisas, convexas, húmedas, grisáceas con una superficie brillante. También pueden presentar colonias rugosas (5,45,46).

Son microorganismos quimiorganotróficos, oxidasa negativos,

fermentan la glucosa y otros carbohidratos, con producción de - piruvato, el cuál es además convertido en ácido láctico, acético y fórmico. Algunas cepas son anaerogénicas. Aquellas especialmente aisladas de sitios extraintestinales, tienen cápsulas de - polisacáridos o microcápsulas. De acuerdo al estado del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, las cepas pueden ser - descritas como: lisas (S) o rugosas (R) (5,45).

3.2. Clasificación de Escherichia coli patógenas.

En la actualidad, se admiten ciertas cepas de E.coli invasivas y enteropatógenas, productoras de toxinas, responsables de brotes y casos esporádicos de diarrea infantil incluyendo al neonato, así como otros tipos de diarrea como la del viajero en el adulto. E.coli diarreagénica (o entérica) es subdividida en 3 - grupos: 1) E.coli enteropatógena para la cuál los grupos O y K - han sido citados, 2) E.coli enterotoxigénica que incluye cepas-productoras de toxina termolábil y termoestable y 3) E.coli enteroinvasiva para la cuál, los grupos O también son descritos - (5,55).

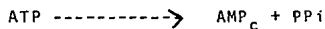
E.coli enterotoxigénica.- Se relaciona con diarrea en infantes y adultos, hasta el momento, las cepas descritas pertenecen a algunos de los grupos O. Estas cepas producen una o dos - toxinas diferentes, la termolábil y la termoestable. La capaci-

dad genética para producir las dos toxinas, esta controlada por DNA presente en plásmidos transmisibles llamados ent. Se ha hecho clonación de ambos genes y demostrado que el gen ST posee las características de un transposon (16,24,75).

La toxina termolábil (LT), es destruída por calentamiento a 65°C durante 30 min, su mecanismo de acción es idéntico al de la toxina del cólera, su PM es de unos 73,000 daltones y a semejanza de la toxina del cólera, la componen dos subunidades A y B.

La primera consiste en una molécula A_1 (24,000 daltons) y otra A_2 (5,000 daltons), unidas por un puente disulfuro, cada fracción A está unida en forma no covalente a cinco subunidades B (75).

La LT causa diarrea al estimular la actividad de adenilato ciclasa, ligada a la membrana, esto da por resultado la conversión de ATP en AMP cíclico (AMP_c):



Cantidades pequeñísimas de AMP_c inducen la excreción activa de Cl^- e inhiben la absorción de Na^+ , creando un desequilibrio de electrolitos a uno y otro lado de la mucosa intestinal, con lo que se pierden cantidades abundantes de líquidos del intesti-

no (16, 17).

El mecanismo por el cual la toxina LT estimula la actividad de la adenilato ciclasa es el siguiente: 1) La subunidad B de la toxina se liga a un receptor específico de la célula, el gangliósido GM y la subunidad A₁ es liberada del resto de la toxina penetrando en la célula; 2) La subunidad A₁ separa NAD en nicotinamida y ADP-ribosa y transfiere esta última a la proteína ligadora de GTP (11).

Datos más recientes han permitido crear un modelo por el cual la toxina LT activa la adenilato ciclasa, estos resultados demuestran que la LT cataliza la ADP ribosilación de la subunidad alfa de una proteína ligadora de GTP llamada Gs. Esta última consiste en dos subunidades, alfa y beta que existen juntas en la membrana celular (75).

La activación normal de la adenilato ciclasa resulta de la interacción de la subunidad alfa libre (ligada a GTP) de Gs con la unidad catalítica de adenilato ciclasa, pero esta actividad es regulada por su asociación con GTP y con la subunidad B.

Así, cuando las subunidades alfa y beta de Gs se asocian, Gs posee poco efecto estimulante en la actividad de adenilato ciclasa. Después de la ADP ribosilación por LT, la subunidad alfa

de Gs tiene mucho menor afinidad por su subunidad beta (17,11, - 46,75).

La toxina termoestable (ST), comprende una familia de pequeños polipéptidos heterogéneos, de 15,000 a 20,000 daltons, - que no son destruidos por calentamiento a 100°C durante 30 min.

La ST actúa de igual forma que la LT, sólo que se activa - el GMP_c (en lugar de la adenilato ciclasa), este último inhibe - el contranporte de NaCl por la pared intestinal (11, 63).

E.coli enteroinvasiva.- El factor patogénico de este tipo de E.coli es la capacidad para invadir y proliferar dentro de - las células epiteliales y causar muerte de la célula. La capaci - dad invasiva es dependiente de la presencia de un plásmido gran - de (aproximadamente de 140 megadaltons) que codifica la produc - ción de varias proteínas de la membrana externa involucrada en - la invasividad. E.coli enteroinvasiva tiene una predilección - por la mucosa colónica. Clínicamente la enfermedad causada por - esta clase de E.coli se caracteriza por fiebre, diarrea acuosa, - severos espasmos abdominales y toxemia seguida por disenteria - con evacuaciones con moco y sangre (29).

E.coli enteropatógena.- Este tipo de E.coli causa una le - sión histopatológica ultraestructural distinta en el intestino -

humano, la lesión involucra la destrucción de las microvellosidades sin evidencia de invasión.

Se ha reportado que esta clase de E.coli posee un plásmido de aproximadamente de 60 megadaltons que codifica para las propiedades de adherencia a las células Hep-2 (2,24,75).

3.3. Estructura Antigénica de E.coli.

La superficie de E.coli esta cubierta con sustancias capaces de promover respuestas inmunitarias, los anticuerpos resultantes son comunmente usados para la clasificación serológica de cepas patógenas y no patógenas. Estos antígenos superficiales, incluyen sustancias referidas como adhesinas, las cuales son responsables del ataque a las células de la mucosa epitelial.

La mayoría de los antígenos comunes de E.coli son los antígenos O, K y H. La terminología O (de el alemán Ohne Hauch) y H (de el alemán Hauch), introducidos por Weil Felix, es usada para el antígeno somático (O) y el antígeno flagelar (H) de E.coli respectivamente. El término antígeno K (de la palabra alemana - Kapsel) es usada para el antígeno capsular (51,56).

La estructura antigénica de E.coli es tan compleja como la de Salmonella y otros géneros dentro de las enterobacterias. Se

han reconocido aproximadamente 162 grupos de antígenos O. Muchas de estas cepas también poseen antígenos K y H, que hasta el momento llegan a 100 y 52 respectivamente (51).

Antígenos O

Son propios de la membrana externa, los cuales sirven como estructura protectora; están compuestos de complejos fosfolípido polisacárido, son termoestables, resistentes a tratamientos con alcohol y ácidos diluidos, los agregados que forman son granulares (5,51).

Antígenos H

Son de naturaleza proteica (flagelina), el orden de los aminoácidos representa la especificidad de los distintos antígenos flagelares, son termolábiles, se inactivan lentamente por tratamiento con alcohol y los agregados que forman floculan (51,57).

Antígenos K

Están presentes en grandes cantidades en las envolturas, son de naturaleza polisacárida y algunas de sus características se alteran por calentamiento a diferentes temperaturas (51).

3.4. Patogenicidad.

Aunque E.coli es parte de la flora normal del tubo digestivo, desde hace años se sospechaba que podía causar gastroenteritis de moderada a intensa en seres humanos y animales. Sin embargo, esto fue difícil de comprobar de manera inequívoca, aunque algunos serotipos O111,B4 y O55, al parecer guardaban relación frecuente con diarrea (52).

Se sabe que diversos tipos de cepas de E.coli causan gastroenteritis por tres mecanismos diferentes: 1) Producción de una o dos toxinas que ocasionan indirectamente pérdida de líquidos, 2) Invasión real del epitelio de la pared intestinal, que causa inflamación y pérdida de líquidos y 3) adhesión al epitelio y destrucción de las microvellosidades vecinas posiblemente por elaboración de una toxina (75).

E.coli se relaciona con diversos síndromes, entre ellos podemos mencionar: 1) Infecciones a menudo graves y a veces fatales como cistitis, apendicitis, peritonitis, infecciones vesiculares, septicemia y endocarditis; 2) Diarrea epidémica del adulto y del niño y 3) Diarrea de los viajeros (5).

Los procesos patológicos producidos con mayor frecuencia por E.coli en el hombre, son los que afectan al tracto urinario-

por vía hematógica o linfática, generalmente sigue la vía ascendente desde la uretra a través de la vejiga hasta alcanzar los uretéros y el riñón (5,17).

Los animales también sufren infecciones por sus propias cepas de E.coli enterotoxigénica y en los neonatos puede causar la muerte, por la pérdida de electrolitos. Extensos estudios con cepas que infectan terneros y lechones recién nacidos, revelan que además de producir una enterotoxina, tales cepas poseen una estructura superficial conocida como fimbria que se adhieren específicamente a las células epiteliales del intestino delgado. El antígeno en cuestión (K88 para las cepas de porcinos y K99 para las bovinas), es una estructura similar a un pili, que permite el contacto íntimo entre los microorganismos toxígenos y las células que recubren el interior del intestino delgado. La necesidad de esta relación íntima, es reforzada por el hecho que los anticuerpos contra los pilis son protectores (5,20).

Cepas de E.coli enterotoxigénica análogas que atacan al ser humano, también poseen estructuras poliformes que han sido llamadas factores de colonización o CFA. Se han descrito dos de estos factores con diferencias serológicas, CFA/1 y CFA/11, y es posible que se identifiquen más factores de colonización en cepas que atacan al hombre. Como dato interesante, tales factores de colonización también son mediados por plásmidos y se han des-

crito plásmidos únicos que portan genes para CFA/1 (30).

La colonización de las mucosas, es mediada por adhesinas - específicas, con las cuales las células pueden resistir la acción fluyente de el peristaltismo del intestino (54).

3.5. Infección Urinaria.

Definición.- Es la invasión y colonización de gérmenes en la vía urinaria, que puede comprometer al riñón. Es la nefropatía más corriente y como infección ocupa el tercer lugar después de las del árbol respiratorio y digestivo.

El agente etiológico aislado más frecuentemente (87%) en los urocultivos es Escherichia coli, le siguen en orden de importancia Proteus, Enterobacter y Pseudomonas aeruginosa y los gérmenes gram positivos, son raros a excepción del Streptococcus faecalis (enterococo). Se presentan habitualmente como cultivos puros. Solo el 1.3% de los cultivos son mixtos y éstos generalmente son infecciones secundarias a instrumentación urológica o postquirúrgica o malformaciones (19,33,56).

La vía de penetración del germen al árbol urinario es casi siempre ascendente y son excepcionales las vías hematógenas y linfáticas. Las malformaciones y obstrucciones de la vía urina-

ría; reflujo vésico uretral, estenosis, litiasis, valvas, etc., - son frecuentes y deben ser objeto de investigación. Las manifestaciones clínicas varían con la edad. En los menores de 2 años predominan la intensidad de los signos generales, 1) fiebre acompañada de diarrea y vómitos, inapetencia, retardo del crecimiento y palidez.

En el preescolar y escolar, los síntomas orientan al árbol urinario; disuria, poliaquiuria, enuresis, hematuria, orinas de mal olor, ocasionalmente dolores lumbares. Estos síntomas no son patognomónicos de infección urinaria, se presentan también en el síndrome uretral agudo o síndrome disúrico o abacteriuria-sintomática que corresponden a infecciones de la uretra, glándulas adyacentes y vaginitis (15,19,31,41,56,70).

Las infecciones del tracto urinario, afectan a personas de todas las edades y de ambos sexos, variando en gravedad desde las que pasan inadvertidas hasta las que comprometen seriamente a todo el organismo; aunque su incidencia es elevada en lactantes, principalmente varones en el primer año de vida, donde se presenta 10 veces más frecuentemente que en la mujer de la misma edad, siendo igualmente alta durante la vida sexual activa en la mujer (3,31).

Para confirmar el diagnóstico de infección urinaria, clíni

camente es indispensable contar con el exámen bacteriológico de orina. Para que este examen tenga valor, la muestra de orina debe ser obtenida por técnicas extremas de asepsia (43,70).

Las infecciones en la vejiga son siempre precedidas por una colonización periuretral con patógenos en la entrada de la vejiga.

Varios factores de virulencia bacteriana, han sido identificados en organismos responsables de infecciones del tracto urinario. Estos incluyen producción de hemolisinas, cantidades altas de antígeno K y capacidad para adherirse a células uroepiteliales.

La capacidad de los microorganismos para adherirse a las células epiteliales de vejiga, juegan un papel importante en su colonización inicial. Svanborg-Eden et al. (72,74) demostraron que E.coli obtenida de cultivos de pacientes con cistitis, se adhieren a las células epiteliales en números significativamente altos (69).

La adherencia de E.coli a células uroepiteliales ha sido sujeta a numerosas investigaciones. Los resultados obtenidos de estudios en animales y humanos sugieren que la fimbria tipo 1 (pili) de E.coli se unen a residuos de manosa presentes en la su

perficie de las células epiteliales de la vejiga. Este es el mecanismo más importante de ataque de este patógeno en el tracto urinario (36).

Un segundo tipo de fimbria (fimbria P), la cuál causa hemaglutinación manosa resistente, es también importante en el ataque a este nivel anatómico (69).

Así la adherencia bacteriana, es aparentemente un determinante principal de virulencia, en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario (52,69).

Mecanismos de defensa contra las infecciones urinarias.

La micción es un mecanismo de defensa potencial contra las infecciones del tracto urinario. Otro mecanismo de defensa presente en la vejiga es la orina misma, la que en personas sanas puede tener acción inhibitoria y aún bactericida para microorganismos responsables de infecciones del tracto urinario. En los hombres se sugiere la presencia de secreciones prostáticas antibacteriales, las cuales pueden ser un factor inhibitorio (36).

Poco se sabe acerca de la naturaleza de los mecanismos antiadherentes de la vejiga, especialmente en humanos. Los experimentos in vitro por Svanborg-Eden y Svennerholm (74), demost

ron que la gammaglobulina comercial y la IgA e IgG urinaria aislada de sujetos bacteriúricos, reducen significativamente el ataque de cepas homólogas de E.coli a células uroepiteliales. Experimentos similares con animales inmunizados con diferentes fimbrias de E.coli fueron menos susceptibles a infecciones del tracto urinario (69).

Factores involucrados en la invasión de la vejiga.

Factores bacterianos: - Inóculo.
- Características adherentes.
- Otros factores de virulencia.

Factores del hospedero: - Micción.
- Efecto fluidificante.
- Constituyentes antibacterianos de la orina.
- Mecanismos antiadherentes; orina, IgA, IgG, uromucoide, mucosa de la vejiga.

Las infecciones del tracto urinario son probablemente unas de las infecciones bacterianas no epidémicas. La mayoría de los casos no obstructivos de infección del tracto urinario son causados por E.coli y los pacientes son usualmente infectados por los

serotipos O (33).

3.6. Adherencia.

Las bacterias pueden fijarse tenazmente y a menudo con exquisita especificidad, a distintas superficies. Esta adherencia está dada mediante una masa de fibras enmarañadas constituidas por un polisacárido de molécula ramificada que se extiende desde la superficie de la bacteria y forman un compacto glicocálix que rodea a las células individualmente o a una colonia de ellas (12,53).

El glicocálix es un determinante crítico para la iniciación y progresión de varias enfermedades producidas por las bacterias. La superficie activa real de cualquier célula bacteriana, vegetal superior o animal, consiste en un conjunto compacto de fibras de polisacárido, construidas por la propia célula. Una célula bacteriana se adhiere a células animales, vegetales o incluso a otra bacteria por yuxtaposición de su propio glicocálix a la superficie de la célula a la que se adhiere.

Las fibras de polisacárido del glicocálix bacteriano que se encuentran cargados negativamente en la mayor parte de su extensión, pueden establecer enlaces iónicos con los polisacáridos de las células eucariotas por mediación de los cationes divalen-

tes del medio (12,66).

En este mismo sentido, las lectinas poseen una atracción - específica hacia los polisacáridos, presentes en las células de organismos superiores y/o las fibras del glicocálix bacteriano, - actuando así como nexo de unión (66).

Como resultado de la especificidad de la adherencia bacteriana, la superficie de las células eucariotas es colonizada frecuentemente por una sola especie de bacterias, que pueden proliferar y formar una microcolonia englobada y fijada por las fibras de las células bacterianas. La adherencia capacita a las bacterias infectivas para su permanencia en el lugar que colonizan, sobre todo si no está colonizado por otros microorganismos, como sucede en órganos normalmente estériles. Los patógenos persistentes del tracto urinario están provistos de un glicocálix - bien desarrollado que impide su arrastre y eliminación por la orina (60,68).

La capacidad de ciertas bacterias para adherirse a células eucariotas es reconocida como un paso fundamental para la colonización de tejidos hospederos in vivo. Esta adherencia asegura - el establecimiento en las células hospederas y les permite competir con otros microorganismos comensales. Se reporta que los mecanismos de adherencia específicos juegan un papel importante en

el ataque de E.coli, Neisseria, Streptococcus y especies de Mycoplasma a varios tejidos epiteliales (28,35,73).

Aunque no hay duda de la propiedad adhesiva de E.coli ente rotoxigénica, poco se sabe acerca de la naturaleza de el mecanismo de la adherencia, que se atribuye a las características de la superficie de la bacteria, tales como carga y propiedades hidrofóbicas (28,55).

Los aspectos fisicoquímicos de la adherencia de microorganismos ha superficies, ha sido revisado por Rutter y Vincent (60). La superficie de las células procarióticas y eucarióticas están en suma cargadas negativamente. La fuerza repulsiva electrostática entre la superficie de la célula cargada puede ser vencida por fuerzas atrayentes (28,60,66).

La unión específica de la fimbria a receptores en la superficie de las células epiteliales, puede vencer las fuerzas de repulsión entre la bacteria y las células epiteliales.

Smyth et al (68) sugieren que la reducción en el potencial de la superficie de la célula puede ser debida al enmascaramiento producido por los polisacáridos del antígeno K, lipopolisacáridos y por las adhesinas con características hidrofóbicas. Probablemente esto promueve la adhesión a la mucosa intestinal (66,68).

La adherencia de E.coli, es un factor en la patogénesis, - la cual es a menudo reflejada por la habilidad de la bacteria pa - ra aglutinar eritrocitos humanos o animales (10,13,16,32,36).

La capacidad adhesiva, es un factor de virulencia para - E.coli causando infección del tracto urinario. El ataque resul - ta de la interacción de los receptores de la célula hospedera con estructuras de la superficie de la bacteria conocidas como adhe - sinas (28,44,53,75).

Se ha demostrado que E.coli se adhiere a las células Hela - en dos diferentes maneras. En la primera la bacteria ataca difu - samente la superficie entera de la célula. Otra forma se presen - ta cuando la bacteria ataca areas localizadas de la célula. La - primera forma se conoce como adherencia difusa y la segunda como adherencia localizada (3,7,64).

En la superficie de la célula hospedera, los receptores - que permiten el ataque de la bacteria, están constituidos por - carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos.

Se sugiere, que varios glicoconjugados específicos median - la adhesión o la hemaglutinación de E.coli uropatogénica, y en - tre estos se mencionan a la manosa, N-acetil glucosamina, antige - no M y Gal alfa 1 (75).

3.7. Fimbrias o Adhesinas.

Las fimbrias son filamentos rectos, delgados y además más cortos que los flagelos, se extienden hacia afuera desde la superficie de la célula y se encuentran casi exclusivamente en las bacterias gram negativas, a las que proporcionan un medio para adherirse a células animales u otras bacterias (9,37,54,59).

Las fimbrias constituyen el ejemplo de un grupo de estructuras superficiales denominadas adhesinas, que permiten a las células bacterianas adherirse a diferentes superficies celulares.

Estas tienen importancia para la supervivencia de las bacterias en el organismo de un huésped animal (2,5,10,37,54,73).

Se originan en la membrana citoplásmica y están compuestas por monómeros autopolimerizables de una proteína llamada pilina (37,42).

Existen diversos tipos de fimbrias, pero sus funciones básicas son las mismas. Las fimbrias o pilis comunes están distribuidas alrededor de la superficie celular y en algunos casos, con una densidad considerable (100 a 200 por célula) (32).

Poseen la capacidad de unirse a determinados residuos de -

azúcares presentes en las glucoproteínas y otros componentes superficiales de las células (32).

Estas funciones pueden detectarse midiendo la adherencia de una bacteria a células epiteliales, o bien a través de su capacidad de producir hemaglutinación. Las fimbrias pueden tener proporciones hidrofóbicas como consecuencia de un alto contenido de aminoácidos apolares. Existen diferentes tipos de fimbrias, distinguiéndose entre sí bioquímica y serológicamente (22).

Estas estructuras han sido encontradas extensamente distribuidas en casi todas las bacterias. Una bacteria típica, fimbriada, posee de 100-300 fimbrias periféricas en su superficie, la mayoría de ellas son de 0.5-1.5 μ m de largo y aproximadamente de 7nM de diámetro (42).

Las fimbrias son frágiles y pueden ser removidas casi enteramente por agitación mecánica en un mezclador a alta velocidad, morfológicamente son muy delgadas y solo son visualizadas por microscopio electrónico (23,42).

3.8. Clasificación, Tipos y Características de Fimbrias.

Con base en su habilidad hemaglutinante se han descrito dos tipos de fimbrias: tipo 1, las que se caracterizan por que -

su hemaglutinación es inhibida por manósidos y son llamadas hema-
glutinación manosa sensible (HAMS). La otra variedad en las que
la reacción no es inhibida por la manosa recibe el nombre de -
hemaglutinación manosa resistente (HAMR) (7,25).

Propiedades de las fimbrias manosa sensible y manosa
resistente de E.coli (21,29)

PROPIEDAD	MS	MR
Actividad en presencia de D-manosa	Ausente	Presente
Actividad a altas temperaturas(10-50°C)	Presente	Ausente
Actividad después que la bac- teria ha sido calentada a 65°C/30 min.	Presente	Ausente
Actividad después de un tratamiento con formaldehído a 37°C/4 hr.	Presente	Ausente
Patrón de actividad con eritro- citos de diferentes especies animales.	El mismo en todas las cepas de <u>E.coli</u> .	Diferentes pa- trones en dife- rentes cepas de <u>E.coli</u> .
Condiciones óptimas para su desarrollo.	48 hrs., caldo aeróbico estático.	Toda la noche en agar a 37°C.
Organelos con los cuales esta asociado.	Fimbria tipo 1.	Fimbria MR.

Tipos de fimbrias bacterianas.

Fimbria tipo 1.- La fimbria tipo 1 y las actividades adhesivas, son producidas por muchos cultivos de E.coli y por Enterobacter cloacae, Shigella flexneri, Klebsiella sp, Serratia marcescens y por algunos serotipos de Salmonella. Tienen un promedio un diámetro de 70 Å y 2 ug de peso. Las actividades adhesivas de la fimbria tipo 1 son similares, aunque antigénicamente diferentes, implican diferencias estructurales y químicas. Conferen a las células bacterianas, la habilidad para crecer como una película en la superficie de medios de cultivo estáticos y para atacar a una variedad de células animales y vegetales. Las características más importantes de la fimbria tipo 1 son la inhibición de su actividad adhesiva y su habilidad de formación de la película por la D-manosa (4,7,9,21,25,27,38).

Las fimbrias tipo 1 se encuentran en la mayoría de las cepas de E.coli. Esta fimbria posee una importancia fundamental, la cual, es unirse al material mucoso en la superficie del epitelio (39,45,71).

Esta compuesta de casi un 100% de proteínas con menos de un 0.6% de ácidos nucleicos, fosforo y carbohidratos. Esta clasificada dentro de las fimbrias manosa sensible y dentro de sus propiedades se incluye la habilidad para causar hemaglutina-

ción en todas las temperaturas de prueba (0° y 55° C). La fimbria tipo 1 permite a E.coli adherirse a una variedad de células eucariotas, es decir, eritrocitos de varias especies animales, leucocitos y células epiteliales (28,32,39,71).

Sus propiedades adhesivas pueden ayudar a colonizar las superficies epiteliales además contribuir a la patogenicidad de E.coli enteropatogénica (28,38,39,67).

Brinton (10) ha demostrado que la producción de la fimbria tipo 1, esta sujeta a un mecanismo de control fenotípico llamado variación de fase. La fimbria tipo 1 ha sido aislada, concentrada y purificada por varias técnicas. Lo más conveniente es removerlas de las células por una agitación mecánica por 2 min a alta velocidad y una centrifugación a baja velocidad, acompañada de una precipitación isoeléctrica. Dicha fimbria esta compuesta por subunidades de un PM de 17,000 (27).

Fimbria tipo 2.- Es producida por algunas Salmonellas, morfológicamente son indistinguibles de la fimbria tipo 1 y son formas no adhesivas de la fimbria tipo 1.

Fimbria tipo 3.- Producida por Enterobacter aerogenes y Serratia marcescens, tienen un diámetro de 48 Å. Este tipo de fimbria, media la adhesión de la bacteria a células vegetales, -

fibras de celulosa y vidrio, pero no a células animales.

Fimbria tipo 4.- Producida por Proteus sp. tienen un diámetro de 40 Å y causan hemaglutinación manosa resistente de eritrocitos selectos. Las propiedades adhesivas del tipo 4, producidas por Proteus mirabilis pueden contribuir a la habilidad del organismo para causar pielonefritis (10).

Otras fimbrias.- Un factor de colonización descubierto en una cepa de E.coli patógena para el hombre, esta asociada con una fimbria que mide 80-90 Å de diámetro. Este factor, promueve satisfactoriamente la colonización del intestino de animales de laboratorio y la fimbria aislada no causa hemaglutinación manosa resistente con eritrocitos de cobayo. El factor de colonización es un determinante ecológico similar en funciones al K88 y a otras adhesinas de E.coli (11).

Dentro de estos factores de colonización se han descrito dos tipos para el hombre; el CFA/1 el cuál fue encontrado en una cepa de E.coli aislada de un paciente con diarrea severa en Daca Bangladesh. Un segundo antígeno de superficie fue consecuentemente descubierto al cuál se le llamó CFA/11 (2,28,39,47).

Propiedades del CFA/1.

El CFA/1 purificado, es una molécula fimbrial de 7.0 nm de diámetro y tiene un peso molecular de 1.6×10^6 , es un polímero de subunidades idénticas de peso molecular de 23,800 con una valina N-terminal, 37% de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y 11 residuos de prolina por mol.

El antígeno purificado retiene su morfología, antigenicidad y actividad biológica. El CFA/1 purificado exhibe hemaglutinación manosa resistente de eritrocitos del grupo "A", bovino y de pollo.

Es un antígeno protéico, tiene la capacidad de inducir la producción de anticuerpos contra él, se pierde espontáneamente y está controlado por un plásmido.

El CFA/1 es termolábil, se desnaturaliza con calor a 60°C durante una hora, su desarrollo es inhibido por baja temperatura de incubación (18°C).

El desarrollo óptimo se logra incubando la cepa en medio sólido de peptona-agar-NaCl o en el medio modificado de casaaminoácidos-extracto de levadura y sales. Este antígeno se defecta en la bacteria cuando se mezcla una gota de PBS con las bacte-

rias por probar y una gota de la suspensión de eritrocitos humanos del grupo A diluida 1:4 en PBS con 1% de manosa y por otro lado, con una suspensión de los eritrocitos pero sin manosa; donde se manifiesta la hemaglutinación sin manosa, indica la presencia del pili común y donde hay hemaglutinación en presencia de manosa indica que tiene CFA/1 puesto que el pili común se ve inhibido por la presencia del carbohidrato (2,4,18,23,24,25,26,28,30,42,58,62,63,72).

El CFA/1 ha sido aislado por precipitación isoelectrica y por técnicas de ultracentrifugación y la fimbria purificada puede ser vista con microscopio electrónico. El punto isoelectrico del CFA/1 es de 4.8.

El CFA/1 liberado de las células bacterianas es monovalente. La hemaglutinación, sin embargo puede ser obtenida por sensibilización de micropartículas de látex con el CFA/1 purificado o por agregados del CFA/1 purificado, los cuales son inducidos a un bajo pH. El CFA/1 purificado retiene su afinidad por las células epiteliales del intestino delgado de conejos y se libera por calentamiento de las células a 60°C por 30 min. (2,28,50).

3.9. Hemaglutinación.

La hemaglutinación es una técnica de sedimentación global en pozos de plástico. Fue empleada inicialmente para medir

la hemaglutinación por virus, y se adoptó a otros agentes aglutinantes. Se prepara una mezcla de glóbulos y antisero, en pequeñas depresiones de una placa y se espera a que los glóbulos sedimenten. Los glóbulos aglutinados se distribuyen homogéneamente sobre el fondo de la depresión y los glóbulos no aglutinados forman un botón central obscuro (5,17,34,40).

Existen dos técnicas básicas que son usadas para detectar las propiedades adhesivas de la bacteria in vitro; la primera; - hemaglutinación semicuantitativa, la cuál mide la habilidad de adherencia de la bacteria a eritrocitos; y la segunda; pruebas de adherencia en las cuales las células epiteliales aisladas y cultivos de órganos con la bacteria se obtienen medidas cuantitativas de la adhesión microscópicamente o por conteo de bacterias viables. Hay diferencias en la reactividad de las células de diferentes especies animales con diferentes adhesivas bacterianas- (39).

La actividad adhesiva de la bacteria en pruebas puede ser influenciadas tanto por condiciones físicas y químicas del sistema de prueba. La hemaglutinación fue la primera manifestación observada de las propiedades adhesivas de la bacteria entérica fimbriada (6).

La hemaglutinación por E.coli presenta patrones similares-

de actividad con eritrocitos de varias especies animales (6,21.-28,39).

Esta hemaglutinación es manosa sensible, sujeta a una fase de variación y correlacionada con la presencia de la fimbria tipo 1. La hemaglutinación de eritrocitos humanos del grupo A por E.coli enterotixigénica de diferentes serogrupos y aislados de adultos con diarrea se encontró estar asociada con la presencia del CFA/1 en esas cepas (21,28,39).

La habilidad de E.coli para aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales ha sido correlacionada con la presencia de factores adhesivos en la superficie de la bacteria (21).

C A P I T U L O I V

PARTE EXPERIMENTAL

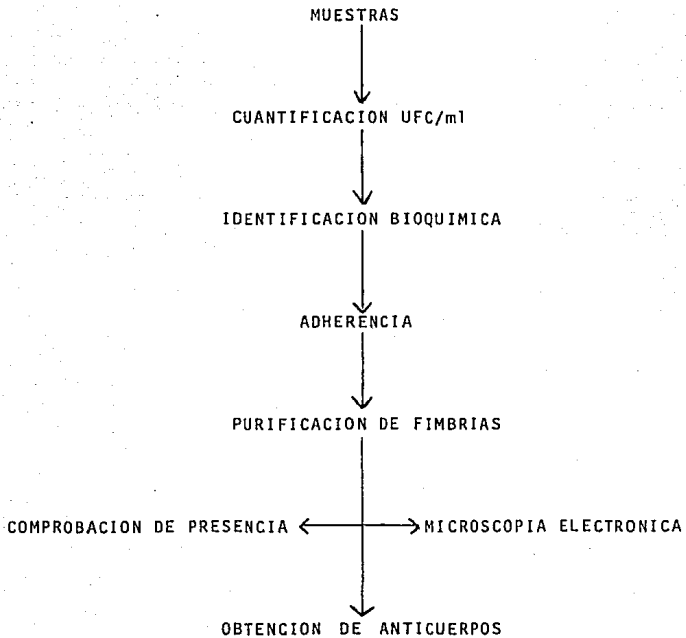
4.1. MATERIAL.

MATERIAL BIOLÓGICO.

- Orinas de niños y niñas (pacientes del Instituto Nacional de Pediatría INP).
- Conejos de Nueva Zelanda de 2-3 kg de peso.
- Eritrocitos humanos tipo A y O.
- Eritrocitos de carnero.
- Eritrocitos de bovino.
- Suero de cabra.
- Cepas de E.coli H10407 proporcionada por el Dr. A. Gravito.
- Cepas analizadas; aisladas de muestras de orina obtenidas del INP.

La formulación de los medios de cultivo y soluciones empleadas se describen en el anexo.

4.2. M E T O D O L O G I A



Obtención y procesamiento de muestras.

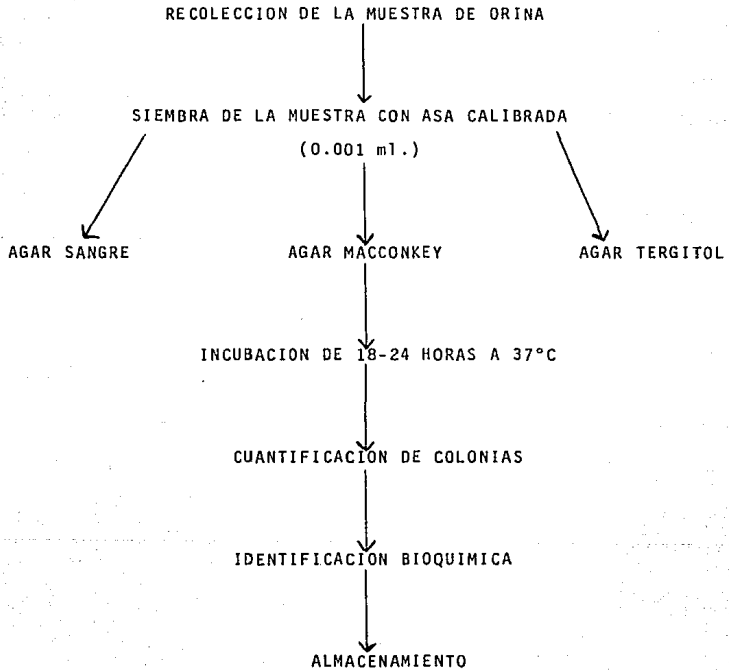
Se analizaron 2572 muestras de orina provenientes de niños y niñas del Instituto Nacional de Pediatría. Para que el examen tuviera valor, las muestras se obtuvieron mediante orina emitida del segundo chorro con aseo previo y colocación de un recolector desechable. Posteriormente a cada muestra se le realizó urocultivo; inoculando 0.01 ml de la muestra con una asa de 4mm de diámetro en los siguientes medios de cultivo; agar-sangre, agar-MacConkey y agar-tergitol, incubándose durante 18-24 hr. a 37°C.

La cuantificación de colonias por/ml. de orina se realizó acorde a el criterio de Kass.

Los cultivos en los que no hubo desarrollo en las primeras 24 hrs. se incubaron otras 24 hrs. y si a las 48 hrs. no lo hubo se tomaron como urocultivo negativos.

De las cajas positivas se aislaron al azar 49 capas de E.coli procediéndose a caracterizarlas bioquímicamente.

PROCESAMIENTO DE UN UROCULTIVO



Identificación Bioquímica.

Se siguieron los criterios comunmente usados en bacteriología diagnóstica. Dentro de las bioquímicas de mayor porcentaje de seguridad para considerar que la cepa corresponde a Escherichia coli están las siguientes:

<u>PRUEBA BIOQUIMICA</u>	<u>REACCION</u>
Indol	+
Rojo de Metilo	+
Voges-Proskauer	-
Citrato de Simmons	-
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	-
Ureasa	-
Gas de glucosa	+
Lactosa	-
Caldo de malonato	-
Movilidad	+/-
Lisina	-
Arginina	-
Gelatina (22°C)	-
Ornitina	-

Las cepas ya identificadas bioquímicamente, se sometieron-

a pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación por la D-manosa con diferentes tipos de eritrocitos.

Obtención y procesamiento de diferentes tipos de eritrocitos.

Las muestras de sangre fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Pediatría, 9 ml. de sangre recientemente obtenida fue adicionada con 0.25 ml. de citrato como anticoagulante.

Para la separación de los eritrocitos, las muestras se lavaron con PBS y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 20 min.

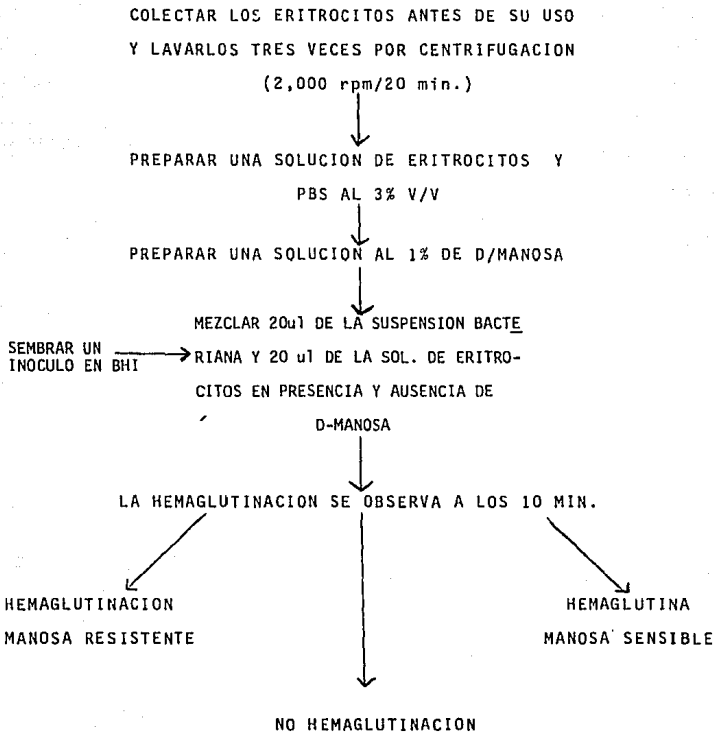
Posteriormente los eritrocitos fueron suspendidos en PBS para obtener un volúmen al 3%.

Hemaglutinación.

Se emplearon cultivos de E.coli H10407 y de las 49 cepas aisladas. Estos cultivos se obtuvieron por inoculación de c/u de las cepas en estudio en el medio BHI líquido, incubándose a 37°C durante 18 hr. De cada cultivo se colocaron 20 ul en placas excavadas y 20 ul de la suspensión de los eritrocitos en presencia y ausencia de D-manosa y se colocaron durante 10 min. a temperatura de 4°C procediéndose a la observación.

Hemaglutinación en ausencia de manosa, significó la presencia del pili común o bien el factor de colonización; si la hemaglutinación se presentó en la mezcla de la bacteria con los eritrocitos en presencia, de manosa, indicó la presencia de un factor de colonización diferente al pili común, puesto que este se inhibe en presencia de manosa.

HEMAGLUTINACION DE ERITROCITOS



Producción del Factor de Colonización.

Se inocularon en forma masiva dos cajas petri con agar-CFA con la cepa de Escherichia coli H10407, se incubaron 48 hrs. y - al finalizar el tiempo de incubación se resuspendieron en 60 ml. de PBS estéril. Con esta suspensión se inocularon 19 botellas - de Roux con 1 ml. de inóculo, cada una conteniendo 150 ml de - agar-CFA, la incubación se realizó por 48 hrs. en una posición - horizontal.

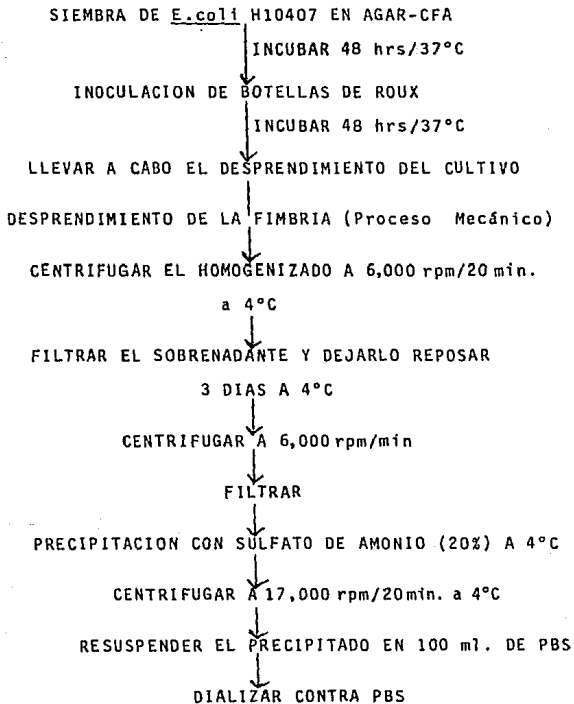
Al finalizar el tiempo de incubación, se introdujeron pequeños trozos de varilla de vidrio con los cuales se llevó a cabo el desprendimiento del cultivo de la bacteria, que se colectó en un matraz estéril colocado en un baño de hielo.

El cultivo se dejó reposar en el baño de hielo por 30 min. posteriormente se llevó a cabo el desprendimiento de la fimbria mediante agitación mecánica dentro del baño de hielo para evitar sobrecalentamiento.

El homogenizado se centrifugó a 6,000rpm/20 min. a 4°C, el precipitado se desechó y el sobrenadante se filtró a través de - una membrana Millipore de 0.65 um de poro. El filtrado se dejó - reposar durante tres días a 4°C y después se centrifugó a 6,000- rpm durante 20 min. Enseguida se realizó otra filtración seme--

jante a la anterior. El filtrado obtenido se precipitó con sulfato de amonio al 20% de saturación por 30 min. a 4°C; posteriormente se centrifugó a 17,000 rpm/20 min. a 4°C; el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió a 100 ml. de PBS - 0.05M conteniendo azida de sodio. Este volumen fue dializado - por 24 hrs. a 4°C contra 1,000 volúmenes de PBS, con dos cambios de PBS para remover las sales residuales.

PRODUCCION DEL FACTOR DE COLONIZACION



En la muestra dializada se determinaron proteínas empleando el método de Lowry.

Cuantificación de Proteínas del Antígeno Dializado.

Inicialmente se realizó una curva patrón con albumina sérica bovina con el fin de interpolar los valores obtenidos del antígeno problema y así obtener la cantidad de proteínas presente en la muestra dializada.

La determinación se efectuó de la siguiente manera:

TUBO	SOL. ALBUMINA	H ₂ O	RC	FC ()	PROTEINA
1	-----	1ml	1ml	Mezclar	-----
2	0.1ml	0.9ml	1ml	10 min	10ug/ml
3	0.2ml	0.8ml	1ml	en	20ug/ml
4	0.4ml	0.6ml	1ml	vortex	40ug/ml
5	0.6ml	0.4ml	1ml	en	60ug/ml
6	0.8ml	0.2ml	1ml	refri	80ug/ml
7	1ml	---	1ml	gera-	100ug/ml
Prob	1ml	---	1ml	ción.	-----

Posteriormente se realizó la lectura de todos los tubos a una longitud de onda de 750nm. Una vez obtenidas las lecturas, se graficaron los puntos, graficando microgramos de proteína con tra densidad óptica y se interpoló la lectura del problema.

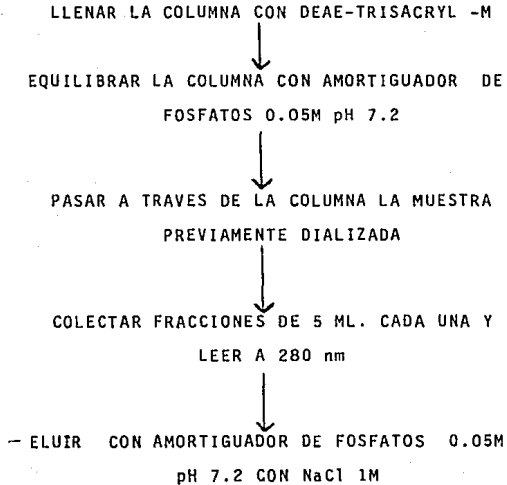
Purificación del Antígeno CFA/I.

Conocida la cantidad de proteína que contenía la muestra, se calculó la cantidad de gel (gramos) que se utilizaría para fabricar la columna. Se utilizó una columna para cromatografía (de 1.6 cm. x 8.2 cm.); provista con émbolos y conductos adecuados - que quedaron sellados perfectamente. Se armó la columna, se purgó con amortiguador de fosfatos, evitando que quedara aire atrapado en la membrana del émbolo.

Posteriormente se fue depositando lentamente el gel con el cual se llenó la columna, en este caso el gel empleado fue el Tris-acryl-M DEAE (LKB), resbalando por las paredes del tubo del vidrio evitando que se formarían burbujas de aire. Posteriormente la columna se equilibró con amortiguador de fosfatos 0.05M - pH 7.2, ya equilibrada se hizo pasar la muestra previamente dializada contra el amortiguador anterior, a través de la columna.

Se colectaron fracciones de 5 ml. cada una, dichas fracciones fueron leídas a 280 nm en un fotómetro de sistema (PMQ3) - Zeiss. Finalmente se llevó a cabo la elución empleando un amortiguador de fosfatos 0.05M, pH 7.2 con NaCl 1M para eluir la proteína remanente.

PURIFICACION DEL ANTIGENO CFA/1



Fijación del CFA/1 a partículas de látex.

Las partículas de látex se lavaron y con ellas se hizo una dilución con agua destilada de 1:10, a partir de ésta se hizo una segunda dilución 1:20, con lo que se obtuvo 1:200 de la concentración original y se agregaron 20 ug de CFA/1 por ml. en un volumen final de 10 ml. aproximadamente.

Esta mezcla se incubó durante 60 min. a 37°C. Las partículas fueron lavadas 2 veces por centrifugación y resuspendidas en buffer de glicina-salina y finalmente resuspendidas en 2,5 ml. de buffer de glicina-salina conteniendo 0.2% de albumina sérica-bovina.

Posteriormente se efectuaron pruebas para comprobar actividad (mediante una hemaglutinación del CFA/1 purificado con distintos eritrocitos).

Con el CFA/1 fijado a las partículas de látex se llevó a cabo la hemaglutinación con los distintos tipos de eritrocitos. Esta hemaglutinación también se observó a través de el microscopio fotónico y los resultados obtenidos se fotografiaron. Una vez que se demostró que el antígeno purificado presentaba actividad se procedió a la obtención del antisuero anti CFA/1.

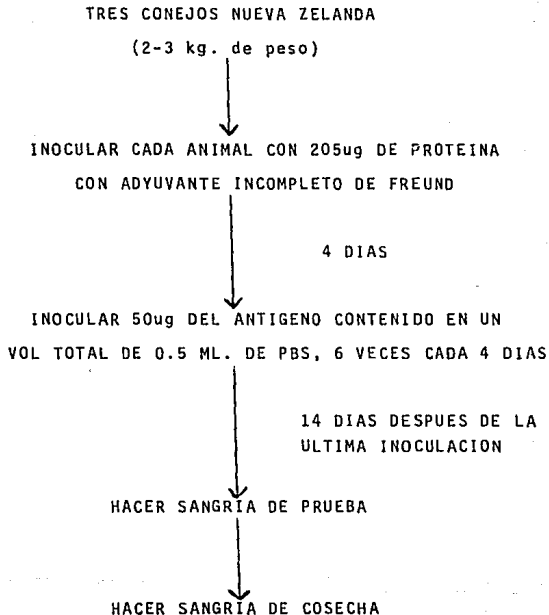
Obtención del antisuero CFA/1.

Se usaron tres conejos blancos Nueva Zelanda de aproximadamente 3 kg. de peso, los cuales fueron hiperinmunizados de la siguiente manera:

A cada animal se le inyectó 205 ug de proteína preparada con adyuvante incompleto de Freund (0.2 ml. por inyección, en cuatro sitios diferentes de la axila y la región inguinal). Cada cuatro días, los animales fueron inyectados con 50 ug del antígeno, conteniendo un volumen total de 0.5 ml. de PBS. Las inyecciones de refuerzo fueron dadas en cada uno de los 5 sitios (patas delanteras, traseras, así como la región cervico dorsal). Seis refuerzos con intervalos de 4 días.

Después de la última inoculación se dió un refuerzo a los catorce días, al finalizar este periodo se hizo una sangría de prueba y finalmente los conejos fueron sangrados por punción carotíaca para obtener la mayor cantidad de suero posible.

OBTENCION DEL ANTISUERO CFA/1



Titulación del antisuero CFA/1.

La titulación del suero se hizo por medio de aglutinación con la bacteria. Primero se efectuó una dilución del antisuero problema 1:10 (0.1 ml. de suero problema más 0.9 ml. de SSI). Por otro lado se rotularon 10 tubos con su número respectivo y se les añadió 0.5 ml. de SSI. Enseguida se pusieron 0.5 ml. del suero diluido 1:10 al primer tubo y se paso 0.5 ml. de éste tubo al segundo y así sucesivamente hasta el noveno tubo del que se desecharon 0.5 ml. el décimo tubo fue el control de antígeno (negativo).

Posteriormente se adicionó a cada tubo 0.5 ml. de antígeno (la bacteria). Con los pasos anteriores, se obtienen las siguientes diluciones; 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120.

En una placa de vidrio, se puso una gota del suero con una gota de las diluciones hechas.

Se llevaron a cabo las lecturas y se interpretaron los resultados.

El título fue la dilución más alta que dió aglutinación positiva.

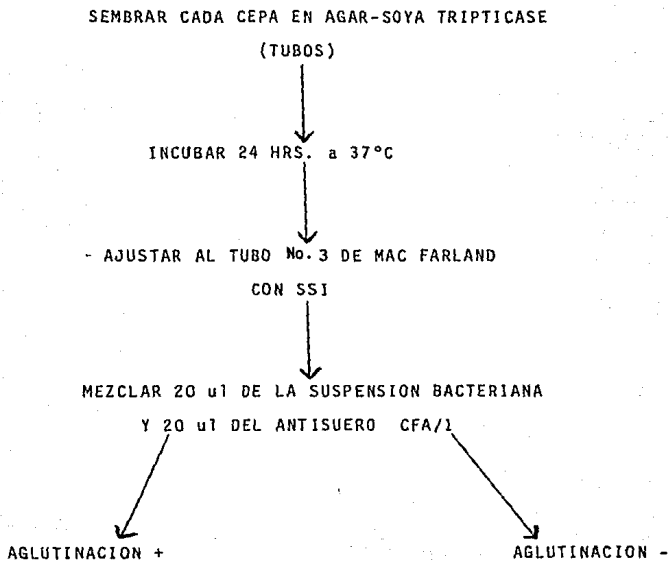
Aglutinación de las cepas estudiadas con el antisuero CFA/1.

Obtenido ya el antisuero CFA/1 se realizó una aglutinación de las 49 cepas estudiadas, para lo cuál se hizo lo siguiente:

Inicialmente se partió de un cultivo de 24 hrs. de las cepas en agar soya tripticase, con este cultivo se hizo una suspensión ajustando al tubo N.3 del estándar de Mac Farland. La aglutinación se llevó a cabo en una placa de vidrio mezclando 20 ul de la suspensión bacteriana y 20 ul del antisuero.

AGLUTINACION DE LAS CEPAS ESTUDIADAS CON EL ANTISUERO

CFA/1



Precipitación de Inmunoglobulinas.

Se disolvieron 1,000 g de sulfato de amonio en 1,000 ml. de agua destilada a 50°C, se dejó reposar esta solución toda la noche y se ajustó el pH a 7.2 (con solución diluida de amonio o ácido sulfúrico). Por otra parte se hizo una dilución del suero 1:2 con solución salina.

Se adicionó una solución de sulfato de amonio saturada gota a gota a esta solución del suero para llevar a una concentración de 45% de saturación, se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente, y se centrifugó 15 min. a 1,000 g a 4°C. Después se lavó el precipitado con una solución de sulfato de amonio al 45% y se centrifugó de nuevo.

El precipitado que se formó se disolvió con PBS en el mismo volumen inicial. Se centrifugó de nuevo 15 min. a 1,000 g con el objeto de remover cualquier material insoluble.

Las gammaglobulinas se precipitaron usando sulfato de amonio saturado a una concentración final de 40%. Para remover el precipitado se centrifugó y el botón se disolvió en PBS en un volumen mínimo para finalmente llevar a cabo la diálisis de la fracción gamma contra 5 cambios de PBS a 4°C.

Purificación de Inmunoglobulinas (IgG).

La purificación de las IgG se realizó mediante cromatografía utilizando una columna de 2.2 cm. x 9.5 cm. con DEAE-Sephacel.

En primer lugar se equilibró la columna con buffer de fosfatos 0.01 M, pH 8.0.

Posteriormente se pasó la muestra a través de la columna y la elución se realizó empleando el mismo buffer (pH 8.0, 0.01 M), colectando fracciones de 2 ml. cada una y midiendo su densidad óptica a 280 nm en un fotómetro de sistema (PMQ3) Zeiss.

PRECIPITACION DE INMUNOGLOBULINAS

HACER UNA DILUCION DEL SUERO 1;2 CON SSI
↓
ADICIONAR SULFATO DE AMONIO PARA LOGRAR UNA SATURACION AL 45%
↓
AGITAR 30 MIN. A TEMP. AMBIENTE
↓
CENTRIFUGAR 15 MIN. A 1,000 xg/4°C
↓
LAVAR CON UNA SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO AL 45%
↓
- CENTRIFUGAR 15 MIN. A 1000 x g.
↓
RESUSPENDER EL BOTON FORMADO
↓
CENTRIFUGAR 15 MIN. A 1,000 x g.
↓
PRECIPITAR CON SULFATO DE AMONIO (40%)
↓
CENTRIFUGAR 15 MIN. A 1,000 x g.
↓
- DISOLVER EL PRECIPITADO FORMADO CON PBS
↓
DIALIZAR CONTRA 5 CAMBIOS DE PBS A 4°C
↓
PURIFICAR LAS IgG OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO USANDO DEAE-SEPHACEL

Inmunoelectroforesis.

La pureza de las IgG se verificó por inmunoelectroforesis, la cuál se llevó a cabo en un portaobjetos de 13 x 18 cm. sobre el cuál se puso una fina película de agar al 1.5%. En el gel solidificado se hicieron horadaciones en forma de pozos al centro de la placa divididos por un canal. Los compartimientos fueron llenados con amortiguador de Trisbarbital hasta aproximadamente 1 cm. por encima de los electrodos.

El portaobjeto con el gel se colocó sobre la plantilla de la cámara y con una micropipeta se pusieron 20 ul de la muestra problema y a un lado del pozo se adicionó 1 ul de azul de bromofenol, que al ligarse con la albúmina sérica se irá desplazando con esta, controlando de este modo la migración de la proteína.

Posteriormente se estableció contacto con el amortiguador mediante 2 pedazos de papel filtro formando un puente entre la placa de gel de agar y el amortiguador.

Se tapó la cámara y se conectó con la fuente de poder ajustando a 120V dejando correr aproximadamente 60 min. Se sacó la placa de la cámara y se retiró el gel del canal, posteriormente se agregaron 60 ul de antisuero normal de conejo y finalmente la placa se dejó en ambiente húmedo 24 hrs. para que se llevara a cabo la difusión.

Tinción de las líneas de precipitación.

La placa se colocó en una caja de plástico y se cubrió perfectamente con solución salina isotónica durante 24 a 48 hrs. este lavado tuvo por objeto eliminar las protefmas que no precipitaron.

Posteriormente la placa se lavó con agua destilada para eliminar la solución salina y se colocó en una estufa a 37°C para que se secara perfectamente.

Una vez que la placa se encontraba seca se colocó en la caja de plástico y se cubrió con la solución colorante de negro de amido.

El colorante se dejó actuar por aproximadamente 30 min. Posteriormente se escurrió el colorante y se lavó con la solución de lavado (ver anexo), cambiando la solución cada 10 min. hasta que el gel de agar quede incoloro y las bandas de precipitación teñidas.

Aglutinación de las IgG con las cepas estudiadas.

Obtenidas las IgG purificadas se realizó una aglutinación de aquellas cepas que presentaron hemaglutinación manosa resistente con la sangre humana tipo A y la sangre de bovino.

También se partió de un cultivo de 24 hrs. en agar-soya-tripticase, ajustando dicho cultivo al tubo N.3 del estándar de Mac Farland con solución salina isotónica.

La aglutinación se llevó a cabo en una placa de vidrio mezclando 20 ul de la suspensión bacteriana con 20 ul de la solución de IgG.

Posteriormente se llevó a cabo la lectura e interpretación de los resultados.

C A P I T U L O V

RESULTADOS

Frecuencia de microorganismos aislados de urocultivos.

Durante un periodo de 6 meses se recibieron 2572 muestras de orina, de las cuales 143 (5,6%) fueron positivas al urocultivo realizado.

Los microorganismos que se encontraron con mayor frecuencia correspondieron a Escherichia coli (65.96%), K.pneumoniae (13.64%), P.aeruginosa (3.19%) y otras enterobacterias, Candida-sp, en menor proporción Tabla 1.

TABLA No. 1

MICROORGANISMO	POR CIENTO
1) <u>Escherichia coli</u>	65.96%
2) <u>Klebsiella pneumoniae</u>	13.64%
3) <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	3.19%
4) <u>Proteus mirabilis</u>	1.98%
5) <u>Morganella morganii</u>	1.05%
6) <u>Candida sp</u>	1.96%
7) Otros	11.45%
8) <u>Streptococcus faecalis</u>	0.77%

Hemaglutinación con diferentes eritrocitos.

En este capítulo del trabajo, únicamente se realizó hema--
glutinación a 49 cepas de E.coli de un total de 2572 muestras -
de orina, las cuales fueron seleccionadas en base a la especie -
más frecuentemente identificada.

De las 49 cepas estudiadas, 23 correspondieron a bacterias
aisladas de urocultivos con cifras superiores a 100,000 UFC/ml -
(47%) y el (53%) 26 cepas, con cuentas menores de 100,000 UFC/ml.

Al someter a la bacteria a hemaglutinación con el empleo -
de eritrocitos humanos tipo A y empleando el manócido necesario -
para determinar la sensibilidad o resistencia al mismo, encontramos
que 35 cepas presentaron hemaglutinación manosa resistente -
(HAMR) y 13 cepas presentaron hemaglutinación manosa sensible -
(HAMS).

Para el tipo 0 humano, se obtuvieron los siguientes resul-
tados: 34 cepas presentaron HAMR y 13 cepas HAMS.

Con respecto a la sangre de carnero se obtuvieron 32 cepas
con HAMR y 17 cepas con HAMS.

Para la sangre de origen bovino, se obtuvieron los siguien
tes resultados: 30 cepas presentaron HAMR y 18 cepas HAMS.

TABLA No. 2

Resultados de HA con distintos tipos de eritrocitos para
cada una de las cepas estudiadas

No. cepa		CARNERO 4°C	TIPO A 4°C	TIPO O 4°C	BOVINO 4°C
1	121	A	R	R	R
2	339	A	R	R	R
3	375	A	R	R	R
4	104	S	R	R	R
5	286	O	R	R	R
6	108	N	R	R	R
7	125	D	R	R	R
8	104	E	R	R	R
9	75	F	R	R	R
10	153	S	R	R	R
11	168	N	R	R	R
12	138	N	R	R	R
13	172	D	R	S	R
14	43	N	R	S	R
15	244	A	R	NOHA	R
16	185	F	R	R	S
17	338	N	R	S	S
18	11	S	R	NOHA	S
19	44	N	R	S	S
20	73	N	R	S	R
21	266	A	S	R	R
22	300	A	R	S	S
23	260	N	R	S	S
24	94	E	R	S	S
25	220	F	R	S	S

Continúa

No. cepa			CARNERO 4°C	TIPO A 4°C	TIPO O 4°C	BOVINO 4°C
26	259	O	R	S	R	S
27	19	F	R	S	R	S
28	90	D	R	S	S	S
29	104	D	R	S	NOHA	S
30	178	F	R	R	R	R
31	35	F	R	R	R	R
32	83	E	R	R	R	R
33	263	A	S	S	R	-
34	209	O	R	S	R	R
35	355	A	S	R	R	R
36	163	S	S	R	R	S
37	241	S	S	R	R	R
38	198	F	S	R	R	R
39	324	N	S	R	R	R
40	193	F	S	R	R	R
41	323	N	S	R	R	S
42	417	O	S	R	S	R
43	101	D	S	R	S	R
44	308	A	S	R	S	R
45	312	N	S	R	S	S
46	107	E	S	R	S	R
47	205	F	S	R	S	S
48	1	F	S	R	S	R
49	20	N	S	S	R	S
Control	H10407		R	R	R	R

TABLA No. 3

	CARNERO	TIPO A	TIPO O	BOVINO
HAMR	32(65.36%)	35(71.43%)	34(69.38%)	30(61.22%)
HAMS	17(34.69%)	13(26.53%)	13(26.53%)	18(36.73%)

HAMR - Hemaglutinación manosa resistente.

HAMS - Hemaglutinación manosa sensible.

A partir de los resultados de la tabla 2, se lograron formar 15 grupos con diferentes respuestas ante los cuatro tipos de eritrocitos empleados, siendo el más frecuentemente identificado aquel que fue HAMR para los cuatro tipos de eritrocitos (14 cepas) tabla 4.

En vista de que se obtuvieron 35 cepas con HAMR para eritrocitos humanos tipo A y 30 cepas para eritrocitos de origen bovino, el siguiente paso fue relacionar estos datos con la posible presencia del CFA/1 (como lo reportaron Evans et al.) para lo cual se realizó primero la extracción y purificación por cromatografía en columna con DEAE-Trisacryl M.

La purificación del CFA/1, se logró con el empleo de E. coli H10407 no flagelada, la cual se creció en la superficie de agar CFA. Realizando el desprendimiento mecánico de la fimbria y realizando el homogenizado por centrifugación, filtración y precipitación con sulfato de amonio, así como centrifugación a alta velocidad para finalmente dializar contra PBS.

El método de Lowry para la cuantificación de proteínas, permitió determinar 205 ug de proteína por ml. La cromatografía de CFA/1 en columna con DEAE-trisacryl-M mostró dos picos importantes, Fig. 1. Encontrándose actividad en el primero de ellos, la cual fué demostrada a través de la hemaglutinación.

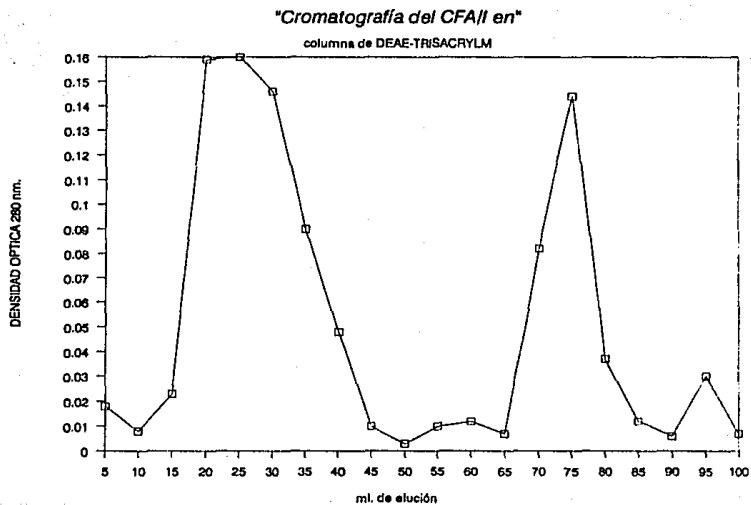
Pool 1 (+++), Pool 11 (-)

TABLA No. 4

PATRONES DE ACTIVIDAD MAS FRECUENTES

No. cepas	CARNERO 4°C	TIPO A 4°C	TIPO O 4°C	BOVINO 4°C
14	R	R	R	R
7	R	S	R	S
5	S	R	R	R
5	S	R	S	R
4	R	R	S	R
2	R	R	R	S
2	R	S	S	S
2	S	R	R	S
2	S	R	S	S
1	R	NOHA	S	R
1	R	R	NOHA	S
1	R	S	NOHA	S
1	S	S	R	
1	R	S	R	R
1	S	S	R	S

Fig. 1



La columna y la muestra fueron primero equilibradas con amortiguador de fosfatos 0.05M , pH 7.2. La elución se llevó a cabo con el mismo amortiguador conteniendo NaCl 1M.

Con el fin de comprobar actividad del pool 1, partículas - de látex fueron sensibilizadas con la proteína purificada, la - cuál exhibió HAMR con eritrocitos humanos, de carnero y bovino, - Fig. 2.

Dichos resultados no sólo fueron visualizados por la hema- glutinación en placa, sino también se observaron al microscópio- fotónico, Fig. 3.

Una vez obtenido el antígeno puro, el siguiente paso fue - la obtención de anticuerpos con conejos de Nueva Zelanda como se - refirió en la parte experimental.

Los títulos de los sueros anti CFA/1 fueron 1:2560. Poste- riormente con este antisuero se realizó una aglutinación con las - 49 cepas estudiadas, de las cuales 28 de ellas dieron aglutina- - ción (+) y 20 aglutinación (-), Tabla 5.

La determinación del contenido de proteínas del antisuero - se logró mediante la realización de una electroforesis, esto per- - mitió encontrar 7.1 mg/ml de proteína.

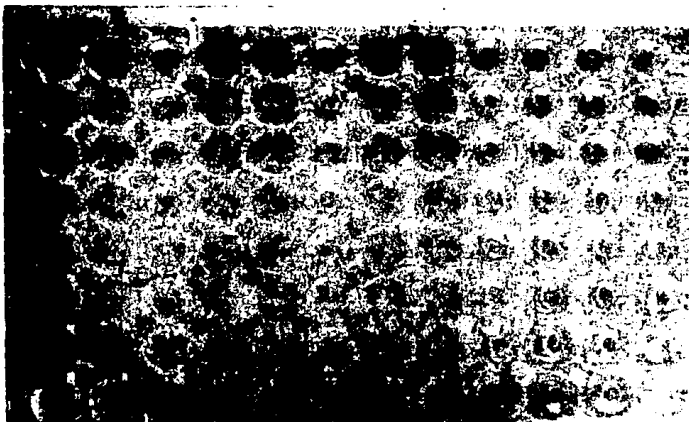
Purificación de IgG.

La purificación de IgG realizada por una cromatografía en columna con DEAE-Sephacel permitió obtener un pico correspondiente a las IgG con un contenido de proteínas de 3.7 mg/ml, Fig. 4.

Pureza de las IgG.

Para realizar la comprobación de la pureza de las IgG de conejo, se realizó una inmunoelectroforesis, colocando en los pozos la IgG obtenida y en el carril un suero de cabra anti suero normal de conejo, obteniéndose como resultado una sola banda correspondiente a las IgG, Fig. 5.

Fig. 2



Hemaglutinación del CFA/1 purificado con eritrocitos de diferentes orígenes.

Fig. 3



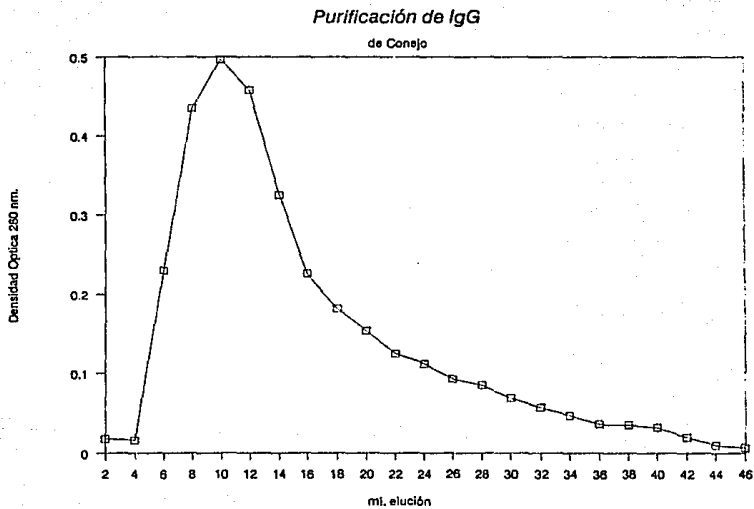
Hemaglutinación del CFA/1 fijado a las partículas de látex vista al microscópio fotónico.

TABLA No. 5

AGLUTINACION CON ANTISUERO CFA/1

Núm. cepas	Aglutinación con antisuero CFA/1
28	+
20	-

Fig. 4



La columna y la muestra fueron equilibradas con amortiguador de fosfatos 0.01M, pH 8.0.

Fig. 5

Inmunolectroforesis de las IgG purificadas

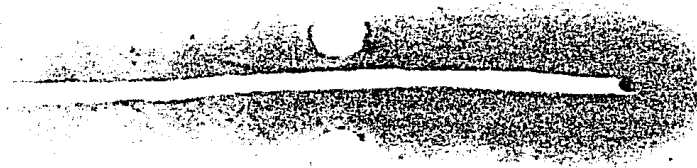
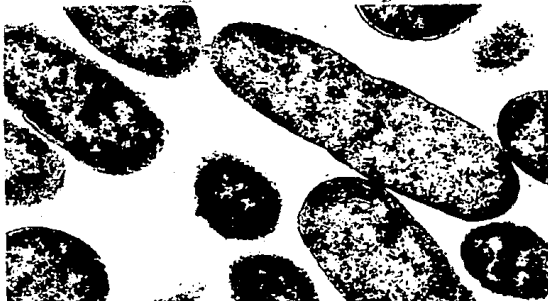


Fig. 6

Microscopía Electrónica del CFA/1



Aglutinación de las cepas con las IgG purificadas.

Para realizar esta parte del trabajo sólo se trabajó con -
aquellas cepas que presentaron HAMR para la sangre humana tipo A.

Dichas cepas se aglutinaron con las IgG purificadas y se -
obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA No. 6

No. cepa	TIPO A	BOVINO	AGLUTINACION CON ANTISUERO CFA/1	AGLUTINACION CON IgG
121	A	R	R	+
339	A	R	R	+
375	A	R	R	+
104	S	R	R	+
286	O	R	R	+
108	N	R	R	+
125	D	R	R	+
104	E	R	R	+
75	F	R	R	+
153	S	R	R	+
168	N	R	R	-
138	N	R	S	+
185	F	R	R	-
178	F	R	R	-
38	F	R	R	-
83	E	R	R	+
172	D	R	R	+
43	N	R	S	+
11	S	R	R	+
73	N	R	R	+
266	A	R	R	+
355	A	R	R	-
163	S	R	S	+
241	S	R	R	+
198	F	R	R	+
324	N	R	R	-
193	F	R	R	-
323	N	R	S	+
417	O	R	R	+
101	D	R	R	+
308	A	R	R	+
312	N	R	S	-
107	E	R	S	-
205	F	R	S	-
1	F	R	R	-

C A P I T U L O VI

DISCUSION

Las infecciones del tracto urinario en niños son frecuente y recurrentes. El agente más frecuentemente involucrado es Escherichia coli, la cuál se presenta con una frecuencia de 70 al 80% en tanto que K.pneumoniae lo hace con una frecuencia del 5 al 6% y ocasionalmente menos frecuente otras bacterias gram-ne gativas (14).

El presente trabajo a través de un muestreo de 6 meses y con el procesamiento de 2572 muestras de orina nos permitió corroborar lo antes ya referido ya que en nuestro estudio E.coli se presentó con una frecuencia del 66% en tanto que K.pneumoniae lo hizo con una frecuencia del 13.64% y Proteus y otras enterobacterias su frecuencia fue inferior al 2%.

La habilidad de E.coli para adherirse al tracto urinario, es reconocida como un requisito para que se pueda efectuar la colonización, que llevara posteriormente el cuadro clínico (14,69).

Esta adherencia ha podido ser demostrada in vitro por el empleo de células de vías urinarias, cavidad bucal y en cultivo de tejidos, permitiendo reconocer distintos patrones de adherencia en la que se encuentran involucradas diferentes adhesinas (3).

La hemaglutinación de eritrocitos de diferentes especies - con cepas de E.coli ha sido usada como una evidencia de la capacidad de adherencia de esta bacteria.

La hemaglutinación de diferentes tipos de eritrocitos por E.coli, ha sido ampliamente estudiada desde hace más de tres décadas (48).

Diversos estudios han hecho pensar en la existencia de más de un tipo de fimbria o adhesinas involucradas en el proceso de adherencia por una misma bacteria (48).

El presente trabajo, estuvo dirigido a la demostración de esta diversidad de adhesinas de E.coli aislada de vías urinarias, para lo cual se empleó la hemaglutinación e inhibición de la misma con el empleo de un manóside (48).

Como podemos observar en la tabla 2, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de HAMR y HAMS a los distintos tipos de eritrocitos empleados.

La HAMS cuya frecuencia fue de 26,53% para eritrocitos de origen humano tipo A y O hace pensar en la existencia de la fimbria tipo 1, también conocida como fimbria común, ya que este apéndice filamentosos, encontrado en una alta proporción en cepas

de E.coli y otras bacterias gram-negativas, es capaz de mediarla hemaglutinación de diversos tipos de eritrocitos y ser inhibida por manosa o bien por distintos oligosacáridos que contengan en su composición manosa (36).

Por otro lado, la existencia de reportes acerca de HAMR de eritrocitos de origen humano y bovino, los cuales refieren que aproximadamente el 50% de las cepas de E.coli de origen extraintestinal producen HAMR con eritrocitos de origen humano, cifra que se incrementa al 80% cuando se emplean cepas con ciertos serotipos del antígeno O (13).

En nuestro caso (tabla 3), la frecuencia de HAMR de eritrocitos de origen humano tipo A fue aproximadamente del 70% en tanto que para eritrocitos de origen bovino y de carnero la cifra se encontró ligeramente superior al 60%, lo cual concuerda con lo encontrado por otros autores como se mencionó anteriormente (13,48).

Sin embargo, cuando se trata de relacionar este tipo de HA con el factor de colonización CFA/1 que genera HAMR, los resultados son diferentes (13), ya que en el presente trabajo, aproximadamente del 60-70% de las cepas de E.coli estudiadas causaron HAMR para eritrocitos de origen humano A y O, así como de origen bovino y de carnero que de acuerdo con lo reportado

por Evans y col. la HAMR(+) de eritrocitos humanos tipo A y bovinos es indicativo de la presencia del CFA/1(24), evidencia que fue puesta de manifiesto en el presente trabajo al realizar la hemaglutinación con los eritrocitos antes referidos y el manósido correspondiente. Por lo tanto, podemos inferir, que en base a la hemaglutinación contamos con cepas portadoras de la fimbria o factor de colonización CFA/1 (tabla 2 y 4).

Con el fin de confirmar o descartar la presencia de CFA/1- en las cepas HAMR(+), se procedió a la obtención y purificación del antígeno por la técnica de Evans (23). Empleando la cromatografía de intercambio iónico y la cepa de E.coli H10407 portadora del factor de colonización CFA/1, cuya presencia fue confirmada por microscopía electrónica realizada por el Depto. de Histología de la Fac. de Medicina UNAM, Fig. 6.

La presencia de este factor de colonización se demostró a través de la hemaglutinación con partículas de látex con diferentes eritrocitos, Fig. 3 y el manósido correspondiente (23).

La purificación del antígeno, nos permitió la obtención del antisuero en conejos inmunizados, el cuál al ser probado en 48 cepas aglutinó a 28 de ellas. Por lo tanto, la habilidad para causar HAMR si se correlaciona con la presencia de CFA/1 en E.coli de origen extraintestinal a través del empleo del antisue

ro CFA-1.

Por otro lado las cepas que no reaccionaron con el antisuero CFA/1 se sometieron a aglutinación con el antisuero K88 - ab(78) no obteniéndose aglutinación alguna, por lo cuál podemos descartar la presencia de este tipo de adhesinas en las cepas estudiadas.

En vista de que diferentes autores han reportado la ausencia de aglutinación por cepas de E.coli de origen extraintestinal con antisuero CFA/1(13), procedimos a la precipitación y purificación de las IgG obtenidas de conejos inmunizados con la cepa en cuestión y por este procedimiento logramos corroborar la presencia de CFA/1 en 18 cepas de las 35 cepas de E.coli HAMR - (tabla 6).

En base a los estudios de Duguid y col (21), el cuál refiere la existencia de más de una fimbria en una sola bacteria involucradas en la hemaglutinación, a través de nuestros estudios encontramos la existencia de HAMR y HAMS simultáneamente en 9 cepas (tabla 4), lo cuál apoya nuestra idea.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

C A P I T U L O VII

CONCLUSIONES

1. Escherichia coli es el microorganismo más frecuentemente involucrado en infecciones de vías urinarias.
2. La capacidad de E.coli para poder generar infecciones urinarias se debe a su capacidad para adherirse a superficies de células eucariotes.
3. E.coli es capaz de aglutinar eritrocitos de distintos tipos.
4. La hemaglutinación puede ser inhibida por manosa.
5. La hemaglutinación puede ser resistente a la presencia de manosa.
6. E.coli puede ser simultáneamente portadora de más de un tipo de adhesinas.
7. E.coli obtenida a partir de urocultivos puede ser generadora de HAMR.
8. La HAMR sugiere la presencia de adhesinas diferentes a la fimbria tipo 1.

9. Se corroboró la presencia de CFA/1 con uso de antisuero.
10. Las IgG purificadas y obtenidas de animales sensibilizados - con el factor de colonización CFA/1 aglutinó 18 cepas de - E.coli HAMR.
11. Las cepas estudiadas no presenta la fimbria K88ab.

ANEXO

Medios de cultivo:

AGAR CFA

Casaaminoácidos.....	1%
Extracto de levadura.....	0.15%
Sulfato de magnesio.....	0.005%
Cloruro de manganeso.....	0.005%
Agar.....	2%
pH 7.4	

Medio de conservación:

Proteasa peptona.....	10g
Extracto de carne.....	10g
Agar	9g
pH 7.4	

Agar sangre

Extracto de músculo de corazón.....	10g/1
Triptosa.....	10g/1
Cloruro de sodio.....	5g/1
Agar-agar.....	15g/1
pH 6.8	

Agar Casoy

Peptona de casefna..... 17g/1
Peptona de harina soya... 3g/1
D-glucosa.....2.5g/1
NaCl..... 5g/1
Di-potasio-hidr6geno
fosfato.....2.5g/1
pH 7.3

Agar de soya tripticasefna

Peptona de carne..... 15g/1
Peptona de soya..... 5g
Cloruro de sodio..... 5g
Agar..... 15g
pH 7.3

Agar EMB

Peptona de gelatina..... 10g
Lactosa..... 5g
Sacarosa..... 5g
F6sfato dipot6sico..... 2g
Agar.....13.5g
Eosina..... 0.40g
Azul de metileno..... 0.65g
pH 7.2

Caldo Infusión Cerebro Corazón

Infusión de cerebro y ternera.....	200g
Infusión de corazón de res.....	250g
Mezcla de peptonas.....	10g
NaCl.....	5g
Fosfato dipotásico.....	2.5g
Dextrosa.....	2.0g
pH 7.4	

Agar MacConkey

Peptona de gelatina.....	17g
Mezcla de peptonas.....	3g
Lactosa.....	10g
Sales biliares.....	1.5g
NaCl.....	5g
Agar.....	13.5g
Rojo neutro.....	0.03g
Cristal violeta.....	0.001g
pH 7.1	

Agar tergitol

Proteasa peptona.....	5g
Extracto de carne.....	3g
Lactosa.....	10g

Agar..... 15g
Tergitol 7 0.1g
Azul de timol (brom)... 0.025g

Reactivos

Para purificación del CFA.

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.2
 - Na_2HPO_4 4.9693
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.9693afora a un litro con agua destilada
 - NaH_3 0.002%

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.2 con 1M de NaCl, es la anterior adicionada de 58,5g de la sal - mencionada.

- Solución amortiguadora de fosfatos-salina 0.01M, pH 7.2
 - Solución madre A 0.15M de Na_2HPO_4 21.3g/l
 - Solución madre B 0.15M de KH_2PO_4 20.4g/l
 - Solución madre C 0.15M de NaCl 8.5g/l
 - Sol. madre A..... 76 ml
 - Sol. madre B..... 24 ml
 - Sol. madre C.....100 ml

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.5M, pH 8.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 69g/l

Na_2HPO_4 71g/l

Para tinción de placa de IEF

- Negro de amido

Amido black. 1g

Acetato de sodio 4.1g

Acido acético. 30ml

Agua destilada. c.b.p.1000 ml

- Solución de lavado

Acido acético. 50ml

Glicerina. 5ml

Agua destilada c.b.p.1000 ml

B I B L I O G R A F I A

1. Ahren C.M., et al
Comparision of methods for detection of colonization factor antigens on enterotoxigenic E.coli.
Journal of Clinical Microbiology, 23(3), 586-591, (1986).

2. Ahren C.M., et al
Synergistics protective effect of antibodies against E.coli enterotoxin and colonization factor antigens.
Infection and Immunity, 38(1), 74-79, (1982).

3. Andrade Jasso Alma Yasmina
Infección de vías urinarias por Escherichia coli en niños.
Fac. de Ciencias UNAM, 1988.

4. Back E., et al
Enterotoxigenic E.coli and other gram-negative bacteria of infantile diarrhea; surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen and loss of enterotoxigenicity.
The Journal of Infection Diseases, 142 (3), 318-327, (1980).

5. Bailey Scott.
Diagnóstico Microbiológico
E. Medica Panamericana, 6a. edición, Argentina (1983).

6. Bartus Henry, et al
Indications that the erythrocyte receptor involved in enterotoxigenic E.coli attachment is a sialoglycoconjugate. Journal of Clinical Microbiology, 21(6), 951-954, (1985).

7. Blumenstock Erich, et al
Adhesion of piliated E.coli strains to phagocytes; differences between with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili. Infection and Immunity, 35(1), 264-269, (1982).

8. Bourchier D., et al
Radiological abnormalities in infants with urinary tract infections. Archives of Disease in Childhood, 59, 620-624, (1984).

9. Brinton C.C.
Non-flagellar appendages of bacteria. Nature, 183, 782-786, (1959).

10. Brinton C.C.
The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. Trans.N.Y.Acad.Sci., 27, 1003-1054, (1965).

11. Carpenter Charles C.J.
Mechanisms of bacterial diarrheas.
Am J. Med., 68, 313-316, (1980).

12. Costerton J.W.
El mecanismo de la adherencia en las bacterias.
Investigación y Ciencia, 18, 66-77, (1978).

13. Gravioto A., et al
Mannose-resistant hemagglutination of human erythrocytes
by stains of E.coli from extraintestinal sources; lack of
correlation with colonization factor antigen (CFA/1).
FEMS Microbiology Letters, 6,41-44, (1979).

14. Cunningham Robert J.
Urinary tract infection in infant and children.
Urinary Tract Infection, 75 (6), 59-64, (1984).

15. Chabanon Gerard, et al
Adhesion to human cell line by E.coli strains isolated
during urinary tract infections.
Journal of Clinical Microbiology, 10(4), 563-566, (1979).

16. Changechawalit Suchitra; et al.
Colonization factors associated with enterotoxigenic E.coli
Infection and Immunity, 45(2), 525-527, (1984).

17. Davis Dulbecco; et al
Tratado de microbiología
Salvat editores. 2a. edición 1978.

18. Dean Evelyn A; et al.
Purification and characterization of a receptor for the
987P pilus of E.coli.
Infection and Immunity, 42(1), 98-105, (1985).

19. Dighe Adrian M; et al.
General practice management childhood urinary infection.
Journal of the Royal College of General Practitioners, 34,
324-327, (1984).

20. Dougan Gordon; et al.
In vivo properties of a cloned K88 adherence antigen determi
nant.
Infection and Immunity, 52, 344-347, (1986).

21. Duguid J.P.; et al.

The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of E.coli
J.Med. Microbiology, 12, 213-227, (1978).

22. Evans Dolores G; et al.

Pasmid-controlled colonization factor associated with viru-
lence in E.coli enterotoxigenic for humans.
Infection and Immunity, 12(3), 656-667, (1975).

23. Evans Dolores G.; et al.

Purification and characterization of the CFA/I antigen of
enterotoxigenic E.coli.
Infection and Immunity, 25(2), 738-748. (1979).

24. Evans Doyle J. et al.

Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropatho-
genic, E.coli determined with human, bovine, chicken and
guinea pig erythrocytes in the presence and absence of manno-
se. Infection and Immunity, 23(2), 336-346, (1979).

25. Feutrier Josiane; et al.

Purification and characterization of fimbriae from Salmonella
enteritidis.
Journal of Bacteriology, 168(1), 221-227, (1986).

26. Francis David H., et al.
Production of K88, K99 and 987P antigens by E.coli cultured on synthetic and complex media.
Journal of Clinical Microbiology. 15(1), 181-183, (1982).

27. Freitag Cynthin S; et al.
Genetic analysis of the phase variation control of expression of type 1 fimbriae in Escherichia coli.

28. Gaastra Win, Graaf Frits.
Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic E.coli strains.
Microbiology Reviews. 46(2), 129-161, (1982).

29. Gangarosa Eugene J.
Epidemiology of E.coli in the United States.
The Journal of Infectious Diseases. 137(5), 634-638, (1978).

30. Giesa Frank; et al.
Isopycnic separation of E.coli cultures possessing colonization factor antigen 1.
Journal of Clinical Microbiology, 15(6), 1074-1076, (1982).

31. Gleckman Richard A.
Treatment duration for urinary tract infections in adults.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31(1), 1-5, (1987).

32. Hales Barbara A., Amyes S.C.B.

The transfer of genes encoding production of manose-resistant haenoglutinating fimbriae from uropathogenic enterobacteria. Journal of General Microbioly. 132, 2243-2247, (1986).

33. Hansom L.A.; et al.

Antigens of E.coli, human immune response, and the pathogenesis of urinary tract infections. The Journal of Infections Diseases., 136, 5144-5149, (1977).

34. Hudson L.

Practical Immunology.
Blacwell Scientific Publications, 2a. edition.

35. Hull S., et al.

Multiple forms of genes in pyelonefritigenic E.coli binding globoseries glycolipid receptors. Infection and Immunity, 47(1), 80-83, (1985).

36. Hultgren Scott J., et al.

Roles of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by E.coli. Infection and Immunity, 50(2), 370-377, (1985).

37. Isaacson Richard E., et al.
Pili of enterotoxigenic E.coli from pigs and calves.
Infection and Immunity, 29, 824-826, (1980).
38. Jawest Ernest.
Microbiología Médica.
Ed. El Manual Moderno, 11a. edición, 1983.
39. Jones Garth W.
Receptors and Recogniting.
Ed. J.L. Ressing Vol. 3, Serie B, pp. 139-168, London (1977).
40. Kabat Elvin A.
Inmunología Experimental.
Ed. La Prensa Médica Mexicana, 1986.
41. Kass Evan J.
Acute and Recurrent urinary tract infection in children.
Chief Pediatric Urology, 124, 607-619, (1984).
42. Klemm.
Fimbrial colonization factor CFA/1 protein from human
enteropathogenic E.coli strains.
FEBS Letters, 109(1), 107-110, (1979).

43. Kenneth B. Roberts, et. al.
Urinary tract infection in infants with unexplained fever;
a collaborative study.
The Journal of Pediatrics, 103(6), 864-867, (1983).
44. Keusch Gerald T.
The role of bacterial adherence in infection.
Infection and Immunity, 43(1), 368-379, (1984).
45. Grieg R. Noel; et al.
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
Vol. 1, ed Williams Wilkins, Baltimore/London, 1984.
46. Lennette Edwin H.
Manual of Clinical Microbiology.
American Society for Microbiology, 3a. edition, Washington
D.C. 1980.
47. Levine Myron; et al.
Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen
11-positive enterotoxigenic E.coli, morphology, purification,
and immune responses in humans. Infection and Immunity,
44(2), 409-420, (1984).

48. Lung A; et al.

Haemagglutination by E.coli septicemia and urinary tract infections.

Journal of Clinical Microbiology, 10(4), 447-481, (1979).

49. Lomberg Helena; et al.

Influence of blood group on the availability of receptors for attachment of uropathogenic Escherichia coli.

Infection and Immunity, 51(3), 919-926, (1986).

50. Manual de Instrucciones para Cromatografía de Intercambio Iónico.

DEAE/CH, TRISACRYL M (LKB).

51. Minshew B.H.; et al.

Association of hemolysin production, haemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal E.coli isolates.

Infection and Immunity, 20, 50-54, (1978).

52. Minsén, B.H.; et al.

Some characteristics of E.coli strains isolated from extraintestinal infections of humans. The Journal of Infectious Diseases, 137(5), 648-654, 1978.

53. Norgenhagen Stephan E.
Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion
American Society for Microbiology, 1985.
54. Neidhard Frederick C.
E.coli and S.thyphimurium cellular and molecular biology.
American Society for Microbiology, Vol. 1, (1987).
55. O'Brien Alision, Natard Janes.
New concepts in the pathogenesis of enteropathogenic E.coli
diarrhea.
Pathogenesis, of E.coli.
56. Ougra Pearay J., et al.
Urinary tract infections in children; an update
The Journal of Pediatrics, 106(6), 1023-1029, (1985).
57. Orskov I. and Orskov F.
Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic E.coli strains
from diarrhea in adults and children.
Med. Microbiol. Immunol., 163, 99-110, (1977).
58. Oudega Bauke, et al.
Excretion of proteins by gram negative bacteria; exports of
bacteriocina and fimbrial proteins by E.coli.
Antonie van Leeuwenhoek, 50, 569-584, (1984).

59. Rhen Mikael, et al.

Fimbriation and P antigen of E.coli strains harbouring mutated recombination plasmid encoding fimbrial adhesins of uropathogenic E.coli strains KS71.

Journal of General Microbiology, 132, 77-77, (1986).

60. Rutter P.R. and B.Vincent.

The adhesion of micro-organisms to surfaces physico-chemical aspects.

Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B.Vincent (ed), Microbial adhesion to surfaces.

Ellis Horwood Ltd., Chichester England, 1980.

61. Sensonetti P., et al.

Genetics of virulence in enteroinvasive E.coli

Pathogenesis of E.coli diarrhea, 74-77, (1982).

62. Saucedo Pérez Ana María.

Características de cepas adherentes de E.coli aisladas de niños con diarrea con y sin cuadros diarreicos.

Fac. Química, UNAM, 1988.

63. Satterwhitw T.K. and H.L. Dupont.

The patients with acute diarrheae.

Lancet 22, 181-184, (1978).

64. Scaletsky Isabel C.A., et al.
Correlation between adherence to Hela cells and serogroups, serotypes, and serotypes and bioserotypes of E.coli.
Infection and Immunity, 49(3), 528-532, (1985).
65. Sedlock Davis M, et al.
Use of a hemadsorption technique to evaluate the stability of the hemagglutinations reaction of E.coli cultures possessing human colonization factor antigens.
Journal of Clinical Microbiology, 15(4), 554-557, (1982).
66. Sharon Nathan.
Lectinas
Investigación y Ciencia. Núm. 11, 90-100, (1977).
67. Sherman P.P., et al.
Functional heterogeneity of intestinal E.coli strains type 1 sometic pili (fimbriae); assessment of bacterial adherence to intestinal membranes and surface hydrophobicity.
Infection and Immunity 49(3), 797-804, (1985).
68. Smyth C.J. P. Jonsson.
Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic E.coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography.
Infection and Immunity, 22, 462-472, (1978).

69. Sobel Jack D.
New aspects of pathogenesis of lower urinary tract infections.
Supplements of pathogenesis of lower urinary tract infections.
Supplement to Urology, 26(5), 11-15, (1985).
70. Sociedad Chilena de Pediatría.
Infección Urinaria.
Normas de Pediatría.
Ed. Científica, 2a. edición.
71. Soman Abraham N., et al.
Antiadhesive properties of a quaternary structure-specific
hybridoma antibody type 1 fimbriae of E.coli, J. Exp. Med.
158, 1114-1128, (1983).
72. Svanborgh Eden, Hansson H.A.
Escherichia coli pili as possible mediators of attachment to
human urinary tract epithelial cells.
Infection and Immunity, 21(10), 229-237, (1978).
73. Svanborgh Eden, et al.
Influence of adhesins on the interaction of E.coli with human
phagocytes.
Infection and Immunity, 44(3), 672-680, (1984).

74. Svanborgh Eden, et al.

Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells of E.coli strains: associated with various forms of urinary tract Infection.

Lancet 2,490-492, (1976).

75. Volk Benjamín and Kadner Person.

Microbiología Médica.

Ed. Interamericana McGraw-Hill, 3a. edición, 1986.

76. Welch Rodney A.

Characterization of E.coli hemolysins conferring quantitative differences in virulence.

Infection and Immunity, 43(1), 156-160, (1984).

77. Williams Peter H, et al.

Characterization of nonfimbrial mannose-resistant protein hemagglutinins of two E.coli strains isolated from infants with enteritis.

Infection and Immunity, 44(3), 592-598, (1984).

78. Pedroza Vargas Ma. del Refugio.

Aislamiento y Purificación de un factor de Adherencia K88 de Escherichia coli enterotoxigénica y su posible neutralización, TESIS EN PROCESO. Fac. de Química, UNAM.