



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ACTUALIZACIÓN EN BACTERIOLOGÍA MÉDICA

TESINA TEÓRICA

RECOPILOCIÓN BIBLIOGRÁFICA DE

Escherichia coli

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MÓNICA AGRIPINA GONZÁLEZ CASTRO

J50699

QUERÉTARO, QRO., JUNIO DE 1992



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ACTUALIZACIÓN EN BACTERIOLOGÍA MÉDICA

TESINA TEÓRICA

RECOPILACIÓN BIBLIOGRÁFICA DE

Escherichia coli

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

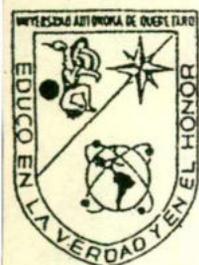
QUÍMICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MÓNICA AGRIPINA GONZÁLEZ CASTRO

J50699

QUERÉTARO, QRO, JUNIO DE 1992



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ACTUALIZACIÓN EN BACTERIOLOGÍA MÉDICA

TESINA TEÓRICA

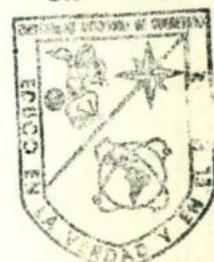
**RECOPILOCIÓN BIBLIOGRÁFICA DE
*Escherichia coli***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE FACULTAD DE
QUÍMICA**

QUÍMICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MONICA AGRIPINA GONZALEZ CASTRO



BIBLIOTECA

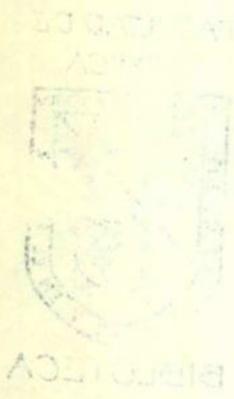
QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 1992.

No. Adq. 150699

No. Titulo _____

Clas. TS 616.01

66439



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

----- *** -----

*Al ser más maravilloso que es Dios,
por permitirme vivir y ver realizadas
una de mis metas.*

*A mis padres, por darme la vida, por su
ejemplo, cariño, comprensión, confianza,
apoyo, y su espera por este momento.*

*A mis hermanos y cuñadas, por su cariño
y por compartir momentos tan especiales
como este.*

*A mis amigas y amigos, por su cariño y
por estar en los momentos que más los he
necesitado.*

*A la maestra Magaly por su afecto,
consejos y palabras de aliento.*

Al maestro Sergio, a la maestra Marielena
y la maestra Angeles, por su apoyo, su
tiempo para leer estas lineas y por
aguantar todas las molestias que les cause.

Y a todas las demás personas que me ayudaron
para realizar esto que aunque no las nombro,
porque si no, no acabo, gracias. Y en especial a
otras personas que siempre estan en mi recuerdo.

A TODOS GRACIAS!

INDICE

I N D I C E

I. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	1.
II. OBJETIVO.....	13.
III. GENERALIDADES.....	14.
IV. TAXONOMIA.....	30.
V. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	35.
A. Estructura.....	36.
A.1) Pared Célular.....	36.
A.2) Ribosomas.....	40.
A.3) Antígenos.....	44.
A.4) Adhesinas.....	46.
A.5) Flagelos.....	48.
A.6) Pilis.....	50.
A.7) Plásmidos.....	55.
A.8) Cápsula.....	57.
B. TOXINAS.....	57.
B.1) Enterotoxinas.....	58.
B.1.1) Toxina termolábil (LT).....	59.
B.1.2) Toxina termoestable (ST).....	72.
B.2) Endotoxinas.....	79.
B.3) Hemolisina.....	84.
B.4) Aerobactina.....	85.
C. NUTRICION Y METABOLISMO.....	86.
VI. PROPIEDADES FÍSICAS.....	89.
A. Temperatura.....	90.
B. pH.....	96.
C. Radiación U.V.....	98.
D. Detergentes.....	100.

E. Agentes quelantes.....	100.
F. Cinética.....	100.
VII. PROPIEDADES QUIMICAS.....	102.
A. Mercuriales.....	103.
B. Concentración de NaCl.....	104.
C. Halógenos.....	105.
D. Péroxido de Hidrógeno.....	105.
E. Colorantes.....	106.
F. Antibacterianos.....	107.
G. Otros agentes.....	113.
VIII. PROPIEDADES MICROSCOPICAS.....	116.
IX. PROPIEDADES DE CULTIVO.....	117.
X. PROPIEDADES MACROSCOPICAS.....	119.
XI. PATOGENIA.....	123.
A. Patogenia General.....	124.
A.1) Infección de vías urinarias.....	124.
A.2) Gastroenteritis.....	125.
A.3) Bacteremia.....	126.
A.4) Infecciones Biliares y peritoneales.....	127.
A.5) Infección neonatal.....	128.
A.6) Septicemia del recién nacido.....	128.
A.7) Otras manifestaciones.....	128.
B. Patogenia por subespecies.....	130.
B.1) <i>E. coli</i> causante de infecciones extraintestinales.....	130.
B.2) Colonización.....	131.
XII. TRATAMIENTO GENERAL.....	135.
XIII. DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO.....	138.
A. Recomendaciones para la toma de muestra y toma de muestra.....	139.
A.1) Sangre.....	143.

A.2)Líquido cefalorraquídeo.....	145.
A.3)Exudado faríngeo.....	148.
A.4)Esputo.....	149.
A.5)Orina.....	152.
A.6)Héridas, abscesos por mordedura e infecciones.....	156.
A.7)Tracto genital.....	157.
A.8)Oído, mastoides y senos paranasales.....	159.
A.9)Ojo.....	161.
A.10)Heces.....	162.
A.11)Contenido duodenal.....	164.
B.Transporte y medios de transporte.....	165.
C.Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	173.
D.Pruebas de identificación.....	179.
D.1)Pruebas para la identificación de <i>E. coli</i>	180.
D.1.1)Reacción de Kligler.....	180.
D.1.2)Prueba de Indol.....	182.
D.1.3)Prueba de utilización de citrato.....	182.
D.1.4)Prueba de formación de H ₂ S.....	184.
D.1.5)Prueba de la detección de ureasa.....	185.
D.1.6)Prueba de movilidad.....	186.
D.1.7)Prueba de rojo de metilo.....	187.
D.1.8)Prueba de Voges-Proskauer.....	188.
E. Pruebas confirmatorias.....	192.
E.1)Pruebas Serológicas y biológicas, mas comunmente usadas en la identificación de <i>E. coli</i> como especie y sus subespecies.....	192.
E.1.1)Serotipificación.....	192.
E.1.2)ELISA.....	193.
E.1.3)Anticuerpo fluorescente.....	193.
E.1.4)RIA.....	194.

E.1.5)Coagulación.....	194.
E.1.6)Detección de toxina LT y ST.....	194.
E.1.7)Prueba de Sereny.....	196.
E.1.8)Hibridización del DNA.....	197.
E.1.9)Hemaglutinación manosa resistente y manosa sensible...	197.
E.1.10)Adherencia a células Hep-2.....	197.
XIV.SUBESPECIES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	199.
A. <i>E. coli enterotoxigénica</i> (ETEC).....	200.
B. <i>E. coli enteropatógena</i> (EPEC).....	222.
C. <i>E. coli enterohemorrágica</i> (EHEC).....	243.
D. <i>E. coli enteroadherente</i> (EAEC).....	262.
E. <i>E. coli enteroinvasiva</i> (EIEC).....	269.
APENDICE I.....	279.
*Medios de cultivo.....	279.
*Medios de transporte.....	295.
APENDICE II.....	298.
*Tinciones.....	298.
*Reactivos.....	300.
BIBLIOGRAFIA.....	304.

**ANTECEDENTES
HISTORICOS**



THEODOR ESCHERICH

1857 1911

I-ANTECEDENTES HISTORICOS

El médico Norteamericano Benjamin Rush (1789) aportó los primeros datos clínicos sobre las diarreas, señalando las variables características presentes durante la enfermedad, describiendo acerca de la diarrea pediátrica que: "Prevalece en la mayoría de los pueblos grandes de los Estados Unidos; en donde la tasa y frecuencia están en relación con el calor, temperatura ambiental y estación del año. Se inicia a veces con diarrea, la cual continúa durante muchos días sin manifestar ningún otro síntoma de indisposición, pero con más frecuencia se acompaña de vómito violento y efecto purgante, además de fiebre alta".(88).

Rush le llamó "*còlera infantum*" y rechazó la idea de que esta diarrea fuera causada por la dentición como se creía; así por algún tiempo esta enfermedad fue llamada también: *Enfermedad de Rush*. (88).

Escherichia coli fue descrita por primera vez en el año de 1885, por el Pediatra Alemán Theodore Escherich (en honor del cual lleva su nombre), encontrándola durante sus investigaciones sobre la composición de la flora bacteriana normal del niño recién nacido (82), a la cual le llamó *Bacterium coli commune*. (88).

E. coli es el nombre que se acepta en la actualidad para designar al bacilo coliforme común originalmente llamado *Bacillus coli commune*, por Escherich 1885, *Bacillus coli* por Migula 1895 y *Bacterium coli* por Lehmann en 1896.(46).

Escherich demostró la patogenicidad de *Escherichia coli* en conejos, pero él conservó algunas reservas acerca de la patogenicidad de ésta en humanos. En 1985, marcó el primer centenario de su primera descripción y en todo ese tiempo se ha estudiado extensamente.(88).

De Viena Escherich regresó a Munich (1885), donde Frobenius, un alumno de Robert Koch, le mostró las técnicas relativamente nuevas, para la identificación de bacterias en cultivos puros. Con este conocimiento Escherich concibió el plan de clarificar la significación de bacterias en la fisiología y patología de la digestión de lactantes. Como primer paso el mostró que la leche humana es normalmente estéril, pero que los cocos piógenos pudieran estar presentes en ciertas condiciones patógenas,(1885).(95).

Después de esto, siguió con una serie de estudios de la bacteriología de heces en lactantes, en el curso del cual *Bacterium coli commune* (ahora *Escherichia coli*) y *Bacterium lactis aerogenes* (ahora *Klebsiella pneumoniae*) fueron descubiertas y sus propiedades fueron descritas, incluyendo la composición del gas producido cuando estos microorganismos fermentar carbohidratos y la observación de que bajo condiciones

aerobias su crecimiento es estrictamente dependiente de la fermentación de carbohidratos. (95).

Hay evidencia de que en este año, Escherich aisló repetidamente bacilos disentéricos en cultivos puros que podía haber pasado por alto, afortunadamente no fue así, y al describir estos organismos, nos proporcionó una información tan importante, gracias a la cual tenemos conocimiento actual de lo que ahora llamamos *Shiga* (1898). (95).

En 1889, se demostró que la diarrea era una entidad clínica con un probable origen infeccioso, y asociada al clima cálido, lo que condujo a llamarla: "*enfermedad del verano*", "*enfermedad de la estación*" o bien "*diarrea del verano*". (102).

Muchos autores atribuyeron el descubrimiento de *Escherichia coli* *diarrogénica* a Bray, no obstante que la patogenicidad intestinal fue sugerida primeramente por Laurelle en 1889 y éste argumentó que *Escherichia coli* podría causar peritonitis si se liberaba a la cavidad peritoneal. (102).

Escherichia coli había sido aislada de las heces de lactantes normalmente, aunque se le vio por primera vez, como no patógeno. Escherich en 1894 mostró que estaba presente en la orina de las jovencitas que sufrían infecciones del tracto urinario y sugirió que alcanzaba la vejiga por ruta ascendente. (95).

En 1897, Lesage sugirió que había clases de *Escherichia coli* armadas y desarmadas y que podían ser diferenciadas en bases serológicas, ya que observó que el suero de un paciente convaleciente aglutinaba con bacterias obtenidas de pacientes durante una epidemia, cosa contraria ocurría con bacterias obtenidas de niños sanos. (88).

En estos tiempos se suponía que la "diarrea del verano", llamada así en 1889, era de naturaleza infecciosa; sin embargo, diversas investigaciones bacteriológicas realizadas en muchas partes del mundo, sugirieron que una gran variedad de agentes pudieran estar involucrados incluyendo: *Enterococos*, *Salmonellas*, *Shigellas*, y/o especies de *Proteus*.(88).

El papel de este organismo como patógeno ha surgido de una forma lenta y controvertida, ya que hasta la fecha hay incertidumbre del mecanismo de patogenicidad que evidencia ciertas cepas de *E. coli* que se saben son patógenas para el hombre.(7).

A esto siguió un etapa durante la cual se realizaron investigaciones encaminadas a probar la relación el colibacilo con las diarreas infantiles. Los trabajos de la escuela francesa sobre el tema son notables, cabe destacar los trabajos por Lesage (1897) y de Nobecuort (1899), quienes sostenían el papel patógeno de este microorganismos en este tipo de padecimientos.(88).

Escherich y sus col., observaron la frecuencia de aislamiento de *E. coli* en la orina de mujeres jóvenes y fueron los primeros en reconocer su significación en la infección del tracto urinario (1898).(95).

Escherich en 1899, consideró que *E. coli* era la causa de disentería, pero se piensa que Von Pirquet (1910-1911) descartó esta aseveración años después.(95).

En la Gran Bretaña entre 1900 y 1910, algunos estudios mostraron que la "diarrea del verano" era particularmente prevalente en los primeros dos años de vida, sobre todo a la edad del destete (de aquí el nombre con el que también es conocida como "diarrea del destete". En estos estudios se observó que existía una gran influencia en esta enfermedad por el bajo nivel socioeconómico y mala alimentación y observándose también que los niños alimentados con el pecho eran protegidos contra esta enfermedad. (88).

En 1904 Eijkman, Barh en 1908 y 1910, investigó una población de niños con diarrea y concluyó que *Escherichia coli* jugaba un papel en esta enfermedad. (88).

Eijkman (1904), propuso pruebas rápidas para identificación de *E. coli* en el agua (contaminación por heces), estas consistían principalmente en poner el agua a temperaturas elevadas y observar sus propiedades bioquímicas (gas, indol, lactosa, etc.) y así poder diferenciar a este organismos de otras

bacterias coliformes, pero Edwards y Ewing en 1962 propone realizar más pruebas bioquímicas, las cuales son impracticables en el laboratorio de rutina.(16).

Entre los años de 1920-1935, la mortalidad por diarrea había disminuido drásticamente en forma constante. Nueva York tuvo casos de 45.5 por 1000 en 1872 y decreció a 5 por 1000 en 1920; este mismo fenómeno ocurrió en el Reino Unido, en el cual de 1.7 por 1000 en 1893 bajo a 0.08 por 1000 en 1937; las condiciones características de la enfermedad también cambiaron para lo cual Smellie en 1939, escribió: *"Este tipo de enfermedad con su incidencia estacional característica de brotes explosivos y gran infectividad, es en estos días una rareza y ahora estamos frente a una enfermedad de etiología mixta y que además, se presenta todo el año y se mantiene en verano e invierno por igual"*. (88).

Topley y Wilson (1920-1935), citado en (1), observaron que la enfermedad que produce el cuadro clínico de diarrea, acompañado de vómito y colapso, no podía estar causado por una gran variedad de entidades bacterianas y ellos propusieron: *"Dicha enfermedad está causada por un agente, el cual hasta la fecha no conocemos"*.(88).

Durante los 20s en Alemania, Adam y col. (1923), realizaron investigaciones bacteriológicas de diarrea infantil y siguiendo el curso de la infección identificaron bioquímicamente a un microorganismo con un grupo distinto de *Escherichia coli*, el

cual produjo diarrea. (88). En los 30s Goldsmchmidt, amplió el trabajo de Adam para demostrar que "*dyspepsiekoli*", podía ser identificada serológicamente.(88).

A pesar de las decrecientes tasas de mortalidad infantil a causa de la diarrea pediátrica, el interés en ésta se reanudó en los años de 1930-1940 a causa de los numerosos brotes de enteritis nosocomial neonatal que produjeron un alta mortalidad. (88).

Dulaney y Michelson en 1935, descubrieron un brote de gastroenteritis severa en el Hospital General de Memphis, de donde aislaron una variante colonial específica de *Escherichia coli* llamada *Bacterium coli mutabile*, la cual era antigénicamente homogénea y estaba significativamente asociada con diarrea. (88).

En los primeros decenios de este siglo, antes de que se dispusiera de antimicrobianos, las bacterias gram positivas eran evidentemente los agentes causales predominantes en la septicemia neonatal. En 1940 y 1950 se culparon a los germenés gramnegativos, sobre todo a *E. coli*, en los casos de septicemia neonatal.(50).

La diarrea en niños en edad temprana provoca una gran morbilidad y mortalidad; aunque hoy en día este es un problema de países en desarrollo, se acepta que su distribución es mundial, observándose brotes de diarrea infantil en Inglaterra

desde mediados del siglo XVIII, durante la revolución Industrial y la urbanización. (7)(88). Por lo que durante los años de 1945-1951 diversos investigadores en Inglaterra, aislaron algunas cepas de *E. coli* a partir de brotes de diarreas infantiles.(82).

Crowley y col. (1941), notaron que la enteritis nosocomial que desde un punto de vista bacteriológico, los diversos hallazgos que han sido registrados en esta enfermedad son curiosamente reminiscentes a los de la diarrea del verano infantil. A esta profética observación precedieron cuatro años hasta la descripción de Bray de *Escherichia coli* como una causa tanto de la diarrea del verano como nosocomial.(88).

Los hallazgos de Bray y Varela fueron confirmados por otros investigadores en otros centros. Giles y col. en 1949, describieron un brote de diarrea ocurrido en Aberdeen, Escocia en 1947, que había involucrado 207 niños; 196 (96%) habían presentado una cepa de *E. coli* designada como tipo "alfa", en contraste con solamente 6 (4%) de 151 pacientes con diarrea atribuible probablemente a otras causas que presentaron además esta cepa. Durante la última etapa del brote *E. coli* tipo "alfa" se recuperó con menos frecuencia y fue remplazada por la cepa llamada "beta". Taylor en 1949 aisló la cepa de *E. coli* D-433 de brotes institucionales ocurridos en Londres. (88).

La evidencia acumulada dio lugar a la aceptación de *E. coli* como causante de diarrea en humanos hasta 1945, cuando John Bray publicó un artículo sobre la asociación de *E. coli*

antigénicamente homogénea con la "*diarrea del verano*". Al mismo tiempo a Bray (1945) en Inglaterra y en México Varela y col. demostraron la patogenicidad de *E. coli* O-111:B4, por el aislamiento de ésta en brotes de diarrea infantil, que además presentaban una serología peculiar que permitía diferenciarlos de las cepas de *E. coli* de la flora normal.(73).

E. coli-Gómez y *E. coli-neapolitanum* fue aislada de las heces fecales y del pus del oído de un niño de dos meses, que murió de enteritis aguda, en 1946. Estos mismos investigadores encontraron el mismo serotipo de *E. coli* en un brote de diarrea que atacó cinco niños en el Hospital Infantil de la cd. de México y a una mujer que trabaja en la cocina del Hospital.(7)(82).

Bray la describió como *Escherichia coli neapolitanum*, por su capacidad de fermentar rápidamente la sacarosa y salicina, y lentamente la maltosa. Varela y col. la describieron como *Escherichia coli-Gómez* en honor de quien ocupaba el puesto de Director del Hospital Infantil de México.(73).

La naturaleza epidémica, distribución mundial y alta mortalidad, asociada a los brotes de diarrea en guarderías entre 1930 y 1949, estaban caracterizados por la ausencia de una etiología definible. (88).

El esquema de tipificación serológica descrita por Kauffmann y Dupont en 1947, permitió que *E. coli neapolitanum*, *E. coli tipo*

"alfa", *E. coli*-Gómez pertenecían al mismo serogrupo designado como *Escherihia coli* 0111 B4 y *Escherichia coli* 055 B5 pertenecía a *E. coli* "beta".(7); sin embargo la patogénesis de estos estaba pobremente entendida, debido a la incapacidad para producir la enfermedad humana en animales de experimentación.(82).

Thompson en 1955 fue, al parecer, el primero en reconocer las semejanzas entre *Vibrio cholerae* y *E. coli enteropátogena* causante de enfermedad en niños. En ambas condiciones el organismo se encontró en gran número en el intestino delgado y, a diferencia de la shigellosis, no había invasión del tejido. Esta situación era sugestiva de la participación de una enterotoxina.(82).

A finales de 1960 Sack y Gorbach en Calcuta, demostraron la similaridad clínica y la patofisiología de la diarrea debida a *E. coli* y *V. cholerae*.(82).

En 1961-1966, Taylor dice que la *E. coli* como otras enterobacterias, está subdividida en numerosos serotipos, algunos de los cuales parecen causar infecciones en el hombre y están principalmente asociados con la gastroenteritis de los niños. (13).

En 1969, estudios realizados en Londres, se demostró que más de un 50% de individuos sanos eran portadores de bacilos entéricos que contenían el factor R (el cual es una resistencia medicamentosa múltiple mediante un plásmido portador

de los genes que determinan la resistencia) y que en muchos casos, estas cepas constituían la mayor parte de las *E. coli*. (21).

En 1970 Rowe demostró que *E. coli* enterotoxigénica puede ser una causa importante de enfermedad diarreica en el adulto, al examinar y estudiar una epidemia de diarrea en soldados británicos acantonados en Aden encontró un solo serotipo de *E. coli* que fue identificado como O148. (82).

En el area veterinaria y en la investigación del cólera se obtuvieron resultados que condujeron al descubrimiento de dos enterotoxinas producidas por *E. coli*: *toxina termolábil (TTL)* y *toxina termo-estable (TTE)*; en ambas la producción era controlada por un plásmido. (82).

Jaks (1973) señala que la enterotoxina termolábil de *E. coli* tiene un peso molecular de 5×10^6 y que es inseparable de la endotoxina, y postula que la actividad reside en una proteína del complejo endotóxina carbohidrato-lípido-proteína. Lariviere también propuso que la actividad de la toxina termolábil, estaba asociada con fracciones de alto peso molecular. (82).

Explicaciones recientes de la familia Enterobacteriaceae, son dadas por Gross y Holmes (1983), sobre la tipicación de la *E. coli*. Poco se sabe sobre los factores que pudieran promover la colonización intestinal pero Hanson y col.

en 1983, han encontrado una variedad de adhesinas incluyendo fimbrias P y X, MS en aislados fecales y orales de recién nacidos. (95).

El papel de este organismo como patógeno ha surgido de una forma controvertida, ya que hasta la fecha hay incertidumbre del mecanismo de patogenicidad que evidencian ciertas cepas de *E. coli* que se saben son patógenas para el hombre. (7).

Escherichia coli es el microorganismo que más se ha estudiado en los últimos 100 años, hasta ahora es la forma de vida libre más estudiada, sin embargo, todavía reserva ciertas incógnitas que provocan que no se conozcan en su totalidad algunos de sus mecanismos de patogenicidad. (7).

OBJETTIVO

II- O B J E T I V O

Esta revisión tiene como objetivo general examinar trabajos publicados acerca de los mecanismos de patogenicidad de *Escherichia coli* productora de diarrea. La intención inicial es la de conjuntar la información y relacionar los antecedentes, modelos experimentales realizados hasta la fecha, para obtener un panorama general sobre patogénesis, establecer y dirigir los conocimientos alcanzados por diferentes investigadores y así dejar abiertos los criterios y caminos que faltan por explorar para aclarar los mecanismos de patogenicidad involucrados en la producción de ciertas enfermedades en el hombre.

GENERALIDADES

III-G E N E R A L I D A D E S

Hasta hace muchos años, no era posible aislar un agente etiológico específico de la mayoría de los pacientes con diarrea aguda. Sin embargo hasta 1885, gracias al pediatra Theodore Escherich, estudiando la flora bacteriana normal del niño recién nacido, fue que descubrió la *Escherichia coli* como el organismo aerobio más común que se encuentra en el tubo digestivo del hombre.(82), desde entonces se han realizado una serie de estudios e investigaciones acerca de sus mecanismos de patogenicidad y a la vez se ha tenido que implementar medidas profilácticas para prevenir la infección. (50).

Durante los últimos años se han informado en la literatura médica, varias publicaciones sobre nuevos agentes etiológicos productores de diarrea, al igual que sobre algunos de los mecanismos de patogenicidad involucrados en la patogenia de la enfermedad en humanos y animales. (50).

La participación de *E. coli* en las diarreas se sospechó desde el siglo pasado porque este microorganismo se encontró tanto en heces normales como en diarreicas y a tenido gran interés el establecer el papel que esta bacteria representa en el desarrollo del síndrome diarreico. Los investigadores de modo firme y absoluto, habían dedicado la mayor parte de su trabajo a tratar de llevar adelante algún concepto o doctrina que pudiera cooperar a dilucidar su verdadero papel. (82).

Sin embargo, durante el último decenio y debido principalmente al reconocimiento de *Escherichia coli enterotoxigenica* como la causa principal de la enfermedad diarreica aguda en los adultos y la identificación de rotavirus como causa frecuente en niños pequeños, se han aislado agentes etiológicos de 80 a 85% de pacientes con enfermedades diarreicas agudas. (39).

Escherichia coli se considera causa de diarrea bacteriana en niños menores de tres años. En niños recién nacidos con diarrea, la etiología es viral y se atribuye como ya dijimos a rotavirus; sin embargo, su asociación con Enterobacterias y específicamente con *Escherichia coli* enteropatógena parece ser más común. (50)(35).

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por una gran diversidad de microorganismos que varían en sus propiedades bioquímicas y en su estructura antigénica. (53).

Los microorganismos presentes en dicha familia se encuentran en el intestino de humanos y de animales, en el suelo, sobre plantas, en el agua, etc., muchas especies son parasitas, algunas son saprófitas, algunas son patógenas para el hombre, produciendo una gran variedad de enfermedades infecciosas entéricas, septicemia y otras. (53). Las enterobacterias son componente importante de la flora intestinal humana normal, pero son relativamente infrecuentes en la flora normal de otros sitios del microorganismo. (53).

sintéticos en presencia de glicerol o glucosa como la (88)(19) única fuente de carbono y energía (agar Mac Conkey , EMB)(29) y la temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en un límite bastante amplio de temperatura ; y el pH favorable es de 7.0 (50) .Son quimiorganotróficos y algunas cepas producen hemolisinas. (21)(19).

Es relativamente resistente, permanece vivo durante algún tiempo fuera del organismo humano, en especial en condiciones húmedas y en aguas contaminadas de materia fecal. Es destruida por el calor a 60°C durante una hora, los antisépticos comunes la destruyen con relativa facilidad. (19).

Escherichia coli es la especie predominante de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo y se eliminan por las heces al exterior. Por esto, no es raro encontrarlas en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el suelo, agua o algún otro lugar, donde se postula que se deriva de su " *habitat primario*" y usualmente se describe como "contaminación fecal ", por lo que las pruebas encaminadas a detectar su presencia son ampliamente utilizadas en los laboratorios de salud pública. (16)(84).

La familia *Enterobacteriaceae*, comprende varias tribus, como la tribu *Escherichieae*, y el género *Escherichia*. Por muchos años, *Escherichia coli*, fue la única especie de este género, pero actualmente se reconocen tres nuevas especies, aisladas en seres humanos: *E. hermannii*, *E. fergusonii* y *E. vulneris*, pero aun no se ha comprobado su patogenicidad. Estas especies son poco comunes, mientras que *E. coli* se encuentra naturalmente en las heces y en determinados casos puede causar enfermedades.(19), por lo que en este trabajo nos enfocaremos a su estudios principalmente.(19).

Escherichia coli, como ya mencionamos es de la familia de las *Enterobacteriaceae*, de la tribu *Escherichieae*, del género *Escherichia* y la especie que estudiaremos que es la *Escherichia coli*.(19).

Características generales: Es un bacilo gram negativo, de 1 a 3 micrometros X 0.5 micrometros, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados: en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forman esporas, generalmente no capsulados, en cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en cultivos viejos se presentan en formas de una dimensión mayor, en agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm, convexas, o con borde continuo o ligeramente ondulado, brillantes de color blanco o ligeramente amarillentos.(19). *E. coli* es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa, crece bien en los medios de cultivo de laboratorio simples (caldo simple) y medios

En la tabla No. 1, se encuentran resumidas las características bioquímicas de *Escherichia coli*:

TABLA No. 1

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *Escherichia coli*

Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Catalasa	+
DNasa	-
Oxidasa	-
Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Lisina	
Motilidad	V
Ornitina	V
Utilización del Citrato	-
Ureasa	-
Reducción de nitrato	+
ONPG	+
Crecimiento de KCN	-
Fermentación	Mezcla de ácidos
Gas de glucosa	+
ACIDO DE:	
Arabinosa~	+
Lactosa~	+
Maltosa~	+
Manitol~	+
Sorbitol~	V
Trehalosa~	+
Adonitol	V
Inositol	-
Dulcitol°	V
Esculina°	V
Salicina°	V
Sacarosa°	V
Xilosa°	+

% Moles en G + C 50 - 51

~ Puede ser tardío

° Variable para diferentes cepas

Tomado de Sussmán M. 1985. *Escherichia coli* in Human and Animal Disease. ed: M. Sussman. Academic Press. y basado en el Lenette 1989. (53).

Su diagnóstico en el laboratorio se basa en el aislamiento del agente en las heces (coprocultivo) o de otro material patológico. Se conocen una serie de medios selectivos y diferenciales para realizar la siembra del material a estudiar.(19).

Una vez aislada la colonia se estudia morfológicamente y se procede a la identificación mediante pruebas bioquímicas y de constitución antigénicas (identificación serológica), y en los casos que ameriten se realizan pruebas biológicas, estas últimas permiten una identificación exacta del tipo. (19).

No se puede diferenciar a *E. coli* de la mayoría de las bacterias gramnegativas con la tinción de Gram, siendo necesario el cultivo y la adecuada caracterización bioquímica para identificar con precisión el microorganismo. La identificación serológica de *E. coli* puede ser útil en el paciente individual con la infección recurrente del aparato urinario, a fin de ayudar a diferenciar entre recaída y reinfección. (39).

El diagnóstico de laboratorio de diarrea por *E. coli*, plantea un problema particular debido a la capacidad de este microorganismo de causar enfermedad por varios mecanismos diferentes. La detección de la mayoría de las cepas patógenas de *E. coli* requiere métodos para la investigación de toxinas, los cuales se basan en el empleo de animales o cultivo de células, técnicas inmunológicas y de hibridación de DNA.(53).(84).

Otras formas de identificación de *E. coli*, se basan en técnicas inmunológicas promisoras incluyendo ensayos enzimáticos con inmunoabsorbentes (ELISA) y métodos de aglutinación de partículas, inmunodifusión en gel, adición de anticuerpos específicos y luego la adición de anticuerpo conjugado con la enzima, con desarrollo de color si es positiva, técnicas de coaglutinación, las cuales se hablarán más adelante. (53).

La identificación final se establece por medio de una batería de pruebas bioquímicas, aglutinación con antisueros (O y H) apropiados, las técnicas de anticuerpos fluorescentes, han sido útiles para la rápida identificación de microorganismos con serotipo. (53).

Con respecto a su patogenicidad, desde hace más de 50 años se sabe que ciertos tipos de *E. coli* pueden provocar cuadros de "diarrea del viajero" y especialmente en los niños de corta edad hay una producción de diarrea aguda. (16).

En base a los mecanismos de patogenicidad, *Escherichia coli* se ha clasificado como : *E. coli enteropatògena (EPEC)*, *E. coli enteroinvasiva (EIEC)*, *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*, *E. coli enterohemorràgica (EHEC)* y *E. coli enteroadherente (EAEC)*. (32).

Escherichia coli como ya mencionamos forma parte de la flora intestinal normal, pero también pueden actuar como

patógenos "oportunistas" que pueden causar infecciones fatales, cuando logran asentarse en tejidos vasculares o necróticos provocando infección en los tractos biliares y urinarios obstruidos, y junto con los anaerobios intestinales provocando infección del peritoneo contaminado.(9).

Otros tipos de enfermedades provocadas por este microorganismo son infecciones en el tracto urinario, colecistitis aguda con gangrena, úlceras pépticas, incluso hay datos que *E. coli* coloniza la piel y membranas mucosas de pacientes debilitados, también puede producir abscesos en cualquier parte del cuerpo, es frecuente que los recién nacidos y sobretodo si se trata de prematuros, presenten bacteremia con meningitis y pielonefritis por vía hematógena.(42)(84).

La "diarrea del viajero", es la causa más común de cepas enterotoxigenicas de *E. coli*, las cuales pueden ocurrir por diversos mecanismos. La invasión de la corriente sanguínea llamada bacteremia, es la manifestación más grave de infección por *E. coli*, la cual es más común en pacientes con infecciones urinarias, sepsis biliar o intraperitoneal y después de aborto o de la cirugía pélvica. (42).

Subespecies de *Escherichia coli*: En base a la clasificación de *E. coli* antes mencionada, surgen diferentes serotipos importantes de los cuales podemos mencionar:

A) *E. coli* *Enteropatògena* (EPEC), se ha identificado mediante aglutinaci3n con antisueros especifcos dirigidos contra el antígeno somático "O" y el antígeno flagelar "H", su mecanismo de patogenicidad aún no está plenamente establecido, aunque se piensa que puede ser por adherencia al eritrocito, y por lo tanto actúa destruyendo microvellosidades intestinales y causando una lesi3n en el pedestal. (57).

Originalmente recibieron este nombre todas las *E. coli* que causaban diarrea cuando se observ3 que ciertos serotipos podían estar relacionados con la enfermedad diarreica, de manera que ahora el término *E. coli enteropatògena* sólo se aplica a los gérmenes causantes de enfermedad que no producen toxinas termolábiles o termoestables, que no tienen los genes que codifican a estas toxinas, y que no son enteroinvasores. (50).

B) *E. coli* *Enteroinvasiva* (EIEC), que son capaces de invadir el epitelio intestinal y provocar un daño semejante al causado por *Shigella*.(18). Recientemente se ha demostrado que este serotipo de *E. coli* presenta la propiedad de penetrar a las células del epitelio intestinal produciendo diarreas de tipo disenteriforme en adultos y niños. (84).

C) *E. coli* *Enterotoxigenica* (ETEC), que apartir de 1968 se ha demostrado la existencia de cepas de *E. coli* productoras de enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST), codificadas por plásmides formando la base de la informaci3n actual sobre este mecanismo de producci3n de la enfermedad. (50)(57).

D) *E. coli* *Enterohemorrágica* (EHEC), perteneciente al serotipo O57:H7 y su patogenicidad se ha asociado a la producción de citotoxinas, que pueden producir algunos casos de colitis hemorrágicas y síndrome hemolítico (SUH). (57).

E) *E. coli* *Enteroadherente* (EAEC), es el grupo más recientemente descrito por Mathewson y col. (1958). La patogénesis, epidemiología y serotipos de las cepas de este grupo están en discusión, hay evidencias preliminares que sugieren que ellas son capaces de causar enfermedad diarreica ya que pueden adherirse al epitelio intestinal y se asegura claramente que ellas no pertenecen a ninguno de los otros grupos: por esta razón han sido designadas en un quinto grupo (57), se caracteriza por presentar una adherencia a células Hep-2, pero curiosamente son EAF- negativas y no pertenecen a los serogrupos clásicos (54)

Escherichia coli se encuentra tanto en heces normales como en heces diarreicas, por este motivo se ha venido intentando por diversos autores el tratar de explicar o esclarecer el papel que esta bacteria representa en el síndrome diarreico; poco a poco se ha venido incrementando las evidencias de que *E. coli*, puede ser directamente la causa de diarrea en una gran proporción de niños y la llamada "diarrea del viajero" en adultos, aunque los microorganismos involucrados no pertenecen a los serotipos considerados como patógenos y es capaz de dar brotes epidémicos de diarrea en niños. (57).

En la tabla No. 2 se presenta un resumen de la relación entre los serotipos de *E. coli* y los serogrupos más comunes ; así como el cuadro clínico probable que presenta cada grupo de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad. (54)(56).

La sintomatología de la *Escherichia coli*, se muestra en las observaciones clínicas como los estudios en voluntarios que indican que el periodo de incubación se encuentra generalmente entre 24 y 72 horas. El cuadro que se presenta es muy variable, incluye desde la enfermedad fulminante de tipo cólera, en el cual los síntomas de diarrea son de tipo acuoso moderado, cólicos abdominales y a veces algunos grados de fiebre resultan molestos, pero no ponen en peligro la vida. Se puede presentar vómito en menos de la mitad de los adultos con diarrea por *E. coli*, siendo raras ocasiones responsables de pérdidas importantes de líquidos.(39).

En nuestro país, las enfermedades comprendidas en el grupo de enteritis y otras enfermedades diarreicas destacan como uno de los problemas de salud más importantes y más comunes en el ser humano, por lo que los datos de morbilidad y mortalidad reflejan su magnitud; así se observa que para el quinquenio 1972-1976, este grupo de enfermedades ocupó el primero y segundo lugar en mortalidad, principalmente muerte entre los lactantes (se ha calculado que hasta el 15% de los niños puede morir por diarrea antes de los tres años de edad), después de esto le proceden únicamente las enfermedades respiratorias agudas y él mismo sitio como causa de enfermedad

para el quinquenio 1977-1981 y para el año 1982 a junio 1987 ocuparon el segundo lugar las enfermedades diarreicas, quedando en primer lugar las enfermedades respiratorias agudas. (50)(70).

Las afecciones extraintestinales por el bacilo *E. coli* van seguidas de un estado de inmunitario general, como puede ponerse de manifiesto por reacciones serológicas; pero los anticuerpos resultantes no alcanzan el intestino ni el aparato urinario en donde el agente puede crecer sin ningún obstáculo. (19).

En el recién nacido, los títulos de anticuerpo anti-*Escherichia* contra los serotipos más comunes son bajos o nulos por haber un paso transplacentario muy limitado. La carencia o escasez de anticuerpos en el neonato parece condicionar un estado de susceptibilidad natural a numerosas afecciones por este microorganismo. Con frecuencia el adulto muestra concentraciones altas de anticuerpos, la mayor parte de las cuales se debe a reacciones antigénicas cruzadas que se producen entre diferentes especies de enterobacterias, así como enterobacterias y microorganismos patógenos de otros grupos bacterianos diferentes. (19).

En las infecciones generales se desarrollan anticuerpos específicos, pero no está claro si a continuación ocurre inmunidad importante contra los microorganismos. Los anticuerpos contra los glucolípidos de las *Enterobacteriaceae*,

se relacionan con protección contra las secuelas hemodinámicas de la bacteremia producida por bastoncillos gramnegativos y también reducen la reacción febril e incrementan la depuración intravascular de ciertos agentes infecciosos. (42).

No se dicta ninguna medida preventiva especial, las *E. coli* aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad son sensibles a la mayor parte de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la infección por gram negativos; sin embargo, en los últimos años se han incrementado el número de cepas resistentes a ampicilina, cefalotina y a otros fármacos, por lo que se hace indispensable determinar en el laboratorio la sensibilidad de la cepa aislada a los antibióticos. En lo mejor que respecta a las cepas aisladas de procesos diarreicos, el mejor tratamiento parece ser el manejo del equilibrio hídrico y electrolítico en el organismo. (19).

Como medida de salud pública, se ha fijado que la forma más adecuada de proteger a la población contra las enfermedades transmitidas por el agua, es determinando su contaminación fecal por la presencia o ausencia de *E. coli*, así como otras medidas en la higiene personal de manos y manejo de los alimentos. (19).

Desde hace mucho tiempo se conoce el problema de las diarreas y disenterías como uno de los azotes más temibles de la humanidad, las diarreas no respetan razas, fronteras ni edades, pero sus principales víctimas son los pueblos insalubres

en los que las tazas de mortalidad por estos padecimientos siguen siendo muy elevados, encontrando que los más afectados son los niños y quienes viven en condiciones paupérrimas.(32)(82).

Escherichia coli es el microorganismo que más se ha estudiado en los últimos 100 años, hasta ahora es la forma de vida libre más estudiada, sin embargo, todavía reserva ciertas incognitas que provocan que no se conozcan en su totalidad algunos mecanismos de patogenicidad.(32)(82).

TABLA No. 2

PARACION DE LAS CINCO CATEGORIAS DE *E. coli* QUE CAUSAN DIARREA

EGORIAS DE <i>E.coli</i>	CLASES	SINDROMES CLINICOS	SINDROMES EPIDEMIOLOGICOS	SEROGRUPOS "O" MAS COMUNES	EDAD AFECTADA
erotoxigénica (ETEC)		Diarrea muy acuosa con gran pérdida de electrolitos.	Diarrea infantil en países menos desarrollados; diarrea del viajero en adultos.	06,08,015,020 025,027,063, 078,085,0115, 0128,0148,0159	Lactantes y adultos
eroinvasiva (EIEC)		Diarrea; disentería	Afecta usualmente a adultos; algunos brotes por alimentos en neonatos.	0124,0136,0143 0144,0147,0152 0164,029,0167	Adultos y lactantes
erohemorrágica (EHEC)		Diarrea sanguinolenta; colitis hemorrágica; síndrome urémico hemolítico.	Brotos por alimentos de neonatos y en adultos también.	0157, 026 *	Adultos y niños
eropatógena (EPEC)	CLASE I Más importante, usualmente EAF+.	Diarrea infantil aguda y crónica.	Brotos de diarrea en guarderías; casos esporádicos y epidémicos de diarrea infantil en comunidades; rara en adultos.	055, 086, 0111, 0119,0125,0126 0127, 0142, y 0128ab.	Lactantes
	CLASE II Menos importantes raramente EAF+.	Diarrea infantil	Brotos de diarrea	018,044,0112	niños
eroadherente (EAEC)		Definida diarrea sin sangre o leucocitos fecales.	Incriminadas en estudios epidemiológicos.	Aún no definidos.	Adultos y niños

El serogrupo 026 fue originalmente categorizado como EPEC, pero es ahora considerado para estar en EHEC. EAEC es una categoría provisional aún no bien definida de *E. coli* diarrogénica.

ado de: Levine M.M. and R. Edelman. 1984. Epidemiol. Rev. y modificado con Levine, M. 1987. J. Infect. Dis. 155(3).

TAXONOMIA

VI-TAXONOMIA

Escherichia coli actualmente se encuentra clasificada dentro de la División *Gracilicutes*, Familia *Enterobacteriaceae*, Tribu *Escherichieae*, Género *Escherichia* y especie *E. coli* (49).

Clasificación según Edwards y Ewing (2a. Ed. 1986):

FAMILIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
TRIBU I	<i>Escherichieae</i>
GENERO I	<i>Escherichia</i>

En esta edición Edwards reconoce 5 especies de *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. (40).

Clasificación de acuerdo al manual de Bergey: (49).

BERGEY (1974 8a. Ed.)	BERGEY (1984 vol. 1)
FAMILIA <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
TRIBU <i>Escherichieae</i>	
GENERO <i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>
ESPECIE <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .

En esta última edición desaparece el término tribu. (49)(76).

A) CLASIFICACION ACTUAL DE *Escherichia coli* EN BASE A LOS MECANISMOS DE PATOGENICIDAD:

La tabla No. 3 presenta una clasificación reciente realizada por Levine y col. (1987), basada en las propiedades distintivas de virulencia, interacciones con la mucosa intestinal, distintos síndromes clínicos, diferencias en epidemiología y distintos serotipos O:H.(56).

La tabla No. 4 presenta los términos y acrónimos recopilados por Levine y col. (1987), empleados hasta ahora para describir a *Escherichia coli* diarrogénica. Esta clasificación a menudo se dificulta para discriminar cuales son los términos que son definidos y cuales representan entidades distintas.(56).

TABLA No. 3

DIFERENTES GRUPOS DE *Escherichia coli* DIARROGENICA

				ACRONIMO
1.- <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica				(ETEC)
2.- <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva				(EIEC)
3.- <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena				(EPEC)
CLASE	ADHERENCIA A Hep-2	EAF	SEROTIPOS	
I	Localizada	+	Clásicos	
II	Negativa o difusa	-	Clásicos	
4.- <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica				(EHEC)
5.- <i>Escherichia coli</i> Enteroadherente				(EAEC)

Tomada de: Levine, M. 1987. J. Infect. Dis. 155.
Bibliog. (56).

TABLA No. 4

Escherichia coli, DENOMINACIONES DE TIPOS PATOGENOS
ASOCIADOS A LA PRODUCCION DE DIARREA

PATOGENO	ACRONIMO
<i>Escherichia coli</i> enteropat6gena (Serotipos cl6sicos)	EPEC
<i>Escherichia coli</i> enterotoxig6nica	ETEC
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	EIEC
<i>Escherichia coli</i> enterohemorr6gica	EHEC
<i>Escherichia coli</i> enteroadherente	EAEC
<i>Escherichia coli</i> enteropat6gena facultativa	FEEC
EPEC adherente a eritrocitos	EAEPEC
<i>Escherichia coli</i> citot6xica	
<i>Escherichia coli</i> productora de citotoxina Vero	VTEC
<i>Escherichia coli</i> productora de citotoxina semejante a Shiga	SLEC°
<i>Escherichia coli</i> "Attaching and effacing"	AEEC°

°Agregado y modificado el orden.

Tomado de: Levine, M. 1987. J. Infect. Dis. 155.

Bibliog. (56).

PROPIEDADES

BIOLOGICAS

V-PROPIEDADES BIOLÓGICAS

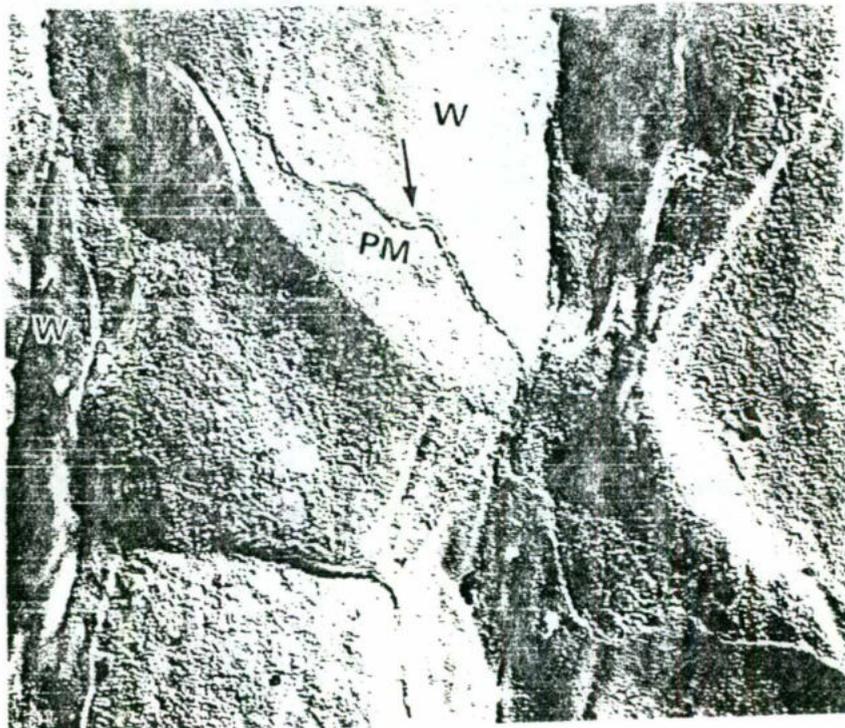
A) ESTRUCTURA:

La estructura de *E. coli* al igual que las demás Enterobacterias, comparte características como una cubierta de células rígida, rodeando una membrana citoplásmica, un cromosoma único, consistente de un DNA de doble filamento y localizado en todo el citoplasma (contrario a los eucariotes, en los cuales no hay núcleo) , así mismo tienen ribosomas que son más pequeños y menos complicados que los ribosomas eucarióticos y la ausencia de mitocondrias para el metabolismo oxidativo o un Reticulo endoplasmico para la secreción de proteínas.(59).

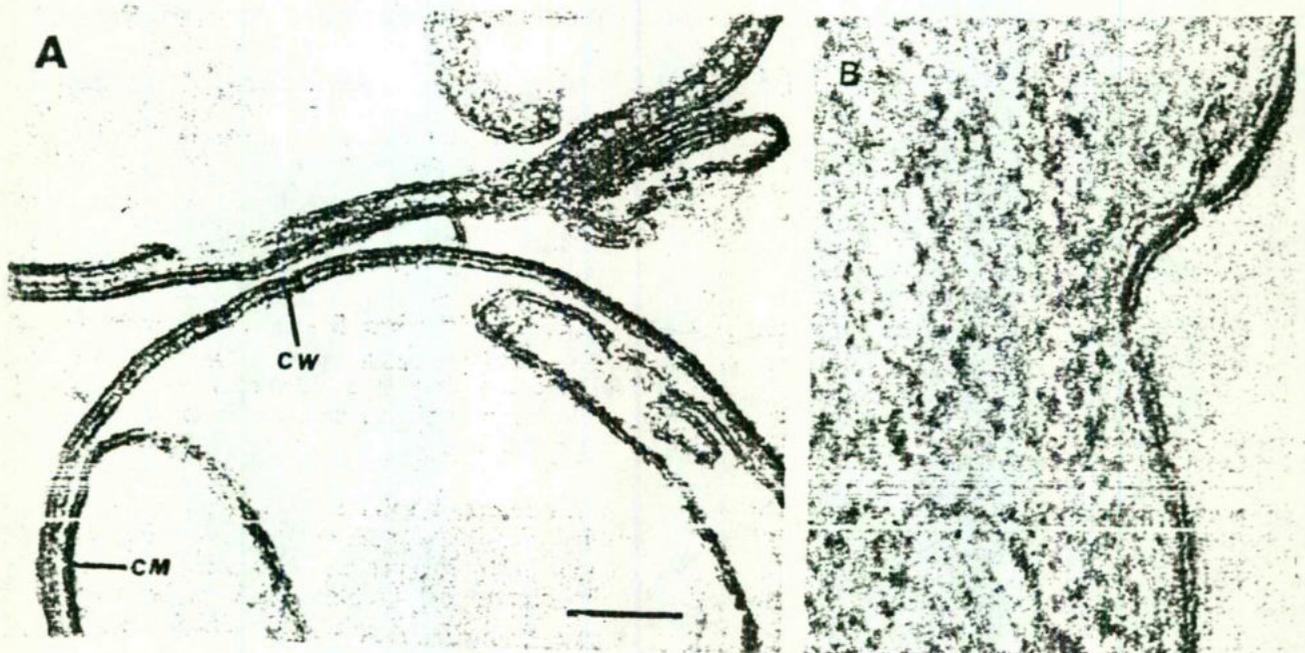
A. 1) PARED CELULAR: Su cubierta celular se caracteriza por una estructura multilaminar, en la cual la membrana interna o citoplásmica que mide de 20 a 30 Å densa a los electrones (y que corresponde a la pared celular, más gruesa que las células gram positivas) , consiste de una bicapa fosfolípida con proteínas intercaladas. La siguiente capa consiste de un *peptidoglicán* delgado relacionado con las bacterias gram positivas, junto con un espacio periplásmico. El *peptidoglicán* es un polímero de eslabonamiento transversal que da al organismo su forma rígida (capa basal) la cual puede ser purificada mediante el empleo de detergentes y de solventes de lípidos (después de la rotura celular) y donde no hay presencia de ácido teicoico . La membrana externa compleja que sigue, consiste de otra bicapa fosfolípida con intercalación extensa

de un número de elementos que consisten en lipopolisacaridos (LPS) y lipoproteínas, las cuales están unidas al *peptidoglicán* y proteínas multimericas cuyos poros de membrana facilitan el transporte. (21)(59). En este tipo de bacterias como la *E. coli*, resulta totalmente imposible aislar la pared de las membranas, pues tiene la capa externa demasiado parecidas a las propias membranas. Pero la capa externa e interna pueden separarse gracias a la acción de la lisozima debido a que ataca específicamente a los peptidoglicanos. (21).

En la figura No 1 se muestra la superficie de *E. coli* puesta de manifiesto mediante grabado por congelación. W= superficie externa de la pared celular. En el punto que señala la flecha, la capa más externa ha sido eliminada, poniendo de manifiesto una cubierta subyacente; se desconoce si esta cubierta se halla formada por *petidoglicán* o por lipoproteína. Estas cepas han sido eliminadas en la mayor parte de la superficie celular, exponiendo la superficie granulosa de la membrana plasmática (PM). (21).



En la fig. No 2 se muestra la separación entre la membrana citoplásmica (CM) y la pared celular (CW) en una cubierta purificada de *E. coli* mediante un breve tratamiento con lisozima. La mitad superior de la sección de la pared presenta una banda gruesa y densa, situada por fuera de la membrana plasmática, que se encuentra separada de una banda externa fina y densa por una capa clara de grosor constante; las células no tratadas presentan la misma estructura. En la mitad inferior, la lisozima ha eliminado gran parte del material situado junto con la capa gruesa, aunque persiste una capa fina. Así, en esta pared de una bacteria gramnegativa el *peptidoglicán* se halla unido a la capa externa, que persiste en parte después de ser eliminada. (21).



En la composición de la estructura externa como hemos indicado anteriormente, la eliminación del *peptidoglicán* de la cubierta celular de organismos gramnegativos como *E. coli* por acción de la lisozima da lugar a la producción tanto de fragmentos de la membrana interna, que, al igual que otras membranas biológicas, contiene fosfolípidos y proteínas.(21).

Sin embargo, tan sólo la membrana externa contiene, además, un lipopolisacarido (LPS), de mayor densidad que el resto de los componentes de dicha membrana; de ahí que mediante técnicas de centrifugación por equilibrio de densidades en un gradiente de sucrosa es posible obtener dos bandas claramente separadas. La banda más pesada, que contiene LPS, procede de la membrana externa, mientras que la banda menos pesada contiene citocromos y diversas enzimas biosintéticas que son características de la membrana interna. Utilizando otro método de separación es posible, gracias a la acción de un detergente no iónico, disolver la membrana interna de la fracción correspondiente a la cubierta celular, con lo que queda intacta la membrana externa y el *peptidoglicán*.(21).

Como se indica en la figura N^o 3, la fusión del *peptidoglicán* con las capas más externas de la membrana en *E. coli* se basa en la presencia de una capa virtualmente continua de lipoproteína, unida por enlaces covalentes al *peptidoglicán* y penetrando en la membrana.(21).

La función que tiene la membrana externa en *E. coli* es la de dominar sus actividades sociales, cubriendo o desvelando ciertos receptores que son utilizados por los fagos, las bacteriocinas y por los mecanismos de defensa del huésped que ha sido infectado (incluyendo anticuerpos específicos). Además la membrana externa determina el grado de permeabilidad del microorganismo, ya que, aunque al parecer carece de sistemas específicos de transporte, es capaz de dificultar e incluso de impedir el paso de numerosas moléculas de tamaño medio o de gran tamaño. Por esta razón, en muchas bacterias gramnegativas, el *peptidoglicán* no puede ser atacado por la lisozima (a diferencia de lo que ocurre en los grampositivos), y ciertos fármacos cuya molécula es muy grande (como la actinomicina), son incapaces de alcanzar lugares de acción a menos que previamente se lesione la membrana externa (por ej., por tratamiento con EDTA).(21).

A.2) RIBOSOMAS: Las células de *E. coli* contiene alrededor de 15,000 ribosomas y el número total de ellos depende de la velocidad de crecimiento. Tanto la integridad de los ribosomas presentes en extractos celulares como su función resultan sensibles a las condiciones iónicas existentes en el medio. Las células de *E. coli* son destruidas por métodos menos agresivos (por ej., digestión enzimática de la pared celular), alrededor de un 80% de las partículas ribosómicas son recuperadas en forma de polisomas, (ver fig. N^o 4).(21).

En los polisomas, los ribosomas se hallan conectados entre sí, por una cadena de RNA mensajero que es muy sensible a la acción de la RNasa. (21).

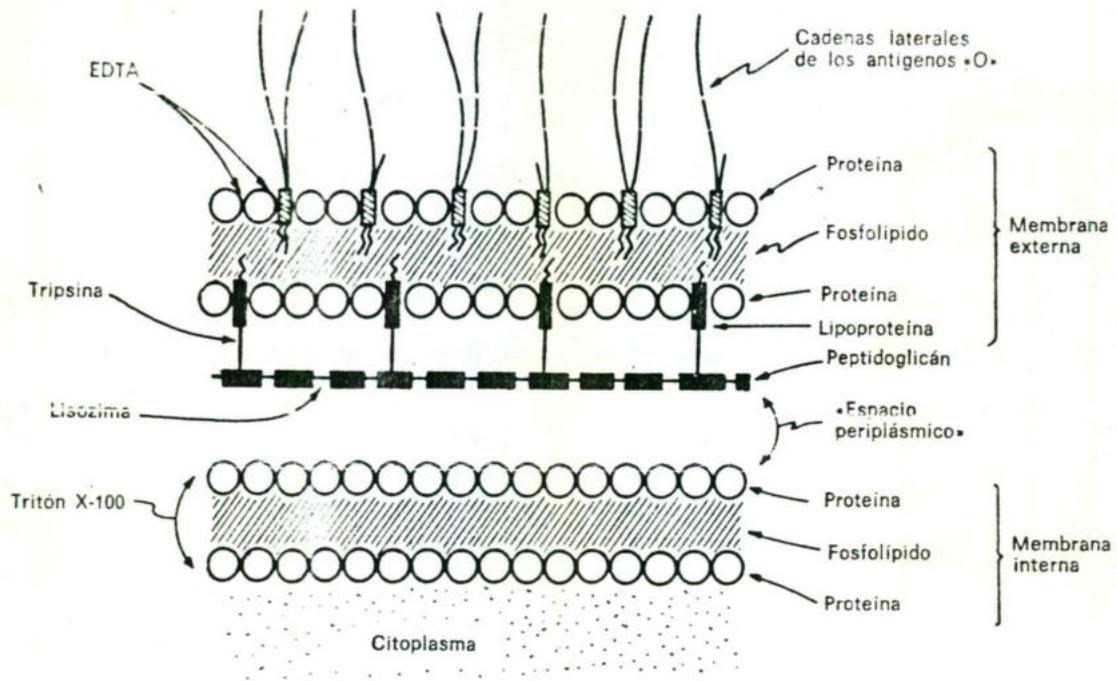


FIG. No. 3

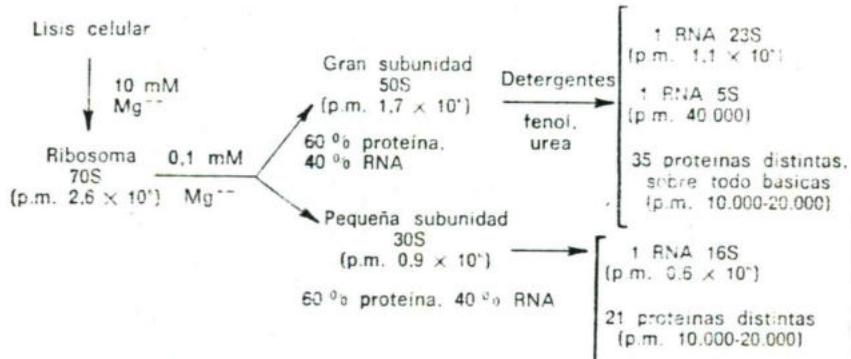


FIG. No. 4

Además de sus propiedades antigénicas (lo que puede aprovecharse para la preparación de vacunas), son el soporte de la adherencia y, por tanto, un factor de iniciación de la infección (9).

"PILI" sexuales: A diferencia de los comunes, son largos, pero tienen diámetro similar, poco numerosos, son necesarios para la transferencia del material genético desde las bacterias donantes a las receptoras durante la conjugación bacteriana (84).

Casi todas las enterobacterias pueden formar fimbrias o pelos que generalmente son llamados *pilis tipo I*. Los *pili* de tipo I, parecen mediar la hemaglutinación cuando se ponen en presencia de eritrocitos de cobayo y esta reacción es inhibida por D-manosa, y son también responsables de la adherencia bacteriana a las células eucarióticas (32) , que es un proceso considerado como paso inicial para ciertas infecciones, como la del aparato urinario (59), se ha visto que la D-manosa también inhibe la aglutinación de otros eritrocitos (como adhesinas del humano tipo II) (31) . Todavía no existe el análisis serológico general de los antígenos de *fimbrias*, sin embargo estudios genéticos recientes han demostrado que las *fimbrias tipo I* grandemente potencian la capacidad de las cepas de *E. coli* (que también contienen toxina) para liberar la toxina a las células eucarióticas susceptibles (59):

A.6) P I L I: Muchas bacterias gramnegativas como la *E. coli*, poseen apéndices rígidas en la superficie denominadas, *pili* (latín, "pelos") o *fimbrias* (latín, "franjas") (42). Los *pili* son elementos filamentosos incostantes, no fundamentales para la vida bacteriana, visibles solamente al microscopio electrónico y carentes de movilidad (84) , se proyectan hacia afuera (radian en una forma peritrica a la superficie del microorganismo en todas direcciones) por lo que duplica su diámetro (59), son más cortos y delgados que los flagelos (42) y al igual que éstos se componen por polímeros de proteínas (31).

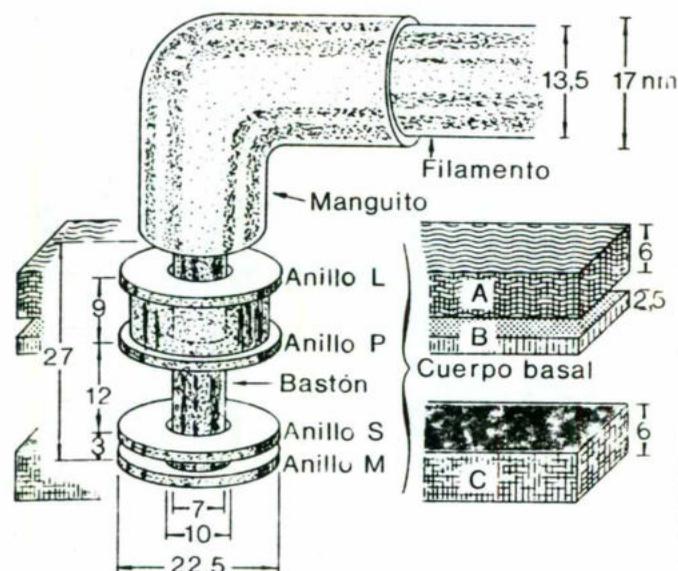
Se han descrito dos tipos de *pili*, los cuales se clasifican sobre la base de su función en *pili comunes* y *pili sexuales*, ambos pueden hallarse en la misma bacteria, así las cepas de *E. coli* presentan normalmente de 100 a 200 *pili comunes* distribuidos por toda la superficie bacteriana y de 1 a 4 *pili sexuales* (84).

"PILI" comunes: son filamentos rígidos de 7-8 nm de diámetro, cortos (0.5-2 um), muy numerosos, implantados en toda la superficie bacteriana. Los *pili comunes* se adhieren al latex, hematíes y glicocálix de los epitelios (9) , esto también interviene en la adherencia de las bacterias simbióticas a las células del huésped y el *pili sexual*, que es responsable de la unión de las células donadora y aceptora en la conjugación bacteriana (42).

antigénicamente diferente a la flagelina del filamento, y en *E. coli* tienen 45 nm de longitud y está compuesto de 6 filamentos helicoidales concéntricos. (84).

El corpúsculo basal, está formado por dos pares de discos de 22.5 nm de diámetro. Uno de estos dos pares se sitúa en la membrana citoplásmica: el anillo M se inserta dentro o justamente por debajo de ella y el anillo S se sitúa inmediatamente por fuera de la membrana y queda posiblemente adherido a la superficie más interna de la capa del peptidoglicano. El otro par se adosa sobre la pared bacteriana: el anillo P en el peptidoglicano y el L en el lipopolisacárido. (84).

En la fig. 6 se presenta un esquema representativo del extremo basal de un flagelo de *E. coli*. Situación topológica, respecto a la pared bacteriana y a la membrana citoplásmica y dimensiones de las diferentes estructuras. A, capa lipopolisacárida; B, capa de peptidoglicano; C, membrana citoplásmica. (84).



Las fimbrias han sido caracterizadas en dos formas diferentes, una *antigenica* y otra *funcional*. Las fimbrias antigenicas poseen un antigeno llamado "de factor de colonización" (en ingles CFA I y CFA 2) y se han encontrado en un gran número de *E. coli* asociadas con gastroenteritis, esta clase de adhesinas CFA, nacidas de un plasmido CFA es extremadamente importante para la detección de *E. coli* asociada con este trastorno y el otro tipo de fimbria *funcional* es asociada con infecciones del tracto urinario.(59).

Estudios geneticos recientes han demostrado que las fimbrias tipo I, de una manera muy importante potencian la capacidad de las cepas de *E. coli* que tambien contienen toxina para liberar esta toxina a células eucariotas suceptibles. (59).

A. 5) FLAGELOS: También son elementos facultativos, órganos de estructura helicoidal y locomotores, responsables de la movilidad bacteriana, especificidad antigénica H (16) , y junto con las moléculas limpiadoras y el sistema de sideropora permiten la adquisición de nutrientes (59).

Los flagelos se componen de tres partes: a) filamento, b) codo o manguito y c) corpúsculo basal. El filamento se forma por una proteína contráctil, la *flagelina*, está es responsable de la actividad antigénica del flagelo (antígeno H). El codo, está compuesto de una unidad proteica o simple, es más estable que el filamento a pH bajo, altas concentraciones de urea, solventes orgánicos y agentes desnaturalizantes. Es

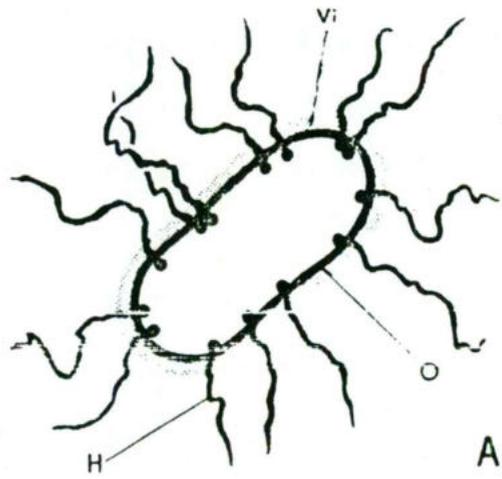


Fig. 5a. ANTIGENOS

estructura en particular e incluye adhesinas definidas como fimbrias, así como otras que han sido pobremente caracterizadas y por lo tanto dichas estructuras no han sido determinadas (40).

Ciertas adhesinas tales como los antígenos K88 y K99, fueron originalmente observados como una masa fimbrial amorfa sobre la superficie bacteriana sin una estructura definida. Recientemente se ha demostrado que tales antígenos consisten en finos filamentos de 2 a 3 nm. de largo, por lo que ahora son considerados como **fimbrias**. (40).

Las adhesinas permiten al organismo adherirse y colonizar la superficie de la mucosa. En la *E. coli* que es no patógena pero capaz de tener su residencia en el tracto gastrointestinal la presencia de adhesinas se piensa que juega un papel muy importante en permitir al organismo colonizar exitosamente al huésped .(21).

E. coli posee múltiples adhesinas, la capacidad específica de las adhesinas para reconocer distintos receptores de membrana y el uso de receptores análogos pueden ser herramienta poderosa para la clasificación e identificación, de esta especie.(40).

Cada fimbria individual consiste de cientos de subunidades de proteínas dispuestas de manera helicoidal, las cuales proveen al organelo con su enlace específico.(59).'

Los antígenos K son polisacáridos que contienen generalmente grupos ácidos. Cuando están bien desarrollados forman cápsulas que se ven definitivamente al microscopio. El antígeno B, retiene sus propiedades de unir aglutininas después de calentarse a 100°C, este antígeno se encontró casi exclusivamente en cepas de *E. coli* asociadas a diarreas infantiles. (19). En la estructura antigénica de esta especie se conocen aproximadamente 100 de estos antígenos "K", y por poseer tipos L, A o B, presentan diferentes propiedades físicas e inmunológicas (ver fig. 5a).(29).

Se ha demostrado también que estos antígenos existen no como material capsular separado en la superficie celular, sino más bien como una región termoestable del antígeno "O" (Orskov y col. 1977) . Por esta razón, se ha propuesto que el término antígeno "K" sea utilizado para denotar solamente antígenos superficiales ácidos, polisacáridos o proteicos (fimbriales) demostrables.(75)(76). La serotipificación O:H es usualmente adecuada para propósitos epidemiológicos, debido a la alta frecuencia de pacientes con enteritis causada por bacterias con combinaciones antigénicas somático- flagelares (O:H).(14).

A.4) ADHESINAS: El término adhesina fue primeramente usado por Duguid y col. en 1953, para describir apéndices proteinados filamentosos diferentes a los flagelos (40). El término adhesinas se define como el componente de la superficie bacteriana que media la unión específica con membranas de células eucarióticas. Este término no presupone ninguna

en los flagelos (de microorganismos móviles). Son de índole proteica y se inactivan con temperaturas mayores de 60° C y con alcoholes y ácidos. La designación de H (del alemán Hauch: aliento).(93).

Los flagelos, son organelos proteicos que determinan la especificidad del antígeno H de los miembros móviles de la familia, los antígenos "H" de *E. coli* a diferencia de los de *Salmonella* son monofásicos. (9)(53).

En la estructura antigénica de *E. coli* se han reconocido aproximadamente 52 de estos antígenos.(29).

*Los antígenos K, de envoltura o capsulares: se considera que éstos son envolturas o cápsulas que rodean a la célula. Generalmente interfieren en la aglutinación por antisueros específicos "enmascarando" los antígenos "O". Casi todos los antígenos K se destruyen con calor (100°C).(27). El término "K" fue introducido por Kauffmann y Vahine en 1945, para describir la envoltura celular que enmascara el antígeno "O" y que hace a ciertas cepas de *E. coli* no aglutinables. Al principio, los antígenos "K" fueron subdivididos de acuerdo a su estabilidad al calor en tres tipos: L, A y B.(75)(76).

El término antígeno "K", se deriva de la palabra Kapsel (cápsula), pero en la actualidad no solo comprende antígenos capsulares, sino también de envoltura (L, A y B). Todas las cepas que contienen antígeno A termoestable son encapsuladas.(75)(76).

A.3) ANTIGENOS: La *Escherichia coli* posee diversos antígenos que pueden agruparse en tres categorías principales: O, H y K .(93).

***Los antígenos "O" (somáticos):** son antígenos del cuerpo celular (soma). Son termoestables, resisten el calentamiento hasta 100°C y no se destruyen con alcohol ni ácido diluido. El término O, del alemán *Ohne* (sin) se aplicó por primera vez a formas no proliferadoras, es decir no flageladas, de microorganismos *Proteus*, y ahora se usa como término genérico para los antígenos somáticos lipopolisacáridos de todos los bacilos entéricos.(27).

Los antígenos "O" son cadenas laterales de LPS (lipopolisacáridos), los cuales forman la columna vertebral de los sistemas analíticos antigénicos. El LPS es una molécula muy compleja, que consiste en tres regiones (Luderitz y col. 1971): a) lípido A, incluido en la membrana externa de la pared celular, responsable de muchas propiedades biológicas del LPS; b) el centro del LPS, ligado al lípido A y que expresa la especificidad rugosa (R), poco conocido en las formas S (lisas) por la unión al centro de los antígenos O; c) los polisacáridos O-específicos de las formas bacterianas S son la base química de la clasificación serológica de las enterobacteriáceas.(9).

En la estructura antigénica de *E. coli* se han reconocido aproximadamente 162 grupos de antígenos "O".(29).

***Los antígenos H o flagelares:** estos son ubicados

El RNA ribosómico (rRNA) constituye la mayor parte del RNA celular, pero no posee la relación de bases que caracteriza a los ácidos nucleicos de doble cadena; por otra parte, es posible que su composición de bases sea muy distinta de la que presenta el DNA de la misma célula.(21) La composición en nucleótidos del RNA ribosómico es la siguiente:

ORGANISMO	rRNA de la unidad mayor(moles%)				DNA(moles%)
	C	A	U*	G	GC
<i>Escherichia coli</i>	21.0	25.5	21.0	32.5	50

* Incluyendo al pseudo-U.

La RNAasa I de *E. coli* demuestra la dificultad que presentan la localización de una determinada enzima en la célula. Esta proteína básica, que durante mucho tiempo se había considerado como una enzima ribosómica, es adsorbida por los ribosomas durante el proceso de lisis, ya que si las células se convierten en esferoplastos antes de que se produzca la lisis, la enzima se encuentra entonces en el espacio periplásmico.(21). Las bacterias gramnegativas, al convertirse en esferoplastos o al sufrir un choque osmótico liberan proteínas. Estas proteínas (que son generalmente, enzimas hidrolíticas) que actúan sobre sustancias nutritivas insolubles, están situadas, al parecer, en el espacio periplásmico, es decir, entre la membrana interna y el peptidoglicán.(21).

La RNasa I es una endonucleasa probablemente utilizada para hidrolizar al RNA extracelular: esta enzima se encuentra en el espacio periplásmico, y es inhibida por acción del Mg++ a la concentración normal presente en la célula.(21).

Si la concentración de Mg^{++} (0.1 a 1 mM) es baja, o la concentración de K^{+} es elevada, los ribosomas se disocian en dos subunidades, una de ellas de **gran tamaño** (50S) y otra de **pequeño tamaño** (30S). La electroforesis en gel y la cromatografía han permitido demostrar que la subunidad de menor tamaño en las bacterias como *E. coli* contienen 21 proteínas distintas, mientras que la unidad mayor tiene 35.(21).

En la siguiente figura No 5: a) se ponen de manifiesto diversos aspectos de ribosomas 70S de *E. coli*, en los cuales se muestra su forma irregular, la cavidad, densamente teñida y los surcos. b) Diversos aspectos de la subunidad 50S de *E. coli* y c) Modelos de plástico basados en las fotografías que se presentan en b. Es posible que la subunidad menor se adapte al hueco formado por la parte principal de la unidad mayor y la prominencia o "nariz".(21).

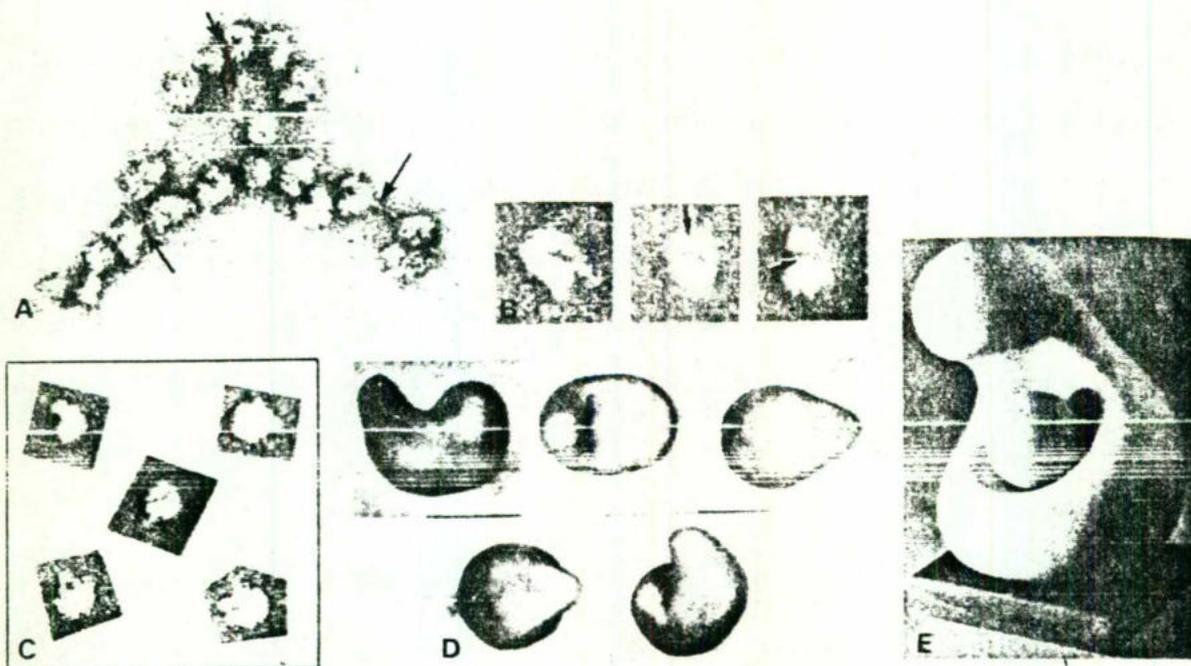


FIG. No. 5

Otra forma de clasificación de los "pili" son de acuerdo al número de unidades por vuelta y por diámetro, de esta clasificación se conocen dos: un "pili rígido" como el 987P y pili tipo 1 y otro "pili flexible" como el K88 y K99(33).

La virulencia de ciertas bacterias patógenas no sólo depende de la producción de toxinas sino también de los "antígenos de colonización", que en la actualidad se han reconocido como simples pelos que dan a las células propiedades adherentes. En las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena, tanto las enterotoxinas como los antígenos de colonización (pili) están determinados genéticamente por plásmidos transmisibles (42).

La fig. N° 7 muestra a los pili, en la cual el pili sexual ha sido recubierto de partículas virales (fagos) para los cuales sirven como receptores específicos (42).

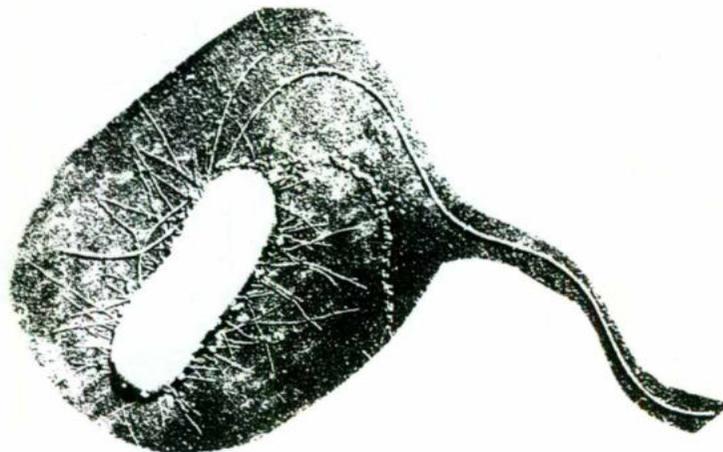


Fig. N° 7. Micrografía electrónica de una célula de *Escherichia coli* que posee 3 tipos de apéndices: pelos ordinarios (cerdas cortas y rectas); un pelo sexual (más largo, flexible, con partículas adheridas de fago); y varios flagelos (los más largos y gruesos). Diámetros: pelos ordinarios, 7 nm; pelo sexual, 8.5 nm; flagelos, 25 nm.(42).

Por otra parte, diversas cepas de *E. coli* enterotoxigenicas presentan estructuras filamentosas semejantes a fimbrias manosa-resistentes, de amplio espectro hemaglutinante, pero a diferencia de las anteriores se eluyen a temperaturas elevadas. Son las fimbrias tipo MRE (manosa-resistentes y eluyentes), que se encuentran en cepas de *E. coli* productoras de diarreas en los animales (cerdos y terneras), relacionadas con los antígenos K88 y K99 y con los factores de colonización (CFA I y CFA II), responsables de la adherencia de las células del intestino delgado y la producción de diarreas. La síntesis de fimbrias está codificada por plásmidos transferibles (84).

En la tabla N° 5 se presenta un resumen sobre las diferentes fimbrias y su relación con la adherencia:

-----TABLA N° 5 -----

TIPO DE FIMBRIA; CLASIFICACION	TAMAÑO (nm x μ m)	ADHESINAS	AGLUTINACION; HEMATIES DE	FIJACION AL
I	7 x 2	MS	cobayo-aves caballo	Epitelio urinario
MRE	7-11 x 0 .15-15	MRE	diversas es-- pecies a temp elevadas	Intestino delgado

La fimbria tipo I corresponde a *E. coli* (16) .

La fimbria tipo MRE corresponde a *E. coli* K88, K99 y factor de colonización (CFA) (84) .

A. 7) PLASMIDOS: Fueron descubiertos en Japón hacia 1950 en el curso de una epidemia de disenteria bacilar por shigelas (16). Los plásmidos son unidades no cromosomales de DNA autorreplicables que llevan su propia maquinaria replicadora, así como otros genes que pueden ser proveedores de un fenotipo al organismo, que necesitaría si el plásmido fuera perdido, parte de las bacterias que transportan genes que facilitan a la célula huésped la transferencia del plásmido por conjugación, es decir, el paso del material genético no cromosómico de una bacteria a otra por contacto, y codifica la producción de *pili* sexuales, F (84) .

Además son responsables de la resistencia de ciertas bacterias gramnegativas, a uno o más antibióticos por un mecanismo diferente al producido por mutaciones cromosómicas. Esta resistencia se adquiere por promover la elaboración de una enzima degradante o modificante (beta-lactamasa, y antibióticos β -lactámicos, transferasa y aminoglicósidos), (ver fig. N° 8) (84).

Debido a las infecciones peligrosas por *E. coli* se han aislado y decidido diferentes clases de plásmidos: (84).

***PLASMIDOS "ENT":** codifican la síntesis de las enterotoxinas. Todos los plásmidos estudiados son responsables de la producción de toxinas termoestables o de toxinas termolábiles, solas o conjuntamente (84).

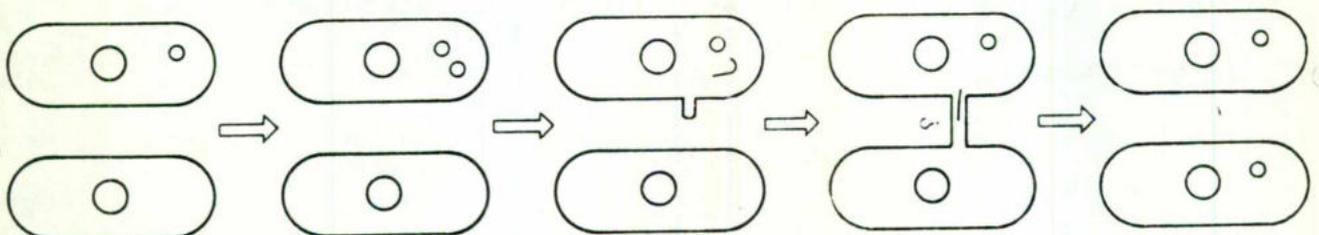
***PLASMIDOS "INV"**: responsables de la capacidad de penetración en las células epiteles del intestino, en las bacterias enteroinvasivas como la *E. coli*.

***PLASMIDOS " HYL"**: son específicos en la producción de alfa-hemólisin, que causan lisis de hematies. Hasta el momento no se conoce modo de acción ni la naturaleza molecular.

***PLASMIDOS "K"**: son responsables de la producción de antígenos en la superficie celular de *E. coli*. Los antígenos son específicos de especie (84).

***PLASMIDOS "R"**: Un especial pero extraordinaria e importante clase de plásmido son los plásmidos "R", los cuales juegan un papel predominante en la resistencia antimicrobiana en contra de la *E. coli*.(59).

***PLASMIDOS COL V**: Un nuevo tipo de plásmido se ha aislado recientemente de infecciones extraintestinales, estos plásmidos le confieren a la *E. coli* varias propiedades como la de incrementar su virulencia, incluyendo la resistencia a la fagocitosis y el complemento, así como la fijación de fierro mediado por aerobactina. Estudios clínicos y epidemiológicos indican que la *E. coli* que tiene portando el plásmido Col V, es más patógeno. Algunas otras propiedades es que son heterogéneos en tamaño, composición genética y son no conjugativos.(95).



A.8) C A P S U L A : La cápsula o capa mucosa es un elemento incostante, no esencial para la fisiología bacteriana. Esta compuesto por polisacáridos, pero en ocasiones están formadas por polipéptidos. La cápsula protege a la mayoría de las bacterias de la fagocitosis, favoreciendo con esto su multiplicación y facilitando la invasión del organismo infectado. La virulencia desaparece en el momento en que se pierde la cápsula (84).

La cápsula estudiada encontrada en *E. coli* es el antígeno capsular K1, el cual es un polímero de ac. neuramínico-N-acetil. Esta molécula de cerca mimetiza compuestos similares encontrados en tejidos de mamíferos y probablemente es la razón de la inmunogenicidad mala de este organismo . Por lo tanto la cápsula K 1 inequívocamente es un factor de virulencia (59).

Las cápsulas actúan en forma puramente defensiva, para promover la virulencia bacteriana por decremento de la fagocitosis. Actuando de dos maneras: a) su composición polisacarida, hace cápsulas altamente hidrófilicas, las cuales fuertemente inhiben fagocitos por la superficie hidrófilica de las células del huésped y b) muchas cápsulas son relativamente poco inmunogenas y poco activadoras del complemento.(59).

B) T O X I N A S :

La idea de que los organismos producen venenos es tan antigua como evidente, y en realidad es cierto de que muchas

bacterias patógenas producen venenos antigénicos, llamados generalmente **toxinas**. Hay dos tipos de **toxinas**: las *exotoxinas* y las *endotoxinas* que se explican más adelante (9).

Por definición las toxinas en forma pura, interactúan de alguna manera específica en el huésped para producir una respuesta determinada por una alteración en la velocidad o fisiología del sistema de células blanco. Las citotoxinas y las hemolisinas destruyen células, mientras que muchas otras toxinas causan daño en general al organismo, en la ausencia de muerte celular individual (26).

B.1) ENTEROTOXINAS: (ó EXOTOXINAS):

Una enterotoxina es una toxina producida en el tracto intestinal por un organismo infeccioso. La enteropatogenicidad y la capacidad de producir una enterotoxina molecular pequeña termoestable y una enterotoxina proteica termolábil es conferida a *E. coli* por un plásmido enterotóxico (Ent+). Esta toxina causa diarrea o vómitos, este efecto resulta generalmente de la acción directa de la toxina sobre la pared intestinal, pero puede seguir también a la absorción de la toxina en el torrente circulatorio y a su acción en otras partes (9)(29).

B.1) ENTEROTOXINAS

B.1.1 TOXINA TERMOLABIL: (LT)

Gyles y Barnum en 1969 señalaron que la toxina LT de *E. coli* comparte muchas características con la toxina colérica (82); entre las características que se comparten están modo de acción, relación antigénica en las subunidades A y B, capacidad de unirse al receptor gangliósido GM 1 (que se explicará mas adelante), etc. (82).

En la actualidad sabemos que la *enterotoxina termolàbil de E. coli* es una exotoxina, aunque gran parte de ella se encuentra en el espacio periplàsmico de la bacteria, como lo sugiere el hecho de que a la terapéutica con polimixina B, ocurre una rápida liberación de la toxina (82); la toxina LT, es de naturaleza proteica con un contenido muy pobre en lípidos y carbohidratos. Es termosensible, tiene un peso molecular aproximado de 95 000 , aunque otros autores obtienen valores diferentes dependiendo de los métodos utilizados en su obtención (82).

Lohnrath y Holmgren (1979) mostraron que, al igual que la toxina colérica, la *toxina termolàbil de E. coli* tiene dos tipos de subunidades monoméricas, una de peso molecular de 11,600 (subunidad B) y una subunidad grande (subunidad A) de peso molecular de 28,000 que pueden ser separadas por electroforesis.(54).

La subunidad B oligomérica, está formada por las cinco subunidades monoméricas agregadas en un anillo, ya que ésta es la única forma geométrica estable de agregación (ver fig. 11) (82).

La subunidad A, al parecer está formada por dos fragmentos, uno grande A 1 (23 daltones) y uno pequeño A 2 (5,000 daltones), los cuales como en el caso de la toxina colérica pueden ser separadas cuando se trata a la subunidad A, con agentes reductores (82). Se considera que la subunidad A, está unida e insertada parcialmente en el anillo B por la porción A 2, este modelo está apoyado por las evidencias al microscopio electrónico (82).

a) Funciones de las subunidades: La subunidad B de la toxina TL de *E. coli* al igual que la subunidad B de la toxina diftérica y de la toxina colérica, no es tóxica para la célula y no posee actividad estimulante sobre la adenilato ciclasa; al parecer la subunidad B, es la responsable de la unión específica a las células, ya que pueden competir con la toxina completa por los sitios de unión (gangliósido GM 1) sobre las células susceptibles (82).

La subunidad A, purificada no es capaz, por ella misma, de unirse a la célula ni es tóxica, mientras que las fracciones conteniendo A y B se unen, y tienen actividad tóxica, lo que sugiere que la subunidad A pudiera ser la fracción efectora, se pudo comprobar, que la subunidad A es la responsable de la activación de la adenilato ciclasa ya que es activa enzimáticamente, cuando se adiciona a estromas de eritrocitos de

píchón, en donde se demostró que la subunidad A era capaz de activar la adenilato ciclasa y que no era indispensable la subunidad B (14)(82).

La acción de la toxina sobre la célula consta de una fuerte y rápida unión a receptores de la superficie celular. Dicha unión ocurre casi instantáneamente y es saturable e inicialmente reversible, aunque el número de receptores varía ampliamente de acuerdo con los tipos de células y difieren para células individuales del mismo tipo. La fuerza de unión a diferentes tipos celulares es la misma y la constante de asociación está cerca de 10^{-9} M. La observación de que un gangliósido específico es el principal receptor de la membrana, lo presentó en 1973 cuando fue propuesto al gangliósido GM 1, que pertenece a los gangliósidos formados por complejos glucolípidos que se encuentran en la membrana plásmática de las células (82).

Los gangliósidos son sustancias anfipáticas que consisten de un cerámico hidrofóbico y un oligosacárido, el cual contiene uno o más residuos de ác. siálico. En las células el cerámico lipofílico está ubicado en la mitad externa de la membrana plasmática, mientras que el carbohidrato sale a la superficie (82). Holmgren demostró que el gangliósido GM 1 (galactosil N-acetil-galactosaminil-sialosil-galactosil-glucosil cerámico) podía fijar e inactivar a la toxina TL, pero de una manera específica como se observa. En la toxina colérica, lo cual según Guerrant puede explicarse así:

1.- La neuraminidasa puede estar presente en preparaciones crudas de *E. coli*, que puede convertir una fracción de GT 1 (sialosil galactosil N-acetil galactosaminil-sialosil sialosil-lactosil cerámico) a GD 1a (sialosil galactosil N-acetil galactosaminil-sialosil-lactosil cerámico) y este último a GM 1.

2.- La toxina cruda puede estar formada por toxinas con distinta susceptibilidad a los gangliósidos en donde todos los miembros son sensibles a GM 1, la mayoría queda como sensible a GD 1a y el resto sensible a G1.(82). El receptor biológico natural de la toxina es GM 1. Esto se apoya en los siguientes estudios:

*- Investigaciones realizadas con varios tipos de células, incluyendo células de la mucosa del intestino delgado de diferentes especies, demostraron una correlación directa entre el contenido de GM 1 y el número de moléculas de toxina que la célula puede unir.

*- El tratamiento previo de las membranas celulares con la fracción B de la toxina, bloquea específicamente los gangliósidos GM 1 de la membrana (82).

*- El GM 1 exógeno puede estar incorporado como receptor funcional dentro de la membrana celular de diversos tejidos, lo que incrementa la capacidad del intestino de unir toxinas y aumentar la susceptibilidad del intestino a la acción diarrogénica de la toxina (82).

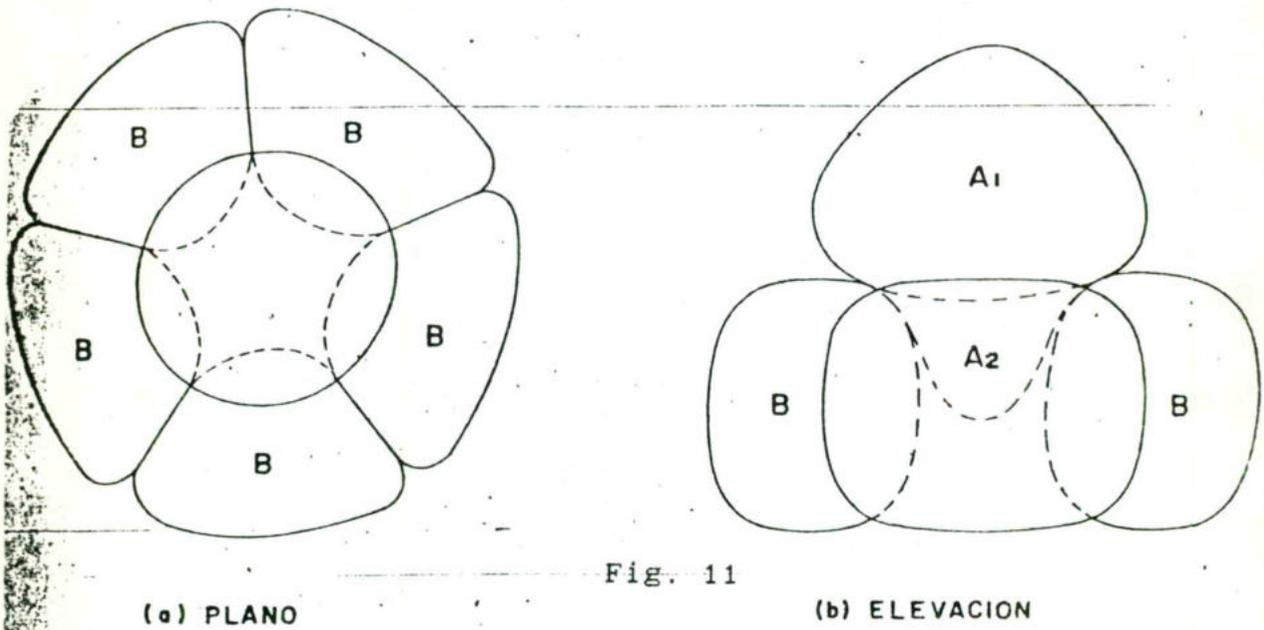


Fig. 11

(a) PLANO

(b) ELEVACION

Arreglo de las subunidades de la toxinas LT de *E. coli*.

Las cinco subunidades B forman un anillo (a)

en el cual la subunidad A se inserta parcialmente (b).

b) Penetración de la toxina a la célula: La penetración de la toxina a la célula se basa en estudios que muestran la unión inicial de la subunidad B a la célula; esta unión es reversible si las células se mantienen a 4° C, o irreversibles si las células son incubadas a más de 20° C. La subunidad B tiene un papel importante en el proceso de entrada para subunidad A y no solamente es un ancla de la toxina sobre el receptor GM 1 de la membrana, lo cual provoca cambios de reversible a irreversible se debe a que existe una asociación de la subunidad B con la membrana, lo cual provoca cambios conformacionales en dicha subunidad, por la unión GM 1 (82).

Se presuponen dos posibles mecanismos por los cuales la subunidad B se ubica parcialmente en la membrana, por lo que puede conducir a la entrada de la subunidad A:

1) La subunidad B forma un canal hidrofóbico a través de la membrana por la cual puede pasar a la subunidad A.

2) Entre la subunidad B y un componente de la membrana, se produce una interacción hidrofóbica que facilita la entrada de la subunidad A a la membrana interna; A 1 se libera por una reducción intracelular con glutatiòn del enlace disulfuro entre A 1 - A 2. (Ver fig. No. 12).

c) Modo de acción de la toxina: La toxina adicionada a células intactas se une al receptor natural y da lugar a una serie de cambios, provocando la aparición de una fase lag previa a la acción enzimática (82).

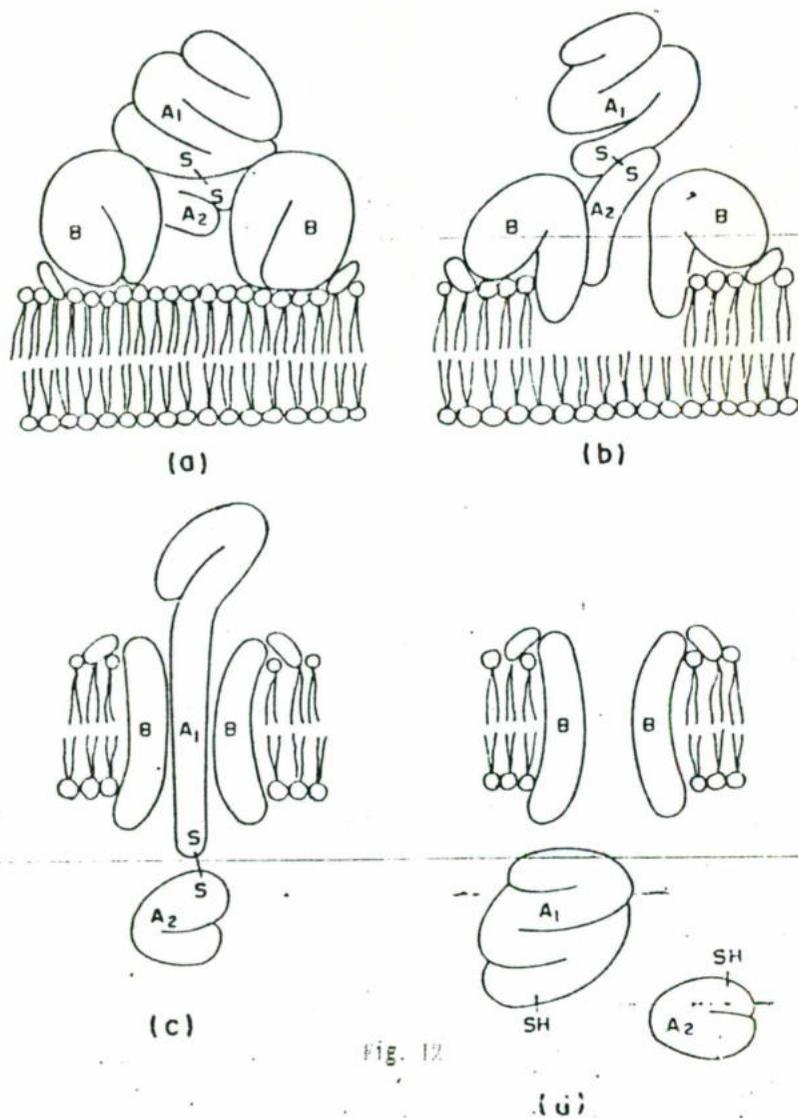


Fig. 12

Fig. 12

Mecanismo propuesto para la entrada de la subunidad A₁ de la toxina

LT de *E. coli*. Ensamble de las subunidad B a los receptores específicos (a), el receptor induce un cambio conformacional en la subunidad B y su inserción en la membrana (b) y crea un canal hidrofóbico, a través del cual la subunidad A₁ puede difundirse en el interior de la célula (c) A₁ se libera por una reducción intracelular con una ruptura del enlace disulfuro entre A₁-A₂ (d).

La toxina ejerce su efecto sobre el intestino delgado "*in vivo*" y sobre una variedad de células de otros organismos "*in vitro*" a través de la adenilato ciclasa. Dicha activación no es de tipo hormonal como ocurre con glucagon o epinefrina en la que la acción es inmediata y de corta duración; por el contrario la acción de la toxina es lenta y permanente. Gill (1976) demostró que la activación de células rotas dependía (además de la subunidad A--o el fragmento A 1--y la membrana celular de otros factores, como NAD+) de factores proteicos celulares y ATP (82).

Gill y Richardson (1980) observaron que al igual que la toxina diftérica y la toxina colérica, la toxina termolábil de *E. coli* tiene actividad de ADP ribosil transferasa ya que cataliza la reacción:



La proteína ADP- ribolisada, ha sido identificada recientemente como una proteína unida al guanidil nucleótido que tiene un peso molecular entre 42 y 43 mil daltones. Al parecer la modificación de esta proteína es responsable de los cambios en la función de la adenilato ciclasa que induce la toxina termolábil (82).

Cassel y Selmger (1977) han propuesto que la adenilato ciclasa es reactiva cuando la proteína unida a GTP es ribosilada pero es capaz de revertir al estado inactivo como resultado de la hidrólisis del GTP a GDP y fosfato inorgánico. (82.)

La fig. No. 13 presenta el mecanismo de ribosilación y de activación de la adenil ciclasa.(82).

La adenilato ciclasa ha sido reconocida como un complejo enzimático unido a la membrana que consta por lo menos de 3 componentes. Su nomenclatura todavía no ha sido definida. Field propuso que se denomina un receptor hormonal específico "H" que está situada sobre la parte externa de la membrana; un componente (R) responsable de la regulación de la actividad enzimática dependientes del GTP, y el componente (C) que será responsable de la conversión enzimática de ATP a AMPc. El regulador y el componente enzimático están situados en la superficie interna y los tres pueden existir colectivamente como el complejo adenilato ciclasa o como proteínas individuales en la membrana.(ver la fig. No. 14).(82).

d) Efecto de la toxina termolábil sobre la secreción intestinal: El líquido y los electrólitos perdidos durante un episodio de diarrea causada por *E. coli enterotoxigénica* (TL), son el reflejo de los efectos de la toxina termolábil sobre el transporte de varios electrólitos, inicialmente el sodio y el cloro en el intestino delgado se ven alterados tanto *in vivo* como *in vitro* en la difusión extracelular a través de las uniones membranales; no obstante hay también mecanismos de " transporte activo" los cuales participan y son de especial importancia en el fenómeno responsable de la diarrea secretora.(82).

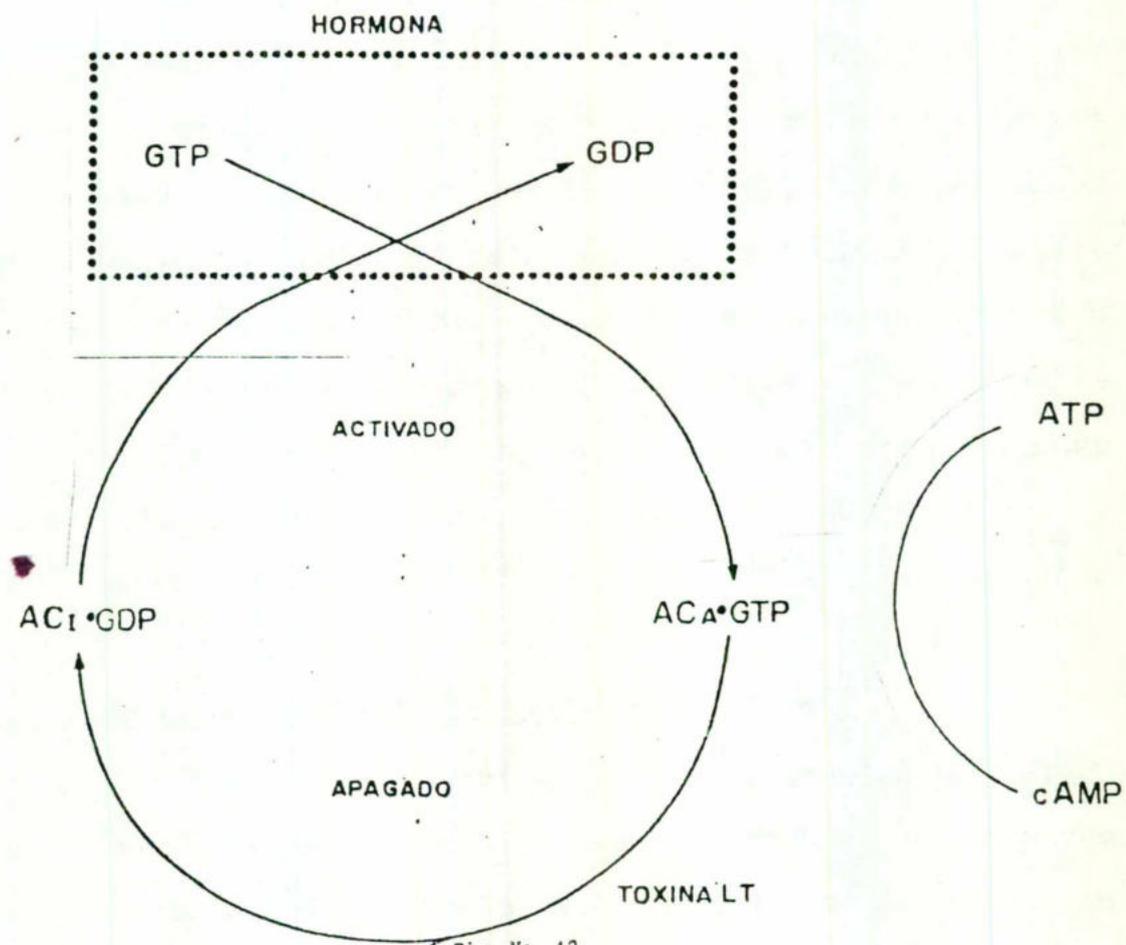


Fig. No. 13

Pi Mecanismo propuesto para la regulación de la

adenilato ciclasa y el sitio de acción de la toxina termolábil de *E. coli*.

AC_a: Adenilato ciclasa activada.

AC_i: Adenilato ciclasa inactivada.

Field y col. (1969) demostraron la relación entre la acción de la toxina termolábil de *E. coli* y el adenosin-monofòsfato-cíclico (AMPc), sobre la secreción intestinal.(82).

El epitelio absorbe sodio y cloro a un ritmo normal, pero la absorción de sodio se incrementa notablemente si se adiciona glucosa al lado mucosal. La adición de teofilina que provoca dos efectos importantes:

a) La absorción de sodio disminuye dramáticamente y se observa un cambio en el transporte neto de absorción de cloro a secreción.(82)

b) Se obtuvieron idénticos resultados al agregar toxina termolábil sobre el lumen, aunque el tiempo de activación fue más lento (15 a 30 min.). Estos cambios en los flujos de cloro y sodio dan como resultado un aumento en la fuerza osmótica que provoca la secreción de agua.

El efecto doble del AMP cíclico sobre la absorción activa y la secreción respectivamente, parece involucrar diferentes tipos de células. La absorción de sodio y de cloro se realiza a través de las células epiteliales con microvellosidades y se consideran dos sistemas de transporte activo de sodio.(82).

La membrana de las células epiteleales con microvellosidades presenta un canal o acarreamiento para el dar iones, a través de los cuales, estos iones se introducen a la

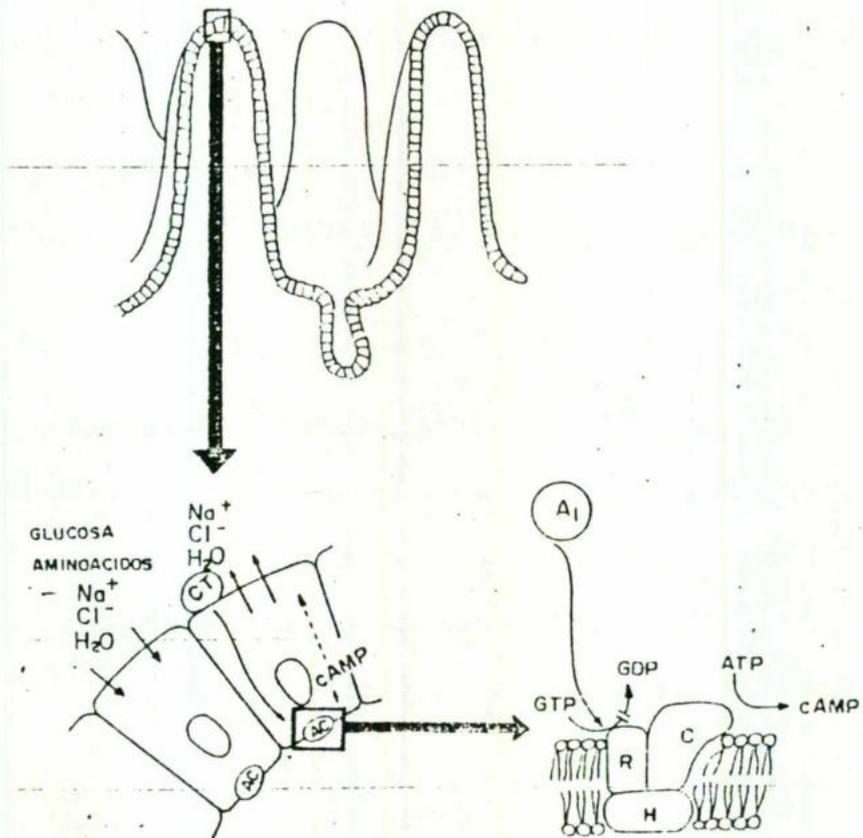


Fig. No. 14

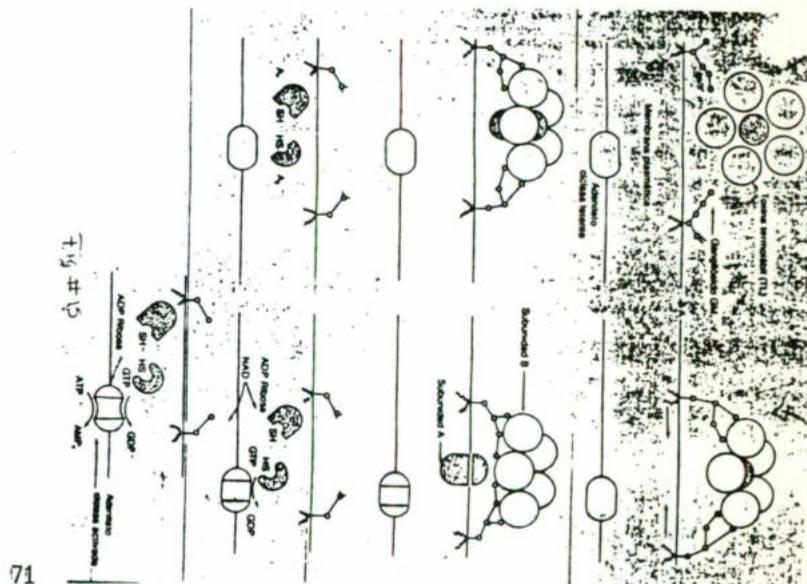
Mecanismo por el cual la toxina LT de *E. coli* causa diarrea.

célula. Este sistema es inhibido por toxinas TL , toxina colérica (TC) y AMPc. (82).

Por otro lado, la membrana de las vellosidades tiene un mecanismo para la absorción de sodio que está acoplado a la absorción de glucosa y de otros solutos orgánicos. Esta absorción de sodio acoplada a glucosa no es afectada por AMPc y sirve como base para la rehidratación oral con soluciones de electrolitos y glucosa recomendada en las enfermedades diarreicas, las que se ven afectadas en los niveles de AMP cíclico. (82).

En resumen, los efectos de la toxina TL de *E. coli* parece alterar el proceso de transporte de iones por lo menos en dos sitios diferentes por medio del AMPc. En células epiteliales vellosas el AMPc inhibe la absorción acoplada de sodio y cloro, y en las células cripticas (donde probablemente se lleve acabo la activación de la secreción por toxinas TL) el AMPc estimula la secreción activa de aniones. (82).

La fig. No. 15 muestra un resumen de lo explicado anteriormente. (82).



B.1.2. TOXINA TERMOESTABLE: (ST)

La toxina ST de la *E. coli* fue descrita por primera vez por Smith y Gyles (1970) al describir las dos distintas clases de enterotoxinas existentes en esta especie. Esta toxina retiene la mayor parte de su actividad después de ser sujeta a ebullición durante 30 minutos, de aquí el nombre de toxina termoestable (ST).(32).

En la tabla No. 6 se muestran las diferencias entre las toxinas LT y ST de *E. coli* y se observa que en contraste a LT, la cual está asociada a la célula y localizada en el espacio periplásmico (Hirst y col. 1984), ST parece ser transportada y liberada en el medio extracelular (Robertson y Aldeterre 1978). (59)(96).

Burgess y col (1978), describieron dos actividades de ST de *E. coli* (STa y STb), que fueron elaboradas por una cepa de *E. coli* patógena para cerdos y bovinos.(26). STa es soluble en metanol y activa en el ensayo de ratón lactante (que mas adelante se explicará), mientras que STb es insoluble en metanol y activa en asa ligada intestinal de cerdo o conejo, pero negativa en el ensayo de ratón lactante (Burgess y col. 1978). Hasta la fecha no se han obtenido cepas aisladas de humanos que produzcan STb.(59)(95)(96).

La tabla No. 7 muestra algunas características distintivas entre STa, STb y LT.

En la tabla No. 6 se muestran un resumen de las propiedades de las Enterotoxinas de *E. coli*.

T A B L A No. 6

PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS DE *ESCHERICHIA COLI*.

PROPIEDAD	LT	ST
Peso molecular	73,000	3,000-6,000
Subunidades	cinco B + una A	No identificada
Propiedades inmunológicas	Estrechamente relacionada a toxina de cólera y otras LTs.	No inmunogénica en estado natural.
A y B sintetizadas por separado y luego asociadas.	si	---
La subunidad B se une a la célula.	si	---
Receptor celular	Gangliósido GM1+glucoproteína y relacionada	Protelna de PM 100,000 (no GM1) aún no identificada
Sububidad A con actividad enzimática.	si	---
Internalización	Por microinvaginaciones de superficie no cubiertas.	?
Acción bioquímica	Activa la adenilato ciclasa.	Activa la guanilato ciclasa.
Acción fisiológica	Prolongada hipersecreción fluida después de una fase lag.	Hipersecreción rápida desde el principio y de corta duración.
Modo de acción	absorción-secreción Ribosilación del componente de unión de ciclasa adenilato de GTP por el ADP dependiente de NAD.	Modificación de enzimas de la membrana plasmática.
Lugar de acción	Epitelio del intestino delgado.	Epitelio del intestino delgado.
Lugar de objetivo intracelular	Superficie interna de la membrana plasmática	Superficie interna de la membrana plasmática.
Control genético en la bacteria de la toxina.	plásmido	plásmido
Métodos de ensayo	Animales, cultivos celulares, inmunoensayos, hibridización de DNA.	Modelos de animales, hibridización de DNA, inmunoensayos.
% Proteína	98	15 (variable)
% Lípidos	1	83 (variable)
% carbohidratos	1	2
Sensible a la tripsina	1	1

Sensible a calor	+	-
Sensible al ácido	+	-
Reacción de asa ligada	+	+
Neutralización por antisuero	+	-
Dializable	+	-
(25)(6)(7)		
Anticuerpos neutralizantes	produce	produce
Métodos de ensayo	Modelos animales, cultivos celulares y métodos inmuno-- lógicos.	Modelos animales cultivos celula- res, y métodos - inmunológicos.
Control genético	Cromosómico	Plásmido
Naturaleza química	Proteica	Protéica

(82)(95).

CARACTERISITCAS DISTINTIVAS DE LAS TRES DIFERENTES

TOXINAS DE *E. coli*

TABLA N° 7

CARACTERISTICAS	L T	ST a	ST b
Inicio	Lag	Inmediata	Inmediata
Duración	Prolongada	Corta	Corta
Peso molecular	86,000	2,000	5,000
Antigénicidad	Fácilmente	Haptencia	?
Bioensayos/modelos	Células CHO:Y1 Asas, 18hrs	Asas 4-6 hrs ratón lactan- te.	asas de yeyuno de cerdo des- tetado.
Solubilidad en metanol	No probada	Soluble	Insoluble.
Mecanismo	Activa la adenilato ciclase.	Activa la guanilato ciclase.	No adenila- to ciclase.
Especificidad de tejido	Promiscuo	Relativamente especifica.	Especie- especifica.

(96)(98).

La toxina termoestable, no tiene nexos con la toxina termolábil, ni con la toxina del cólera. Es una proteína, pero es poco inmunógena, también es estable ante las proteasas, y no interviene en el sistema de la adenilciclase. (50)(95)(96).

En resumen podemos decir que la toxina termoestable (ST), es producida por cepas ETEC y con péptidos pequeños de bajo peso molecular (1,000 - 6, 000) solubles en metanol y no inactivados por calentamiento. Estudios recientes de

resonancia magnética nuclear, han permitido dilucidar la configuración y sitio activo de la toxina estable al calentamiento (ST) más relacionada con diarrea en humanos.(14).

Se desconoce su receptor de la (ST) en las células del tubo digestivo, pero es distinto del receptor para la toxina termolábil. Como resultado del efecto de la toxina sobre la guanilato ciclasa, se presenta un aumento medible de GMP cíclico en el intestino delgado y grueso. Se ha sugerido que la toxina termostable altera los canales para el Ca^{++} en las membranas celulares, y que con el aumento en la captación de Ca^{++} se activa la calmodulina y tiene lugar una serie de sucesos que da como resultado final la estimulación de la guanilato ciclasa.(50).

Queda por determinarse como esta ST se pega y penetra al citoplasma celular. Ya dentro de las células epiteliales, estas toxinas (LT y ST) incrementan los niveles de GMP cíclico a través de la estimulación de la guanil ciclasa.(14).

La hibridización de DNA ha proporcionado las evidencias preliminares de la heterogenicidad molecular entre las ST activas en ratón lactante (STa) producidas por las diferentes cepas humanas (Moseley y col. 1982).El empleo de un fragmento radiomarcado de DNA que codifica para STa porcina, se empleo como una sonda para hacer hibridización y detectar las secuencias homólogas de DNA en colonias lisadas de *E. coli*, como método de selección cepas de STa +.(96).

La hibridización en condiciones estrictas permitió observar DNA que codifica para STa, en por lo menos la mitad de las cepas humanas. En condiciones menos estrictas, las cepas que previamente fueron negativas para STa, ahora dieron positividad siguiendo que hay una relación; pero no secuencias iguales de DNA en cepas de STa +. Esta sugerencia fue confirmada en un estudio subsecuente de Moseley y col. (1982), en el cual empleo una segunda para determinar genes que codifican ST-STa-H, formada por un fragmento de DNA radiomarcado que codifican para STa humana y fue empleada junto con una sonda para STa - P (porcina) construida previamente. Se sugiere que hay dos tipos de STa (una porcina y otra humana) y que presentan alto grado de homología, por lo tanto la observación de que algunas cepas de ETEC, fueron seleccionadas mediante el empleo de ambas sondas STa-H y STa-P sugiere que estas cepas de origen humano, poseen dos genes que codifican para STa y quizá estos se localizan en diferentes plásmidos. (59)(95)(96).

El mecanismo detallado por el cual la ST estimula la guanilato ciclasa en la mucosa intestinal no se conoce a fondo; en contraste al efecto de la LT sobre la adenilato ciclasa y la secreción fluida de agua y electrolitos; la acción de la ST sobre la guanilato ciclasa y la secreción fluida se produce casi instantáneamente, es de corta duración y fácilmente reversible, por lo tanto es posible que la diarrea por sí misma pueda revertir la acción de la ST por la "dilución de la toxina en los receptores mucosales". (59)(95)(96).

La acción de la ST, en contraste a la de la LT, está restringida a células intestinales y es mucho más pronunciada sobre la mucosa del intestino delgado que del colon. La guanilato ciclasa está presente en la membrana con borde de cepillo y parece ser que la ST, se ensambla a los receptores de la membrana celular con borde de cepillo y se acopla así a la guanilato ciclasa, de tal forma que se estimula la actividad de esta enzima. (59)(95)(96).

Guerrant y col. (1980) observaron que la indometacina, considerada como un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, inhibió la activación de la guanilato ciclasa intestinal inducida por ST, así como la secreción de líquidos y iones, ésta no es inhibida si se induce con un análogo estable de GMP. Esto podría suponer, en forma indirecta, que probablemente las prostaglandinas participan en la estimulación de la guanilato ciclasa inducida por la toxina ST de *E. coli*. (59)(95)(96).

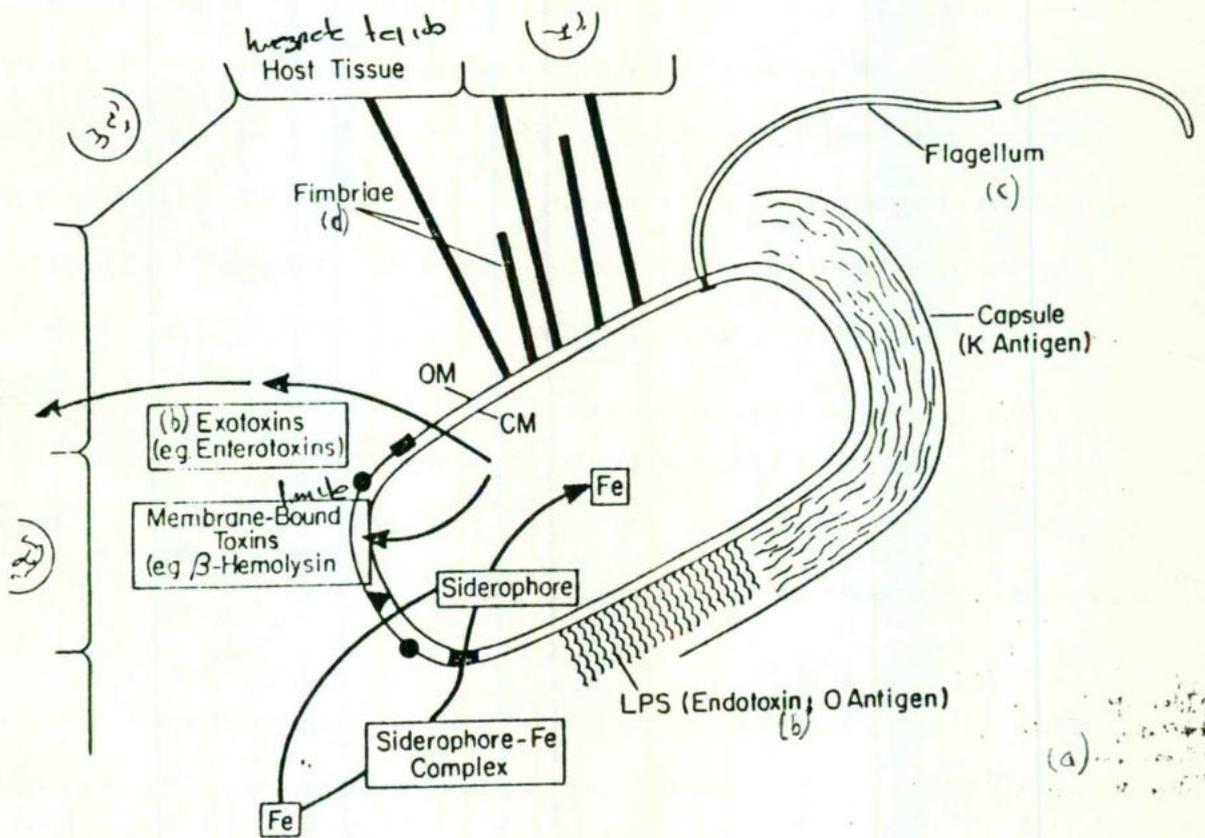
Esto podría suponer, en forma indirecta que probablemente las prostaglandinas participan en la estimulación de la guanilato ciclasa inducida por la toxina ST. Sin embargo, parece ser que el mecanismo de activación es más semejante al efectuado por hormonas que por otras enterotoxinas bacterianas. (96). Se ha sugerido que la toxina termoestable (ST) altera los canales para el Ca^{++} en las membranas celulares, y que con este aumento se activa la calmodulina y tiene lugar una serie de sucesos que da como resultado final la estimulación de la guanilato ciclasa. (50).

B.2) E N D O T O X I N A S

Los lipolisacáridos (LPS) de la pared celular de las bacterias gramnegativas puede causar hipotensión , shock, fiebre, coagulación intravascular y muerte. Debido a esta toxicidad, y al hecho de que están incorporadas a la pared bacteriana, se llaman endotoxinas. Las exotoxinas, en cambio, no son componentes estructurales de la célula y se liberan desde las bacterias, de modo que su actividad biológica es mucho mayor en filtrados de cultivos que en suspensión de células madres. Aunque la endotoxina puede también escapar a los líquidos circundantes, la célula entera de las bacterias gramnegativas retiene la mayor parte de la actividad endotóxica.

Los LPS tóxicos, o endotoxinas, de la *E. coli* son macromoléculas compuestas de tres regiones principales: lípido A, polisacárido central y antígenos "O".

***LIPIDO A:** el lípido A se compone, de glucosamina-4-fosfato, ácidos grasos de cadena larga y etanolamina. En ciertos saprófitos, la glucosamina falta en el lípido A, entonces, el lípido A es un fosfolípido poco común que usa D-glucosamina en lugar de glicerol como "esqueleto". Los disacáridos de glucosamina tienen uniones beta-1, 6 en *E. coli*. Las unidades de disacáridos parecen estar unidos entre sí por grupos pirofosfato o fosfodiéster (9). Los ácidos grasos están unidos a la subunidad de glucosamina por uniones éster o amida (9).



(59) (95) .

Fig. No. 9

Diagrama representativo de *E.coli*.

a)Estructura; b)Antigenos; c)Flagelos; d)Fimbrias.

***POLISACARIDO CENTRAL:** Esta región no sólo contiene el cetoácido (llamado KDO), nexa con el lípido A, sino también heptósa, fosfato, etanolamina y tres hexosas. Estas últimas, que consisten en galactosa, glucosa y N- acetil glucosamina, se llama centro externo, y el resto es el centro interno. Estos mutantes carecen de la enzima llamada UDP-glucosa sintetasa, de modo que la síntesis del centro no se completa (9). Otro enfoque para el aislamiento del lípido A, consiste en el uso de mutantes que sintetizan un polisacárido defectuoso que contiene únicamente lípido A y el cetoácido KDO. Los mutantes sin lípido A se han aislado, y por tanto el mismo parece ser indispensable para la supervivencia de las bacterias.

***ANTIGENO "O":** La región más externa de la molécula de LPS consiste en unidades repetidoras de oligosacáridos que contienen generalmente de 3 a 5 azúcares cada una, gracias a estos azúcares se pueden clasificar las bacterias en serotipos mediante el uso de antisueros específicos. Fructuosa y ramnosa son 6-deoxihexosas comúnmente presentes en las cadenas laterales de "O", la síntesis de cadenas laterales "O" empieza aparentemente en la superficie interna de la membrana citoplasmática, donde las unidades de oligosacáridos se construyen.

Las inyecciones de pequeñas dosis de endotoxinas en animales de laboratorio producen cambios llamativos (coagulación, temperatura corporal, metabolismo, inmunidad humoral y celular, etc.) y una dosis mas grande es letal (9).

En la fig. N° 10 se presenta un diagrama de lipopolisacárido mostrando tres regiones principales: lípido A, centro y antígenos "O". Observar la posición clave de KDO como enlace entre lípido A y polisacáridos. KDO se une por una ligadura cetoacídica a los residuos de glucosamina del lípido A (9).

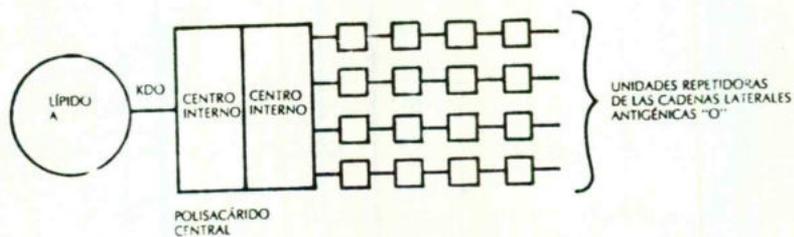


Fig. 10

En el cuadro N° 1 se presenta un resumen de las diferencias entre las EXOTOXINAS Y ENDOTOXINAS (42).

CUADRO N° 1

DIFERENCIAS DE LAS EXOTOXINAS Y LAS ENDOTOXINAS	
<i>EXOTOXINAS</i>	<i>ENDOTOXINAS</i>
Excretadas por células vivientes; se hallan en conc. elevadas en medio líquido.	*Parte integral de la pared celular microbiana de los m.o. gram negativos, liberadas al ser desintegrada dicha pared.
Polipéptidos, peso molecular 10,000-900,000	*Complejos lipopolisacáridos. Porción de lípido A quizá sea responsable de la toxicidad.
Inestables relativamente; destruidas a menudo con rapidez por calor mayor de 60° C.	*Relativamente estables; soportan calor mayor de 60°C durante horas sin pérdida de toxicidad.
Altamente antigénicas; estimulan la formación de antitoxina de título elevado. La antitoxina neutraliza la toxina.	*No estimulan la formación de antitoxina, estimulan la formación de anticuerpos al residuo de polisacárido.
Convertidas a toxoides atóxicos e antigénicos con la formalina, ácidos, calor, etc.	*No son convertidas a toxoides.
Muy tóxicas; mortales para animales de laboratorio en dosis de microgramos o menos.	*Poco tóxicas; mortales para animales de laboratorio en dosis de cientos de microgramos.
No producen fiebre en el huésped.	*Producen fiebre en el huésped con frecuencia.

(42).

B. 3) HEMOLISINAS: Una pieza importante de evidencia epidemiológica son las hemolisinas, las cuales son importantes en algunas enfermedades causadas por *E. coli*. El hallazgo más recientemente encontrado es que más de la mitad de los organismos de *E. coli* aislados en infecciones extraintestinales poseen hemolisinas, mientras que el 10% de *E. coli* aisladas del tracto gastrointestinal poseen hemolisinas y el otro 90% no lo poseen. (59).

Debido a la adquisición de hierro, el cual es esencial para la sobrevivencia de las cepas invasoras de *E. coli* en los tejidos humanos, esta especie posee dos sistemas potenciales de adquisición de hierro: Hemolisina y aerobactina. (74).

La producción de la alfa-hemolisina de *E. coli* que son proteínas de gran peso molecular que pueden ser excretadas (59), destruyen la membrana eritrocitaria y da una fuente fácil de hierro (hemoglobina) usable para la bacteria, así como la formación de quelatores (sideroforos) de hierro, de bajo peso molecular, los cuales solubilizan y sequestran hierro de los tejidos del huésped para el uso del crecimiento bacteriano. (74).

En un estudio efectuado en 1990, se encontró una baja frecuencia en la producción de hemolisina en aislados de sangre presentando un 22%, comparable con reportes previos de 1980, un 29% de los aislados de líquido cefalorraquídeo, comparado con estudios de 1988 y un 24% de los aislados de *E. coli* resistentes a antibióticos en pacientes con urosepsis los cuales expresaron hemolisinas, pero se han encontrado un % mayor en aislados urinarios. (74).

B. 4) AEROBACTINA: La evidencia reciente sugiere que la aerobactina de siderophoro hidroximato es el sistema de asimilación de hierro más importante producido por *E. coli*, durante la infección invasora. Esta aerobactina quela y secuestra hierro de los tejidos del huesped. La producción de aerobactina es detectada con mayor frecuencia en los aislados urinarios y de sangre de aislados fecales normales.(74).

En conclusión se puede decir que la aerobactina es el medio principal para que aislados de *E. coli* extraintestinal adquiera hierro, mientras que las alfa-hemolisinas pudieran servir como un medio alternativo de adquisición de hierro en ausencia de genes de aerobactina. La importancia de aerobactina en la infección humana invasora se apoya posteriormente por la presencia de síntesis de aerobactina en aislados clínicos de otras bacterias entericas incluyendo *Salmonella*, *Enterobacter* y *Shigella*.(74).

C) NUTRICION Y METABOLISMO:

Como sabemos la *E. coli* es un aerobio y anaerobio facultativo(19) (por lo que puede o no requerir de aire para su crecimiento)(50), en el intestino es principalmente anaerobio, y, puesto que sus propiedades absortivas conducen, en última instancia, a la presencia de una solución pobre en aminoácidos y azúcares en sus regiones inferiores, éstas constituyen un medio de crecimiento específico para este organismo y extrae la mayor energía posible de la fermentación.(42).

Es poco exigente en sus necesidades nutritivas por lo cual los medios de cultivo y los "caldos" proporcionan una fuente de vitaminas y coenzimas a la *E. coli* para su crecimiento y desarrollo.(42).

En la *E. coli*, la glucosa es metabolizada de manera "fermentativa" (93) primeramente a través de la vía Embden-Meyerhof y también puede ser metabolizada a través de la desviación de la *hexosa monofosfato*, que la convierte en pentosa-P pasando por P-gluconato (como se muestra en la fig. 17). En la respiración, la pentosa-P es oxidada a acetil-P y glucosa-P, y en la fermentación es convertida en fructuosa-6-P gracias a una compleja serie de transferencias de 3 carbonos (21).

Así por ejemplo, el succinato que es necesario para los procesos biosintéticos, se forma a través de una vía oxidativa en condiciones anaerobias, y mediante mecanismos reductores en condiciones aerobias. El oxígeno impide la acción de las flavoproteínas reductoras, ya que con la capacidad de utilizar al vía oxidativa crecen normalmente en ausencia de aire,

pero su crecimiento se detiene en presencia de oxígeno, a menos que el medio de crecimiento contenga succinato.(21).

La *E. coli* cuando crece en forma aerobia en un medio glucosado, tan solo oxida dicha sustancia hasta llegar a producir ácido acético y CO_2 , con una producción de ATP que es sólo el 40% del total posible; sólo cuando se produce una acumulación de ácido acético se inicia el metabolismo de este producto a través de la vía de los ácidos tricarbóxicos(43).

Este microorganismo lleva acabo una respiración anaerobia, la cual consiste en el transporte de electrones, aunque el receptor final no sea el O_2 . De esta manera la *E. coli* posee un sistema de transporte de electrones capaz de reducir los nitratos a nitritos en condiciones anaerobias, y obtener de este modo la mitad de energía que produce en la reducción de O_2 y la vía metabólica es, en todos los aspectos idéntica al de los organismos aerobios.(43).

También hay otro sistema de transporte bacteriano, en el que el primer paso del metabolismo de los azúcares, es decir la fosforilación, se produce durante su entrada en el interior de la célula de este compuesto y hay una translocación de grupos, en el que el compuesto que se libera en el citoplasma no es el mismo que ha sido captado en el medio, la *E. coli* utiliza este sistema para transportar diversos compuestos relacionados entre sí: glucosa, manosa, sus productos de reducción (sorbitol y manitol) y fructuosa.(ver fig. N° 16) (43).

PROPIEDADES FISICAS

VI-PROPIEDADES FÍSICAS

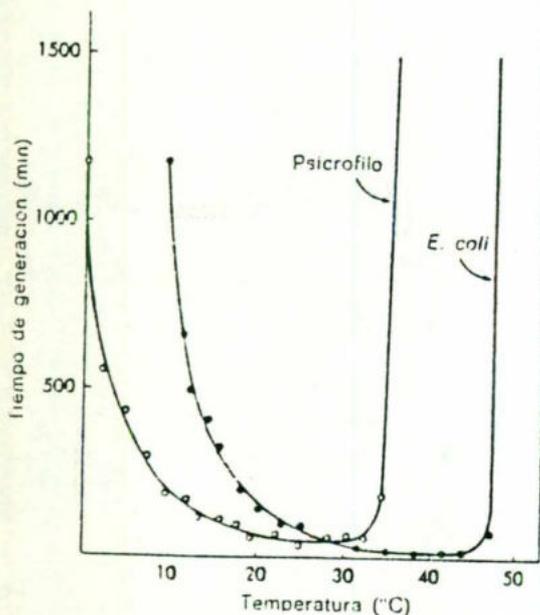
Es relativamente resistente: permanece vivo durante algún tiempo fuera del organismo (alcantarillado, agua, leche y alimentos desde horas a semanas), ya que son resistentes a la acción de los agentes ambientales, lo que condiciona su capacidad de supervivencia en el medio externo, en especial en condiciones húmedas y en aguas contaminadas. Es destruida por el calor a 60° C durante una hora. (19) (84).

A) TEMPERATURA :

Los sistemas enzimáticos de las bacterias tienen una temperatura ideal de funcionamiento en la que se conoce como "temperatura óptima". Por encima y por debajo de esta temperatura siguen viviendo las bacteria dentro de amplios márgenes; estos límites superior e inferior se llaman "temperatura máxima y mínima de desarrollo". (84).

Los límites térmicos para el crecimiento de una bacteria son una característica estable de gran valor taxonómico. En general, las bacterias se clasifican en: a) *psicrófilas* las cuales crecen mejor a temperaturas bajas (15-20°C); las formas b) *mesófilas* lo hacen mejor de 30-37°C y las formas c) *termófilas* de 50-60°C. La *E. coli* es considerada dentro del grupo b) , y algunas veces dentro del grupo a), ya que su temperatura de crecimiento esta entre 8°C y 47°C. (42)(84), siendo su temperatura optima entre 30-37°C(25)(93).

En la sig. gráfica se muestra la acción de la temperatura sobre el tiempo de generación de un mesófilo típico como lo es *E. coli*, en donde la mayor parte de esta puede crecer por encima de una temperatura de 30°C o más, si bien existe una zona muy estrecha en la que el crecimiento es óptimo. (21). El crecimiento por debajo de la zona óptima desciende y llega más rápido a una *temperatura mínima de crecimiento*. El grado de crecimiento por encima del óptimo disminuye progresivamente con el aumento de temperatura, y da origen a una *temperatura máxima*



en delimitada. (21).

mite más bajo de temperatura para el crecimiento bacteriano puede estar en relación con un fenómeno de solidificación de lípidos de membrana, o con la extremada sensibilidad de los procesos de iniciación de la síntesis proteica frente al frío. En cambio, inmediatamente por encima de las temperaturas máximas, muchas enzimas se desnaturalizan y se produce la muerte celular: en otras palabras, la célula es incapaz de producir enzimas de estabilidad superior al máximo necesario. Sin embargo, en la gama de temperaturas que disminuyen el ritmo de crecimiento, las células no mueren, sino que cambian su ritmo de crecimiento, el cual viene limitado por la disminución reversible de una enzima. (21).

Estudios de rangos de temperatura del serotipo O157:H7 de *E. coli*, en conjunción con otras formas fecales y no fecales en agua y alimentos requiriendo una temperatura de incubación de 44.5°C en el medio, y después para la fermentación de lactosa y producción de gas en caldo de sulfato de laurel(85) triptosa una temperatura de 35°C y en medios de EMB y IMVIC para el crecimiento y producción de gas una temperatura entre 44°C y 48°C (85). En medios de EMB de Difco , el incubador fue puesto en un rango de temperatura de 0°C a 50°C y tiempos de 24, 36 y 48 hrs, obteniendose los siguientes resultados:

BACTERIA	TEMPERATURAS (°C)		
	24 HRS	36 HRS	48HR
<i>E. coli</i> O157:H7	24.3-41.0	19.3-41.0	19.3-41.0
ATCC 11775	29.2-44.5	26.0-44.5	22.7-44.5

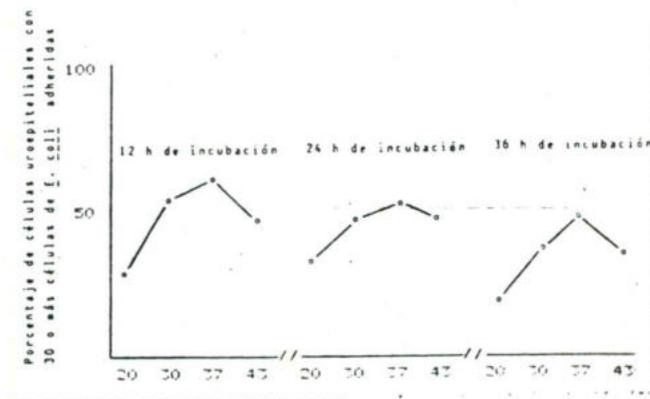
Otros estudios que se relizaron sobre la adherencia de la *E. coli* uropatógena (cepa 36692) en relación con las temperaturas . Este estudio se hizo gracias a pruebas de hemaglutinación y adherencia *in vitro* a células uroepiteleales, donde los valores de temperatura estudiados fueron de 20, 30, 37 y 43°C. Las temperaturas superiores e inferiores fueron descartadas porque afectaron el crecimiento de la bacteria. En el siguiente cuadro se observan los resultados:(25)

TEMPERATURA (°C)	TITULOS HEMAGLUTINANTES A DIF. TIEMPOS DE INCUBACION.		
	12 HRS	24 HRS	36 HRS
0	8	4	4
30	16	8	8
37	16	8	8
43	8	4	4

Esto explica que la temperatura utilizada en el trabajo no afecta el crecimiento bacteriano pero inhibe la capacidad hemaglutinante y de adherencia de las células epitelesiales(25). En la tabla anterior se observa que la *E. coli* 36692 a las 12 hrs de cultivo incubada a 30° y 37°C alcanzó el mayor título hemaglutinante (la adherencia bacteriana constituye el primer evento infeccioso bacteriano entre el hombre y la bacteria)(80); el efecto inhibitorio puede deberse a la acción que ejerce la temperatura sobre la pilina o bien a un mecanismo indirecto sobre alguna proteína involucrada en la síntesis o ensamble de la estructura fimbrial(25).

Además del efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento, las temperaturas extremas matan a las bacterias. El calor extremo se utiliza para esterilizar las preparaciones(42), el agua hirviendo a 100°C aplicado durante 10 a 30 minutos, por no formar esporas puede ser destruida por ebullición durante 5 minutos por procedimiento de pasteurización, el frío extremo también destruye las células microbianas debido a

un fenómeno llamado "shock por enfriamiento", en donde las células reciben la muerte por un enfriamiento rápido, lo que no se observa con el enfriamiento gradual o con pases progresivos a distintas temperaturas, por ejemplo en *E. coli* el enfriamiento rápido de desde 37°C a 5°C puede matar al 90% de las células en crecimiento (21)(42).



Porcentaje de adherencia a células epiteles de *E. coli* uropatógena a diferentes temp. y tiempos de incubación.

En la siguiente tabla N° 8 se muestra una serie de propiedades que muestran las toxinas termolábil y termostable ante los diferentes factores físicos y químicos.

TABLA No. 8

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS TOXINAS DE <i>E. coli</i>		
PROPIEDAD	L T	S T
% de proteína	98	15
% de lípidos	1	83
% de carbohidratos	1	2
sensibilidad a tripsina	+	-
sensibilidad al ácido	+	-
antigenicidad	+	-
neutralización por antisuero	+	-
dializable	-	+
sensibilidad al calor	+	-
destrucción al calor a 100°C por 10 minutos.	+	-
resistencia al calor a 60°C por 30 minutos.	-	+

(32).

*los flagelos pueden ser desnaturalizados por acción del calor a 100°C durante 20 minutos, con ácido ó alcohol.(21).

B) p H:

La mayoría de los microorganismos tienen una gama de pH bastante estrecha, y debe determinarse empíricamente el pH óptimo, casi todos los neutrófilos crecen mejor en un pH de 6.0 a 8.0, por lo que toleran cambios de pH de hasta 3 y 4 unidades, pero todo cambio superior a 1 unidad afecta el crecimiento. *E. coli* pues no tolera un pH superior a 8 ni inferior a 4.5.(21)(42).

Las bacterias regulan su pH interno a pesar de los amplios límites de valores de pH externo, el cual es regulado por un conjunto de sistemas de transporte de protones en la membrana citoplásmica, incluyendo una bomba primaria de protones manejada por el ATP y un intercambiador de Na^+/H^+ , también se ha propuesto que el sistema de intercambio de los iones K^+/H^+ también contribuye a la regulación del pH interno en los neutrófilos(42).

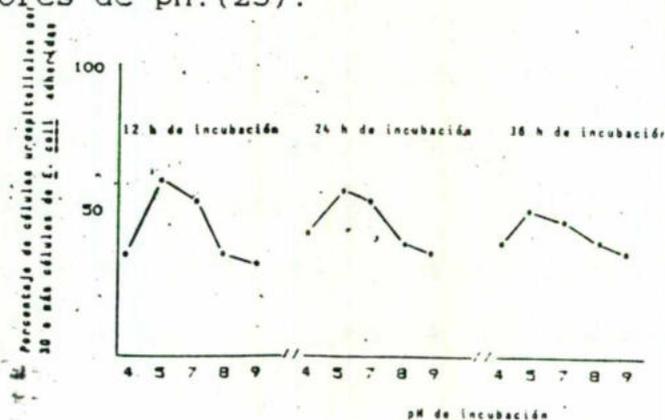
El pH también se estudio sobre la adherencia de *E. coli* uropatogena fimbriada a células uropiteleales, con la técnica de hemaglutinación, el cual se demostró que si afecta inhibiendo la capacidad hemaglutinante(7) , los valores para su estudio que se usaron fueron pH 4, 5, 7, 8, y 9 , los medios con pH superior e inferior se descartaron porque afectaron notoriamente el crecimiento de la cepa bacteriana en estudio, y se obtuvieron los siguientes resultados:(25)

pH de incubación	TITULO HEMAGLUTINANTE A DIF. TIEMPOS DE INCUBACION		
	12 HRS	24 HRS	36 HRS
20	8	4	4
30	16	8	8
37	16	8	8
43	8	4	4

(33).

Podemos decir que el pH (4-9) no afecto el crecimiento bacteriano pero si inhibio la capacidad hemaglutinante y de adherencia a células uroepiteleales, esta acción puede deberse a la misma acción de la temperatura sobre la pilina, o bien a un mecanismo indirecto sobre alguna proteína involucrada en la síntesis como se explicó anteriormente(25), aun pH de 5 y 7 se estableció el mejor título hemaglutinante pero el número de bacterias adheridas por célula epiteleal fue mayor a pH 5, debido a la fuerza iónica, ya que estimula la interacción adhesiva entre la fimbria y los receptores epiteleales (25)

La siguiente gráfica muestra el porcentaje de adherencia a células uroepiteleales de *E. coli* cultivada a diferentes valores de pH.(25).



Se puede observar en la grafica anterior que el mayor promedio de bacterias adheridas por células uroepiteleales se logró a pH 5 y 7 en las primeras horas de cultivo.(25).

C) RADIACION ULTRAVIOLETA :

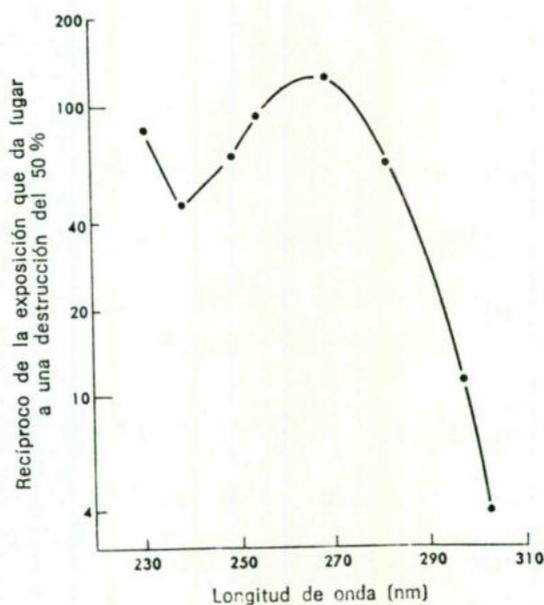
Utilizando radiaciones de onda cada vez más corta, se produce una esterilización bacteriana a partir de 330 nm, que , desde este punto aumenta rápidamente. El efecto esterilizante de la luz solar se debe principalmente a su contenido en luz UV (300-400 nm). La mayor parte de la luz UV que llega a la atmósfera, así como todos los tipos de luz cuya longitud de onda es menor de 290 nm, es eliminada por el ozono que se encuentra en la parte más externa de la capa atmosférica; si no fuese así, los seres vivos no podrían sobrevivir en la superficie terrestre. (43).

La absorción de luz UV por las bacterias se debe principalmente a las purinas y pirimidina de los ácidos nucleicos, que alcanzan un máximo de 260 nm.(43).

El espectro de esterilización (es decir, la eficacia de la esterilización por radiaciones de longitud de onda distinta; como se muestra en la fig. 17) está relacionado con el espectro de la absorción de las bacterias lo que sugiere que la absorción de radiaciones por los ácidos nucleicos o por las proteínas puede tener un efecto letal. (21)(43).

En un estudio sobre *E. coli* fimbriada (*E. coli* Fim +) se demostró que se podía obtener una mutante no fimbriada llamada (*E. coli* Fim -) por delección mutagénica con luz ultravioleta, se hizo actuar luz UV (235nm) sobre 10×10^8 bact/ml, considerándose 0.1% de sobrevivencia.(80).

En la fig. 17 se muestra el espectro de la acción destructora de los UV sobre *E. coli* (ordenadas: valor recíproco de la energía incidente necesaria para una destrucción del 50%). También existen lesiones por radiaciones, como son las lesiones del DNA, que impiden la replicación de la bacteria (mutaciones).(21)(43).



Las lesiones en otras regiones de la célula apenas tienen importancia. Así, al aislar el represor del fago lambda, Ptashne utilizó *E. coli* tan enormemente irradiadas que prácticamente la totalidad de su DNA era incapaz de transcribir.(21).

Considerando a la adherencia como el primer evento infeccioso bacteriano, se han desarrollado una serie de investigaciones tendientes a impedir el fenómeno adherente como, temperatura, pH, concentraciones de NaCl, etc.(80).

D) DETERGENTES: Estos actúan disolviendo los lípidos de la membrana celular. Las bacterias gramnegativas tienden a ser cuantitativamente más resistentes a los detergentes iónicos (que lisan la célula por acción sobre su membrana). (21).

E) AGENTES QUELANTES: El LPS es accesible a los anticuerpos que se encuentran situados en la superficie celular. Su unión a la membrana no se realiza de manera uniforme, ya que, en *E. coli*, es posible liberar casi la mitad de los LPS por tratamiento con un compuesto quelante de metales, la etilendiamina del ácido tetracético (EDTA) mientras que el fenol solubiliza la totalidad del LPS.(21).

F) CINÉTICA: La sensibilidad de un organismo al calor se expresa generalmente en la práctica en forma del *punto de muerte térmica*: dicho punto corresponde a la temperatura mínima que da lugar a la esterilización de un caldo de cultivo de un volumen determinado expuesto a dicha temperatura

durante 10 minutos. Dicho valor es de unos 55°C para *E. coli.*(21).

PROPIEDADES QUÍMICAS

VII-PROPIEDADES QUIMICAS

A concentración suficientemente elevada, muchos agentes químicos, tienen una acción bacteriostática e incluso bactericida. La palabra desinfectante se limita a sustancias que tienen una rápida acción bactericida a baja concentración (21). Las bacterias gramnegativas como la *E. coli* tienden a ser cuantitativamente más resistentes a los detergentes iónicos (que lisan la célula por acción sobre su membrana).(43), y excepto la benilpenicilina, son intrínsecamente sensibles a concentraciones factibles séricas y tisulares de casi todos los antimicrobianos.(9).

A) MERCURIALES: durante muchos años, en medicina se han utilizado diversas formas de mercurio. El cloruro de mercurio, alguna vez popular como desinfectante, es muy tóxico y actualmente de uso limitado. Los mercuriales orgánicos como metafen, mertiolate y mercurocromo son menos tóxicos y, aunque no confiables como desinfectantes de la piel, son útiles como agentes antisépticos. Las sales de fenilmercurio se encuentran entre los inhibidores más eficaces de bacterias gramnegativas y grampositivas.(43).

El siguiente cuadro muestra la mayor dilución de diferentes desinfectantes que destruyen a la *E. coli* luego de 10 minutos pero no después de 5 minutos a 37°C:(32)

NITRATO DE FENIL-MERCURIO	MERTIOLATE	METAFEN	MERCURIO- CROMO	CLORURO DE MERCURIO	FENOL
1:48.000	1:32.000	1:32.000	1:180	1:10.000	1:75

B) CONCENTRACIONES DE NaCl :

En un estudio se comprobó que la cepa bacteriana de *E. coli* uropatógena, era capaz de crecer a concentraciones de NaCl entre 0 y 50 g/litro.(25), pero afectó notoriamente la hemaglutinación llegando incluso a la falta de ésta, también se recubrió la *E. coli* de una pseudocápsula mucosa fácilmente detectable a nivel de colonia y a través del microscopio. Esta pseudocápsula probablemente recubrió las fimbrias bloqueando el contacto con los receptores de eritrocitos y células uroepiteliales e impidiendo, de este modo, la adherencia (25).

A continuación se muestran los resultados obtenidos de títulos hemaglutinantes de *E. coli* uropatógena cultivada a diferentes concentraciones de NaCl y tiempos de incubación: (25)

TITULOS HEMAGLUTINANTES A DIFERENTES
TIEMPOS DE INCUBACION.

CONCENTRACION NaCl (g/litro)	12 hrs	24 hrs	36 hrs
0	8	4	4
20	8	4	2
30	4	4	0
40	0	0	0
50	0	0	0

Como se observa el factor físico que alteró de manera más severa el título hemaglutinante y la inhibición de la adherencia a células epiteliales, fueron las concentraciones de NaCl.(25).

C) HALOGENOS: como el cloro y el yodo se encuentran entre los más útiles desinfectantes del agua y de la piel, son efectivos contra agentes como la *E. coli*. Son únicos entre los desinfectantes porque su actividad es casi exclusivamente bactericida. El yodo en forma de yodo molecular con un pH debajo de 6, se manifiesta su máxima acción bactericida.(43).

El cloro es uno de los agentes bactericidas más potentes, la acción desinfectante de todos los compuestos clorados es el resultado de la liberación de cloro libre.(43).

D) PEROXIDO DE HIDROGENO: en una solución al 3% el peróxido de hidrógeno es un antiséptico inocuo pero débil. La acción antibacteriana del peróxido de hidrógeno habitualmente se atribuye a su capacidad oxidante, es probable que la formación de radicales hidroxilo libres del peróxido sea en gran parte de esta actividad, este también puede causar una gran toxicidad en las células de *E. coli*, y dañando su DNA(42). Como desinfectante de materiales inanimados, el peróxido es muy útil y efectivo. Su empleo se ha incrementado en los últimos 10 años, especialmente para la desinfección de dispositivos médico-quirúrgicos y lentes de contacto de plástico

blando , por ejemplo para la desinfección de lentes con solución de peróxido de hidrógeno al 3% para la *E. coli* se requiere un tiempo de 3 minutos de exposición para disminuir el inóculo a 0.5 organismos por ml. (43).

E) COLORANTES: algunos de los colorantes de alquitrán de hulla especialmente los trifenilmetanos y las acridas, no sólo tiñen las bacterias sino que también son inhibidoras en muy altas diluciones. Dentro del rango de pH, los colorantes básicos son los más efectivos. De los colorantes de anilina, los derivados del trifenilmetano, especialmente el verde de malaquita, verde brillante y cristal violeta, han sido utilizados con muchos propósitos. La acción del cristal violeta se atribuye a su interferencia con la síntesis del componente glucopéptido de la pared celular.(43).

En el siguiente cuadro muestra las diluciones máximas de colorantes de trifenilmetano que inhiben el crecimiento en 24 horas de la *E. coli*:(43)

VERDE BRILLANTE	VERDE DE MALAQUITA	CRISTAL VIOLETA
1:675.000	1:40.000	1:85.000

A continuación se presenta una comparación de diferentes desinfectantes para la esterilización de un termómetro clínico:

<i>E. coli</i>	SOLUCION YODADA 2%	TINTURA DE YODO 2%	ALCOHOL ETILICO PESO /VOL 95%	ALCOHOL ETILICO PESO/VOL 70%	ALCOHOL ETILICO PESO/VOL 50%	ALCOHOL ISOPROPILO PESO/VOL 70%	ALCOHOL ISOPROPILO PESO/VOL 50%
CONTROL	+	+	+	+	+	+	+
80 seg.	+	+	+	+	+	+	+
100 seg.	0	0	+	+	+	+	+
120 seg.	0	0	+	0	0	0	0

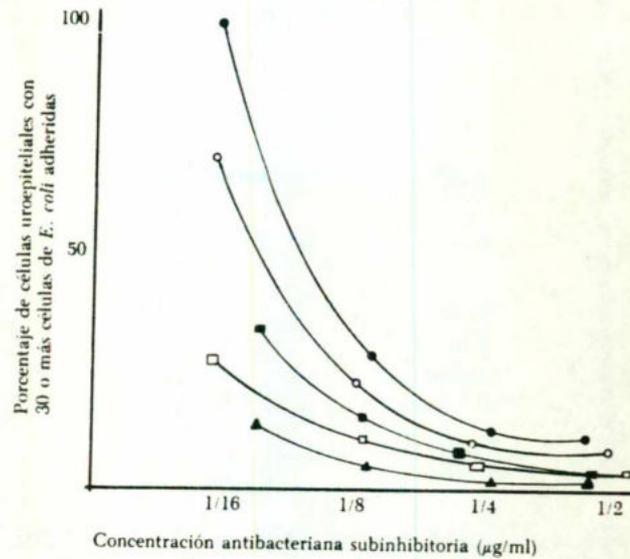
F) ANTIBACTERIANOS:

Los procesos de síntesis de los componentes de la pared bacteriana constituyen con frecuencia los puntos de acción selectiva de los antibióticos; hasta el momento se han identificado diversos puntos específicos de inhibición.(21). Los microorganismos más estudiados a nivel del mecanismo de adhesión han sido los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y de estas bacterias sobresalen los estudios efectuados en cepas de *E. coli* aisladas de cuadros diarreicos y de cepas uropatógenicas. Es así que actualmente existe un enfoque para la erradicación del proceso de adherencia bacteriano, y es el empleo de concentraciones subletales de antimicrobianos(80) . Se hicieron estudios con cepas de *E. coli* fimbriada (*E. coli Fim +*) y de su mutante no fimbriada (*E. coli Fim -*) para evidenciar la acción de algunos antimicrobianos utilizados a concentraciones subletales

sobre la propiedad de adherencia a células uroepiteliales y hemaglutinantes de *E. coli Fim +* (80).

En la siguiente figura se aprecia el efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la adherencia de *E. coli Fim +*:

- Ampicilina
- Acido nalidixico
- Gentamicina
- Nitrofurantoina
- ▲ Sulfametoxazoltrimetoprim



En la tabla siguiente se aprecia las concentraciones mínimas inhibitorias de varios antimicrobianos frente a *E. coli Fim +* y *E. coli Fim -*, destacando la gran sensibilidad de ambas cepas:

AGENTE ANTIBACTERIANO	<i>E. coli Fim +</i> CMI (ug/ml)	<i>E. coli Fim -</i> CMI (ug/ml)
NITROFURANTOINA	8	8
AMPICILINA	2	2
AC. NALIDIXICO	8	8
GENTAMICINA	2	2
SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIM	4	4

En la siguiente tabla se muestran las propiedades hemaglutinantes de *E. coli Fim +* frente a diversas concentraciones subletales de antimicrobianos, donde se observa que la *E. coli Fim -* fue incapaz de aglutinar eritrocitos en presencia o ausencia de antimicrobianos.(80).

HEMAGLUTINACION EN PRESENCIA DE FRACCIONES DE CMI (UG/ML)					
ANTIBACTERIANO	1/16	1/8	1/4	1/2	CONTROL
AMPICILINA	+	+	-	-	+
SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIM	-	-	-	-	+
NITROFURANTOINA	-	-	-	-	+
AC. NALIDIXICO	+	+/-	-	-	+
GENTAMICINA	-	-	-	-	+

+ HEMAGLUTINACION POSITIVA

+/- HEMAGLUTINACION DEBIL

- HEMAGLUTINACION NEGATIVA

* SIN AGENTE ANTIBACTERIANO

En el microscopio electrónico reveló que todas las concentraciones subletales de antimicrobianos utilizados, solamente 1/16 de la CMI de ampicilina y ácido nalidixico permitió el crecimiento de células de *E. coli Fim +*, las que también conservaron las propiedades hemaglutinantes y de adhesión a células uroepiteleales. Las demás concentraciones subletales de antimicrobianos inhibieron la capacidad adherente y hemaglutinante de *E. coli Fim +*, no *E. coli Fim -*, los agentes antibacterianos más efectivos en la inhibición de la adherencia

serían aquellos que inhiben directamente la síntesis de algunos factores citoplasmáticos, que de alguna u otra forma, están relacionados con los componentes básicos fimbriales. Así, ni ampicilina que actúa inhibiendo enzimas biosintetizadoras del peptidoglicano, ni el ácido nalidixico que actúa a nivel de la replicación del DNA bacteriano tendrían efecto sobre la fimbriación de *E. coli Fim +* a una concentración de 1/16 por debajo de la CMI. El mejor efecto antifimbrial estaría dado por aquellos antibacterianos que actúan directamente sobre la síntesis protéica de la célula procariótica.(80). El mejor efecto inhibidor de la adherencia lo presentó gentamicina, nitrofurantoina y sulfametoxazoltrimetoprim, pero cuando se aumentó la concentración total de los antimicrobianos utilizados, el efecto antiadherente tiende a ser igual para todos los antimicrobianos.(80).

*PENICILINA: fue identificada como un agente lítico, que bloquea la formación de enlaces cruzados en el peptidoglicán. Los modelos atómicos que se han construido demuestran que la penicilina es, en parte, un análogo de la D-ala-D-ala, y que posee el enlace peptídico excepcionalmente reactivo situado en el anillo del antibiótico, el cual corresponde al enlace que se rompe durante la reacción de transpeptidación. Como resultado de esta reactividad la penicilina bloquea irreversiblemente la reacción que da lugar a la formación de enlaces cruzados en extractos de *E. coli*, probablemente debido a la formación de una enzima peniciloil estable (en lugar de la enzima normal, de tipo peptidil, que es transitoria).(21).

clase de plásmidos que portan genes para la resistencia a uno y a menudo a varios medicamentos y metales pesados (42).

*CEFALOSPORINAS: son medicamentos β -lactámicos con mecanismos de acción comparables a los de la penicilina, incluyendo la adhesión a receptores y la inhibición de la transpeptidación final del peptidoglicán de la pared celular bacteriana (42). Las concentraciones mínimas inhibitorias habituales ($\mu\text{g/ml}$) de estas cefalosporinas son:

	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)
CEFAZOLINA	0.8
CEFALOTINA	6.0
CEFACLOR	3.0
CEFALEXINA	12
CEFOXITINA	2.0

*AMINOGLUCOSIDOS: todos inhiben la síntesis proteínica de las bacterias insertandose y bloqueando la función de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, estos son mucho más activos en pH alcalino que en pH ácido, estos son empleados principalmente en bacterias gramnegativas entéricas. (42). Las concentraciones mínimas inhibitorias para la *E. coli* son:

	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)
ESTREPTOMICINA	4.0 - 2.5
KANAMICINA	3.0
GENTAMICINA	2.0
AMIKACINA	2.0 - 4.0

Como se ha indicado, la membrana externa de las células gramnegativas limitaría el acceso de la penicilina a sus puntos de acción. Por esta razón, la efectividad de la ampicilina y de la penicilina G sobre extractos de *E. coli* es la misma, pero la primera es más efectiva cuando se trata de células intactas, probablemente debido a que la presencia de cargas positivas adicionales favorecen su paso através del LPS, la carga la cual es negativa. Además, las mutaciones que afectan al LPS producen variaciones en la sensibilidad del microorganismo a la penicilina(21)(59). Amidinopenicilinas son útiles frente a la *E. coli*, y las alfa-amino-bencil penicilinas son sensibles a la *E. coli*. La ampicilina inhibe cepas sensibles de *E. coli* en concentraciones de 3.0 µg/ml o menos. A continuación se presenta una comparación entre las concentraciones inhibitorias mínimas habituales (µg/ml) de penicilina G, ampicilina para bacilos entéricos como la *E. coli*: (84)

ANTIBIOTICO:	BENCIL PENICILINA	AMPICILINA	CARBENICILINA	PIPERICILINA
CONCENTRACION(µG/ML):	100.0	1.6 - 500	12.0	3.1 - 500

*SULFONAMIDAS: el mecanismo básico de acción de todos estos compuestos parece ser la inhibición competitiva en la utilización del ac. p-aminobenzoico (PABA)(42). El mecanismo de resistencia a la sulfonamida (SA) en cepas de *E. coli* que contienen el factor de resistencia llamado factor R se ha explicado por disminución de la permeabilidad de la membrana celular a la sulfonamida (9), los factores R constutuyen una

Las concentraciones inhibitorias mínimas habituales ($\mu\text{g/ml}$) de *clorafenicol* son de 6.0 - 12.0 y de *tetraciclina* es una concentración mínima de 6.0 - 50.0.(84), para inhibir a *E. coli*. (84). El *trimetropim* solo, se requiere una concentración mínima de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ y de *sulfametoxazol* solo de 3.0 $\mu\text{g/ml}$. Los bacilos gramnegativos como la *E. coli* son también susceptibles al ácido *nalidixico* en concentraciones de 20 a 50 $\mu\text{g/ml}$.(84).

G) OTROS AGENTES: como el EDTA el cual provoca una lesión de la membrana de los esferoplastos, si se emplea un choque osmótico, exponiendo las células a la acción del EDTA en un medio hipertónico para ser diluidas a continuación en una solución fría de escasa fuerza osmótica en la cual se lesionan las tres capas. Así pues el EDTA libera gran cantidad de LPS y aumenta la permeabilidad de la membrana externa.(33).

En la siguiente tabla se encuentran resumidas las características bioquímicas de *Escherichia coli*:

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *Escherichia coli*

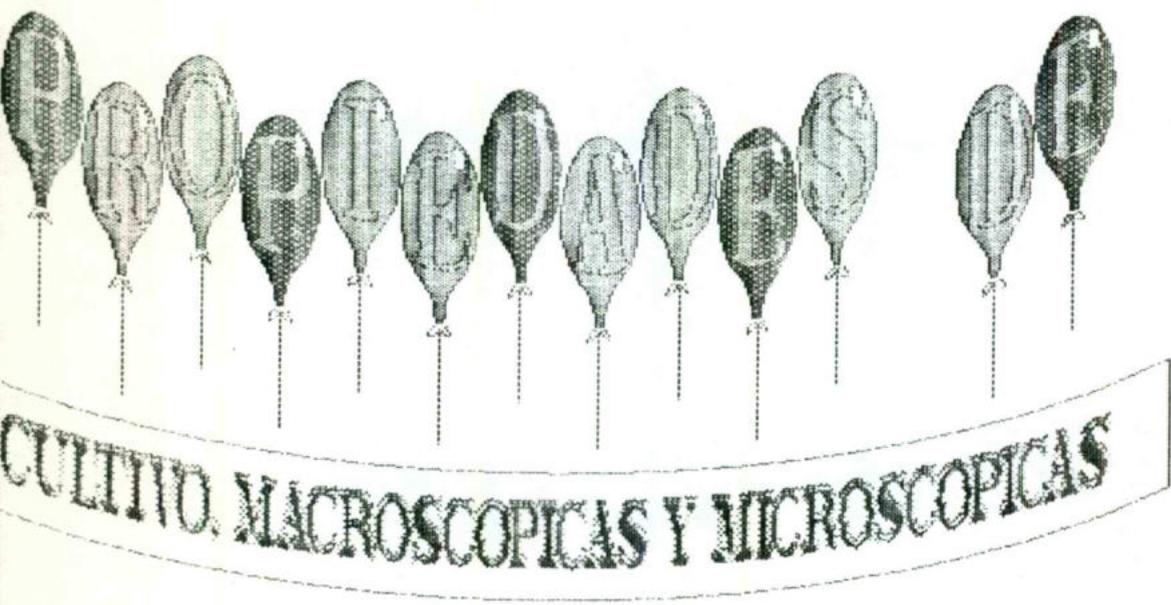
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Catalasa	+
DNasa	-
Oxidasa	-
Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Lisina	
Motilidad	V
Ornitina	V
Utilización del Citrato	-
Ureasa	-
Reducción de nitrato	+
ONPG	+
Crecimiento de KCN	-
Fermentación	Mezcla de ácidos
Gas de glucosa	+
ACIDO DE:	
Arabinosa~	+
Lactosa~	+
Maltosa~	+
Manitol~	+
Sorbitol~	V
Trehalosa~	+
Adonitol	V
Inositol	-
Dulcitol°	V
Esculina°	V
Salicina°	V
Sacarosa°	V
Xilosa°	+

 % Moles en G + C 50 - 51

~ Puede ser tardío

° Variable para diferentes cepas

Tomado de Sussmán M. 1985. *Escherichia coli* in Human and Animal Disease. ed: M. Sussman. Academic Press. y basado en el Lenette 1989. (53)(95).



VIII) PROPIEDADES MICROSCÓPICAS

Son bacterias gramnegativas de forma bacilar, aproximadamente de 1 a 3 μm X 0.4 a 0.6 μm , que se presentan solos, en pares y agrupados en cortas o largas cadenas.(19). La *E. coli* por microscopía electrónica o bien por otras pruebas (aglutinación o hinchazón capsular) puede reconocerse una *cápsula* ó *microcápsula* (en algunas cepas)(49), compuesta de polisacáridos ácidos (llamados antígenos K) pero generalmente son no capsulados(93), también puede reconocerse en esta especie *cilios* o *flagelos peritricos* en toda su periferia, ya que la mayoría son móviles (pero no en su totalidad) por lo que multiplican su radio, también "*pili*" o *pelos sexuales*, los cuales son más pequeños que los flagelos. No forman esporas .(42)(84)(93).

En la fig. 9 (ver pag. 80,) se muestra la morfología, los flagelos (antígenos K), así como los "*pili*" de la *E. coli* vistos en un microscopio electrónico.(43).

En la fig. 19 se muestra la *Escherichia coli* vista en un frotis de gram, se ve la forma bacilar característica.(30).



IX) PROPIEDADES DE CULTIVO

Son poco exigentes en sus necesidades nutritivas, lo que permite desarrollarse en medios de cultivo comunes de laboratorio (16). En caldo simple, crece en abundancia formando una turbiedad uniforme, en anillo pero no en película, con fuerte olor fecaloide (15). Para el aislamiento directo de *E. coli* se recomiendan los medios menos inhibidores como el agar EMB y el agar Mac Conkey, también deben emplearse placas de agar sangre, porque algunas cepas enteropatógenas no se desarrollan en agar Mac Conkey, pero si crecen en placas de agar sangre (la mayoría de las cepas son no hemolíticas)(24).

Es aerobio y anaerobio facultativo y el crecimiento tiene lugar entre 10° y 45°C, siendo la temperatura óptima entre 30° y 37°C (27) (15), proliferan con rapidez en medios sin sangre y en muchos alimentos comunes (embutidos, leche, emparedados, etc)(31).

Cuando se busca *E. coli* en un material natural, constituye una ventaja el sembrar los microorganismos obtenidos, sobre un medio diferencial. Un medio diferencial es aquel que provocará que las colonias de un tipo particular de *E. coli* tenga un aspecto distintivo, tal es el caso del medio EMB, en el cual este microorganismo crece y da un "resplandor metálico" característico(23).

E. coli no crece en medios de KCN (27), y crecen en medios con una baja concentración de nitrógeno y de fósforo,

una elevada concentración de hidratos de carbono (30), acetato de sodio , y colorantes de anilina los cuales inhiben casi a todas las bacterias grampositivas, pero es menos resistente que la *Salmonella* al verde brillante (19).

Hay cepas que fermentan la lactosa tardíamente, de forma irregular, o no lo hacen en absoluto. La *E. coli* produce ácidos y gas a partir de una amplia variedad de hidratos de carbono, aunque hay cepas anaerógenas (que no forman gas), debido a que fermentan a la glucosa dando lugar a la producción de ácido pero no de gas.(32)(30).

El pH favorable para su desarrollo es de 7.0.(15).

Si se intenta aislar de las materias fecales a *E. coli* que producen diarrea (EPEC, EPEC y EIEC), no se recomiendan caldos de enriquecimiento con tetracionato y selenito, ya que ambos resultan inhibidores para la mayoría de las cepas de *E. coli*. En tales casos se emplearán medios menos inhibidores (Agar Mac Conkey ó EMB).(24)(36).

También deben emplearse placas de agar sangre, porque hay algunas cepas enteropatógenas que no se desarrollan en agar Mac Conkey, pero si crecen en placas de agar sangre. La mayor parte de las cepas son no hemolíticas.(24).

PROPIEDADES MACROSCÓPICAS

En agar la *E. coli* forma colonias circulares de 3 a 5 mm, convexas de borde continuo o ligeramente ondulado (19) más o menos de apariencia reluciente y mucoide, de lo que depende en parte de la producción de estructuras superficiales de polisacáridos de color blanco o ligeramente amarillentas(9)(42) En medios diferenciales como el EMB (eosina y azul de metileno) las colonias son de aspecto distintivo a las demás especies, ya que producen un " *resplandor irridiscente*" característico sobre el medio y de color morado-negruzcas (19).

Las cepas lisas (L) forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser subcultivadas repetidamente en medios artificiales se convierten en cepas rugosas (R) que forman colonias granulares, a veces angulosas y opacas. Las variantes encapsuladas producen colonias mucoides, especialmente si son incubadas a bajas temperaturas (19)(21).

Las colonias del colibacilo en gelosa sangre después de 24 hrs. a 37°C, son circulares, aplanadas, lisas, incoloras y miden aproximadamente 2 mm de diámetro en algunas cepas las colonias se encuentran rodeadas de una zona hemolítica(la hemólisis es importante para diferenciar las cepas de *E. coli*) y se emulsionan con facilidad.(19).

En agar Mac Conkey las colonias son de color rojizo debido a que fermentan la lactosa(19).

RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS COLONIAS DE *E. COLI* EN LOS DIFERENTES MEDIOS:

MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIO:

*AGAR EMB: (Agar eosina- azul de metileno), las colonias de *E. coli* muestran generalmente un centro oscuro y tienen un brillo verdoso metálico. Ocasionalmente se observan variantes sin dicho brillo, algunas variantes pueden formar colonias mucoides.(13)(27).

*AGAR MAC CONKEY: las colonias aisladas de estas bacterias, son de color rojo ladrillo y pueden estar rodeadas de una zona de bilis precipitada. Esta reacción se debe a la acción de los ácidos producidos por la fermentación de la lactosa sobre las sales biliares y a la siguiente absorción de rojo neutro. Las colonias son rojas y opacas.(27)(38).

*AGAR SULFITO DE BISMUTO (WILSON BLAIR): la *E. coli* por lo general esta totalmente inhibida. Algunas veces se encuentra una cepa que forma pequeñas colonias superficiales brillantes de color pardo-negrusco, marrón ó verdoso. Este color se limita a la colonia en sí y no muestra brillo metálico)(13)(27).Colonias no viscosas.(23).

AGAR DESOXICOLATO (ADC): las colonias se presentan pequeñas y de color rojo intenso.

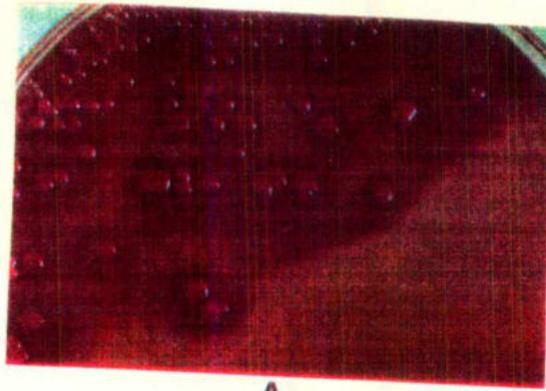
*AGAR ENDO: los fermentadores de lactosa como la *E. coli* aparecen de color rosa a rojo, y los fuertes productores de ácido como esta especie, pueden teñir el medio que rodea a las colonias o producir un brillo metálico por reacción con la fucsina básica.(38).

MEDIOS SELECTIVOS:

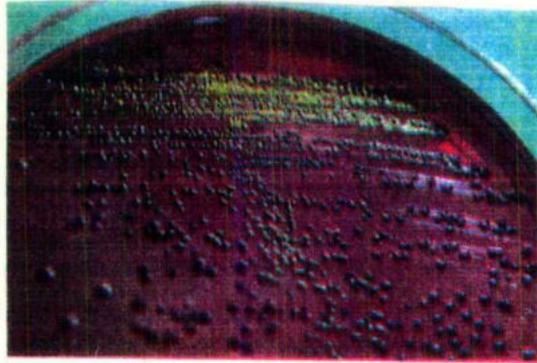
*AGAR SS: las colonias como son fermentadores de lactosa se colorean de color rojo a rosado, o colonias incoloras de centro rosado.(13)(38).

*AGAR HEKTOEN (HE): los fermentadores rápidos como la *E. coli* son moderadamente inhibidos y forman colonias de color naranja brillante a rosa salmón.(38).

*AGAR XILOSA LISINA (XLD): la *E. coli* puede utilizar más de un hidrato de carbono y formar colonias de color amarillo brillante y opacas.(13)(38).



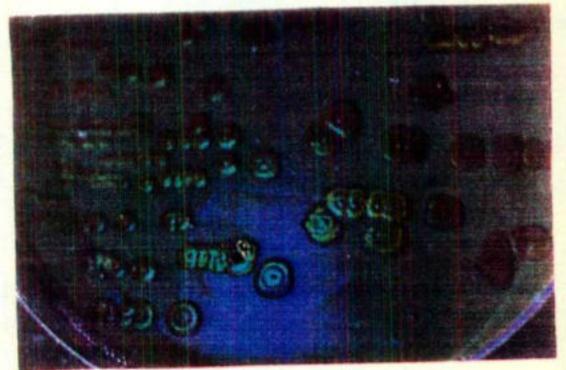
A
Agar MacConkey



D
AGAR EMB



AGAR EMB



AGAR EMB

PATOGENIA

XI-P A T O G E N I A

A) PATOGENIA GENERAL:

Escherichia coli es considerada generalmente un comensal normal del conducto gastrointestinal, a partir de donde puede diseminarse para infectar elementos anatómicos vecinos si se interrumpen las barreras normales.(39).

A. 1) INFECCIONES DE LAS VIAS URINARIAS:

Las infecciones de las vías urinarias constituyen un conjunto de padecimientos con muy variada etiología, patogenia y localización. En términos generales pueden ser clasificados en tres grupos: uretritis, cistitis y pielonefritis.(52). *E. coli* es el agente infeccioso responsable de más del 90% de las infecciones urinarias, incluyendo cistitis, pielitis, pielonefritis y bacteriuria asintomática; el resto es causado por diversos microorganismos principalmente bacterianos, aunque pueden ser cuasados por virus, parásitos, e inclusive por agentes no infecciosos (39)(52). Los síntomas y signos consisten en micción frecuente, disuria, hematuria y, a veces, piuria. La infección de vías urinarias puede dar como resultado bacteremia con signos clínicos de sepsis. La mayor parte de las infecciones son por *E. coli* de los tipos 4, 7 y 75 del antígeno "O". El antígeno "K" parece ser importante en la patogenia de la infección de las vías urinarias superiores. La pielonefritis se relaciona con un tipo específico de pilus, el pilus P, que se fija a la substancias de grupo sanguíneo P.(42).

Con excepción de la porción más inferior de la uretra, las vías urinarias son normalmente estériles gracias a una serie de mecanismos de defensa, el más importante de los cuales es el flujo libre de la orina en todo su trayecto y el vaciamiento completo de la vejiga. En estas condiciones una infección casi siempre es benigna o fácilmente controlable, sino existe otra patología en el huésped que complique la enfermedad. Las vías de acceso de los gérmenes al tracto urinario son dos: la *hematógena* y la *ascendente*. La primera constituye el mecanismo habitual en el recién nacido durante episodios septicémicos, en individuos mayores con infecciones sistémicas graves y en pacientes inmunocomprometidos. La vía ascendente es el mecanismo más frecuentemente observado; en las mujeres porque la vulva y el introito vaginal normalmente contienen bacterias en cantidades elevadas, sobre todo cuando se practican hábitos higiénicos inadecuados, y en el hombre porque existen bacterias en el prepucio. El tubo digestivo es el principal reservorio de bacterias potencialmente infectantes del tracto urinario; esto es particularmente cierto en *E. coli*, pues se ha encontrado el mismo serotipo presente en heces fecales de los pacientes, antes que se desarrolle la infección urinaria. La uretra distal normalmente está colonizada por bacterias entéricas y perineales que pueden penetrar en la vejiga, pero en condiciones de funcionamiento normal, son nuevamente eliminadas. (52).

A. 2) GASTROENTERITIS:

La gastroenteritis o "diarrea del viajero", ó "diarrea infecciosa aguda", son causas comunes de las cepas enterotoxígenas, los niños menores de dos años presentan este

trastorno, caracterizado por náusea, vómito y diarrea. La mayoría de los brotes se han presentado en salas infantiles debido a las cepas específicas de EPEC. Estas cepas producen enterotoxinas termolábil (TL) y similar a la elaborada por *Vibrio cholerae*, mientras que la otra es termoestable (TE). Aunque la diarrea generalmente es ocasionada por la producción de enterotoxina, en ocasiones *E. coli* puede ser enteroinvasora, afectando la mucosa y causando una enfermedad similar a la disentería por *Shigella*. A causa de la rápida deshidratación y la correspondiente elevada mortalidad, es indispensable hacer rápido el diagnóstico del padecimiento. (39)(42).

A. 3) BACTEREMIA:

La invasión de la corriente sanguínea es la manifestación más grave de infección por *E. coli*; generalmente se caracteriza por un brusco comienzo de escalofríos y fiebre, pero en ocasiones únicamente por confusión mental, disnea, o inexplicable hipotensión. Es más común en los pacientes con infección de las vías urinarias y absceso biliar o intraperitoneal, y después del aborto o de la cirugía pélvica. En algunos pacientes no es posible descubrir la puerta de entrada. La mayoría de los casos se presentan en varones de cierta edad, debido al parecer a la elevada frecuencia de instrumentación y cateterización uretral en este grupo. La fiebre varía entre 37.5 y 42°C., siendo más elevada en los pacientes jóvenes. La hiperventilación puede ser uno de los primeros signos. Puede haber hipotensión desde el principio, pero por lo general se presenta entre 12 y 16 horas después de la bacteremia; si ésta

persistente, se acompaña de oliguria y con frecuencia de confusión mental, estupor y coma. Inicialmente la piel es caliente y seca, pero en la mayoría de los pacientes se presentan signos de vasoconstricción periférica, como son las extremidades frías y cianóticas. Afortunadamente la hipotensión es pasajera y se compensa por sí sola en la mayoría de los pacientes con bacteremia por *E. coli*, sin embargo el 25% de los pacientes con bacteremia muestran hipotensión más prolongada, síndrome que se conoce como *choque gramnegativo o choque por endotoxina*. En ocasiones la bacteremia por *E. coli* se desarrolla sin una puerta de entrada evidente en pacientes con cirrosis.(39).

A. 4) INFECCIONES BILIARES Y PERITONEALES:

Generalmente es posible cultivar a *Escherichia coli* de un apéndice perforado o inflamado, o de abscesos secundarios a perforación de divertículos, úlceras pépticas, abscesos subfrénicos o de la bolsa omental, o infarto mesentérico. Es frecuente encontrar junto con *E. coli* otros microorganismos, incluyendo estreptococos anaerobios, clostridios y bacteroides. La colecistitis aguda con gangrena y perforación se acompaña con infección por *E. coli*. A partir de la vesícula, la infección puede ascender por el árbol biliar para producir colangitis y abscesos múltiples del hígado. En ocasiones más raras la infección de la cavidad peritoneal por *E. coli* puede producir tromboflebitis séptica de la vena porta (pileflebitis), que a su vez se complica con abscesos hepáticos (39).

A. 5) INFECCION NEONATAL:

Es frecuente que los recién nacidos, especialmente si se trata de prematuros, presenten bacteremia por *E. coli* junto con meningitis y pielonefritis por vía hematógica. La contaminación con materias fecales y la carencia de anticuerpos globulina gamma-G (IgM) maternos son dos de los factores que hacen que este grupo sea especialmente susceptible a las infecciones coliformes.(39).

A. 6) SEPTICEMIA DEL RECIEN NACIDO:

De 30 a 40% de las septicemias y más del 80% de las meningitis causada por (82). *E. coli* en recién nacidos son por microorganismos que poseen el antígeno K1. Se han obtenido datos semejantes de lactantes con meningitis causada por *E. coli* K1, y parece que esos lactantes adquieren los microorganismos de sus madres al nacer. Se produce infección invasora en estos recién nacidos cuyas madres no tienen anticuerpos específicos al microorganismo.(82). También se ha demostrado que los recién nacidos pueden colonizarse por gérmenes ambientales, o sea, por otras personas aparte de sus padres, con *E. coli* durante su estancia en la sala de recién nacidos.(50).

A. 7) OTRAS MANIFESTACIONES:

Escherichia coli puede producir abscesos en cualquier parte del cuerpo. Son comunes las infecciones subcutáneas en

el sitio de la administración de la insulina a los diabéticos, en las extremidades con gangrena isquémica, o en las heridas quirúrgicas. No es raro observar flemones perirrectales en pacientes con leucemia. Los abscesos subcutáneos se caracterizan con frecuencia por la formación del gas en los tejidos, especialmente entre los diabéticos, el cual puede descubrirse mediante los rayos X. De 5 a 10% de pacientes con bacteremia por *E. coli* presentan infección metastásica en hueso, cerebro, hígado o pulmón. *E. coli* rara vez ocasiona neumonía de novo, aunque es frecuente cultivar bacilos coliformes del esputo en las superinfecciones pulmonares(39).

B) PATOGENIA POR SUB-ESPECIES:

Es aceptado que hay cuatro clases de *E. coli* que causan diarrea en humanos, cada una de éstas clases manifiestan distintas formas de patogénesis: epidemiológicas, clínicas y cada una tiene antígenos somáticos diferentes. (ver Tabla No.2, pag. 29).(40).

- Escherichia coli*:
- a) ENTEROPATOGENA.
 - b) ENTEROTOXIGENICA.
 - c) ENTEROINVASIVA.
 - d) ENTEROHEMORRAGICA.

Un tipo definido es el *E. coli* enteroadherente, que solo se puede identificar por un patrón de adherencia a células Hep-2 en cultivos celulares.(40).

B.1) *E. coli* CAUSANTE DE INFECCIONES EXTRAINTESTINALES:

En relación a ésta se han considerado dos puntos de vista:

1) Es aquel tipo de *E. coli* que predomina en las heces y que solo requiere de las condiciones apropiadas para producir la infección extraintestinal (es decir, factores de predisposición del hospedero). En la tabla No. 12, se muestran los serogrupos encontrados en aislamientos intestinales y extraintestinales.(40).

2) La presencia de propiedades especiales

atribuidas a *E. coli* que le permiten iniciar y sostener una infección extraintestinal (factores de virulencia de la cepa). (8b). Un ejemplo en el que intervienen los dos factores anteriores es la meningitis neonatal causada por *E. coli* que presenta antígeno capsular K-1 que tiene su origen en la flora fecal de la madre. (56).

El siguiente cuadro muestra las diferentes características clínicas diferenciales de las diferentes especies de *Escherichia coli*. (82).

B.2) C O L O N I Z A C I O N:

El evento de colonización implica un sobrecrecimiento e implantación donde no hay ningún tipo bacteriano, esto es, la formación de una población bacteriana que reemplace la pérdida por envejecimiento, dispersión y mecanismos bactericidas locales. Costerton y col. han establecido que el mecanismo básico de las bacterias para colonizar la mucosa es la formación de microcolonias en condiciones favorables de nutrientes, para evadir los movimientos peristálticos y reconocer sitios cercanos de la mucosa para la formación de nuevas colonias. Por lo anterior, un número limitado de microorganismos o especies bacterianas tienen la capacidad de colonizar la superficie de mucosas y así establecer una relación hésped-parásito. (33).

TABLA No. 9

CARACTERISTICAS CLINICAS DIFERENCIALES DE LAS DIARREAS
POR *ESCHERICHIA Coli.*

	E. coli enteotoxigena	E. coli enteroinvasiva	E. coli enteropatogena
MALABSORCION			
Intestino delgado afectado.	X		algunas cepas
Mediada por toxinas.	X		algunas cepas
EVACUACION			
Gran volumen	X		X
Acuosa	X		X
Incolora	X		
Con moco			
DURACION (NO TRATADA)	5 a 10 días		
FIEBRE DE 38.8°C	0		0
EDAD	Cualquiera		Un año
	En viajeros de E.E.U.U.		Brote en guarderías
DISENTERIA			
Intestino grueso afectado		X	algunas cepas
Toxina presente	0		
Evacuación		X	X
Vol. pequeño o moderado.			
Viscosa/con baba		X	
Verde/con sangre		X	X
Con moco		X	X
Leucocitos		X	X
Duración		7-14 días	7-14 días
Fiebre de 38.8°C		X	
Cólico, tenesmo	X		
Edad	Cualquiera		

El éxito de la colonización bacteriana dependerá entonces de que la bacteria:

- se acerque a la mucosa
- evite ser barrida o desprendida
- adquiera los nutrientes esenciales para su crecimiento
- se reproduzca a un ritmo suficiente que permita mantener o aumentar su población
- resista la defensa local del huésped.(33).

Los mecanismos celulares y moleculares de la colonización que se han estudiado se pueden resumir en los siguientes eventos:

a) **Asociación**, b) **Adherencia** y c) **mecanismo de daño**.(33).

a) ASOCIACION: Es la forma más sencilla de interacción entre la bacteria y la superficie de la mucosa: es una unión reversible sólo sobre la superficie manteniéndose así por medio de moco o exudados, enlaces no covalentes, quimiotaxis, fuerzas de Van der Waals.(33).

b) ADHERENCIA: Es una relación más íntima que la asociación, es irreversible mediada por moléculas complementarias especializadas, de naturaleza proteica situadas en la superficie bacteriana y carbohidratos de la membrana eucariótica o glicocálix.(33).

c) MECANISMOS DE DAÑO: Dependerá del microorganismo y se resumen en:

- **Adherencia:** La unión específica entre la bacteria y la

superficie de la mucosas promueve la colonización bacteriana y en el caso de microorganismos patógenos, el evento en si causa daño en las células donde las bacterias se adhieren destruyendo organelos celulares.(33).

- **Invasión:** Las bacterias invasivas después de adherirse atraviesan la mucosa para establecerse en las células del epitelio o en el propio estroma del tejido. Puede haber destrucción de microvellosidades, invaginación de la membrana celular, degeneración de uniones celulares., vacuolización de la bacteria (endocitosis), aparición de material denso a los electrones alrededor de la bacteria endocitada, reproducción bacteriana y expulsión de las bacterias patógenas está determinada generalmente por plásmidos.(33).

- **Toxicidad:** La bacteria es capaz de producir toxinas que estimulan la secreción de agua y electrolitos al interactuar con los mecanismos bioquímicos de las células epiteliales de la mucosa intestinal. Involucra principalmente cuadros septicémicos, enterotóxicos y enterotoxémicos.(33).

TRATAMIENTO

XII-TRATAMIENTO GENERAL

Las *E. coli* aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad habitualmente son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos gramnegativos(43) . Como en otras infecciones, es indispensable canalizar el pus y extraer los cuerpos extraños. Si se sospecha que *E. coli* es el agente etiológico en una infección en particular, la elección de un agente antimicrobiano adecuado dependerá del sitio y tipo de infección, así como de la gravedad(11).Sin embargo aparecen formas resistentes, especialmente en pacientes con antecedentes de tratamiento antibiótico previo. El mejor tratamiento para la diarrea parece ser el manejo del equilibrio líquido y electrolítico. Aunque la diarrea infantil ha podido ser controlada por medio de un cierto número de antibióticos (43).

Muchas cepas de *E. coli* son sensibles a altas concentraciones de penicilina G (50 a 100 ug por ml.), la que puede usarse en dosis de 10 a 40 millones de unidades diarias por vía intravenosa.(43).

A continuación se muestran dosis de algunos de los antibióticos principales para el tratamiento de *E. coli* :

Escherichia coli (aminoglucósido):

1.- *Gentamicina*:

a) Recién nacidos: 5 a 7.5 mg/kg cada 24 horas a intervalos de 12 horas.

b) Lactantes mayores y niños: 5 a 7.5 mg/kg cada 24 horas a intervalos de ocho horas por vía intravenosa.(50).

2.- Amikacina:

a) Recién nacidos: 15 a 30 mg/kg cada 24 horas a intervalos de ocho a 12 horas por vía intravenosa.

b) Niños mayores: 15 a 30 mg/kg cada ocho horas por vía intravenosa.

3.- Kanamicina:

15 a 30 mg/kg cada 24 horas a intervalos de 12 horas por vía intravenosa o intramuscular en dosis divididas por igual.(50).

4.- Ampicilina:

a) Dosis inicial, 50 mg/kg por vía intravenosa, seguida de

b) Dosis diaria, 200 a 300 mg/kg cada 24 horas, a intervalos de seis horas por vía intravenosa.(50).

DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO

A) RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA Y TOMA DE MUESTRA:

*No usar hisopos de algodón, debido a que los ácidos grasos del algodón son tóxicos para los microorganismos. Es mejor utilizar el dacrón o alginato de calcio. Deben enviarse en un medio de transporte nutritivo, como los medios antes mencionados. A los hisopos de alginato de calcio, tienen la ventaja de ser totalmente solubles en buffers, lo cual permite una mejor recuperación de los microorganismos.(5)(53).

*Obtener las muestras que sean posibles con una jeringa y aguja, después llevarlas así al área de siembra (también de heridas).(5)(53).

*No permitir que transcurra tiempo entre la recolección y la siembra (5) no más de 10 minutos deben dedicarse al transporte de las muestras; de otro modo, éstas deben inyectarse mediante un tubo o frasco de transporte anaerobio.(53).

*Si es posible, el laboratorio proporcionará frascos con atmósfera anaeróbica o medio de cultivo tipo, Stuart o Cary-Blair modificado ó clado tioglicolato bien reducido.

*En toda muestra donde se pretende buscar microorganismos anaerobios debe practicarse:

1.Exámen microscópico directo que proporciona información valiosa sobre el tipo de células presentes, morfología, etc.

2.Tinción de Gram que además de proporcionar información morfológica y tintoral de los microorganismos presentes es un excelente control de calidad, ya que si los

morfortipos no se recuperan en cultivo el procedimiento puede ser defectuoso por:

- a. Colección y/o manejo inadecuado de la muestra.
- b. Medio de aislamiento primario mal elegido o deficiente.
- c. Defectos en el sistema anaeróbico utilizado.
- d. Subcultivos incorrectos.

La persona que recoge la muestra es responsable de que el nombre y apellido, así como el registro y la localización del paciente esté correcta y legible. Los errores de identificación de muestras pueden tener consecuencias desastrosas y deben evitarse. La correcta identificación de la muestra, sin embargo se continúa en el laboratorio, donde diferentes tipos de cultivo, subcultivo y otras pruebas y procedimientos apropiados pueden proliferar y eventualmente se recopila en uno ó más informes.(50).

En la mayoría de los laboratorios se ha empleado un sistema para facilitar el manejo de los registros.(50).

DATOS PARA LA TOMA DE MUESTRA

*DATOS GENERALES:

1. Nombre
2. Tipo de muestra
3. No. de expediente
4. Fecha
5. Hora

*EXUDADO FARINGEO:

1. Edad
2. Grado de presentación según inspección.

*UROCULTIVO:

1. Edad
2. Sexo
3. Tipo de toma
4. Micción espontánea, sonda, punción o cateter

*EXUDADO VAGINAL:

1. Edad
2. pH de la mucosa
3. antibioticoterapia

*COPROCULTIVO:

1. Edad
2. Antibioticoterapia

*SECRECIONES, TRASUDADOS Y OTROS EXUDADOS, ASI COMO EL MATERIAL DE ABSCESOS Y COLECCIONES:

1. Antibioticoterapia
2. Datos de importancia (Necrosis, Gas, mal olor, otros.....)

*GRADOS: I) sin alteración.

II) Enrojecimiento o inflamación

(53)

III) Enrojecimiento, inflamación y presencia de pus.

IV) Enrojecimiento, inflamación con presencia de pseudomembranas o placas.

TOMA DE MUESTRA:

La correcta recolección de una muestra para su cultivo es posiblemente la etapa más importante en el aislamiento de microorganismos responsables de enfermedades infecciosas. Una muestra deficientemente recogida puede ser el motivo del fracaso de aislar el microorganismo causante, y la recuperación de contaminantes puede conducir a una terapia incorrecta o aun perjudicial.(46).

Deben seguirse los siguientes conceptos para la adecuada recolección de una muestra:

1. La muestra para cultivo debe ser material del verdadero sitio de infección y debe recogerse con un mínimo de contaminación de tejidos, órganos o secreciones adyacentes(46).
2. Establecer períodos óptimos para la recolección de muestras a fin de tener la mejor oportunidad de aislar los microorganismos causantes.(46).
3. Obtener suficiente cantidad de muestra para llevar a cabo las técnicas de cultivo solicitadas.(46).
4. Utilizar dispositivos de recolección, recipientes para las muestras y medios de cultivo adecuados para asegurar el óptimo aislamiento de microorganismos.(46).

5. Siempre que sea posible, obtener las muestras antes de la administración de antibióticos.(46).

6. El envase recolector de la muestra debe estar correctamente rotulado, con las siguientes datos: Nombre del paciente, No. de identificación, procedencia de la muestra, médico, día y hora de la recolección para ser enviada inmediatamente al laboratorio.(46).

A. 1) S A N G R E:

Los cultivos de sangre tienen gran importancia en el diagnóstico de bacteremia y en el pronóstico de ciertas infecciones. Casi todos los patógenos conocidos y algunos organismos generalmente considerados inofensivos se han cultivado de la sangre. Se le señalara al paciente que los cultivos de sangre deben obtenerse antes de comenzar un tratamiento antibiótico o quimioterapéutico. El número de cultivos tomados tiene su importancia. Nunca debe confiarse en un solo cultivo de sangre para eliminar la posibilidad de bacteremia. La etapa de la enfermedad también es importante(93), las indicaciones para obtener hemocultivos son el rápido aumento del pulso del paciente y de su temperatura, un cambio sensorial y la aparición de escalofríos, postración e hipotensión.(53).

Los hemocultivos se pueden obtener ya sea utilizando aguja o jeringa, o bien el llamado "sistema cerrado", empleando un frasco vacío y un tubo colector de doble aguja (ver las sig. figuras). En ambos casos el sitio de venipunción debe descontaminarse convenientemente(46), y con el mayor cuidado; una

técnica rígida se requiere para proteger contra la contaminación de piel y aire (93)..

TECNICA:

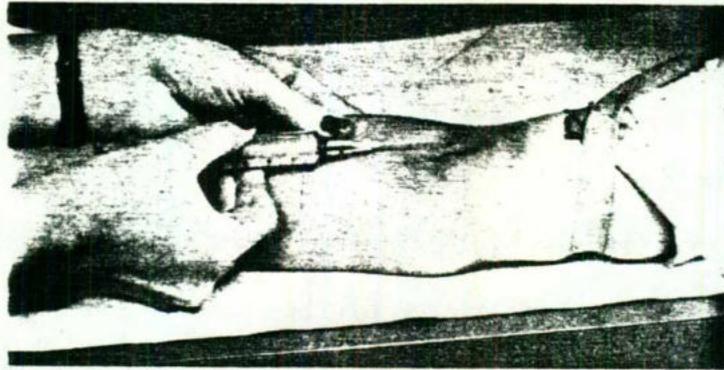
1. Reunir y preparar el equipo (marcar cada frasco con el nombre del paciente).
 2. Aplicar torniquete y elegir sitio óptimo de venipuntura.
 3. Aflojar torniquete y preparar la piel.
 4. Preparar la piel en esta forma:
 - * Limpiar vigorosamente la piel con una gasa embebida de alcohol al 70%.
 - * Aplicar un hisopo de gasa embebida en tintura de yodo 2%.
 - * Dejar secar
 - * Cuando la piel este desinfectada cubrir el sitio con una gasa estéril.
 - * El sitio de venipuntura *no debe* tocarse excepto si los dedos están descontaminados o se usan guantes estériles.
- NOTA:** En casos conocidos de hipersensibilidad al yodo, la piel se prepara vigorosamente sólo con alcohol isopropílico o etílico 70%.
5. Extraer la sangre (10 o 20 ml.) y vaciar en los frascos de cultivo, no ventilar ningún frasco de cultivo de sangre.
 6. Mezclar el contenido del frasco inclinándolo *suavemente* 2 o 3 veces.
 7. Incubar a 37°C.
 8. Observar resultados de 5 a 7 días(93).

La condición más importante de un sistema de cultivo, es el rápido crecimiento de los microorganismos, por lo que hay que impedir la coagulación de la sangre en el frasco de cultivo, ya que las bacterias quedan atrapadas en la sangre coagulada. Se han recomendado varios anticoagulantes; al parecer, el más efectivo es el polianetol sulfonato de sodio (SPS), inhibe la coagulación, neutraliza el efecto bactericida del suero, impide la fagocitosis, parcialmente inactiva ciertos antibióticos y se mantiene estable con las temperaturas de la autoclave. No se recomienda en cultivos de filtro de membrana, y tampoco para cultivos en placas fraccionadas(29). Otros anticoagulantes es el citrato y el oxalato, pero se sabe hace algún tiempo que ambos son tóxicos para muchas bacterias. La heparina no es tóxica pero no soporta su paso por el autoclave(93).

A. 2) LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO:

El examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes sospechosos de meningitis representa uno de los principales procedimientos de emergencia que debe afrontar el personal del laboratorio de microbiología clínica(53), por lo que se debe recoger en condiciones estériles y se llevará al laboratorio *sin demora*(29).

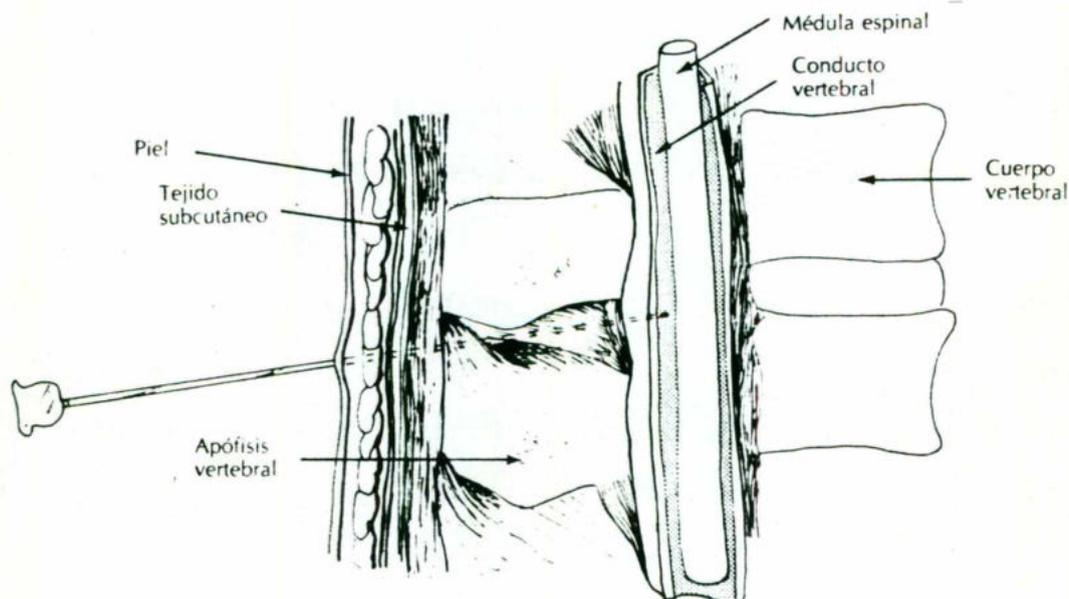
La punción lumbar debe hacerse en condiciones de estricta asepsia, pues la contaminación de la muestra puede



producirse fácilmente y confundir la identificación del agente etiológico. La piel debe desinfectarse con povidona-yodo(53).

Luego de desinfectarse convenientemente la piel de la zona lumbar, se pide al paciente que se recueste sobre un costado con el torso doblado hacia adelante para separar la apófisis espinosas de las vértebras lumbares. Bajo anestesia local, se introduce una larga aguja en el conducto espinal, entre la tercera y la cuarta vértebras lumbares. El líquido cefalorraquídeo no necesita ser aspirado ya que fluye de la boca de la aguja a una presión de aproximadamente 90 a 150 mmHg en individuos normales. El líquido se recoge comúnmente en tres tubos, el tercero de los cuales se selecciona para cultivo. Si ha de haber demora en procesar las muestras, el líquido se deja a temperatura ambiente o se coloca en la incubadora(46).

NOTA: Los recipientes deben estar estériles y que puedan sellarse con tapa de rosca a fin de impedir filtraciones y pérdida o contaminación del contenido. No deben usarse tubos con tapones de algodón o goma.(46).



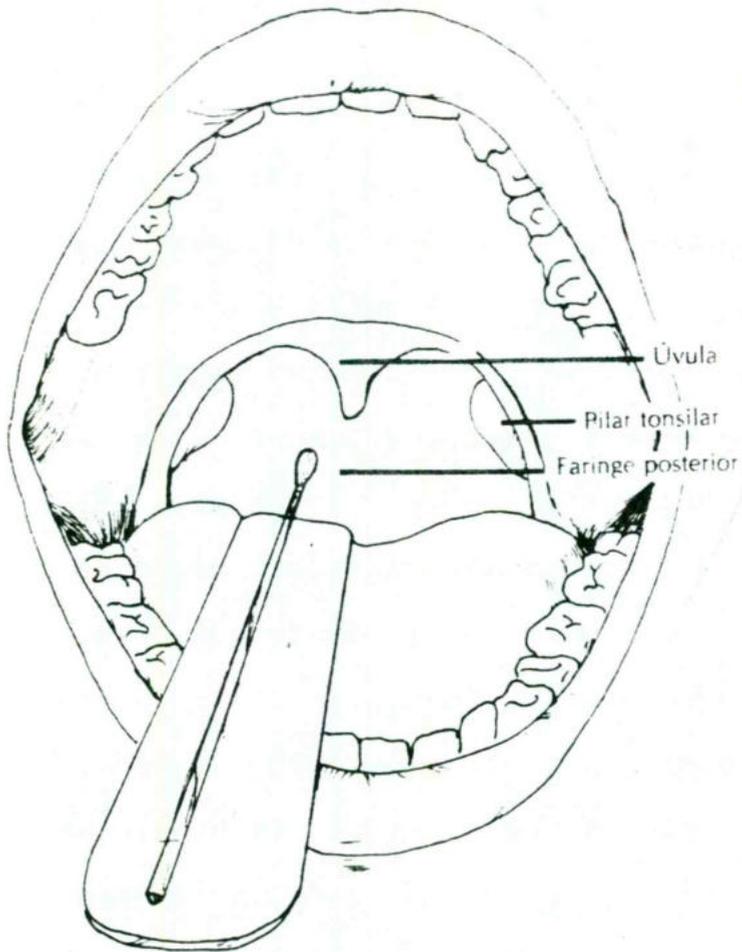
A. 3) EXUDADO FARINGEO:

Los cultivos de garganta constituyen una ayuda importante en el diagnóstico de determinadas infecciones. Por lo que el operador explicará al paciente que por medio de éste estudio es posible identificar microorganismos que pudieran causar sus síntomas o el mal estado del portador. Le señalara que necesita restringir la ingestión de medicamentos o líquidos antes de la prueba. Es conveniente describir el método y recomendar al paciente que trate de no sentir náuseas durante la toma del exudado. Conviene revisar los antecedentes del enfermo en busca del consumo reciente de antibióticos.(38).

Se instruye al paciente para que respire profundo y se le pedirá al sujeto que extienda la cabeza hacia atrás y cierre los ojos, se debe dirigir hacia la cavidad oral abierta un foco de luz brillante por sobre el hombro de la persona que obtiene la muestra y se inspeccionarán zonas inflamadas por medio de un abatelenguas para hacer descender suavemente la lengua y minimizar la contaminación del hisopo, de modo que el hisopo pueda ser guiado hasta la faringe posterior(la emisión de un "aah"por parte del paciente sirve para elevar la úvula y ayuda a reducir el reflejo de la náusea) . El hisopo se desliza entonces se frota enérgicamente la parte posterior de la faringe, ambas amígdalas y la fosa tonsilar, así como las partes donde haya inflamación, exudados o ulceraciones. Debera tenerse cuidado para evitar tocar con el hisopo la lengua y los labios. Una vez recogida la muestra, el hisopo se debe colocar inmediatamente en un tubo de cultivo o en un medio líquido de transporte donde se

cultivaré lo antes posible en el laboratorio.(29)(46)(53).

La figura siguiente ilustra el método correcto de efectuar el hisopado de garganta.



A.4) E S P U T O:

La recuperación de un agente etiológico del esputo u otro espécimen apropiado depende no sólo de los métodos de laboratorio empleados, sino también del *cuidado* en la obtención de la muestra. A menudo, el cultivo de material inadecuado hace que el clínico reciba informes equivocados, al no hallar el verdadero microorganismo infectante o por identificación de un patógeno circunstancial. El personal del laboratorio está autorizado a

rechazar una muestra que sólo contenga saliva, por considerarla *inadecuada* para el examen bacteriológico.(29).

Se le explicará al paciente que se requiere de una muestra de esputo (no de saliva) y que es recomendable recolectarla por la mañana temprano, porque las secreciones se acumulan durante la noche. (39).

Si la muestra se obtiene por expectoración, se pedirá al paciente que ingiera un volumen mayor de líquidos la noche anterior a la toma de muestra, para facilitar la producción de esputo. Se indicará al paciente la forma de espectorar al inspirar tres veces y hacer una tos profunda, se le indicará que no se lave los dientes ni use colutorios antes de la toma de muestra, aunque puede enjuagar la cavidad bucal con agua. Si la muestra se obtendrá por aspiración traqueal se indicará al sujeto que sufrirá molestias al introducir la sonda en la tráquea. Si la muestra se reunirá por broncoscopia, se pedirá al sujeto que ayune durante seis horas antes de la toma. Se le señalará que antes del estudio se le aplicará un anestésico local, para aminorar las molestias durante la introducción de la sonda.(38).

A.4.1) Espectóración: pídense al individuo que tosa de manera intensa y expectore en el recipiente estéril. Si la tos no es productiva, úsese fisioterapia en tórax, nebulización a base de aerosol calentado o respiración con presión positiva intermitente, para la producción de esputo. Tápese el recipiente en forma hermética.(66).

A.4.2) Aspiración Traqueal: antes y después del método, si es necesario adminístrese oxígeno al paciente. Unase el dispositivo para retención del esputo, a la sonda de aspiración. Con guantes estériles lubrique la sonda con solución salina normal, e introdúzcala a través de las fosas nasales, sin aspiración (el sujeto toserá cuando la sonda pasa por la laringe). Introdúzcala hasta la tráquea. Aplique aspiración por 15 segundos como máximo, para obtener la muestra. Interrumpa la aspiración y con suavidad extraiga la sonda.(38).

A.4.3) Broncoscopia: Después de rociar anestésico local en la faringe del sujeto o después que él ha hecho gargarismos con la solución, se introduce el broncoscopio por la faringe y tráquea hasta el bronquio. Se aspiran las secreciones a través del conducto interno del aparato por medio de una solución de lavado como la salina. Una vez obtenida la muestra se extrae el broncoscopio.(38).

Inmediatamente después de la toma de cualquier tipo de muestra deben prepararse frotis para la coloración, especialmente cuando el material es de lesiones patológicas que no se han aspirado con jeringa y aguja y de las que no pueden obtenerse gran cantidad de material. Es importante para obtener frotis apropiados que el clínico lo prepare a la cabecera del paciente, conozca bien la importancia de éste procedimiento y sepa que los frotis gruesos tienen muy poco valor; pueden prepararse frotis delgados con material que parece grueso y adherente, apretando firmemente dos portaobjetos sobre áreas que tienen la muestra aplicada. Este método se recomienda para descargas uretrales, exudados de heridas, material aspirado de

abscesos, etc. Separando por deslizamiento un portaobjetos, del otro, formando zonas delgadas del frotis que son útiles como guía para el microbiólogo clínico, en la selección de medios de cultivo primarios.(53).

A.5) O R I N A:

Para el óptimo aislamiento de bacterias del tracto urinario, y a fin de reducir la contaminación potencial, es imperativo prestar cuidadosa atención a la correcta recolección de muestras de orina. Para obtener mejores resultados, la recolección de muestras de las pacientes deben estar supervisada personalmente por una enfermera o ayudante entrenada(46).

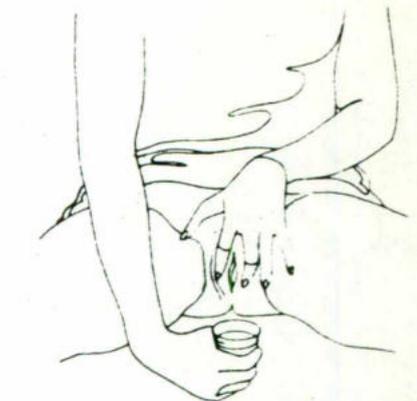
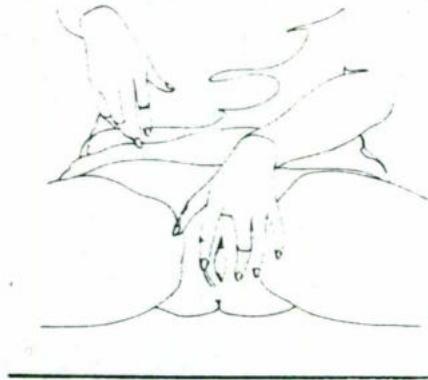
El operador explicará al paciente que por medio de este estudio se confirmará la presencia de infección en sus vías urinarias. Se le señalará que se necesita una muestra de orina y que no es necesario restringir la ingestión alimentos ó líquidos. Es conveniente revisar los antecedentes del enfermo en busca de administración presente de antibióticos. En la hoja de laboratorio habrá que señalar la diuresis inducida por líquidos y fármacos(38).

Para una correcta recolección de muestras de orina de las pacientes, se debe lavar la zona periuretral(extremidades del pene, labios, vulva) y el perineo con agua jabonosa (limpiar de adelante hacia atrás y lavar entre los pliegues de la vagina o retraer el prepucio para limpiar esa zona con mucho cuidado segun sea el caso) y enjuagar bien con

solución salina estéril o agua. Durante la evacuación se deben tener los labios separados y recoger los primeros mililitros de orina en un recipiente o en un orinal a fin de eliminar por arrastre las bacterias de la uretra. Se recoge entonces la porción media de la micción en un recipiente estéril (tener cuidado de no tocar por dentro el recipiente o si éste cae al piso, pedir a la enfermera uno nuevo)(29)(46). Mandar inmediatamente la muestra al laboratorio y si no mantenerla en refrigeración a 4°C para evitar la proliferación de bacterias(29), observar las siguientes figuras (38).

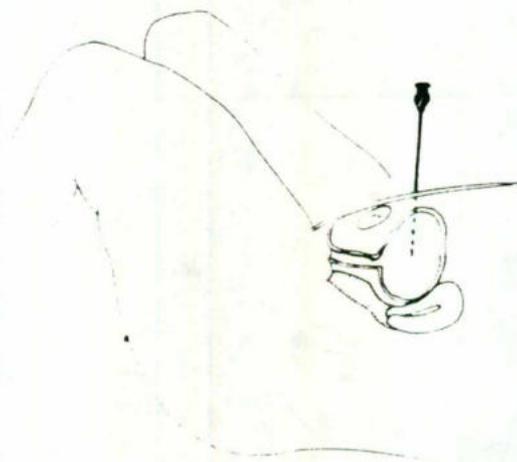
3 Descubra el orificio urinario (meato o "caño" de la uretra), al separar los labios con el pulgar y el índice. Conserve los labios separados durante la fase de obtención de la muestra.

4 Limpie la zona alrededor del meato urinario con tres torundas humedecidas con antiséptico, una para cada lado del meato, y la tercera, para el propio meato. Haga movimientos de adelante hacia atrás. Quite el exceso de antiséptico con otra torunda.



6 Coloque la tapa del recipiente, y si no se envía inmediatamente la muestra al laboratorio, refrigérela.

La contaminación de la orina por la flora microbiana de la uretra o del introito puede evitarse mediante la *aspiración suprapúbica*. El paciente debe tener la vejiga ocupada cuando se hace el procedimiento, la piel sobre la vejiga se desinfecta como para una intervención quirúrgica y se inyecta un anestésico en el sitio de la punción, la aguja calibre 19 o 20 unida a una jeringa se pasa a través de la piel en la línea media, situada a un tercio de la distancia desde la sínfisis pubiana al ombligo. Una vez que la aguja penetra en la vejiga, la orina se aspira con una jeringa y se coloca en un recipiente adecuado para su transporte, ver la siguiente figura.(29)(46)(53).



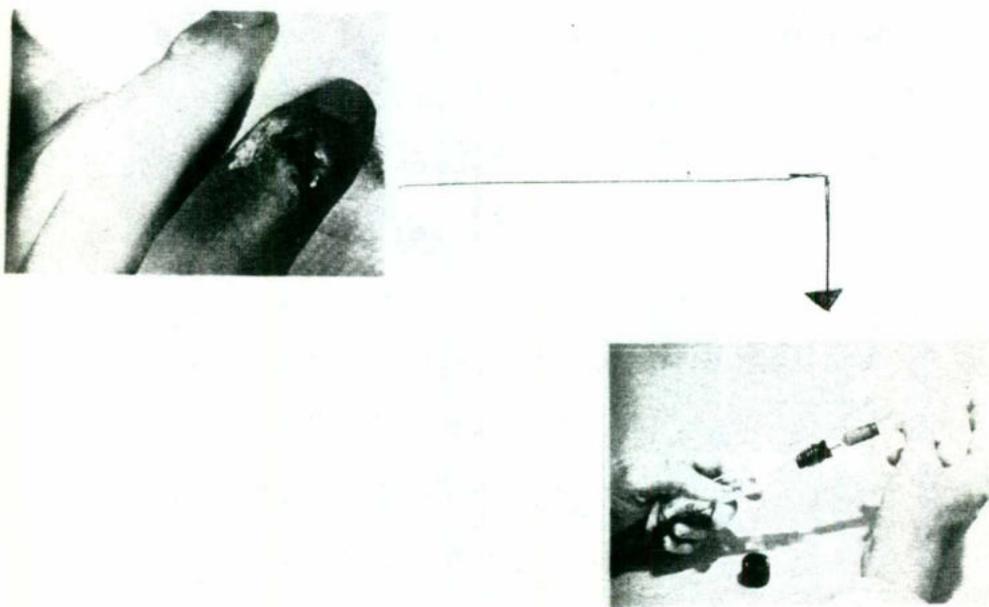
Se pueden emplear para cultivo, muestras de orina obtenidas por cateterismo. Se debe obtener la muestra de la boca del catéter, desinfectando con un agente apropiado la pared del catéter en su unión con el tubo de drenaje y punzándola con una aguja calibre 21 unida a una jeringa en la cual se aspira la orina. La orina recogida en bolsas con catéter es generalmente inadecuada para cultivo, excepto bebés, tomando precauciones especiales. Las muestras de orina recogidas con puntas de catéter de Foley no son apropiadas para cultivo, debido a que las puntas de catéter están invariablemente contaminadas con organismos uretrales. Deben reunirse cuando menos 3 ml de orina, pero no se excederá de más de la mitad del volumen del frasco.(46)(53).

A.6) HERIDAS, ABSCESOS POR MORDEDURAS E INFECCIONES:

El cultivo de secreción de una herida comprende el análisis microscópico del líquido obtenido de una lesión, para confirmar la presencia de infección(38). La superficie de las heridas cutáneas o úlceras decubitales está frecuentemente colonizada por bacterias del medio ambiente, y las muestras obtenidas por hisopado no reflejan a menudo la verdadera causa del proceso infeccioso(46). Por esa razón, el método más aconsejable para recoger muestras cutáneas es por aspiración del material purulento de las profundidades de la herida con una aguja estéril y jeringa(46), prepárese el campo estéril y límpiese la zona alrededor de la herida con solución antiséptica (jabón de cirugía y aplicación de alcohol etílico e isopropílico al 70%)(38)(46). En caso de cultivo de anaerobios, separar suavemente los bordes de la herida con el pulgar e índice de una mano (usando un guante estéril), introdúzcase el aplicador en un plano profundo de la herida, gírese suavemente sin tocar los bordes cutáneos adyacentes y colóquesele sin tardanza en un tubo con el cultivo para anaerobios. O bien introduzcasele la jeringa en la herida, aspirese unos 5 ml de exudado en la jeringa, dejar salir el aire de la jeringa inyectando directamente en un tubo estéril "desgasificado" o en un medio de cultivo para anerobios. Si la aguja está cubierta con un tapón de caucho puede enviarse el líquido de aspiración al laboratorio directamente en la jeringa, o bien en un medio de transporte adecuado.(29)(38)(46).

Los frotis coloreados por Gram de cualquier drenaje pueden aportar una clave temprana de la naturaleza del proceso infeccioso.(53).

Las siguientes figuras muestran más detalles sobre toma de muestra. Sobre técnicas de aislamiento e identificación verificar capítulos siguientes.



A. 7) TRACTO GENITAL:

Los cultivos vaginales no producen con frecuencia resultados significativos. En casos de vaginitis supurativa, las muestras se deben examinar al microscopio en fresco, inmediatamente después de obtenidas; otras especies de bacterias, particularmente enterobacterias, sólo rara vez son incriminadas. La significación de las bacterias anaerobias aisladas de las secreciones vaginales es difícil de interpretar debido a que están presentes en la flora normal.(46).

En la mujer, el sitio óptimo para obtener material para cultivo es el *cuello del útero* y para que la muestra resulte conveniente debe ser obtenida con cuidado por un profesional experto. Se coloca a la paciente en posición de litotomía y cúbrase con lienzos estériles, para llevar al mínimo la exposición de sus partes genitales. Después, pídale que respire profundamente, introdúzcasele el espéculo vaginal estéril lubricado con agua tibia, extrayendo un tapón de moco cervical con una torunda de algodón y una pinza. Se limpia la superficie externa del cuello del útero con un hisopo de algodón. La compresión suave del cuello entre las hojas del espéculo puede producir un exudado endocervical. Si así no ocurre, se introduce entonces un aplicador con una punta de alginato o algodón en el canal endocervical, imprimiendo al mismo un movimiento rotatorio para provocar la salida del exudado de las glándulas, dejar el aplicador unos segundos para absorción óptima de microorganismos. Inocular en los medios de cultivo. (29)(38).

En situaciones especiales, en que no está indicada la obtención de un espécimen cervical (por ejemplo, en niñas o pacientes histerectomizadas) el mismo puede sustituirse por un cultivo uretral o vaginal, el cual se toma un aplicador con algodón estéril, y se pasa suavemente por los labios vaginales y uretra de la niña, después de obtener la muestra se siembra. También se recomiendan cultivos uretrales en la mujer, así como anales, ya que es muy común la infección del canal anal, especialmente cuando el cultivo cervical resulta negativo. (29).

Para obtener una muestra de cultivo rectal sinuso del anoscopio, introdúzcase con cuidado un aplicador de alginato o algodón de 2.5 cm aproximadamente y desplazándolo de un lado a otro para obtener material de las criptas. Si en el hisopo hay materias fecales se debe desechar esta muestra y utilizar otra nueva, si no es así sembrar la muestra.(29)(38).

La siguiente figura muestra el lugar de la toma de muestras.

Puede haber uretritis por microorganismos diferentes a *N. gonorrhoeae*, por ejemplo *Escherichia coli*. En estos casos, la técnica es la misma que el material de vagina y cuello uterino(66). La muestra se obtiene fácilmente mediante la introducción de un hisopo uretrogenital fino, con alginato (que puede humedecerse con agua estéril, haciéndolo avanzar 2 cm en la uretra, imprimiéndole un suave movimiento de rotación e inoculando inmediatamente en el medio específico.(29).

A.8) OIDO, MASTOIDES Y SENOS

PARANASALES:

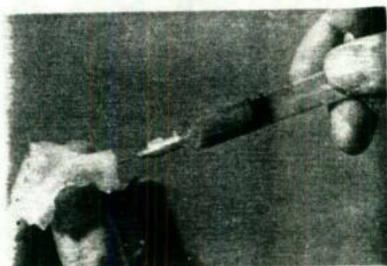
El material del oído, sobre todo el que se obtiene después de la perforación de la membrana del tímpano, debe ser extraído preferentemente por el otorrinolaringólogo mediante un hisopo de algodón o poliéster estéril(29), o bien por timpanocentesis, cuidando que la punta de la aguja, usada para aspiración, no entre en contacto con el espejo ni con el conducto auditivo, inocular después en medios adecuados.(93).

En la otitis externa se debe limpiar el oído externo con una solución acuosa de cloruro de benzalconio 1:1.000

u otro tipo de detergente para limpiar la piel de la flora bacteriana contaminante antes de recoger el material para cultivo, para que los resultados tengan importancia clínica. De otro modo, se recuperará una gran variedad de bacterias no patógenas y hongos saprófitos(29). En los casos de otitis media el material suele obtenerse mediante una torunda ordinaria de algodón, se examinan frotis teñidos por Gram. El material se siembra en medios de agar sangre y de Mac Conkey, y las torundas se incuban en caldo tioglicolato.(66).

Los cultivos de la región mastoidea se recogen generalmente en frotis obtenidos con un hisopo de algodón o poliéster (antes de la terapéutica con antibióticos) y se tratan en el laboratorio de la misma manera que otro cultivo de heridas(29).

Los cultivos de los senos paranasales se recogen de igual manera que las muestras de los cultivos nasofaríngeos, y en casos de sinusitis supurada aguda o en sinusitis purulenta las obtenciones de las muestras se recogen igual que las de heridas.



A.9) O J O:

En los pacientes con conjuntivitis, y especialmente con queratitis, se presentan problemas especiales para la recolección y el procesamiento de las muestras. Los hisopados son generalmente inadecuados para establecer la presencia de microorganismos debido al tamaño pequeño de la muestra. Un problema adicional es la actividad antimicrobiana de los anestésicos tópicos. Por lo tanto se recomienda obtener hisopados para cultivos antes de aplicar anestésicos tópicos y raspados de córnea después de esto último(53). Las muestras de ojo deben obtenerse en condiciones asépticas, y deben recogerse materiales de conjuntivitis, blefaritis y orzuelos en hisopos estériles, instrumentos quirúrgicos o asa de platino esterilizadas de la superficie del saco conjuntival inferior y el borde interno del ojo(29). No hacer frotis hasta 4 horas después de la irrigación o instalación en soluciones desinfectantes o medicaciones oftálmicas. Estas últimas pueden contener preservativos antibacterianos; los anestésicos locales tienden a desalojar los organismos del saco conjuntival(93).

Los raspados, tomados generalmente con una pequeña espátula de platino y fijados sobre un portaobjetos para microscopio, deben teñirse y examinarse. Los frotis de secreciones teñidos por Gram son importantes para la selección de medios de cultivo apropiados(93).

A. 10) H E C E S:

La correcta recolección y conservación de las heces es un requisito importante y con frecuencia descuidado del aislamiento de microorganismos que contribuyen a la enfermedad intestinal(53). El operador explicará al paciente que por medio de este estudio se precisará la causa de sus molestias gastrointestinales o se sabrá si es portador o no, de microorganismos infectantes. Le señalará que no necesita restringir alimentos ni líquidos. Es conveniente revisar los antecedentes del enfermo en busca de características de la dieta y la administración reciente de antibióticos, y viajes en fecha cercana que pudieran sugerir infecciones endémicas o infestaciones(38). Las muestras se recogerán en los primeros momentos de la enfermedad y antes de la administración de antibióticos. Puede obtenerse del pañal o por medio de un frotis rectal, y deben ser cultivadas sin demora(29). Se le pide al paciente que vaya en la mañana y se le enseña a recoger el material fecal en una bandeja de cartón adaptada al inodoro, todo recipiente debe estar estéril para recoger la muestra y prevenir la contaminación accidental, y si no se le pide al paciente que inmediatamente que tenga la muestra la lleve al laboratorio para ser procesada, ya que, las heces recién evacuadas son el material ideal para el examen de laboratorio(93). A menudo en los casos de enfermedad entérica, pueden no ser fácilmente obtenibles; los hisopos rectales son el método más práctico para obtener el cultivo en estas circunstancias. Insertar el hisopo más allá del esfínter rectal y rotarlo. Inocular en placas o colocarlo en soluciones preservativas(93).

A veces se encuentran dificultades en pacientes con diarrea, incapaces de usar un pato. En estas circunstancias, pueden depositarse toallas de papel en el inodoro obteniendo las heces diarreicas por encima del nivel del agua. (93).

Si el paciente está hospitalizado, el personal a cargo de la obtención de la muestra deberá recibir instrucciones explícitas de elegir partes de las heces que muestren moco o sangre. Estas áreas son en general portadoras de gran número de organismos que participan en el proceso patológico(53).

El laboratorio puede ser 'mucho más útil para el clínico si éste le envía un resumen de los antecedentes. Si es necesario, el médico puede ser consultado para obtener dicha información, de modo que a su vez el microbiólogo clínico pueda prestar mayor atención al cultivo de heces en medios más selectivos.(53). Un solo cultivo negativo de heces no basta para confirmar en el laboratorio la no intervención de bacterias infecciosas.(53).

Cuando se prevé de demora de 2 a 3 horas se debe utilizar un medio de transporte como Amies o Cary-Blair.(29).

A. 11) CONTENIDO DUODENAL:

El contenido duodenal que incluye enzimas y bilis pancreáticas y duodenales casi siempre es estéril, pero a veces muestra contaminación con patógenos como *E. coli*. El operador explicará al paciente que por medio de la prueba será posible detectar la infección bacteriana. Se le pedirá que restrinja la ingestión de alimentos o líquidos durante 12 horas antes de la prueba. Conviene describir el método de intubación al enfermo y asegurar que si bien es molesto, no es peligroso. Se le explicará que la introducción de la sonda puede producir náuseas, pero que el cumplimiento de las instrucciones del examinador respecto a la posición adecuada, respiración, deglución y relajamiento llevará al mínimo de molestias. Se sugerirá al paciente que vacíe su vejiga antes del método, para mejorar su comodidad.(38).

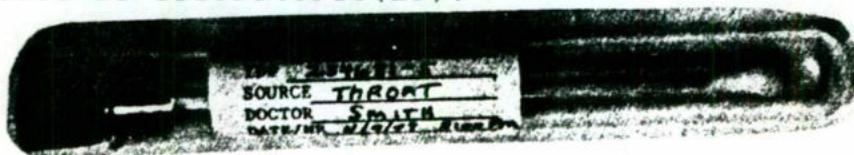
Una vez introducida la sonda nasointestinal, colóquese al sujeto en decúbito lateral izquierdo con los pies elevados, para que por medio del peristaltismo se desplace la sonda y llegue al duodeno. El pH de una pequeña cantidad de líquido aspirado indica la posición del tubo; si está en el estómago, el pH es menor de 7.0; si el tubo está en el duodeno, es mayor de dicha cifra.(38).

La posición del tubo también puede confirmarse por fluoroscopia. Después de la confirmación se aspira el contenido duodenal. Llevese la muestra al recipiente estéril y etiquetar la muestra.(38).

B) TRANSPORTE Y MEDIOS DE TRANSPORTE:

La ineficiencia en el transporte de muestras al laboratorio, después de obtenerlas del paciente es un problema importante. La mejor manera de obtener resultados aceptables es insistir en que el transporte dure los menos posible. Ciertas muestras deben transportarse en un medio o vehículo que preserve sus microorganismos y ayude a mantener la proporción entre ellos. Las muestras microbiológicas puede transportarse en varias formas, pueden emplearse un medio de transporte tipo buffer no proliferante como el Stuart, Toshach y Patfula, pero algunos prefieren el medio con carbón. El caldo nutritivo común o el caldo anaerobio pueden usarse si se emplean hisopos o líquidos de aspiración para el transporte por pocos minutos.(29)(53).

Para muestras tomadas con hisopos, existen en el mercado equipos, los cuales vienen preparados para un transporte en forma anaerobica, el cual consta de un tubo de ensaye Pyrex, con tapón de algodón, de acero inoxidable o de material plástico desechable, que contiene el palito aplicador y también un pequeño tubo, con algunas gotas de caldo para transporte. Se pueden emplear para la obtención de muestras de la garganta, nariz oídos, de heridas y otros sitios quirúrgicos, de los orificios urogenitales y del recto, pero no se recomiendan para la recuperación óptima de anaerobios. Una vez inoculado el hisopo con el material extraído del paciente, se coloca en el tubo interior con caldo para evitar su resecamiento, se rotula y se envía enseguida al laboratorio(29).



taponés de algodón o goma, si ha de haber demora para procesar la muestra, el líquido se deja a temperatura ambiente o se coloca en la incubadora, en cuanto a medios de transporte (46)(53).

En muestras de *orina*, lo que se hace es adicionarle un preservador de ácido bórico, glicerol y formato de sodio, lo cual mantiene a la orina por lo menos 24 horas con la misma eficacia que si estuviera en refrigeración, y si no se tiene estos reactivos ponerla en refrigeración 24 horas por lo menos, recientemente se ha dicho que se puede dejar de 5 a 10 días, para que no haya proliferación de microorganismos, dando resultados falsos positivos. También se pueden usar los medios de transporte Stuart, Amies, Cary-Balir, para muestras de orina por aspiración suprapúbica, o en la misma jeringa se puede transportar la muestra (pero sacándole el aire que queda dentro de la jeringa), y manteniéndola en refrigeración.(29)(53)(84).

Para muestras del *tracto genital*, es conveniente que la muestra se inocule de abajo hacia arriba sobre toda la superficie en un frasco con medio de transporte Transgrow, evitar los cambios bruscos de temperatura. Si se tiene la muestra en el laboratorio, se debe incubar a 35°C toda la noche antes de transportarse a algún laboratorio de referencia por correo, ya que con esto permite un crecimiento suficiente de microorganismos en la muestra para que puedan sobrevivir durante un transporte prolongado, transportarse en posición erecta (con la boca hacia abajo).(29)(38).

recipiente en posición erecta durante la fase de envío (38), la cual se cultivará lo antes posible. Si hay que esperar más de una hora, será necesario mantener el cultivo refrigerado hasta efectuar la estriación de las placas.(29).

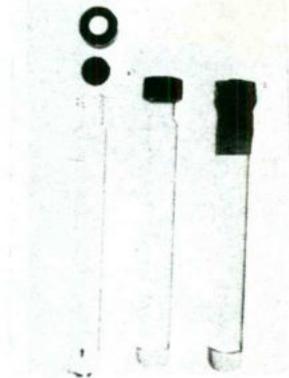
En muestras de *esputo*, en el caso de que no sea posible el cultivo inmediato, se refrigera la muestra durante no más de 1 a 3 horas, ya que con esto surge la recuperación de la mayoría de los gérmenes patógenos, este tipo de muestras deben ser colocados en 3 ml de medio de transporte (albúmina bovina 0.5% en caldo de tripticosa soya, pH 7.2).(29)(93).

En muestras del *heces*, basta disponer de un recipiente de material plástico o parafinado, si el espécimen es llevado enseguida al laboratorio. Cuando se prevé de una demora de 2 a 3 horas se debe utilizar un medio de transporte llamado de Cary-Blair o un buffer de fosfatos 0.033M, mezclado en partes iguales de glicerol (pH 7), también se puede utilizar el medio de transporte de Amies o de Stuart.(29), puede agregarse con estos un indicador que asegure un pH aproximado de 7 (verificar esto visualmente), ya que muchos microorganismos no resisten los cambios de pH que se produce al bajar la temperatura. Si se usan hisopos en estas muestras, agregarse a un tubo con tapa de rosca que contenga conservador, y transportarse al laboratorio lo más pronto posible.(53)(84).

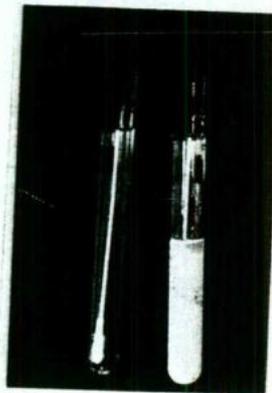
En muestras de *líquido cefalorraquídeo*, deben transportarse en recipientes estériles que puedan sellarse con una tapa de rosca, a fin de impedir filtraciones y pérdida o contaminación del contenido. Nunca deben transportarse tubos con

En muestras de *héridas*, abscesos e infecciones por mordedura, se debe proteger a los anaerobios que pudieran encontrarse en la misma, de los efectos tóxicos del oxígeno atmosféricos, se recomienda más la aspiración de las muestras anteriores con jeringa en vez de hisopos de algodón, si el procesamiento se demora más de 20 a 30 minutos, se debe transferir la muestra a un recipiente anaerobio inmediatamente, esto se hace en un tubo "desgasificado", el cual tiene tapón de goma de butilo ahuecado y una tapa en rosca, se prepara con un medio no nutritivo el cual es adecuado pues contiene polianetol-sulfato de sodio (SPS) y el indicador reazurina, se lava con CO₂ exento de oxígeno y se esteriliza en autoclave para ser transportados al laboratorio. Se puede preparar el tubo manualmente utilizando el método modificado de Hungate o en una cámara anaeróbica, también puede hacerse que el material aspirado sea inyectado a través de un tapón de goma y se extrae de la misma manera en el laboratorio para su estudio (29). Las muestras se mantienen viables de 24 a 48 horas por lo menos. El material también puede aspirarse jeringa, puede ser práctico quitar la aguja, cerrar la jeringa con su sello original y llevar la muestra directamente al laboratorio. No más de 10 minutos deben dedicarse al transporte de las muestras, de otro modo, éstas deben inyectarse inmediatamente a un tubo o frasco de transporte anaerobio. Otro sistema de transporte es el Vacutainer Anaerobic Transporter mostrado a continuación el cual contiene medio de transporte. (29), el método con Gas-Pack, la Culturette anaeróbica genera su propia atmósfera anaeróbica y contiene una pequeña cantidad de medio de transporte para evitar el resecamiento, han aparecido numerosos métodos para proporcionar un medio

TUBO DE TRANSPORTE CON ATMOSFERA ANAEROBICA Y LIQUIDO NO NUTRITIVO,
CON INDICADOR DE RESAZURINA (EL COLOR ROSADO INDICA LA PRESENCIA
DE OXIGENO.



MEDIO DE TRANSPORTE NO NUTRITIVO SEMISOLIDO.



JARRA ANAEROBICA



(29)

anaeróbico, entre los que se incluyen el método de tubo PRAS de Hungate, la cámara anaeróbica o la caja con guante y el frasco anaeróbico(29)(38)(53).

MEDIOS DE TRANSPORTE:

***STUART:** Stuart describió un medio de transporte que ha resultado muy útil para preservar muestras en tránsito. Se usa como método cómodo, sencillo y seguro para transportar muestras de hisopo del paciente al laboratorio. Se han obtenido buenos resultados en la recuperación varios microorganismos durante un transporte de 24 horas. La recuperación es menor después de este plazo pero casi todos los microorganismos más resistentes pueden cultivarse incluso después de 72 horas. (93).

Este medio es esencialmente una preparación no nutriente semisólida muy reductora que inhibe las reacciones enzimáticas autodestructoras dentro de las células y también previene los efectos de la oxidación, manteniendo así las muestras en "status quo", debido a que mantiene el pH favorable. No hay multiplicación de microorganismos. El medio debe usarse con hisopos preparados especialmente: 1) hervir aplicadores con punta de algodón absorbente en buffer de fosfato de Sorensen y mojarlos en una suspensión 1% de polvo de carbón fino. Es necesario recubrir y hervir los hisopos para destruir o desnaturalizar cualquier sustancia inhibidora que pueda haber en el agar y algodón. 2) en vez de algodón puede usarse alginato de calcio para la punta de los hisopos. Su ventaja es que si prefiere puede disolverse completamente en diversas soluciones

(Ringer) permitiendo la recuperación completa de microorganismos.(29)(93).

Como se puede observar en la fórmula de este medio, éste consta esencialmente de una solución buffer (soluciones estabilizadoras de pH) con exclusión de hidratos de carbono, peptonas y otros nutrientes. Este medio está concebido para preservar la viabilidad de las bacterias, el tioglicolato de sodio se le añade como agente reductor, para mejorar la recuperación de las bacterias anaerobias, y la pequeña cantidad de agar provee una consistencia semisólida para impedir oxigenación y derramamiento durante el transporte (46).

***CARY-BLAIR:** Da resultados efectivos y satisfactorios para la recolección y el transporte del material fecal.(93), este medio si se mantiene a la temperatura del ambiente dura más de un año y medio en conservación(29).

***AMIES:** Emplea carbón, evitando así la necesidad de impregnar con carbón los hisopos.

Los diversos medios de transporte pueden adquirirse en forma deshidratada y también como equipos preparados. Estos últimos incluyen equipos anaerobios.

Los equipos hisopo-ampolla se recomiendan para uso en el consultorio cuando la entrega inmediata al laboratorio

clínico no siempre es factible, o en situaciones en las cuales el cultivo debe demorarse inevitablemente.(93).

***TRANSGROW:**

Resulta muy útil, pero al parecer muestra algunas importantes deficiencias. Se ha encontrado que los preparados comerciales de este medio, contienen una concentración variable de CO₂, la humedad se acumula dentro de los frascos y puede dificultar la visibilidad y contribuir a la diseminación de bacterias contaminantes, interfiriendo en el desarrollo de colonias aisladas. Además el cuello estrecho del frasco es un inconveniente para la inoculación y subcultivo de colonias. Este medio se puede mantener refrigerado hasta tres meses.(29).

C) AISLAMIENTO DE E. COLI:

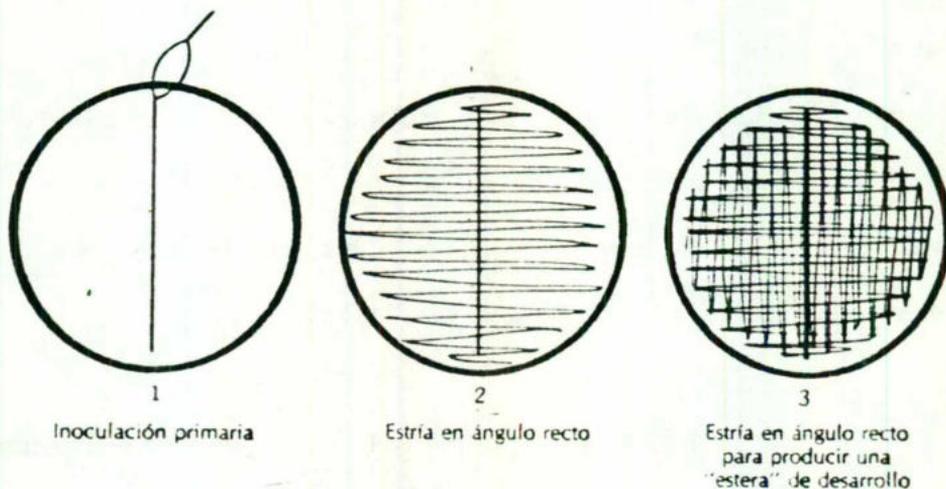
TECNICA:

- a. Toma de la muestra del sitio de infección que se desea investigar. (Ver el tema tratado en los capítulos anteriores sobre TOMA DE MUESTRA).
- b. La muestra puede conservarse en un medio de transporte como el Stuart o Amies.
- c. Hacer frotis de Gram para observación morfológica. (ver técnica en el APENDICE II). (93).
- d. Proceder a la identificación presuntiva en los medios adecuados como se explica a continuación: (93).

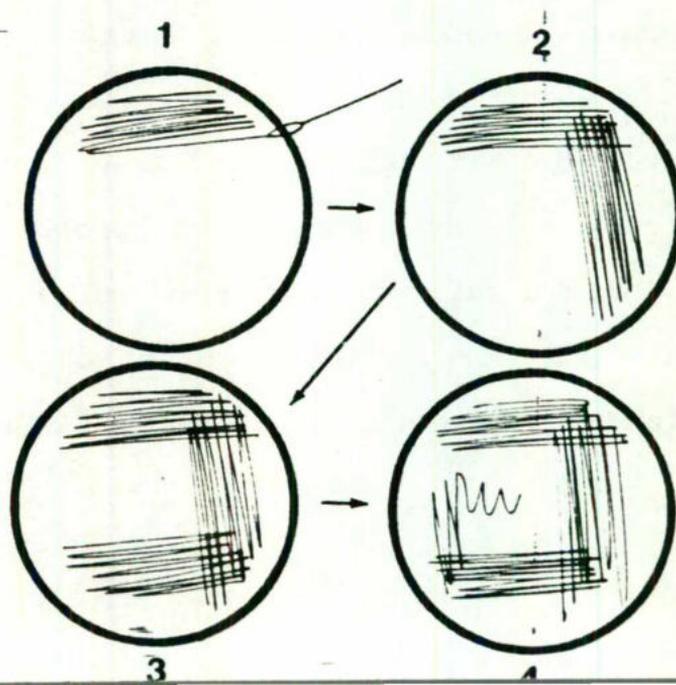
Para un óptimo aislamiento de los microorganismos es esencial inocular la muestra en el medio de cultivo primario apropiado, tan pronto como sea posible luego que ésta llega al laboratorio (38).

La superficie del agar de las placas de Petri se puede inocular como muestra la siguiente figura. El inóculo se disemina sucesivamente en estrías con un movimiento de arriba hacia abajo en cada cuadrante, dando la vuelta a la placa en un ángulo de 90°. El asa se debe esterilizar entre las sucesivas estrías y dejarla enfriar. El propósito de esta técnica es diluir el inóculo suficientemente sobre la superficie del agar como para poder obtener colonias de *E. coli* bien aisladas a partir de unidades formadoras de colonias. (29)(46).

Para *muestras de orina* no centrifugada o algunas otras muestras líquidas, se sumerge en la muestra, y se práctica una sola estria que cruce el centro de la placa de agar. El inóculo se disemina uniformemente en ángulo recto respecto de la estria primaria; luego la placa se da vuelta en ángulo de 90° y se disemina el inóculo hasta cubrir toda la superficie de agar, ver la siguiente figura.(46).



Para *muestras de heces, exudados vaginales y faringeos*, etc. el hisopo se descarga con la muestra en un extremo de la placa de Petri, y después con la ayuda de asa de platino perfectamente esterilizada se hace la diseminación de la muestra, ver la siguiente figura.(46)



Después de efectuar la inoculación de la muestra a estudiar en los diferentes medios, según sea el caso, se procede a incubar las placas de Petri, a una temperatura de 35°-38°C, de 24 a 48 horas, y proceder a TÉCNICAS DE IDENTIFICACION DE *E. coli*.(46), pero antes se explicaran los diferentes medios para el aislamiento de la *E. coli*:

***MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO:**

Como su nombre lo indica, los caldos de enriquecimiento se usan para acrecentar el desarrollo de ciertas especies bacterianas, inhibiendo el de los microorganismos superfluos(46). Estos medios, por su composición química, inhiben o destruyen la flora intestinal normal, como los coliformes (comensales) y permiten el crecimiento de otros, que pueden hallarse en número pequeño, y los cuales pueden ser exigentes. Después de la incubación de 6 a 12 horas, se deben efectuar subcultivos en medios sólidos, para obtener colonias aisladas para estudios ulteriores, El caldo tetracionato y el caldo selenito constituyen ejemplos de medios de enriquecimiento y se usan principalmente en bacteriología entérica(46), también se encuentra el caldo gram negativo (GN) (46).

El desoxicolato y el citrato inhiben las bacterias Gram positivas. El *caldo GN* es un medio enriquecedor selectivo ideado por Hajna para cultivar organismos gramnegativos del grupo entérico, en el que la selectividad que producen los hidratos de carbono y debido a la concentración relativamente baja de desoxicolato, el caldo es menos inhibidor de *E. coli*, se

recomienda para muestras contenidas en torundas de algodón anales, sangre, esputo, orina y para el examen de utensilios.(5).

El *caldo tetrionato* es un medio de enriquecimiento de materiales de heces, orina, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Las sales del medio y el yodo inhiben muchas otras bacterias.(46).

***MEDIOS DIFERENCIALES:**

Los medios diferenciales, en virtud de su composición química, darán características especiales a determinados géneros bacterianos, por el diferente aspecto de sus colonias en el cultivo, debido a la fermentación de la lactosa en el medio, esto es gracias a que poseen un sistema indicador visiblemente cambiado como resultado de las actividades metabólicas y que permiten la observación de reacciones diferenciales. Algunos ejemplos son el agar con eosina y azul de metileno (EMB) y el agar MacConkey, contienen lactosa y un colorante indicador en estado de decoloración. Las bacterias que fermentan la lactosa con la producción de ácido o aldehídos producirán colonias rojas, o colonias con un reflejo metálico, según el medio empleado, como la *E. coli* (46)(84)(93).

El *agar MacConkey*, este es un medio diferencial para la selección y recuperación de Enterobacterias y bacilos gramnegativos entéricos relacionados. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de bacterias grampositivas y de algunas gramnegativas exigentes. La lactosa es el único hidrato de carbono, las bacterias fermentadoras de lactosa forman

colonias de diferentes tonos de rojo debido al viraje del indicador rojo neutro (rojo pH menos de 6.8) por la producción de ácidos mixtos, la *E. coli* como fermentadora de lactosa aparecen las colonias de color rojo ladrillo y puede estar rodeada de una zona de bilis precipitada. Las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen incoloras y transparentes.(46).

El *agar EMB*, es un medio diferencial utilizable en lugar del *Agar MacConkey* para aislar y detectar enterobacterias o bacilos coliformes relacionados en muestras con bacterias mixtas. Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben a las bacterias grampositivas y a las gramnegativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos. El *agar EMB* de Levine, con lactosa solamente, da reacciones más paralelas a las de *agar MacConkey*; la fórmula modificada detecta también fermentadores de sacarosa.(5)(46).

Agar desoxicolato-citrato(ADC), es un medio diferencial usado para aislar enterobacterias a partir de cultivos mixtos. Dado que el medio tiene alrededor de 3 veces mayor concentración de sales biliares (desoxicolato de sodio) que el *agar MacConkey*.(46).

Agar Tergitol 7: Este medio es adecuado para el desarrollo de microorganismos, ya que da alrededor de un 30% de recuento más alto que otro medio selectivos empleados para el mismo fin. (5).

***MEDIOS SELECTIVOS:**

Los medios selectivos son complejos y sirven no sólo para diferenciar entre ciertos géneros, sino también resultan muy selectivos en su acción sobre otros organismos, ya que son nutricionalmente adecuados para las bacterias que se desean aislar; contienen inhibidores capaces de suprimir el crecimiento de ciertos organismos, pero que permiten (seleccionan) el crecimiento de uno o más tipos deseados(46)(93). Los bacilos entéricos son resistentes frente a la inhibición por acción de ciertos colorantes bacteriostáticos (por ejemplo el verde brillante) y de compuestos activos de superficie (por ejemplo sales biliares). Los medios selectivos que contienen estas sustancias, como los antes mencionados facilitan considerablemente el aislamiento de bacilos entéricos a partir de cultivos fecales(21).

D) PRUEBAS DE IDENTIFICACION:

La identificación de *E. coli* se logra usando los siguientes criterios y procedimientos:

***CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS:**

El crecimiento en cultivos primarios aporta claves importantes para el reconocimiento rápido, y a menudo la identificación presuntiva de *E. coli*, tomando en cuenta: 1) morfología colonial, 2) crecimiento en medios simples, complejos, diferenciales o selectivos, 3) índice de crecimiento, 4) crecimiento anaerobio y 5) características microscópicas, coloración de Gram (nos dice si el organismo es grampositivo o gramnegativo), forma de bacilos y tamaño. (93).

De acuerdo a la morfología colonial podemos tomar en cuenta los siguientes puntos:

1. **Superficie de la colonia:** lisa, rugosa, arrugada, contorneada (superficie irregular, ondulada), granular (fina, mediana, aspera), papilar, opaca, brillante.

2. **Características ópticas:** Opaca, translúcida, opalescente, Iridiscente (muestra los colores cambiantes del arco iris con luz refleja), opaca, reluciente.

3. **Consistencia:** Viscosa, membranosa, frágil y quebradiza.

4. **Pigmentación del crecimiento:** blanco, amarillo oscuro, amarillo claro, amarillo pajizo, amarillo profundo, rosado, rojo, etc. (93).

***CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:**

Esta es otra parte muy importante para la identificación de *E. coli*, por lo que se debe tener mucho cuidado en la lectura de los resultados (positivos o negativos) de las pruebas a efectuar, ya que de esto dependerá la identificación definitiva de la Familia, genero y especie, usando un diagrama con resultados obtenidos de bioquímicas en base a la experiencia de la identificación de *E. coli*(93).

D.1) PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE E. COLI:

D.1.1) REACCIONES EN KIA: (KLIGLER)

a) Fundamento:

Cuando el tubo KIA es inoculado con organismos fermentadores de glucosa, como lo es la *E. coli*, la cual puede utilizar la lactosa, sólo se puede obtener una cantidad relativamente pequeña de ácido, ya que, la concentración de glucosa del medio es de solo 0.1%. (46).

Las bacterias que utilizan la lactosa producen en KIA cantidades relativamente grandes de ácido, debido a la mayor concentración de lactosa en el medio. Esta cantidad de ácido es suficiente para superar la reacción alcalina desarrollada en el pico, y todo el tubo permanece consecuentemente de color amarillo. Las reacciones ácido/ácido características de *E. coli* son indicativas de organismos fermentadores de lactosa.(46).

b) Técnica:

El tubo de KIA se inocula con una asa recta del microorganismo a estudiar e incubar de 18 a 24 horas. (46).

Interpretación:

*ACIDA/ACIDA (A/A):

La *E. coli* tiene la facultad de fermentar tanto la lactosa como la glucosa en busca de elementos nutritivos, dando una reacción de un pico de flauta ácido y una capa profunda ácida, después de 18 a 24 horas de incubación. En un periodo de 18 a 24 horas la concentración de lactosa en mayor cantidad aún no se ha consumido y todavía existe una condición ácida. Si se leyera el mismo tubo de KIA después de 48 horas o más, el pico de flauta se habría vuelto alcalino por depleción de la lactosa y la utilización de peptonas. (58).

*Interpretación respecto a los gases formados:

Si se produce gas como producto terminal del metabolismo de los hidratos de carbono, los gases producidos son anhídrido carbónico e hidrógeno, la bacteria que produce gas se denomina aerogénica y se manifiesta como una burbuja o desplazamiento completo del medio del fondo del tubo, dejando un área clara, burbujas en el medio o ligera muesca del medio en el costado del tubo, la *E. coli* puede o no presentar esta facultad. (ver fotografía en el cuadro No. 1). (58).

D.1.2) PRUEBA DEL INDOL:

a) Fundamento:

El indol, un bencilpirrol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido Triptofano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, siendo especialmente útil para identificación de *E. coli* de miembros del grupo de Klebsiella y Enterobacter. (46)(58).

b) Técnica:

Inocular agar triptofano con el organismo en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar éste periodo, añadir 5 gotas del reactivo (EHRlich o KOVAC). (53).

c) Interpretación:

El desarrollo de un vivo color fucsia en la interfase del reactivo y el medio, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y una prueba positiva para *E. coli*. (ver fotografía en el cuadro No. 1)(58).

D.1.3) PRUEBA DE UTILIZACION DEL CITRATO:

a) Fundamento:

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de

Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía por vía distinta de la fermentación de hidratos de carbono, utilizando citrato como única fuente de carbono. La determinación de *E. coli* puede hacerse a partir de cualquier medio que pueda detectar la utilización del citrato por parte de las bacterias.(46).

La utilización del citrato se detecta mediante la formación de subproductos alcalinos. La bacteria que puede utilizar citrato, también puede extraer nitrógeno de la sal de amonio, con una producción de amoníaco, llevando a la alcalinización al medio por conversión de NH_3^+ en hidróxido de amonio (NH_4OH). (46).

b) Técnica:

Tomar una colonia bien aislada e inocular una sola estria el pico de agar citratado el cual comúnmente es la fórmula de Simmons (ver APENDICE I). Incubar.(5)(46)(53).

c) Interpretación:

El desarrollo de un color azul intenso en 24 a 48 horas indica una prueba positiva y revela que el organismo en estudio ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con la producción de productos alcalinos. La prueba también es positiva en una ausencia de color azul, si existe un desarrollo visible de colonias a lo largo de la estria de inoculación y por el contrario una prueba negativa como lo es *E. coli* no se presenta cambio de color del medio (verde) y no hay crecimiento en la superficie del "pico de flauta".(ver fotografías en el cuadro No. 1).(46)(53).

D.1.4) PRUEBA DE FORMACION DE H₂S:

a) **Fundamento:**

La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de aminoácidos y otros compuestos que lo contienen en la forma de gas H₂S, constituye una característica importante para su identificación, la producción de gas H₂S es detectable en un sistema analítico cuando:

- El medio contiene una fuente de azufre.
- El medio contiene un indicador de H₂S.
- El medio promueve el desarrollo de la bacteria en estudio.

La bacteria posee un sistema enzimático productor de H₂S.

La secuencia de etapas conducen a la producción de H₂S en un sistema analítico son las siguientes:

- Liberación de sulfuro de cisteína o de tiosulfato por acción enzimática bacteriana.
- Acoplamiento del sulfuro (S⁻²) con el ión hidrógeno (H⁺) para formar gas H₂S.
- Detección del gas mediante sales de metales pesados como hierro, bismuto ó plomo, en la forma de sulfuro de metal pesado, precipitando con formación de un color negro.

Pero como sabemos de antemano que la *Escherichia coli* no presenta formación de H₂S. (46) (53).

b) **Técnica:**

Se usa medio SIM, punción con el asa y el inóculo hasta el fondo del tubo (1cm) y sacar siguiendo la misma línea inicial de inoculación. Incubar a 35°C durante 24 horas. (46) (58).

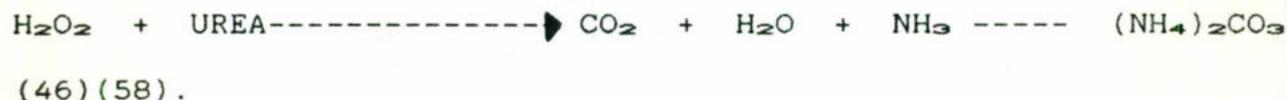
c) Interpretación:

En los sistemas de detección de H_2S , el punto final es de un precipitado negro (ennegrecimiento del medio) insoluble del sulfuro de metal pesado, formado en el medio, lo que indica una prueba positiva al ácido sulfhídrico y negativa la no presencia de este precipitado en el medio. Por lo que la *Escherichia coli* no presenta este precipitado, dando una reacción negativa a H_2S . (5)(46).

D.1.5) PRUEBA DE LA DETECCION DE UREASA:

a) Fundamento:

La urea es una amina del ácido carbónico, los microorganismos que poseen la capacidad de hidrolizar urea poseen la enzima llamada ureasa, con la liberación de amoníaco, una característica importante en la identificación de especies. (58).



b) Técnica:

Inocular en el Caldo de Urea de Stuart (ver APENDICE I) con una asada cargada (2mm). Incubar los medios en baño maría a $37^\circ C$ por 60 minutos a 2, 8, 12, 24, y 48 horas de incubación si el medio es líquido. (46)(53)(58).

c) Interpretación:

Los organismos que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 ó 2 horas; las especies menos activas puede requerir 3 ó más días.

La reacción es:

**Caldo Stuart*: un color rojo rosado intenso en todo el caldo indica alcalinización e hidrólisis de urea y por tanto, se considera la reacción como positiva, si no se produce cambio de color (amarillo anaranjado) en el caldo la reacción es negativa, como lo es para *E. coli*. (58). (ver fotografía en el cuadro I).

D.1.6) PRUEBA DE DETERMINACION DE MOVILIDAD:

a) Fundamento:

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación de una especie, las bacterias tienen motilidad por medio de flagelos. Las bacterias móviles pueden tener un solo flagelo o muchos. (58).

Los medios combinados tales como el SIM (sulfuro-indol-movilidad) ó el MIO (movilidad-indol-ornitina), son los que usualmente se utilizan (ver APENDICE I para su preparación), debe interpretarse primero la movilidad ya que el agregar el reactivo para la prueba de indol puede oscurecer los resultados. (53).

b) Técnica:

Inocular en el medio MIO (movilidad-indol-ornitina) (ver APENDICE I) hasta una profundidad de 1.2 cm,

tratar de que entre recta la asa al medio y sacarla por el mismo lugar. Incubar.(53)(58).

c) Interpretación:

Una prueba positiva indica que los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden por el medio, provocando turbiedad. Pueden mostrar un crecimiento en estrias vellosas. Y una prueba negativa o sin motilidad muestra un crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio circudante se mantiene claro.(58). La *E. coli* puede presentar una u otra de estas características.(58).(Ver fotografía en el cuadro I).

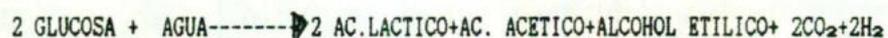
D.1.7) PRUEBA DE ROJO DE METILO:

a) Fundamento:

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6 y 4.4. El pH al cual el rojo de metilo detecta ácidos es considerablemente menor que el de otros indicadores en medios de cultivo bacteriológicos. A fin de producir un cambio de color, el organismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido a partir del sustrato hidrocarbonado que emplea.(46)(58).

La prueba de rojo de metilo es cuantitativa para la producción de ácido y requiere organismos positivos que produzcan ácidos fuertes a partir de la glucosa, por vía de la fermentación ácida mixta, dado que muchas de las especies de enterobacterias como lo es la *E. coli*, que puede producir cantidades suficientes de

ácidos fuertes detectables con el indicador rojo de metilo durante la fase inicial de la incubación, solo se consideran rojo de metilo positivos aquellos organismos que pueden mantener este pH bajo luego de la incubación prolongada de 48 a 72 horas, contrarrestando el sistema estabilizador de pH del medio.(46).



b) Técnica:

Inocular en el caldo RM/VP (ver APENDICE I) con un cultivo del organismo en estudio, incubar. Finalizado éste periodo, añadir directamente al caldo 5 gotas del reactivo de rojo de metilo.(46).

c) Interpretación:

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y es una prueba positiva (lo que se espera de *E. coli*). La prueba Rojo de metilo negativa presenta un desarrollo de color amarillo en la superficie del medio.(46)(58).(ver fotografía en el cuadro I).

D.1.8) PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER:

a) Fundamento:

La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave de la glucólisis. A partir

del ácido piruvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de la acetoina es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoina se convierte en diacetilo y alfa-naftol, el cual actúa como catalizador para revelar un complejo color rojo.(38)(102).

Esta prueba sirve para separar a la *E. coli* (VP -) de los grupos *Klebsiella-Enterobacter* (VP +).(58).

b) Técnica:

Inocular un tubo de caldo RM/VP (ver APENDICE I) con un cultivo puro del organismo en estudio. Incubar. Al finalizar éste periodo, transferir 1 ml de caldo a un tubo de ensayo limpio. Añadir 0.6 ml de alfa-naftol al 5% y 0.2 ml de KOH al 40% (ver APENDICE II para la preparación de estos reactivos). y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos.(46)(58).

c) Interpretación:

Una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rojo a los 15 minutos de añadir los reactivos. La prueba no debe leerse luego de más de una hora, ya que cultivos VP negativos puede producir un color cobrizo, con la consecuente posibilidad de una interpretación falsa positiva, y una prueba negativa lo cual se espera en una especie como la *Escherichia coli* da un color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo).(46)(58).(ver fotografia del cuadro I).

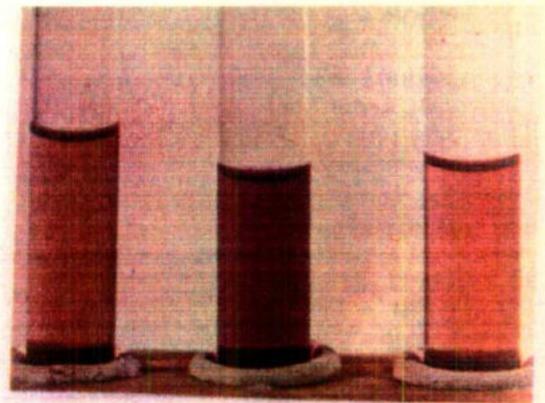
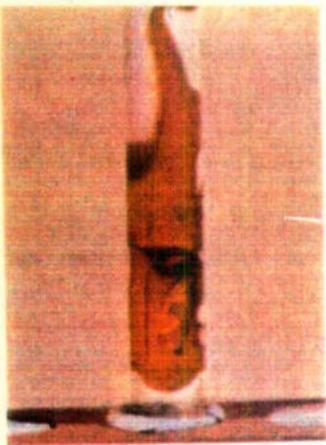
***IDENTIFICACION FINAL:**

En base a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, se anotan perfectamente en una hoja y se comparan con el siguiente diagrama, si se relacionan los resultados obtenidos, se tratará de la familia *Enterobacteriaceae*, Género *Escherichia* y especie *Escherichia coli*. (46) (93).

BATERIA DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

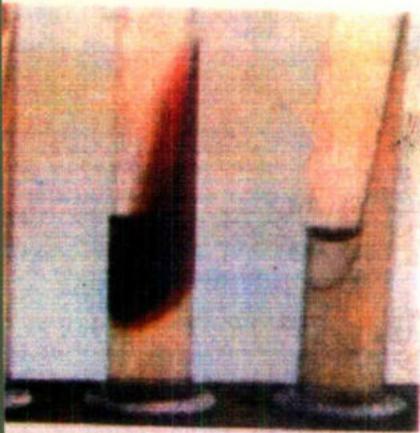
GLUCOSA +	CITRATO -
GAS +.....	MOVILIDAD +/-
LACTOSA +	H2S -
SACAROSA +/-	MANITOL +
UREA -	ROJO DE METILO +
INDOL +/-	VOGES-PROSKAUER -

(53) (93).



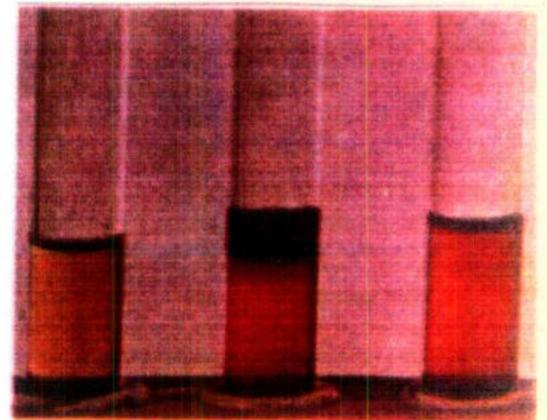
No inoculado Positiva Negativa

Reacción de la ureasa de Stuart.



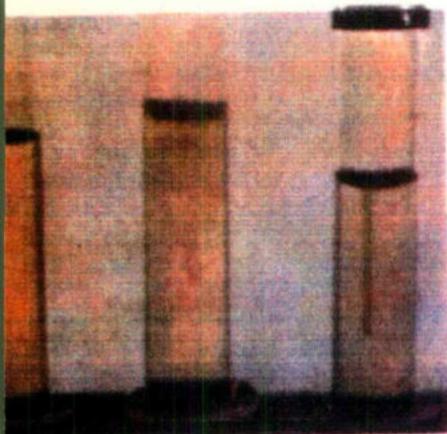
No inoculado Positiva Negativa

Prueba de reducción del nitrato



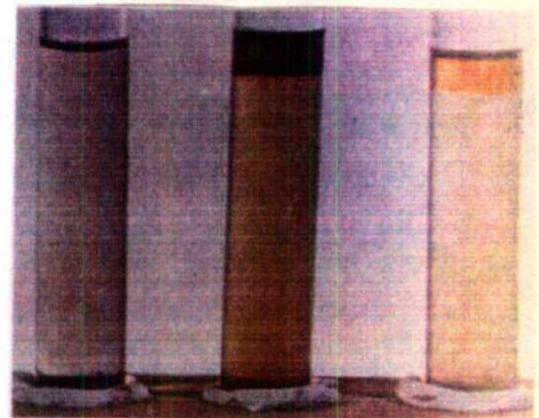
No inoculado Positiva Negativa

Prueba del rojo de metilo.



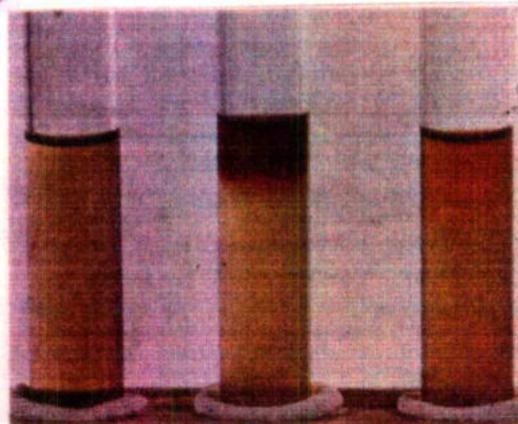
No inoculado móvil (+) Inmóvil (-)

Prueba de motilidad.



No inoculado Positiva Negativa

Prueba del indol de Kovacs.



No inoculado Positiva Negativa

Reacción de Voges-Proskauer.

E) PRUEBAS CONFIRMATORIAS:

E.1) PRUEBAS SEROLOGICAS Y BIOLOGICAS MAS COMUNES, UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACION DE ESCHERICHIA COLI COMO ESPECIE Y SUBESPECIES:

La confirmación serológica y biológica es una parte esencial para reconocer ciertas cepas patógenas de *E. coli*. (53).

E.1.1) SEROTIPIFICACION: (Determinación de antígenos H, K y O).

La serotipificación para identificar cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedad entérica ha sido aplicada mayormente al grupo de microorganismos conocidos como "enteropatogénicos". Este método es complicado y dificultoso y muy rara vez produce información etiológica definitiva. Algunos serotipos específicos han sido también asociados con cepas enterotoxigénicas y enteroinvasoras de *E. coli* (53), este método consiste en la determinación de antígenos H, K y O, mediante el uso de antisueros preparados contra cepas seleccionadas enteropatógenas, enterotoxigénicas y enteroinvasoras, buscando aglutinación (Ag-Ac) como resultado de esto, este tipo de pruebas se encuentra en forma comercial para los laboratorios clínicos, facilitando su uso. (93).

E. 1. 2) E L I S A:

Es un ensayo enzimático con inmunoabsorbentes. Los métodos de ELISA implican la unión de la toxina en filtrados de cultivos con cavidades recubiertas con gangliósidos de placas plásticas de microtitulación.(53). La presencia de la toxina se detecta mediante la adición de anticuerpos específicos y luego por la adición de un anticuerpo conjugado con la enzima. Una reacción con desarrollo de color indica una prueba positiva. Estas pruebas han demostrado un 100% de sensibilidad y especificidad en comparación con los tradicionales ensayos con cultivos de células.(53).

E. 1. 3) ANTICUERPO FLUORESCENTE:

Consiste en usar antisueros marcados con fluoresceína los cuales se venden comercialmente frente a la muestra problema del paciente y la observación al microscopio de fluorescencia de una reacción Ag-Ac. Este tipo de técnicas no se usaban tanto porque muchos antisueros no están en venta y el laboratorio no está equipado para tareas de marcación y control de calidad, además de la inversión del equipo es considerablemente cara y se debe disponer de un personal seguro y experto en esto, pero podemos decir que es un procedimiento de selección excelente y rápido que da mayor porcentaje de hallazgos positivos que la técnica de cultivo convencional.(93).

E. 1. 4) RADIOINMUNOANALISIS: (R I A):

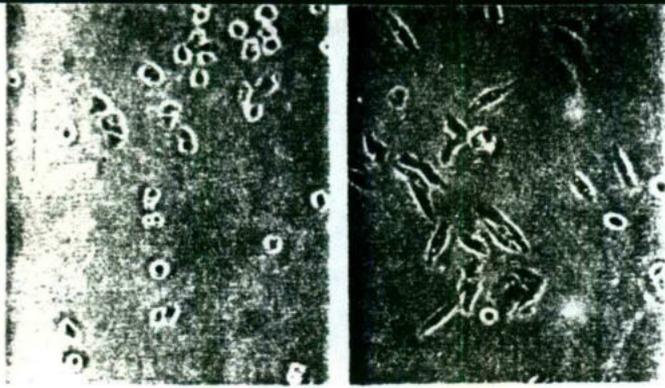
Se usa el marcado de los antígenos o los anticuerpos con isótopos radiactivos, lo cual permite su detección en los inmunocomplejos como en estado libre, en cantidades muy pequeñas, puesto que la radiactividad tiene sistemas de medida de extraordinaria sensibilidad. Este método utiliza el principio de la inhibición competitiva de la unión de un inmunocomplejo de una molécula (Ag o Ac) marcada radiactivamente(16). Este método usa un contador Geiger o de centelleo, el cual emite una radiación la cual un pulso luminoso la detecta con un fotomultiplicador, se amplifica y se registra.(93).

E. 1. 5) COAGLUTINACION:

La coaglutinación con *Staphylococcus aureus* portador de proteína A, conjugado con anticuerpo contra enterotoxinas de *E. coli*. Esta técnica se ha hallado efectiva para la detección de enterotoxinas en lisados de colonias de *E. coli*(53).

E. 1. 6) DETECCION DE TOXINA LT Y ST:

Se pueden utilizar varias pruebas, el modelo clásico ha sido a) la inoculación del asa ileal de conejo aislada y ligada, que produce una respuesta secretora después de 6 horas de haberse inoculado la toxina, de manera que el asa se dilata y se llena de líquido para estímulo funcional (ver figura No 20).(32)(84).



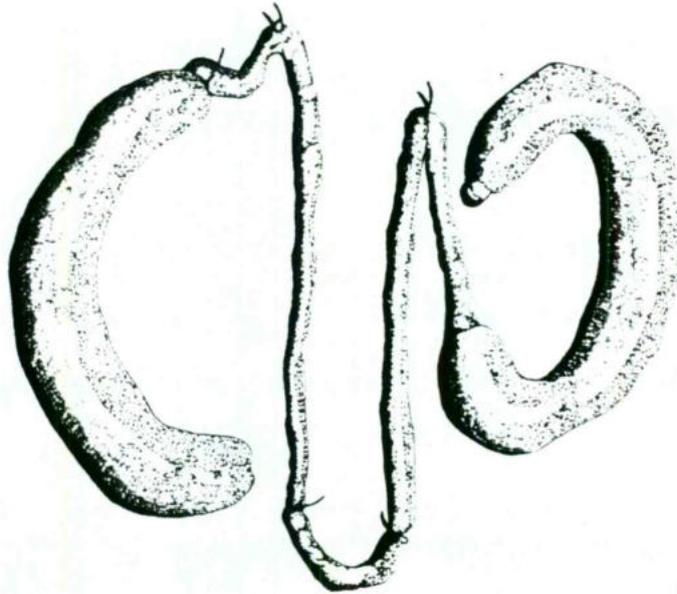
A

B

Cultivo de células CHO (células de ovario de hamster chino).

A. Cultivo de células normales.

B. Células alargadas, después de 24 horas de incubación con un filtrado de células de ETEC.



Inoculación del asa ileal de conejo aislada y ligada para la demostración de enterotoxina.

y b) la toxina termolábil se puede demostrar también por los cambios morfológicos que produce en los cultivos de células Y-1 de tumor adrenal del ratón (redondeamiento) o de células ováricas (CHO) de hámster chino (elongación) (ver figura No 21).(84).

E . 1 . 7) PRUEBA DE SERENY :

La *E. coli* enteroinvasiva se reconoce por su capacidad de penetrar e invadir las células de la conjuntiva y córnea del cobayo, produciendo una queroconjuntivitis; por instilación del saco conjuntival, de 1 a 7 días dan lugar a la aparición de un ojo hipéremico y edematoso, (ver figura No. 21).(84).



FIG.No. 21

E. 1. 8) HIBRIDIZACION DE DNA:

La hibridización de DNA ha sido aplicada con éxito a la detección de enterotoxina de *E. coli* de colonias aisladas y directamente en muestras de heces. La técnica emplea fragmentos radiomarcados de DNA que codifican para enterotoxinas termolábiles y termoestables de *E. coli*. La aplicación de estas sondas genéticas a colonias aisladas implica el desarrollo del microorganismo en estudio en filtro de nitrocelulosa, el lisado de las colonias y la hibridización del DNA de las colonias con el DNA radiomarcado. La hibridización se detecta por autorradiografía y las colonias positivas están indicadas por una área negra. (53).

E. 1. 9) HEMAGLUTINACION MANOSA SENSIBLE Y MANOSA RESISTENTE:

La hemaglutinación es una técnica simple, rápida y económica, en particular se pone en presencia y ausencia de D-manosa o algún análogo para diferenciar las adhesinas manosa sensible (MS) o sea que las que son inhibidas por manosa de las adhesinas manosa resistente (MR). Sin embargo el uso de la hemaglutinación para la identificación de adhesinas es con frecuencia insuficiente y es cada vez más común que muchas cepas de *E. coli* poseen adhesinas múltiples y algunas no aglutinan usando eritrocitos. (32)(95).

E. 1. 10) ADHERENCIA A CELULAS Hep-2:

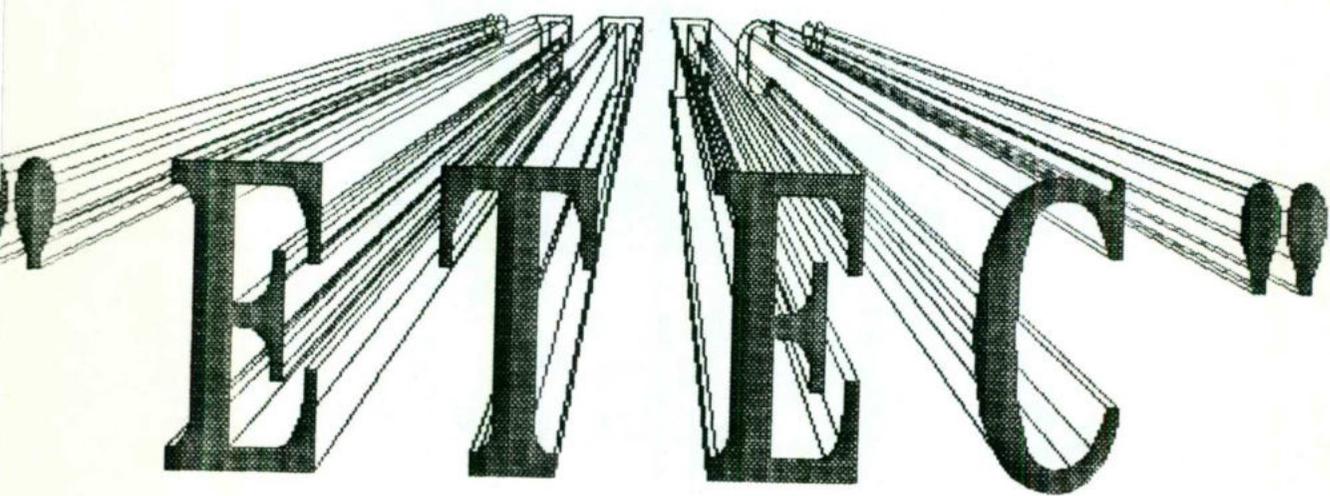
En este método se usa cultivos de células Hep-2 para demostrar la adherencia en 80% de las cepas EPEC aisladas de niños con

diarreas y que contienen pili tipo 1, CFA I ó CFA II, además de la toxinas ST y LT las cuales no presentaban adherencia a este modelo celular. El método *in vitro* consistía en adicionar una suspensión bacteriana, de la que se probará adhesividad, sobre un monocapa de células Hep-2 con una pequeña cantidad de D-manosa e incubar durante 3 horas a 37°C. Después de la incubación se lava con una solución reguladora de pH, para remover aquellas bacterias que no se hayan adherido, se fija con metanol y se tiñe con GIEMSA. La adherencia se observa por microscopía óptica. Este estudio también se puede utilizar con cultivo de células HeLa (células de carcinoma de cervix humano). En laboratorios de rutina se restringe esta prueba por la inversión tan cara de esto. (33).

La disponibilidad de estos métodos hace que las pruebas de enterotoxinas sean factibles para muchos laboratorios y cuando estos métodos o similares estén comercialmente disponibles en un futuro cercano, será posible para todos los laboratorios menos los más pequeños, detectar enterotoxinas de *E. coli*, para un mejor diagnóstico de la diarrea bacteriana. (53).

SUBSPECIES

DE E. COLI



XIV.A)

E s c h e r i c h i a c o l i ENTEROTOXIGENICA

A.1) ANTECEDENTES HISTORICOS:

Cuando se describió por primera vez a *E. coli* enterotoxigénica como agente etiológico en la enfermedad diarreica en humanos, las cepas que se encontraron pertenecían a una larga variedad de serotipos pero, con pocas excepciones, no pertenecían a las clásicas cepas enteropatógenas.(14).

Los determinantes de virulencia de ETEC permanecieron así oscuros por muchos años: principalmente debido a la incapacidad de reproducir la enfermedad causada por estas cepas en animales experimentales.(88).

De y col. en 1956 publicaron resultados sobre distensión y acumulación de líquido en asas ligadas de intestino de conejos inoculados con ultrafiltrados de cultivos de cepas de *E. coli* aisladas de individuos con diarrea tipo cólera, este experimento se había aplicado exitosamente al estudio del cólera. Estudios posteriores demostraron que ciertas cepas de *E. coli* tenían la habilidad de producir exotoxinas que al interactuar con células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero producían un aumento en la secreción de agua y electrolitos, y con esto demostraron que había tres variedades de ETEC (O25, O55, O111). Estos investigadores también examinaron aislamientos de *E. coli* de 40 adultos con diarrea y concluyeron que no existía

correlación entre el serogrupo de *E. coli* y la patogenicidad.(14)(88).

La colonización del intestino tiene lugar mediante un fenómeno de adherencia a la mucosa intestinal en la mayoría de los casos y ésta se realiza a través de ciertas estructuras o apéndices filamentosos que se proyectan de la superficie de la bacteria, denominados "fimbrias o pilis". Estas estructuras son de naturaleza proteica, antigénicas y termolábiles que no tiene relación algunas con los flagelos.(50).

El factor de colonización mejor conocido es el antígeno K88, donde el pili fue descrito en 1958 en colitis patógenas para el cerdo y se trata de un antígeno superficial, de naturaleza proteica diferente de los antígenos "K" polisacáridos.(9)(84).

En 1966 Taylor y Bettelheim, ensayaron el filtrado de un cultivo de *E. coli*, este filtrado había sido esterilizado con cloroformo y fué capaz de inducir secreción en asa ligada de intestino, de manera similar a *Vibrio cholerae*, destacando así la producción de enterotoxinas por cepas de *E. coli* lo que parecía proporcionar la pieza final perdida del rompecabezas, que relacionaba al cólera asiático con el cólera infantum.(88).

Smith y Halla (1967) emplearon exitosamente la técnica de asa ligada en una variedad de animales y mostraron que la dilatación del asa podía ser inducida., no solamente por *E.*

coli recuperada de animales con diarrea, sino también de filtrados de cultivos.(88).

Smith y Gyles (1970) condujeron al descubrimiento de dos distintas clases de enterotoxinas producidas por *E. coli*; una es inactiva por el calor a 60°C durante 30 minutos y la otra retiene la mayor parte de su actividad después de ser sujeta a hervor durante 30 minutos. Por esta razón se le llamó toxina LT (termolábil) y ST (termoestable) de *E. coli* respectivamente. Ambas clases de enterotoxinas son citotóxicas y producen cambios no letales en cultivos celulares, con efecto sobre el crecimiento y metabolismo similares a los inducidos por hormonas.(92).

En este mismo año se reportó que además de la elaboración de toxinas ST y LT, las cepas ETEC tenían la habilidad para producir proteínas fimbriadas por medio de las cuales se adherían a receptores específicos en las células del hospedero. Se han descrito a la fecha ocho de estos factores adhesivos, cuatro en cepas ETEC aisladas de animales (K88, K99, 987P y F41) y cuatro en cepas ETEC aisladas en humanos (CFA/I, CFA/II y CFA/III). Existen varias revisiones recientes sobre las características de estos factores adhesivos ya que juegan un papel muy importante en la patología de estas interacciones.(14)(50).

El papel de estos pilis en la patogenia de la infección quedó plenamente confirmado mediante la inoculación experimental de cerdos con tres variedades de *E. coli*; una que poseía los dos factores de virulencia (enterotoxina y antígeno

K88); otra conteniendo solo la enterotoxina y la tercera poseía únicamente el antígeno K88. La tabla No. 10, presenta la posible participación de estos factores de virulencia en el proceso infeccioso, el cual al parecer requiere primero de la colonización del intestino delgado, seguido de la producción de la o las enterotoxinas.(32)(73).

La significación de ETEC en la diarrea del viajero empezó a clasificarse en el reporte por Rowe y col. (1970), en el cual un serotipo único (O148:H28) producía una toxina que era responsable en 54% de casos de diarrea, en un grupo de soldados que habían viajado a Aden. Observaciones similares se hicieron por Dupont y col. (1971) en las tropas de USA, en el lejano Oriente, de los cuales el mismo grupo se aisló.(59).

Al igual que las enterotoxinas, la producción de estos factores está controlada genéticamente por plásmidos, algunos de los cuales han podido transferirse a cepas de *E. coli* K12 para construir mapas que permitan su estudio.(14).

TABLA No. 10.

COLONIZACION Y PRODUCCION DE DIARREA POR DIFERENTES TIPOS
DE CEPAS DE *Escherichia coli* INOCULADOS EN CERDOS

<i>Escherichia coli</i>	MULTIPLICACION EN INTESTINO DELGADO	DIARREA
K88+ Ent LT+	+ + + +	+ + + +
K88+	+ + + +	+
Ent LT+	--	--

(73).

Cuando se llegó al conocimiento de que plásmidos transferibles controlaban la producción de enterotoxina, se pensó que virtualmente cualquier cepa de *E. coli* podría ser enterotoxigénica por la adquisición del plásmido apropiado. (82).

En 1973 Sack inmunizó conejos con cultivos filtrados que contenían LT demostrando una respuesta inmune sistémica contra la toxina y protección contra cepas homólogas. A partir de entonces se han elaborado toxoides a base de LT purificada inactivada con calor o formaldehído. A pesar de su efectividad en animales, los estudios con voluntarios humanos han sido poco satisfactorios, a la fecha ninguno de estos inmunógenos se han utilizado en pruebas de campo. (14).

El desarrollo de recombinantes genéticas capaces de producir únicamente subunidad B de LT ha permitido la elaboración de un nuevo grupo de vacunas con buena efectividad en

animales de experimentación. Faltan por reportarse estudios en humanos utilizando estos productos.(14).

El primer factor de colonización en cepas de ETEC de origen humano fue descrito por Evans y col. en 1975 (26) y se refiere como CFA/I, fue encontrado en cepas ETEC de los serogrupos O15, O25, O63, O78, O128, O153 (ver tabla N° 14). Evans y col. en este mismo año, publicaron la base de un patrón particular de hemaglutinación y ser confirmado posteriormente por el uso de antisueros contra CFA/I.(26).

En 1976 Orskov y col., encontraron un grupo definido de serotipos de ETEC cuando examinaron un gran número de cepas. Aparentemente la presencia de ciertos antígenos "O", "H" y algunas veces "K", indica una alta posibilidad de que una cepa sea enterotoxigénica. Se ha observado que *E. coli* O78H11 y O78H12 son enterotoxigénicas, mientras que las cepas O78 sin estos antígenos H específicos rara vez lo son. De la misma manera *E. coli* O6H16 es casi siempre enterotoxigénica, mientras que en cepas O6 con otros antígenos H, usualmente no lo son.(82).

Algunas de estas cepas de *E. coli* enterotoxigénicas, también tienen un antígeno K específico; por ejemplo casi todas las cepas O6H16 poseen el antígeno K15, y muchas de estas cepas enterotoxigénicas tienen también patrones comunes de fermentación (50), así mismo una asociación entre el serotipo y el tipo de enterotoxina; el serotipo O6H16 casi siempre produce ambas toxinas, mientras que el serotipo O128H (variable) produce solamente ST. Esta asociación entre los antígenos de pared mediados por el cromosoma celular y la

producción de enterotoxinas y fimbrias mediadas por plásmidos, no está aclarada.(82).

En 1977 Evans y col. observaron que serotipos como O6H16 y O78H11 son menos propensos a perder plásmidos que los otros serotipos antes mencionados, y gracias a la pérdida de la capacidad para producir toxinas ST y LT, permitió clasificar a los aislamientos de *E. coli* en cuatro grupos, de acuerdo a la estabilidad o inestabilidad, en la producción de las enterotoxinas, particularmente en la toxina termolábil.(82).

En este mismo año, estos autores especulan la posibilidad de que tales serotipos sirvan como reservorios de los plásmidos ENT+ en la naturaleza, transmitiendo estos plásmidos a otros serotipo.(50).

Evans y col. (1978), describieron un segundo factor de colonización distinto antigénicamente de CFA/I y referido a CFA/II y que fue asociado con serogrupos O6, O8, O80, y O85 (ver tabla N° 11). CFA/II mostró un diferente patrón de hemaglutinación que el de CFA/I. (27).

En 1980 Levine, demostró que cepas en las que su papel patógeno se habían demostrado por inoculaciones experimentales en voluntarios humanos, carecían de CFA/I o CFA/II. En estas cepas, otros organelos o propiedades superficiales pueden actuar como promotores de la adherencia y la colonización de la mucosa del intestino delgado, de lo que se concluye que CFA/I y CFA/II no son un prerrequisito de virulencia

para todas las cepas de *E. coli* que causan diarrea en humanos. (50)(56).

Los progresos para desarrollar inmunógenos contra ST han sido más lentos. El bajo peso molecular de esta toxina ha sido el problema básico a resolver por no ser inmunogénica en su estado natural. Recientemente se han reportado varios intentos de inmunizar contra ST al unir la toxina con diferentes moléculas acarreadoras. (14).

Los estudios del grupo de Klipstein y col. (1982) en ratas vacunadas con ST purificadas o elaborada artificialmente unida a LT como molécula acarreadora muestran una alta eficacia contra cepas productoras de ambas enterotoxinas; faltan sin embargo estudios en humanos para considerar su posible uso en estudios con población abierta. (14).

Cravioto y col. (1982) , demostraron que las cepas identificadas tentativamente como CFA/II, sobre bases de patrones de hemaglutinación, eran en realidad combinaciones de tres distintos antígenos, los cuales les llamaron componentes 1, 2 y 3, Smith (1982) hizo observaciones idénticas y denominó a estos antígenos como CS1, CS2 y CS3 (ver tabla N° 11) . CS3 estuvo presente aparentemente en todas las cepas. Sin embargo, dependiendo del serotipo y el biotipo, observaron cepas que expresaban CS1 y CS2 al mismo tiempo, no fueron encontradas. Smith y col. , reportaron que un solo plásmido codifica para los genes de CS1, CS2 y CS3 y la determinación de cual antígeno sea expresado, está determinado en función de la bacteria hospedera de *E. coli* y relaciona al serotipo y al biotipo. (63).

La aclaración de la familia de antígenos de CFA/II proporcionó la información básica, pero no mejoró el número de serogrupos "O", que podrían estar correlacionados con la presencia de fimbrias de colonización. Thomas y col. (1982), describieron un nuevo factor de colonización, fue encontrado en ETEC de serogrupos O25, O115, y O167. Estos autores han mostrado que E8775 se parece a CFA/II y consiste de una familia de tres antígenos, llamados CS4, CS5 y CS6.(63).

Más adelante McConnell y col. (1986), identificaron que se encontraban en algunos serogrupos "O" de ETEC, a los que previamente no se les habían encontrado factores de colonización entre ellos, se incluyen los serogrupos comunes O27 y O148 (ver tabla N° 11).(64).

El último de los serogrupos "O" importantes de ETEC no asociado a un factor de colonización conocido fue el O159 (ver tabla N° 11). En contraste con otras cepas ETEC, asociados con factores de colonización manosa resistente. Tacket y col. (1987), observaron una fimbria diferente no hemaglutinante, que purificada mostró que era codificada por un plásmido de 27 megadaltons, que a su vez también codifica para las toxinas LT y ST y demostró que es antigénicamente distinta de los otros factores de colonización descritos y mostró que está presente en las cepas O159:H4 aisladas de diversas partes del mundo. (56).

TABLA No. 11

*RELACION DE SEROGRUPOS "O" Y FACTORES DE COLONIZACION EN
Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA*

ANTIGENO FIMBRIADO	SEROGRUPOS "O"
CFA/I	15, 25, 63, 78, 128, 153
CFA/II	
CS1	6, 139
CS2	6
CS3	6, 8, 80, 85, 139
E8775	
CS4	25
CS5	92, 115
CS6	25, 27, 92, 115, 148, 169
PCFO159	159

(56).

A. 2) GENERALIDADES:

Escherichia coli enterotoxigénica son microorganismos los cuales producen enterotoxinas codificadas por las plásmides ENT (50). Aunque teóricamente cualquier serotipo podría ser portador de plásmidos ENT y producir por tanto, enterotoxinas (84). Estos gérmenes no se identifican con base en la clasificación por serotipos(50). En los últimos años se han acumulado evidencias que señalan a las cepas enterotoxígenas de *E. coli* como causa de graves enfermedades diarreicas en el ser humano (29), esto se debe principalmente a la elaboración de tipos importantes de enterotoxinas, llamadas toxina termolábil (TL), toxina termostable (ST) o ambas. Los factores de adherencia a superficies son también importantes, ya que parecen ser requeridos por los microorganismos para adherirse a la mucosa intestinal, donde elaboran las toxinas.(19)(53).

Ahora se sabe que muchas de las cepas de ETEC poseen factores específicos de adherencia que las capacitan para colonizar el intestino delgado (50) (se ha demostrado por fluorescencia, que el microorganismo se localiza en la superficie del epitelio, pero no penetra la superficie mucosa y no causa respuesta inflamatoria perceptible) (32). Estos factores antigénicos de colonización (CFA/I y CFA/II) contribuyen a la producción de enfermedad por estas bacterias toxígenas. Los factores de colonización se visualizan por microscopía electrónica como estructuras filamentosas que semejan franjas.(50).

Aproximadamente de 40 a 50% de ETEC sólo produce toxina termostable; del 30 al 40% produce toxina termostable y termolábil y del 20 al 30% sólo produce toxina termolábil. Cualquiera de estas ETEC puede dar lugar a enfermedad, que es del tipo de malabsorción. (50)

Aún cuando decididamente las toxinas intervienen en el proceso patológico, son necesarias para la patogénesis otros factores, como la propiedad del microorganismo para adherirse al epitelio intestinal y colonizar el intestino. Se ha identificado un factor colonizador mediado por un plásmido. Dicho factor es regulado por un plásmido transferible, diferente del plásmido ENT. (29).

Se ha demostrado en voluntarios que la administración de una variante ETEC, que había perdido la capacidad de adherencia, pero conservaba la de producir enterotoxina, fue incapaz de producir diarrea a diferencia de la cepa original, lo que señala la importancia de la liberación de toxina a nivel de la célula diana (enterocito) para la producción del cuadro clínico. (84).

Por otra parte, las cepas enterotoxigenas presentan fimbrias con adhesinas MR, específicas de especie, que facilitan la adherencia. Se han denominado antígenos "K" en las cepas de origen animal y factores de colonización (CFA) en las cepas humanas, pero se tiende a designarlo como antígenos F, los factores de colonización para las cepas patógenas para el hombre CFAI o F5 (más frecuentes en los serogrupos O 15, 25, 63, 78, 128), CFAII o F6 (6, 8, 80, 85) y E8775 (25, 115, 167). (84).

A.3) P A T O G E N I A:

La capacidad para causar enfermedad diarreica no está restringida a ningún serotipo especial de *E. coli*, sino que parece depender de la presencia de un factor de colonización mediado por un plásmido que le permite que *E.coli* se adhiera a las mucosas del intestino delgado, y de uno o más plásmidos que codifican la producción de una o ambas toxinas que causan diarrea y que pueden ser producidas por *E. coli*. La mayoría de los aislamientos de pacientes con enfermedad diarreica grave en Bangladesh produjeron ambas toxinas (ST y LT), mientras que los aislamientos de pacientes en otras naciones en desarrollo han mostrado capacidades ampliamente variables para la producción de ST, TL o ambas. El amplio espectro clínico puede estar, en parte relacionado con la producción predominante de ST y TL por los microorganismos implicados. El estudio nutricional del huésped también puede ser un factor para determinar la respuesta clínica a ETEC.(39).

A.4) M E C A N I S M O:

Su mecanismo de acción es semejante al de cólera; el cual se basa en la producción de enterotoxinas, ambas enterotoxinas estimulan la adenilciclase en el epitelio del intestino delgado causando diarrea secretora.(32)(82). No obstante para que este microorganismo sea capaz de producir enfermedad es necesario superar los mecanismos de defensa propios del hospedero.(82).

La ingesta con el agua o los alimentos de una dosis elevada de estos microorganismos (10^7 a 10^9) facilita la adherencia (factor de colonización o fimbrias MR) a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, la toxina producida se fija en el receptor celular (gangliósido GM1) estimulando la adenilciclasa, que por vía del AMP cíclico produce un aumento de la secreción de líquido y electrólitos (cloro y sodio) a la luz intestinal. En consecuencia se produce diarrea. (84).

A. 5) MANIFESTACIONES CLINICAS:

La diarrea que producen los ETEC es severa y sus manifestaciones clínicas son semejantes a las producidas por las del cólera (12). Tanto las observaciones clínicas como los estudios en voluntarios indican que el periodo de incubación se encuentra generalmente entre 24 y 72 horas. El cuadro que se presenta a continuación es muy variable, incluye desde la enfermedad fulminante de tipo cólera observado con frecuencia en el subcontinente hindú hasta el mucho más leve "turista" en México (11), en el cual un inculó de 100 a 10 000 millones de microorganismos produce la enfermedad en adultos; Los síntomas son diarrea acuosa moderada, cólicos abdominales, y a veces algunos grados de fiebre que resultan molestos pero no ponen en peligro la vida (39), cura espontáneamente y dura de tres a cinco días en un huésped normal, pero si hay deshidratación grave en lactantes aumenta la morbilidad (50).

La diarrea por malabsorción es con evacuaciones líquidas (53), sin sangre ni leucocitos (50). En casos fulminantes, la diarrea grave rara vez dura más de 24 a 36 horas, en casos leves de enfermedad los síntomas desaparecen más gradualmente, persistiendo en ocasiones durante una semana o más.(39).

A.6) SEROGRUPOS "O" MAS FRECUENTES:

En la práctica se han observado que solo las cepas de algunos serogrupos O producen con frecuencia los siguientes:"O" 6, 8, 15, 20, 25, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159, 167).(16).

En la siguiente tabla N° 12 se muestra serogrupos "O" de *E. coli* asociados con serogrupos de heces normales en infecciones humanas.(29).

TABLA No. 12

HECES NORMALES	E T E C	
01	01	080 0153
02	06	085 0159
04	07	088
05	08	089
06	09	099
07	015	0101
08	020	0109
018	025	0114
020	027	0115
025	060	0126
045	063	0128
075	075	0142
081	078	0148

(59).

A.7) I N M U N I D A D:

Los seres humanos producen anticuerpos de IgM sérica y de IgA secretoria para el antígeno homólogo "O" de una cepa infectante de ETEC. Estos anticuerpos no evitan la adherencia del microorganismo y la acción de la toxina(50). Naturalmente la diarrea ETEC adquirida induce una respuesta de anticuerpo sérica a los lipopolisacaridos (LPS) y a la toxina termolábil al calor, pero se han dado a conocer reportes en los cuales existe una prevalencia de edad en títulos de anticuerpos (IgG) a la enterotoxina (LT), en el primer año de vida, los primeros seis meses de vida y seguido de un incremento marcado en

los títulos de niños de 6 - 12 meses de edad, en el segundo año de vida se correlaciona bien con los títulos de anticuerpos de 6 - 12 meses de edad, no hubo ningún incremento posterior y en el tercer año de vida cuando la incidencia diarreica disminuyó sustancialmente hubo una uvicuidad no explicada de diferencias de títulos de anticuerpos contra ETEC en partes en desarrollo y partes industrializadas, se observaron prevalencia alta de anticuerpos en niños ecuatorianos en contraste a una prevalencia baja en niños germanos(10).

La inmunidad humana a la ETEC gastroenterica depende probablemente más de la presencia del factor de anticuerpos antiadhesivos, que son secretados en el lumen gastrointestinal y bloquean la adhesión bacteriana del colón y de éste.(59).

La efectividad de una vacuna antiadhesiva contra cepas ETEC debe estar asociada a un adyuvante (tipo polisacárido) para ser efectiva a nivel intestinal. La posibilidad de vacunar humanos con productos bacterianos está aún en fase experimental. Con objeto de evitar la inoculación de recién nacidos y lactantes con proteínas bacterianas se ha pensado que la vacunación contra diarrea en estos grupos de edad pudiera ser de tipo pasivo a través de anticuerpos específicos en calostro y leche de madres inmunizadas con estas proteínas durante el embarazo.(14).

Considerables trabajos se orientan al desarrollo de una vacuna oral, como candidato viable para prevenir la diarrea que causa ETEC. Entre algunas de las vacunas propuestas se incluyen fimbrias CFA purificadas, toxoide LT/ST, *E. coli*

mueratas, fimbriadas o cepas atenuadas de *E. coli* (A-B+, fimbriada, toxoide ST). Klipstein y col. (1987), informaron que la administración oral de un toxoide sintético LT/ST a voluntarios, fue bien tolerado y estimulaba la producción de anticuerpos intestinales contra LT y ST.(56).

Levine y col. han explorado el uso de *E. coli* no toxigénicas, pero que expresaban antígenos para factores de colonización, para ser empleados como una vacuna oral viva. También observó que se podrían utilizar como vacunas la ingestión de receptores (GM1), para que bloquearán a la toxina en ETEC.(56).

Existen numerosos estudios por Cravioto y col. (1990), que demuestran que la alimentación al seno materno protege a los niños contra diarrea (51), se sabe que la leche materna ayuda a proteger lactantes contra infecciones enterales en los primeros meses de la vida. Se piensa que esta protección está dada fundamentalmente por la presencia de anticuerpos específicos de tipo IgA secretora (sIgA), así como de otros factores no globulínicos contra la enterotoxina lábil al calentamiento y factores de colonización CFA/I, CFA/II utilizadas por cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, presentes en la leche materna contra diferentes microorganismos o sus productos. Varias investigaciones han demostrado la presencia de sIgA específica contra LT y CFA/I producidos por ETEC, pero se ha visto también que el efecto de protección no es constante.(51).

La elaboración de inmunógenos a partir de microorganismos aislados de estudios epidemiológicos sobre

etiología de diarrea aguda y su transmisión en la comunidad pueden constituir una base para programas de acción a nivel comunitario.(14).

A. 8) T R A T A M I E N T O :

Las infecciones de ETEC son tratadas con antibióticos cuando el paciente es sintomático y se ha identificado el microbio(50). Las pérdidas intestinales de líquido son cualitativamente idénticas a las del cólera. Por lo tanto, en aquellos pacientes que presentan depleción salina clínicamente importante, los principios de administración de líquidos son idénticos a los descritos por el cólera. Las soluciones por vía bucal que contienen electrolitos y glucosa o sacarosa son muy efectivas para corregir la depleción salina. La tetraciclina, 30 mg/Kg. al día, administrada por vía bucal a intervalos de 6 horas durante 48 resulta eficaz para disminuir la duración de la enfermedad pero no es un elemento esencial para el tratamiento. La doxiciclina, 100 mg. al día, es de un valor profiláctico muy significativo contra la diarrea de los viajeros a causa de ETEC. No se ha demostrado la eficacia de los agentes antiperistálticos como los anticolinérgicos o el Lomotil en la diarrea enterotoxigena por *E. coli*.(39).

La mayor parte de los investigadores estan de acuerdo que la enfermedad clínicamente aguda debe ser tratada y la mayoría recomendaría terapia de amplio espectro, con un agente tal como el trimetropin-sulfametoxazol (TMP-SMX), mas bien que el

subsalicilato de Bismuto (BSS), la propiedad más importante del BSS es la capacidad de evitar la adherencia de células epiteliales ó la colonización intestinal através de una acción no específica e inactivación de la enterotoxina asociada con ETEC. Estudios realizados demostraron que el BSS tiene ventajas sobre los antibioticos, ya que estos suprimen la flora intestinal normal, además el uso de este solo promueve la resistencia antibiotica de la *E. coli*, así como también solo protegen durante el periodo de administración y causan reacciones adversas tal como colitis.(36).

El subsalicilato de bismuto, 60 ml. cada hora, 4 dosis en total proporciona alivio sintomático (defecaciones menos frecuentes, cólicos abdominales menos intensos) pero no tiene efecto sobre el volumen total de la materia fecal.(50).

En nuestro país no existe un control adecuado en la venta y administración de los antimicrobianos, esto mismo puede favorecer la selección de cepas de ETEC multirresistentes haciendo más difícil su tratamiento en la clínica.(2).

A. 9) EPIDEMIOLOGIA:

Debido primordialmente a que las actuales técnicas para demostrar toxigenecidad continúan siendo engorrosas, la epidemiología de la diarrea por ETEC no es bien conocida(39). La ETEC es responsable de la mayoría de los casos de diarrea del turista en visitantes de las naciones en desarrollo en América del Sur, Africa y Asia(39), y se transmiten

por vía fecal-oral, a menudo se efectúa con un vehículo de alimentos o agua contaminados que permite que los gérmenes se multipliquen(50) . La ETEC también es una de las dos causas (junto con los rotavirus) de enfermedades diarreicas agudas en niños(principalmente en lactantes menores de 18 meses de edad) en todos los países en desarrollo. La ETEC ha sido implicada como una causa importante de enfermedad diarreica fulminante tipo cólera, en pacientes adultos en el sur y sudeste de Asia, pero generalmente con una diarrea leve y autocurable en adultos en otras partes del mundo que están en desarrollo.(39).

Sólo brotes ocasionales del padecimiento se han relacionado con agua contaminada(39)(50). La diarrea de los viajeros representa de un 60 a 70% de los casos de diarrea en los viajeros de los países industrializados que visitan las naciones en desarrollo.(32). La ETEC rara vez ha resultado implicada en las enfermedades diarreicas episódicas en niños y adultos de EUA, debido tal vez a la falta de métodos prácticos para la detección de enterotoxinas(53).

En algunos serotipos de *E. coli* enterotoxigena (por ejemplo, O78:H12) que tiene distribución mundial, otros tienen una distribución limitada reconocida (por ejemplo O159:H{variable} en Japón; O139:H28 en Brasil).(42).

A. 10) P R O F I L A X I S:

Las prácticas higiénicas cuidadosas, con especial atención a la ingestión de agua potable y a los alimentos mal

cocinados, un cuidadoso lavado de manos, así como una eliminación de todos los materiales contaminados cuando se está viviendo en un ambiente generalmente insalubre, proporcionan la más adecuada protección contra *E. coli* enterotoxigena(50). También es bueno mencionar la eliminación sanitaria de heces humanas. Ya se ha detallado la profilaxis con doxiciclina, la cual es muy efectiva en 60% a 90%, variando dicha eficacia con la sensibilidad del ETEC a la tetraciclina en el área geográfica.(11). La disponibilidad clínica eventual de una vacuna efectiva reducirá o eliminará la necesidad de ya sea la profilaxis o tratamiento de diarrea del viajero inducida por ETEC.(66). La efectividad de todos los tratamientos dependerá del desarrollo concomitante de servicios médicos accesibles, programas domiciliarios de rehidratación oral, educación y mejoramiento del saneamiento ambiental, que en conjunto lleven a una reducción real de la morbilidad infantil por diarrea en países en desarrollo.(14).

Otros métodos de prevención que se han estudiado son el usar la leche materna al principio de la vida de niños pequeños con diarrea, ya que esta leche posee factores globulínicos y no globulínicos contra la enterotoxina lábil al calentamiento, además de que contienen numerosas proteínas, grasas y carbohidratos,, todo esto incrementa y ofrece oportunidades de utilizar esta leche materna como un vehículo de vacunación pasivas a través de inmiunizar madres durante el embarazo con mecanismos de patogenicidad contra ETEC.(51).

"EPPEC"

XIV.B)

E s c h e r i c h i a c o l i
ENTEROPATOGENA

B. 1) ANTECEDENTES HISTORICOS:

Entre las décadas de los años 1920s y 1950s, hubo una declinación no explicada de "*diarrea del verano*" (estudiada en 1889) en la población en general.(95). Los brotes de gastroenteritis en Aberdeen y London, Giles y col. en 1948 demostraron que se debía a serotipos O55:B5 y O111:B5 de *E. coli*, desde entonces el número de otros serotipos de *E. coli* enteropatógena (EPEC) se han identificado (Taylor 1961) como se muestra en la tabla siguiente. (95).

SEROGUPOS O DE *E. Coli* ENTEROPATOGENA ASOCIADA CON HECES NORMALES.

HECES NORMALES	E P E C		
	BROTOS DE DIARREA		CASOS ESPORADICOS
01	018	0127	01
02	020	0128	02
04	026	0142	04
05	044	0158	06
06	055	0159	08
07	086		015
08	0111		021
018	0112		051
020	0114		075
025	0119		085
045	0124		
075	0125		
081	0126		

(95).

Neter y col. acuñaron el término de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en 1955; y en este término agruparon a

los serotipos de *E. coli* relacionados epidemiológicamente en estudios de diversos países y fueron aislados con frecuencia significativa de niños con diarrea y no de controles sanos; además se demostró su patogenicidad en voluntarios al causar enfermedad (54). Las principales *E. coli* enteropatógenas identificadas pertenecen a un número limitado de serogrupos (Tabla No. 16).

Las cepas EPEC recolectadas de diferentes brotes de diarrea infantil y también de aislamientos recientes de niños fueron examinadas y no se encontró la presencia de enterotoxinas LT ni ST, así como la capacidad de invasión a células epiteliales; estas propiedades solo se presentaron en raras excepciones(23)(34).

Orskov y col. demostraron que las cepas ETEC pertenecían a diferentes serogrupos de los de EPEC y dieron la recomendación de que no era conveniente tipificar serológicamente las cepas (77).

Escherichia coli con propiedades enterotoxigénicas (LT ó ST) e invasión a células epiteliales encontradas en pacientes con diarrea, fue bien establecida por los años de 1974 a 1976 y las de EPEC desde 1945. Al tipificar las cepas de casos esporádicos aislados de diarrea, sólo muy pocas pertenecieron a los serogrupos clásicos de EPEC involucrados en brotes epidemiológicos de diarrea infantil ocurridos en la década de 1940 - 1950. (81)

Se observó que no había una relación directa entre las cepas EPEC y las cepas productoras de enterotoxina ó ETEC (34), aumentando así la confusión y poniendo en duda a las cepas EPEC como cepas productoras de diarrea, por no tener posibilidad de señalar cual es el mecanismo de patogenicidad que le caracteriza y destacando así a las cepas ETEC.(81).

Estos hechos precipitaron grandes controversias llegando a conclusiones tales como: "que las cepas EPEC en realidad no eran patógenas, porque ellas no manifestaron las conocidas propiedades de virulencia" (81).

Las evidencias epidemiológicas, obtenidas por varios investigadores señalaron que las cepas EPEC clásicas eran obviamente patógenas, pero causaban diarrea por mecanismos distintos de LT, ST e invasión a células epiteliales (24). Sin embargo, en la mayoría de las Escuelas de Medicina y Hospitales no se les daba importancia y argumentaban que la tipificación serológica para clasificar a estas cepas debía desaparecer y el empleo de antisuero resultaba inoperante (67).

Levine y col. (1978) del Centro para Desarrollo de vacunas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Maryland, Baltimore: administraron dosis orales en adultos voluntarios de 10^6 a 10^8 UFC/ml y provocaron diarrea definida en éstos. Este experimento renovó el interés por el estudio de las cepas EPEC. Ellos utilizaron cepas EPEC almacenadas durante siete años y que habían cuasado un brote de diarrea en la Gran Bretaña, además, estas cepas se caracterizaban por no producir enterotoxinas LT ni ST y por no ser invasivas.(95).

Este estudio estimuló nuevas investigaciones sobre la patogénesis de la diarrea causada por cepas EPEC, así se obtuvieron nuevos resultados que apuntaban hacia la evidente patogenicidad de EPEC, pero cuyo mecanismo hasta la fecha no ha quedado aclarado. (95).

A D H E R E N C I A :

El evento inicial para poder iniciar una infección es la adherencia; *E. coli* tiene primero que adherirse a las células de la mucosa intestinal y multiplicarse, lo que promueve la colonización del intestino, compitiendo con la flora autóctona por alimento y espacio.(25)(32).

Ferguson (1952) demostró que las cepas patógenas de *E. coli* colonizan el intestino delgado, lo que sugiere fuertemente que la bacteria debe poseer un componente especial que le permita adherirse y no ser eliminada por el peristaltismo intestinal.(40).

Las cepas EPEC (1956) no exhiben formas uniformes en los patrones de hemaglutinación (como lo muestran las cepas ETEC) y varios investigadores tienden a volver a emplear otros modelos experimentales para demostrar la capacidad adherente de estas bacterias. En 1975, Moneish y col. describieron una cepa EPEC (O26:H1) que se adhiere "in vitro" a pedazos de tejido intestinal de un feto humano. Esta adherencia no fue afectada por la manosa.(67)(90).

Salit en 1977, fue el primero en probar cultivos celulares de células Vero (riñón de mono verde Africano), en donde observó que las cepas que poseen *pili* tipo 1, se pueden adherir, estableciendo un modelo de adherencia de Procariote-Eucariote.(18).

Polotsky y col. (1977) observaron que las cepas EPEC causan una lesión histopatológica característica en el intestino humano, la ultraestructura es visible por microscopía electrónica y no la presentaron las cepas ETEC. la lesión se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades producidas por la bacteria EPEC, típicamente sin evidencia aparente de invasión. Las bacterias se unen en forma íntima a la membrana del enterocito y éste envuelve parcialmente a la bacteria dando apariencia en pedestal.(47).

En el mismo año, Cantey y Blake encontraron una cepa patógena para conejos a la que llamaron RDEC-1, que pertenece al serogrupo O155:H, que desde luego no es una cepa EPEC clásica.(50).

Posteriormente Williams y col.(1978) siguieron con los estudios anteriores de adherencia, y observaron que esta era codificada por un plásmido de 56 megadaltons, designado como pLG101, conjugativo asociado a un tipo colicinogénico.(44)(45). Cravioto en 1979, estudió los brotes producidos por cepas EPEC en Gran Bretaña, Irlanda y Australia, encontró que el 80% de las cepas EPEC, se pueden adherir a las células Hep-2 y a su vez no

poseían los antígenos CFA/I, CFA/II ni pili tipo I; el modelo de cultivos celulares demostró ser muy útil para evidenciar un posible mecanismo de patogenicidad de las cepas EPEC; es decir, la adherencia.(88).

Ulshen y Rollo (1980) describieron una lesión semejante a la descrita para la cepa RDEC-1 a partir de biopsias del intestino delgado de una niña de siete semanas de edad con una diarrea severa y persistente de dos semanas, recuperándose cepas de serogrupos clásicos EPEC (O125 y O119).(100).

Wilson y col. en 1980 (24), encontraron que no todas las cepas O26 producen la toxina VT y que otros serotipos también la pueden producir. Estos reportes fueron muy pequeños y aislados, por lo que no provocó interés de parte de la comunidad científica en esa época. Sin embargo, Scotland y col. en este mismo año, trabajando con cepas EPEC encontraron que los serogrupos O26 y O128 fueron productores de la toxina VT.(25).

Candy y col. (1981) observaron que la misma cepa (O26:H11) se adhería fuertemente a células epiteliales bucales de adultos sanos pero la aplicabilidad de este modelo a otras cepas EPEC no ha sido publicada.(67)(90).

Las cepas EPEC al no poseer los antígenos CFA/I o II ni EB775, probablemente deban de poseer algún otro mecanismo de adherencia que hasta ahora no parece mediado por *pilis*, de manera tal que habría que buscar algún otro modelo experimental para demostrar como o porque mecanismo se adhieren estas cepas.(57).

Clausen y Christie (1982) encontraron en cepas EPEC, pertenecientes a los serogrupos O111 y O119, que efectivamente se podían adherir a células Hep-2 y que además se unían en forma de agregados con aspecto semejante a "microcolonias" (11). El trabajo considerado como el más importante dentro de la patogénesis de las cepas EPEC, lo realizó Rothabaum en este mismo año (50) quien en 18 niños con diarrea encontraron por medio de la técnica de inmunoperoxidasas que la cepa O119, se encontraba adherida al enterocito, causando una destrucción del glicocalix y de las microvellosidades, dando lugar a la formación de colonias o grupos en pedestal y observaron una gran vacuolización del enterocito y curiosamente la bacteria no invadió la lámina propia.(50) (84).

Utilizando el mismo modelo de Baldini (1983) (7), demostró que en 31 de 32 cepas de EPEC, capaces de adherirse a las células Hep-2 poseían un plásmido de 50-70 megadaltons y lograron transferir este plásmido a una cepa de *E. coli* K-12 que no era adherente a las células, quedando así demostrado que la adherencia a Hep-2 está codificada por un plásmido al que llamó "factor adherente de las cepas enteropatógenas" (EAF).(3).

Moon y col. (1983), observaron el mismo fenómeno, inocularon en cerdos gnotobióticos cepas de EPEC y la cepa RDEC-1, demostrando con esto el mecanismo de patogenicidad, aparentemente era el mismo. A las cepas que podían desarrollar este daño las llamó "Attaching and Effacing" *E. coli* (AEEC).(6). Moon y col. en este mismo año estudiaron la cepa del serotipo clásico O114:H2 y encontraron que poseía dos plásmidos de aproximadamente 60 megadaltons, además esta cepa no exhibió

Moon y col. en este mismo año estudiaron la cepa del serotipo clásico O114:H2 y encontraron que poseía dos plásmidos de aproximadamente 60 megadaltons, además esta cepa no exhibió adherencia a células Hep-2 y causó diarrea definida cuando se administró a voluntarios, esta cepa causó la típica lesión al enterocito.(6).

Cheney y col. (1983), realizaron un estudio del material genético de la cepa RDEC-1 demostrando que posee un plásmido de 85 megadaltones que codifica para un *pili* diferente a los CFA y es manosa resistente; parece ser que éste es el que le permite adherirse al enterocito y por lo tanto causar daño. El plásmido fue transferible a otras especies bacterianas como *shigella* y se reprimió o expresó dependiendo de las condiciones del cultivo, como por ejemplo: utilizando caldo cerebro corazón (BHI, no se produjo el *pili* y cuando se creció en caldo Penassay se produjo en grandes cantidades.(51).

Inman y col. en 1983 demostraron que la cepa RDEC-1 de *E. coli* se adhirió específicamente a las células "M", célula expuesta en el lumen intestinal que conecta con el folículo linfoide, las bacterias parece ser que se mantienen sin adherirse a las células adyacentes, que son los enterocitos intestinales.(52) (16).

La adherencia a células Hep-2 también se puede realizar en las células HeLa produciéndose dos tipos de adherencia (21), una en forma localizada (AL), que se caracteriza por formar microcolonias en uno o varios puntos de la célula y la

mientras que la adherencia difusa (AD), se encontraba en cepas que no pertenecen al grupo EPEC(89)(90).

Levine y col. (1985) llevaron a cabo un estudio para determinar el papel del plásmido EAF en las cepas EPEC causando diarrea en voluntarios. Nueve de diez voluntarios que ingirieron una cepa O127:H6 con el plásmido EAF, desarrollaron diarrea claramente definida; en contraste dos de nueve voluntarios quienes ingirieron una variante de la cepa, la cual era EAF negativa desarrollaron diarrea y esta fué extremadamente moderada.(55).

Nataro y col. (1985) (69), trabajando con cepas que presentaban adherencia localizada y difusa, encontraron que la adherencia localizada (AL) estaba relacionada con la presencia de un plásmido muy parecido al plásmido reportado por Baldini en 1983, que posee un peso molecular de 58 megadaltones, mientras que las cepas con adherencia difusa (AD) no lo presentaban. Este plásmido resultó ser el mismo al que Baldini llamó EAF (3).

Levine y col. (1985) hicieron un trabajo muy interesante, utilizando preparaciones de membrana externa de la cepa O127 con y sin el plásmido EAF (casualmente fué la misma cepa que se usó en el estudio en voluntarios); esta cepa presentó en un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con SDS un patrón de proteínas de la membrana externa diferente al de otra cepa curada del plásmido asociado en especial a la presencia de proteínas de la membrana externa de 94 Kd. Mediante la técnica de inmunotransferencia se observó que los voluntarios que tuvieron diarrea, presentaron una seroconversión a la

proteína de la membrana externa de 94 Kd, lo que concluyó que probablemente esta proteína de membrana externa juega un papel muy importante en la patogénesis de las cepas EPEC y representa una buena alternativa para preparar un inmunógeno que puede proporcionar protección a la infección por cepas EPEC.(55).

Scaletsky y col. (1985) (89) destacaron que las cepas EPEC tienen preferentemente la capacidad de presentar adherencia localizada, ésto sugirió a Nataro (1985) (69) la idea de que posiblemente se asociara la adherencia localizada con la presencia de el plásmido de 55 megadaltons y al mismo tiempo, observará cuales de las cepas EPEC poseían este plásmido y así clasificó a las cepas en dos clases: I y II.(69).

La clase I, consiste en cepas EPEC que tienen capacidad de dar adherencia localizada y poseen el plásmido de 55 Md; en este grupo se incluyen serotipos: O55, O111, O119, O127, O128, y el O142. Levine y col. (1985) apoyados en los reportes epidemiológicos publicados hasta la fecha, encontraron que éstos serotipos pertenecían a los grupos EPEC más frecuentemente asociados a brotes de diarrea.(55).

La clase II, se formó con serogrupos que no presentaron adherencia localizada y que pudieron o no presentar capacidad de adherencia difusa a células Hep-2. Los serogrupos clasificados aquí fueron :O44, O86, O112 y O114. Estos grupos resultaron ser menos frecuentes en brotes epidemiológicos.(55).

Nataro y col. (1985) trabajaron con el plásmido que había descrito Baldini como EAF (3) y utilizaron enzimas de

restricción con las que se pudo construir una sonda que hibridizó únicamente con las cepas EPEC que presentaron adherencia localizada y estas corresponden a la clase I, así se aclaró un problema que consistía, en el diseño experimental para la selección de las cepas que poseen el plásmido, esta prueba es altamente sensible.(69).

Cleary y col. en 1985, encontraron en el 79% de cepas EPEC, la citotoxina semejante a Shiga, por lo que podría ser éste el mecanismo de patogenicidad de éstas cepas, pero en algunas cepas encontraron actividad citotóxica que no podía ser neutralizada con anticuerpos anti-Shiga, loque implicaba, que podía existir otro tipo de citotóxina.(31).

Knuton y col. (1987) (45) probaron la adherencia de las cepas E2348 (O127) y E851 (O142) a enterocitos humanos, estas cepas poseen el plásmido de 60 Md y presentan adherencia localizada (AL) en células Hep-2, ellos realizaron biopsias de duodeno y ensayaron la adherencia a las 3, 6, 9 y 12 horas, encontrando que a las 3 horas se observaba adherencia en una zona que se amplía paulatinamente a las 6 horas, a las 9 horas coloniza el intestino y a las 12 horas todas la mucosa intestinal está colonizada. La cepa E2348 curada del plásmido de 60 Md también fue probada para la adherencia, encontrando que coloniza la mucosa intestinal; sin embargo, ya no es adherente a células Hep-2; además 13 de 17 cepas de EPEC colonizaron el intestino de una forma extensa.(45).

Este trabajo hace pensar que el plásmido de 60 Md no está directamente relacionado con el daño causado al

enterocito. En este mismo trabajo Knuton la llamó "adherencia inicial" ó "estadio 1": a la adherencia a las 3 horas que causan daño a las microvellosidades y está caracterizada por una irregularidad de éstas dentro de un mismo tipo de células; cabe hacer notar que Knuton no menciona a las células "M", resultando que las células adyacentes no están afectadas y "adherencia tardía" ó "estadio 2": lo denominó al daño provocado por la colonización bacteriana con formación en pedestal.(53).

Marques, Cleary y col, han reportado que el 79% de las cepas EPEC elaboran cantidades moderadas de citotóxicas muy similares ó idénticas a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo I, esto ha sugerido que ésta toxina pudiera jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad por EPEC.(6)(54).

Otros grupos de investigación se han dedicado a buscar la producción de exotoxinas en cepas de EPEC. Hasta la fecha no se han reportado cepas EPEC productoras de toxinas similares a las elaboradas por cepas enterotoxigénicas de *E. coli*. Sin embargo, los estudios de varios autores demuestran que cepas EPEC son capaces de producir proteínas que estimulan la secreción de agua y electrolitos a nivel intestinal.(21).

Existe aún controversia respecto a la fisiopatología de la diarrea causada por cepas EPEC. Con los datos accesibles a la fecha se podría pensar que una vez adheridas a las vellosidades intestinales las bacterias producen una exotoxina que estimula la producción de agua y electrolitos. Los mecanismos bioquímicos de este último proceso aún no se conocen. (21).

B. 2) GENERALIDADES:

Originalmente recibieron este nombre todas las *E. coli* que causaban diarrea, cuando se observó que ciertos serotipos podían estar relacionados con la enfermedad. La terminología se ha evolucionado a medida que se han aclarado los mecanismos patógenos, de manera que ahora el término enteropatógena, sólo se aplica a los gérmenes causantes de la enfermedad, que no producen toxinas termolábiles o termoestables, que no tienen genes que codifican a estas toxinas, y que no son enteroinvasoras. (84)(95).

Existen cepas de *E. coli* que no son capaces de invadir, no son enteropatógenas y no enterotoxigénicas, pero causan diarrea y producen una citotoxina denominada VT ó toxina Vero, (descrita por Konowalchuck y col 1977), cuyo efecto citotóxico se observa en cultivos de tejidos de células Vero, de donde proviene su nombre y produce destrucción progresiva en células Vero. (12). Algunos autores sugieren que estas dos actividades citotóxicas no se encuentran en la misma molécula, siendo la toxina "Shiga-like" intracelular y la toxina VT extracelular. (32).

B. 3) PATOGENIA:

Este grupo de cepas EPEC es causante de diarreas principalmente en los lactantes y niños pequeños durante los meses de verano en forma de brotes epidémicos en las salas de pediatría de los hospitales y maternidades, con mortalidad elevada. No pudo demostrarse su intervención en casos

esporádicos, y en adultos sólo se han escrito varios brotes.(32)(53)(84).

Este grupo de EPEC, según se ha demostrado, causa diarrea en voluntarios. Por estudios anatomopatológicos se ha demostrado que algunos de estos bacilos se adhieren a microvellosidades de ileon de conejo. Su adherencia in vitro a las células Hep-2 se correlaciona con su capacidad para adherirse in vivo. Las biopsias de intestino humano muestran el borramiento del borde en cepillo del intestino delgado, y que los microorganismos están densamente adheridos. Esta capacidad para adherirse parece estar en relación con la presencia de un plásmido distinto del que es necesario para las cualidades del EIEC.(50).

Cepas de *E. coli* como la O157:H7, ha despertado un gran interés, ya que ha sido relacionada con brotes epidémicos de colitis hemorrágica y casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico. Se desconoce el mecanismo de colonización del intestino delgado por la EPEC, pero es un factor crítico en la producción de la enfermedad.(50).

B.4) MECANISMO:

La enteropatogenicidad de *E. coli* parece estar medida por uno de dos mecanismos: 1) producción de una enterotóxina, y 2) penetración de la mucosa intestinal. Las cepas enteropatógenas causan diarreas en niños por mecanismos aún no bien conocidos, ya que no producen enterotóxicas; en el pasado,

el síndrome de diarrea infantil parecía asociarse con ciertos serotipos de éstas cepas; sin embargo, estudios recientes indican una falta de correlación de serotipos con casos de diarreas.(19).

Se han realizado otros estudios que sugieren la presencia de una toxina diferente a las toxinas LT y ST de las cepas de ETEC. Dicha toxina es parecida por sus características biológicas y antigénicas a la producida por *Shigella dysenteriae*, como se ha mencionado anteriormente, la cual está implicada en estos casos. A dichas toxinas se les denomina "Shiga-like", por lo que reportes recientes indican que es posible atribuir a estas citotoxinas cierto papel en la colitis hemorrágica.(32).

B.5) MANIFESTACIONES CLINICAS:

La enfermedad producida por las cepas EPEC se caracteriza por fiebre, malestar, vómito y diarrea, con cantidades prominentes de moco pero sin sangre. La enfermedad por EPEC tiende a ser clínicamente más severa que muchas otras infecciones diarreicas en niños, algunos de los cuales desarrollan diarrea prolongada que persiste más de 14 días y puede llegar a producir la muerte, si no se atiende oportunamente.(24)(65)(100).

Los pacientes presentan diarreas, evacuaciones frecuentes, viscosas y de color verde, generalmente sin sangre ni leucocitos.(50).

B.6) SEROGRUPOS "O" MAS FRECUENTES:

Las cepas EPEC están producidos por determinados grupos O; los más frecuentes son los grupos O26, O39, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142, y O157.(6)(16), asociados muchas veces con determinados antígenos K y H.(84).

B.7) I N M U N I D A D:

La identificación de la relación de los serotipos específicos O y H con EPEC condujo a intentos infructuosos para inmunizar por vía oral con preparados de bacterias muertas o de extractos de bacterias. El reconocimiento del papel esencial que desempeña la adherencia en la producción de la enfermedad, así como la identificación de un plasmide que codifica esta propiedad, puede llevar a enfoques más exitosos en la prevención de la enfermedad.(50).

Dada su frecuencia de aislamiento se han hecho varios intentos de producción de vacunas contra cepas EPEC. En Europa se han experimentado vacunas elaboradas con extractos de lipopolisacáridos obtenidos de cepas pertenecientes a los serogrupos más comunes. Se han utilizado también vacunas a base de bacterias inactivadas con formaldehído o cepas vivas atenuadas a través de su dependencia a ciertos antibióticos como la

estreptomycin. Muchos de estos productos no se han ensayado en pruebas de campo y, en los pocos en que se han realizado, los resultados no han sido satisfactorios. Estas dos razones han hecho que ninguna de estas vacunas esté en uso en la actualidad.(14).

Cravioto y col. han usado un enfoque diferente en el desarrollo de posibles vacunas contra cepas EPEC al obtener mutantes incapaces de utilizar galactosa, y por lo tanto, de vivir por tiempo prolongado en el intestino de humanos. Estas mutantes galE mantienen su habilidad para adherirse a células intestinales a través de la producción de la proteína de membrana externa de 94 kDa codificada por un plásmido. En estudios con voluntarios humanos adultos estos autores han demostrado que mutantes galE espontáneas u obtenidas por clonación son capaces de producir respuesta inmune sistémica posterior a colonización temporal del intestino. El uso futuro de estas cepas mutantes dependerá de la confirmación de estos estudios preliminares en grupos de población abierta.(14).

Los nuevos conocimientos emanados de las investigaciones mencionadas con anterioridad ofrecen mejores posibilidades para el desarrollo futuro de vacunas anti-EPEC. La producción de cepas no patógenas que expresen por recombinación genética proteínas de superficie relacionadas con la habilidad adhesiva de cepas EPEC pudiera ser la base de un grupo de vacunas para el uso en humanos. Otro camino pudiera ser el uso de antígenos orales a base de proteínas adhesivas en forma

purificada solas o en combinación con antitoxinas derivadas de las toxinas producidas por estas cepas.(14).

B. 8) TRATAMIENTO:

Los lactantes y niños con gastroenteritis necesitan reposición de líquidos. uede ser necesaria la hospitalización si hay un deficit de líquidos (mayor o menor a 5%) o no se tolera la hidratación por vía oral.(50). Este tipo de hidratación con líquidos que contengan azúcar y electrólitos a reducido de manera importante la morbilidad y la mortalidad. Como el transporte de agua con glucosa y electrólitos a través del epitelio no es alterado por diversas toxinas, es posible reponer los líquidos por vía oral. Una fórmula para este fin se prepara con media cucharadita de NaCl, un cuarto de cucharadita de KCl, media cucharadita de NaHCO₃, y dos cucharadas de glucosa o cuatro de sacarosa en un litro de agua.(50).

También la diarrea por EPEC en lactantes se trata con antimicrobianos específicos. Estudios previos sugieren que la enfermedad en lactantes causada por aquellos gérmenes seroagrupables podía ser acortada por antimicrobianos. De hecho estos son los únicos microorganismos para los que se ha demostrado que son útiles los fármacos no absorbibles como la neomicina. Esto bien podría relacionarse con el carácter no invasor de muchos de estos microorganismos.(50).

Aunque un fármaco no es absorbible como la neomicina ha reducido los síntomas de la EPEC, no lo hará en caso

de microorganismos invasores. Por tanto cuando el médico se siente obligado a tratar la diarrea, es más probable que un compuesto como TMP-SMX o ampicilina, sea eficaz contra todo el espectro de gérmenes patógenos.(50). También es recomendable Neomicina o colistin.(50).

B. 9) EPIDEMIOLOGIA:

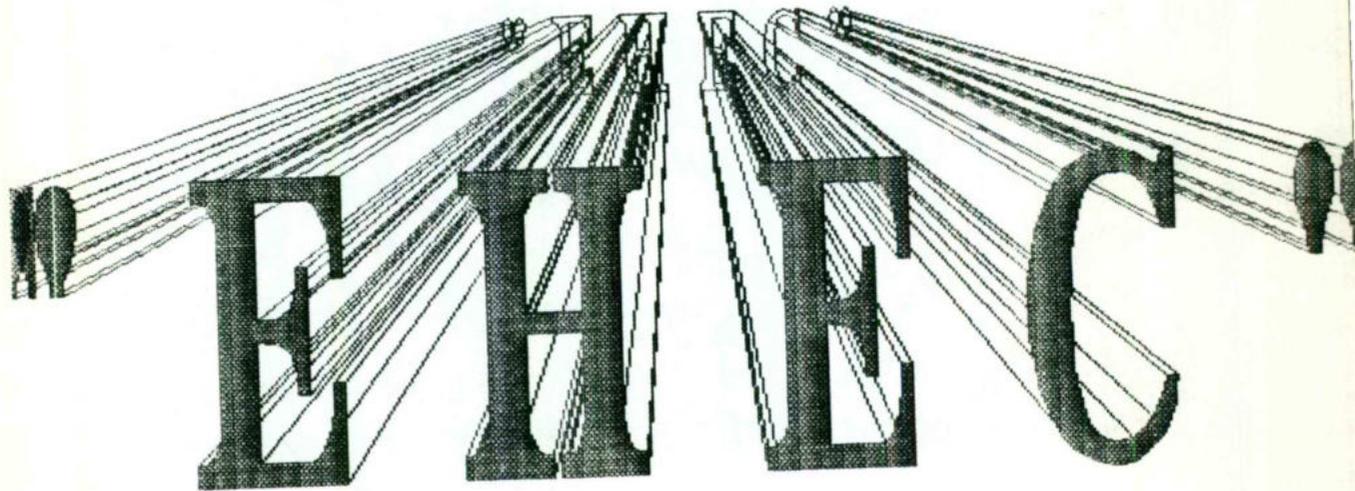
Desde la declinación de la "diarrea del verano", los brotes de gastroenteritis infantil se han asociado con hospitales, cuneros, etc. El estudio de los brotes hospitalarios han facilitado la epidemiología y han permitido la identificación de *E. coli* causante de los serogrupos EPEC responsables, frecuentemente los casos en la comunidad preceden a los grupos hospitalarios, los cuales son debidos a la admisión al hospital de niños con diarrea establecida o de un portador que excreta el factor patogénico. Las mamilas de los niños se han identificado como causa de contaminación.(95).

EPEC es de particular importancia en los países tropicales y las naciones en desarrollo, con hacinamiento y malas condiciones de higiene, ya que la transmisión es vía fecal-oral.(50).

Estudios epidemiológicos realizados en algunos países de Sudamérica, como Perú y Chile, han mostrado que las EPEC constituyen la quinta o segunda causa bacteriana más importante de diarrea en niños.(24)(65)(100).

B.10) P R O F I L A X I S:

Las consideraciones sobre este tema, son las mismas que se han mencionado anteriormente en el tema respectivo a ETEC.(ver pag. 220.).



E s c h e r i c h i a c o l i
ENTEROHEMORRAGICA

C.1) ANTECEDENTES HISTORICOS:

En 1975 se reportó un caso esporádico de colitis hemorrágica, que también estuvo asociado con *E. coli* 0157:H7 y que aparentemente fue transmitido por carne mal cocida pero para esa fecha no se conocía que pudiera o fuera capaz de producir ese cuadro (87).

La patogenicidad de *E. coli* 0157:H7, se ha relacionado con la producción de citotoxinas, entre las citotoxinas publicadas se encuentra la denominada citotoxina VT o citotoxina Vero, descrita por Konowalchuck y col. en 1977 (98)., cuyo efecto citotóxico se observa en cultivo de tejidos de células Vero, de donde viene su nombre y sólo se ha observado igual actividad en la línea celular Hep 2 (83). La otra citotoxina denominada "Shiga-like" o semejante a *Shigella* que fue descrita por O'Brien y col. (72). Esta se caracteriza en cultivo de tejidos de células Hela, en los que causa inhibición de síntesis de proteínas y en el modelo de asa ligada de conejo, que produce acumulación de fluido; su nombre se debe a que presenta características biológicas y antigénicas similares a la citotoxina de *Shigella dysenteriae*. (72).

En 1982 Riley y col., describieron a *Escherichia coli* 0157:H7 como el agente etiológico más importante de la

colitis hemorrágica, la cual se caracteriza por severos dolores abdominales, seguidos de una diarrea con sangre sin leucocitos fecales, pudiendo presentar poco o nada de fiebre. *E. coli* era un serotipo no reconocido anteriormente, pero hasta ese año en que se vió involucrado en brotes de colitis hemorrágica en los Estados Unidos se formó el grupo EHEC (87).

E. coli O157:H7 también ha sido incriminada desde 1983 como causa del síndrome urémico hemolítico (SUH), a partir de un estudio realizado por Karmali y col., en donde encuentran una asociación de este serotipo con casos esporádicos de SUH., y fue confirmado por ellos mismos en un estudio posterior en 1985.(44).

En 1984 algunos investigadores como Beery y col., observaron las características patológicas de la infección por *E. coli* O157:H7, tratando de dilucidar mediante el empleo de modelos animales, probando la actividad citotóxica de *E. coli* O157:H7 en colon y riñon de ratón (6).

El término EHEC (1984) fué acuñado, para referir a las cepas de *E. coli* O157:H7 que manifiestan las características clínicas, epidemiológicas y patológicas relacionadas con colitis hemorrágica, hasta la fecha ha sido difícil emprender estudios epidemiológicos de la infección por EHEC a causa de la carencia de métodos adecuados que sirvan de tamiz para heces.(54). No se sabe además si otros serotipos pudieran ser potencialmente capaces de dar cuadros hemorrágicos. En particular el serotipo O26:H11. es generalmente productor de abundante citotoxina VT (47) y posee un plásmido de

99. Tzipori S., y Et.al. Studies on the pathogenesis of haemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Rev. J. Infec. Dis. 1986.
100. Uisshen M.H., and J.L. Rollo. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastro-enteritis in man-another mechanism. Rev. New England J. of Med. 1980.
101. Willshaw G.A., y Et.al. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding verocitotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. Rev. J. Genet. Microbiol. 1987.
102. Wood P.K., y Et.al. Comparison of DNA probes with the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. Rev. J. Clin. Microbiol. 1986.
103. Yamamoto T., y Et.al. Adherence Characteristics to Human Small Intestinal Mucosa of *Escherichia coli* Isolated from Patients with Diarrhea or Urinary tract Infections. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
104. Zépeda López H.M., Diferencias entre la citotoxina VT y la citotoxina semejante a Shiga, producidas por una cepa de *E. coli*. Tesis Docotral. I.P.N. (Inst. Polit. Nac.). 1987.
105. Zepeda-López H.M., y Et.al. Posible producción de dos citotoxinas por una cepa de *Escherichia coli*. Rev. Bol. Med. del Hosp. Inf. 1985.

92. Smith H.W., and C.L. Gyles. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *E. coli* of porcine origin. Rev. J. Clinic. Microbiol. 1970.
93. Sonnewirth. Métodos y Diagnosticos de Laboratorio Clínico. Octava edición. Ed. Médica Panamericana. Tomo II. 1987.
94. Soriano Becerril D., y Et.al. Conversión fágica en cepas citotóxicas de *Escherichia coli*. Rev. Latinoamer. de Microbiol. 1990.
95. Sussman M., The virulence of *Escherichia coli*. Reviews and Methods. Special Publications of the society for General Microbiology. Ed. The Society for General Microbiology by Academic press. 1985.
96. Svennerholm, A.M. y Et.al. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and Their use in a diagnostic ST ganglioside GM1- enzyme- linked immunosorbent assay. J. Clinic. Microbiology. 1986.
97. Tacket O.C., y Et.al. Challenge studies in volunteers Using *Escherichia coli* Strains whit Diffuse Adherence to Hep-2 Cells. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
98. Tisson D.L., Culture Confirmation of *E. coli* Serotype O157:H7 by Direct Inmuno-fluorescence. Rev. J. Clin. Microbiol. 1990.

84. Pumarola. A. Microbiología y Parasitología Médica. Octava edición. Ed. Salvat Editores. S.A., 1987.
85. Raghubeer Errol V. and Matches R. J., Temperature Range for Growth of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Selected Coliforms in *E. coli* Medium. Rev. J. Clinical Microbiology. 1990.
86. Riesfeld, E.H. Tratado de Química Inorgánica. Ed. Nacional. México, D.F. 1988.
87. Riley L.W., y Et.al. Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. Rev. N. England J. of Med. 1983.
88. Robins-Browne R.M. Traditional enteropathogenic *E. coli* of infantile diarrhea. Rev. J. Infec. Dis. 1987.
89. Scaletsky I.C.A., y Et.al. Correlation between adherence to Hella cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of *E. coli*. J. Infect. e Immunology. 1985.
90. Scotland S.M., Willshaw G.A. y Et.al. Properties of Strains of *E. coli* O26:H11 in Relation to their Enteropathogenic or Enterohemorrhagic Classification. J. Infec. Dis. 1990.
91. Scotland S.M., y Et.al. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. Rev. Lancet. 1985.

76. Orskov, F. Virulence factors of the bacterial cell surface. J. Infect. Dis. 1978.

77. Orskov I. F., y Et.al. Serology, Chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Rev. J. Bacteriology. 1977.

78. Orskov F., Whittam T.S., Cravioto A. and Orskov I. Clonal Relationships among classic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Belonging to Different O Groups. Rev. J. Infec. Dis. 1990.

79. Padhye V.V., y Et.al. Colonic haemorrhage produced in mice by a unique Vero cell cytotoxin from an *E. coli* strain that causes hemorrhagic colitis. Rev. J. Infec. Dis. 1987.

80. Padilla Espinoza, C., y Et.al. Efecto de las concentraciones subinhibitorias de antibacterianos sobre la adherencia de *Escherichia coli* fimbriada a células uroepiteliales. Rev. Latinoamer. de Microbiol. 1988.

81. Pal T., y Et.al. Modified enzymelinked inmunosorbet assay for detecting enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent Shigella strains. J. Clinical Microbiology. 1985.

82. Dr. Pérez P. I. G. Toxina Termolábil (TL) de *E. coli*. Rev. de Infectología. Méx. D.F. 1987.

83. Phillip I.T., y Et.al. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome: Importance of Early Cultures in Establishing the Etiology. Rev. J. Infec. Dis. 1990.

68. Nikaido H, Vaara M. Outer membrane. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low K.B., et al, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. 1987.
69. Nutton S., y Et. al. Adhesion of enteropathogenic *E. coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Rev. J. Infec. Inmunol. 1987.
70. Ocampo J.J. Dr., Informes semanales de Enfermedades Transmisibles. Dirección General de Epidemiología 1976-1988.
71. O'Brien A.D., and R.K. Holmes. Shiga and Shiga-like toxins. Rev. J. Clini. Microbiol. 1987.
72. O'Brien A.D., y Et.al. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. Rev. J. Infec. Dis. 1982.
73. Olarte J., Avances en el conocimiento de la enteropatogenia de las diarreas. Rev. Boletín Medico del Hospital Infantil. 1981.
74. Opal S.M., y Et.al. Aerobactin and alfa-Hemolysin as Virulence Determinants in *Escherichia coli* Isolated from Human Blood, Urine, and Stool. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
75. Orskov F., and Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli* en: Bergan T. Ed. Methods in Microbiology. Vol. 14 London Academic Press. 1984.

61. Mathewson J.J., y Et.al. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. Rev. J. Infec. Dis. 1986.
62. Mathewson J.T., y Et.al. A newly recognized cause of travelers diarrhea: Enteroadherent *Escherichia coli*. Rev. J. Infec. Dis. 1985.
63. Mc Conell, M.M. y Et.al. Characterization of a New Putative Colonization Factor (CS17) from a Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* of Serotype O114:H21 which Produces Only Heat-Labile Enterotoxin. Rev. T. J. Infect. Dis. 1990.
64. McConell M.M., y Et.al. The Possesion of coli surface antigen C56 by enterotoxigenic *E. coli* of serogroups O25, O27, O148 and O159: a possible colonization factor?. Rev. J. Clin. Microbiol. 1986.
65. Lothar, B. y Et. al. Clonal Diversity and virulence factors in Strains of *E. coli* of the Classic Enteropathogenic Serogroup O114. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
66. Lynch y Et. al. Métodos de Laboratorio. Segunda edición. Ed. Interamericana, México. 1990.
67. Nataro, J.P., y Et. al. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J. Infection. Dis. 1985.

54. Levine M.M. and R. Edelman. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and Pathogenesis. Rev. Epidemiol. 1984.
55. Levine M.M., J.P. Nataro, B. Karch; M.M. Baldini, J.B. Kaper, R.E. Black, and A.I. O'Brien. The diarrheal response of human to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. Rev. Journal of Inf. Dis. 1985.
56. Levine M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. Rev. Journal of Inf. Dis. 1987.
57. López Zepeda M. Escuela de Ciencias Biológicas, I.P.N. Diferencias entre la citotoxina VT y la citotoxina semejante a Shiga, producidas por una cepa de *E. coli*. TESIS DOCTORAL. 1987.
58. Mac Faddin, F.J. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana. México, D.F. 1987.
59. Mandell., y Et.al. Principles and Practice of Infectious Diseases. Third Edition. Tomo 1 y 2. Ed. Churchill Livingstone. 1990.
60. Maraves L.R.M., y Et.al. Production of Shiga like toxin by *E. coli*. Rev. J. Infec. Dis. 1986.

46. Koneman, E.W. Diagnóstico Microbiológico. Segunda reimpresión. Ed. Médica Panamericana. 1990.
47. Konowalchuck, K.J. y Et. al. Vero response to a citotoxin of *Escherichia coli*. Rev. J. Infec. Dis. 1987.
48. Kopecku D.J., y Et.al. Genetic determinants of virulence in *Shigella* and dysenteric strains of *Escherichia coli* : their involvement in the pathogenesis of dysentery. Rev. J. Top. Microbiol. e Inmunolo. 1985.
49. Krieg R. N. and Holt G. J. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Baltimore-Sidney. Vol. 4. Ed. Williams and Wilkins. 1984.
50. Krugman / Katz/ Gershun/ Wilfert. Enfermedades Infecciosas. Ed.Interamericana. Méx. D.F. 1988.
51. Kumate J., Presencia de factores específicos en leche materna contra cepas de *E. coli* causantes de diarrea en humanos.Rev. Gaceta Med. de Méx. 1990.
52. Kumate J. y Gutierrez G. Manual de Infectología. Undécima edición. Ed. Ediciones Medicas del Hospital infantil de México "Federico Gómez". México, D.F. 1988.
53. Lenette, E. H. Manual de Microbiología Clínica. Cuarta edición. Ed. Médica Panamericana. 1989.

39. Harrison. Petersdor/Adams/Braunwald/Isselbacher. Principios de Medicina Interna. Ed. Mc Graw Hill. 10a. ed. 6a. en español. TOMO 1. 1986.
40. Hernandez de la Cruz J. Q.B.P., Escuela de Ciencias Biológicas., I.P.N., Caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes con infección del Aparato Urinario y de la vagina de pacientes con Leucorrea. 1990.
41. Inman L.R., and J.R. Cantey. Specific adherence of *E. coli* (strain RDEC-1) to membrannous (M) cells of the Peyer's in *E. coli* diarrhea in the rabbit. Rev. J. Clinical Invest. 1983.
42. Jawetz E., Microbiología Médica. Doceava edición. Ed. El Manual Moderno S. A. de C.V. 1987.
43. Joklik, E.K. Microbiología de Zinsser. Primera reimpresión. Ed. Médica panamericana. 1987.
44. Karmali M.A., y Et.al. The association between idiopathic haemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. Rev. J. Infec. Dis. 1985.
45. Knuton S., D.R. Cloyd and A.S. McNeish. Adhesion of enteropathogenic *E. coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Rev. J. Infec. Inmunol. 1987.

32. García Mendoza Esperanza Q.B.P. Escuela de ciencias Biologicas. I.P.N. (Inst. Politecnico Nacional). Determinación de Toxinas LT, VT y factores de colonización CFA I y CFA II, en 365 cepas de *E. coli*, aislada de niños recién nacidos con y sin diarrea. TESIS PROFESIONAL. 1987.

33. González Lugo G.M. Adherencia de *Escherichia coli* a células Hep-2 un nuevo método. Tesis profesional. I.P.N. (Inst. Politecnico Nac.), Escuela de Ciencias Biologicas. 1991.

34. Gorwith M.J., y Et.al. Clinical and laboratory assessment of the patogenicity o serotyped enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 1977.

35. Gorwith M., y Et.al. A propspective study of rotavirus infection in infants and young children. Rev. J. Infect. Dis. 1981.

36. Graham Y.D. and Evans D.G. Prevention of Diarrhea Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Lesson Learned whit Volunteers. Rev. J. Infec. Dis. 1990.

37. Griffiths E., y Et.al. Formal. Syntesis of aerobactin and 76, 000 daltons Iron regulated outhier membrane protein by *Escherichia coli* K-12 *Shigella flexneri* hybridis and by enteroinvasive strains of *E. coli*. Rev. J. Infec. Inmunol. 1985.

38. Hamilton, H.K. Rose, M.B. Diagnóstico Clínico. Ed. Interamericana. 1987.

25. Espinoza Padilla C. Efecto de algunos factores físicos sobre la adherencia de *Escherichia coli* uropatógena. Rev. Latinoamericana de Microbiol. 1989.
26. Evans D.G., y Et.al. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Rev. J. Inf. Inmunol. 1978.
27. Evans D.G., and D.J. Evans Jr. New Surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. Rev. J. Infec. Inmunol. 1978.
28. Fernandez M. E. Virulence-Related Genes in Col V plasmids of *Escherichia coli* Isolated from Human Blood and Intestines. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
29. Finegold S.M., Diagnóstico Microbiológico. Séptima edición. Ed. Médica Panamericana. 1989.
30. Fuerst R. Microbiología de Frobisher y Fuerst. Ed. Interamericana. Decimocuarta edición. 1984.
31. Gangarosa E. J., and M. H. Merson., Epidemiologic assessment of the relevance of the so-called enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli* in diarrhea. Rev. New England Journal of Medicine. 1989.

17. Cheney C.P.y Et.al. Genetic transfer of a mucosal adherence factor (RI) from an enteropathogenic *E. coli* strain into a *Shigella flexneri* and the phenotypic suppression of this adherence factor. Rev. J. Infec. Dis. 1983.
18. Day N.P.y Et.al. Comparison of an Hep-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella spp.* and *Escherichia coli*. Rev. J. Clin. Microbiol. 1981.
19. Divo A. Microbiología Médica. Cuarta edición. Ed. Interamericana. México. 1990.
20. Doyle, M.P. Foodborne Bacterial Pathogens. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 1989.
21. Dulbecco R., M.D. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores, S.A. tercera edición 1990.
22. Dupont H.L., y Et.al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. Rev. N. England J. of Med. 1971.
23. Echeverria P.D., y Et.al. Enterotoxigenicity and invasive capacity of "enteropathogenic" serotypes of *Escherichia coli*. J. Pediatric. 1976.
24. Epidemiologic Reviews. Vol. 6 1984.

9. Braude A. I. Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1987.
10. Brussow H., y Et.al. Age-Specific Prevalence of Antibody to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Ecuatorian and German Children. Rev. J. Infec. Dis. 1990.
11. Clausen C.R. and Christie D.L. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *E. coli*. J. Pediatric. 1982.
12. Colwell, R. Methods in Microbiology. Primera edición. Ed. Londres Academic. 1987.
13. Cowan y Steel's. Manual para la identificación de bacterias de importancia Médica. Ed. C.E.C.S.A. 3a. Reim. Méx.D.F.1985.
14. Cravioto A. Nuevos enfoques en la prevención de diarrea causada por *Escherichia coli*. Rev. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 1989.
15. Cryan B. Comparison of three Assay Systems for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin. J. Clinic. Microbiology. 1990.
16. Chavez Cabrera Y. Escuela de Ciencias Biológicas. I.P.N. Análisis comparativo por la técnica del número más probable (N.M.P.), Trabajo experimental., TESIS PROFESIONAL. 1983. ,

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

1. Agüero M.A. and F.C. Cabello. Relative contribution of Col V plasmid and K 1 antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*. J. Infect. Immunol. 1983.
2. Baca B.E., y Et.al. Características de transferencia y estabilidad de los plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigenica STA 1, multirresistente a los antibióticos. Rev. Latinoamer. de Microbiol. 1990.
3. Baldini M.M., y Et.al. Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *E. coli*. J. Pediatric, Gastroenterology and Nutriology. 1983.
4. Baudry B., y Et.al. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. Rev. J. Infec. Dis. 1986.
5. BBL. Procedimientos y técnicas de laboratorio. Sexta edición. Estados Unidos. 1991.
6. Beery J.T., y Et. al. Infection of gnotobiotic pigs with an *E. coli* O157:H7 strain associated with un outbreak of hemorrhagic colitis. Rev. J. Infec. Dis. 1986.
7. Berrón Cervera Ernesto. Tratado de Microbiología. Ed. Porrúa.S.A. Cuarta ed. México.D.F. 1959.
8. BIOXON. Medios de cultivo y reactivos de diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

***REACTIVO DE EHRLICH:**

FORMULA:

Alcohol etílico 95%.....95ml
p-dimetilaminobenzaldehído.....1g
Acido clorhídrico concentrado.....20ml

PREPARACION:

Disolver el aldehído en el alcohol y agregar lentamente el ácido. El aldehído seco debe tener color pajizo claro. El reactivo de Ehrlich debe prepararse en pequeñas cantidades y guardarse en un refrigerador cuando no se usa.(53).

Guardar en el refrigerador a 4°C si no se usan.(58).

***INDICADOR ROJO DE METILO:**

FORMULA:

Rojo de metilo.....0.1g
Alcohol etílico, 95°.....300ml

PREPARACION:

Disolver el colorante en alcohol y añadir suficiente agua destilada para 500 ml.(53).

Guardar en el refrigerador a 4°C si no se usan.(58).

***CLORURO FERRICO (FeCl₃) AL 10%:**

FORMULA:

1. Acidificado, recomendado:

Cloruro Férrico.....12g
Acido clorhidrico concentrado.....2.5ml
Agua destilada c.s.p.....100ml

PREPARACION:

Mezclar el cloruro férrico con el ácido clorhidrico concentrado y después vaciar la mezcla suavemente en los 100 ml de agua destilada, agitar suavemente.(93).

2.No acidificado:

Cloruro Férrico.....10g
Agua destilada.....100ml

PREPARACION:

Mezclar el cloruro férrico en 100 ml de agua destilada.(93).

NOTA: Guardar los reactivos en un refrigerador (4°C) mientras no se usan. Estos reactivos deben ser colocados en frascos oscuros para evitar la exposición a la luz.(58).

4. Guardar en un frasco para reactivos de vidrio recubierto de polietileno o parafina.

5. Rotular correctamente. (58).

NOTA: El hidróxido de sodio puede ser sustituido por hidróxido de potasio (KOH) al 40%. Los ingredientes y la preparación son los mismos. El hidróxido de sodio y el de potasio son soluciones sumamente cáusticas; evitar el contacto con la piel para impedir dolorosas quemaduras. (58).

*REACTIVO DE KOVAC:

FORMULA:

Paradimetilaminobenzaldehido.....	10g
Acido clorhídrico (densidad 1.19).....	50ml
Alcohol amílico o isoamílico.....	150ml

PREPARACION:

Disolver el aldehído en el alcohol y agregar lentamente el ácido. El aldehído seco debe tener color claro. Los alcoholes que producen reactivos de indol de color azul oscuro no deben usarse. El reactivo mencionado es estable a temperatura ambiente y tiene color claro. Algunos autores recomiendan la preparación de pequeñas cantidades que se conservan en un refrigerador cuando no se usan. (53).

"R E A C T I V O S"

*ALFA-NAFTOL AL 5% PARA PRUEBA DE VP:

FORMULA:

Alfa-naftol (1-naftol).....5g
Alcohol etílico (absoluto).....100ml

PREPARACION:

1. Disolver el alfa-naftol en menos de 100 ml de alcohol etílico absoluto.
2. Trasvasar la solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agregar alcohol etílico absoluto, c.s.p. 100 ml. (58).

*HIDROXIDO DE SODIO 10N (NaOH) AL 40%:

FORMULA:

Hidróxido de sodio..... 40g
Agua destilada.....100ml

PREPARACION:

1. Pesar rápidamente el hidróxido de sodio y disolverlo en menos de 100 ml de agua destilada en un vaso. Este reactivo es muy higroscópico.
2. Colocar el vaso en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura.
3. Enfriar y trasvasar la solución de NaOH a un frasco volumétrico de 100 ml agregando agua destilada, c.s.p. 100 ml.

DECOLORANTES

Alcohol etílico 95%: agente lento

Acetona: agente muy rápido.

Acetona alcohol: acción intermedia (proporción 1:1)

CONTRACOLORANTES

1. Solución de reserva

safranina O (certificada).....2.5g

Alcohol etílico de 95°.....100ml

2. Solución de trabajo

Solución de reserva.....10ml

Agua destilada.....90ml

PREPARACION:

1. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar reposar 1 minuto.
2. Lavar con agua corriente y quitar el exceso de agua.
3. Cubrir con solución de yodo y dejar reaccionar por 1 minuto.
4. Lavar con agua y decolorar hasta que no aparezca color en el portaobjetos con alcohol acetona.
5. Lavar brevemente con agua corriente y aplicar el contracolor durante 10 segundos.
6. Lavar con agua y dejar secar. Los microorganismos gramnegativos, como es el caso de la *E. coli* se pigmentan de color rojo. (58).

A P E N D I C E I I

TINCIONES

***TINCION DE GRAM:**

*Reactivos y su preparación.

1. Solución A.

Cristal violeta (certificado).....2g

Alcohol etílico al 95%.....20ml

2. Solución B

Oxalato de amonio.....0.8g

Agua destilada.....80ml

Mezclar las soluciones A y B. Guardar por 24 horas antes de usar; luego filtrar.

YODO GRAM

Yodo.....1g

Yoduro de potasio.....2g

Agua destilada.....300ml

Moler el yodo seco y el yoduro de potasio en un mortero, añadir agua poco a poco y moliendo en cada adición a obtener una solución en un frasco de vidrio ambar con el resto del agua destilada.

PREPARACION:

Suspender los componentes en el agua, remojar 10 minutos y hervir con agitación constante por 1 minuto. Distribuir en tubos con tapón de rosca y esterilizar a 121°C por 10 minutos.(58).

***TRANSROW:**

FORMULA APROXIMADA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar base GC (doble concentrado).....72
Agar.....10

PREPARACION:

Suspender el medio deshidratado en el agua destilada, mezclar y calentar agitando, después agregar glucosa al 0.15% y aumentar un 2% en la base agar GC . Dejar hervir un minuto, posteriormente se esteriliza a 121°C por 15 minutos.(12)(58).

Al mismo tiempo, poner en el autoclave una suspensión de 20 g de hemoglobina deshidratada en 1 lt de agua destilada durante 15 minutos. Dejar enfriar ambas suspensiones hasta 50°C; mezclar en condiciones asépticas.(12)(58).

Después gasear los frascos, una vez llenados con CO₂ al 20% en aire y cerrarlos bien. Puede agregarse Timetropim lactato (5mg/lt) al agar Transrow si se desea, especialmente para examinación de muestras rectales.(12)(58).

***CARY BLAIR:**

FORMULA APROXIMADA EN GRAMOS PARA 990 ml DE AGUA DESTILADA:

Fosfato disódico.....	1.1
Cloruro de sodio.....	5
Tioglicolato de sodio.....	1.5
Agar.....	5

PREPARACION:

Mezclar los ingredientes con el agua y calentar agitando frecuentemente hasta que la solución se vuelva límpida. Dejar enfriar hasta 50°C y agregar 9 ml de solución acuosa de CaCl al 1% recién preparada y ajustar el pH a 8.4. Distribuir en tubos con tapa de rosca esterilizados. Calentar al vapor por 15 minutos y dejar enfriar; ajustar la tapa.(93).

***STUART:**

FORMULA EN GRAMOS PARA UN LITRO DE AGUA DESTILADA:

Tioglicolato de sodio.....	1
Glicerofosfato de sodio.....	10
Cloruro de Calcio.....	0.1
Azúl de metileno.....	0.002
Agar.....	3
pH final 7.3± 0.2	

"MEDIOS DE TRANSPORTE"

*AMIES:

1. Agregar 4 gramos de agar a un litro de agua destilada; calentar hasta disolución y mientras todavía está caliente, agregar:

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Cloruro de sodio.....	3
Cloruro de potasio.....	0.2
Tioglicolato de sodio.....	1
Fosfato disódico anhidro.....	1.15
Fosfato monopotásico.....	0.12
Cloruro de calcio al 1%.....	10 ml
Cloruro de magnesio 6H O al 1%.....	10 ml
pH final 7.3	

PREPARACION:

2. Remover hasta que se disuelva y agregar 10 gramos de carbón neutro farmacéutico. Distribuir en tubos con tapa de rosca en volúmenes de 5 a 6 ml, agitando frecuentemente para mantener la suspensión de carbón. Evitar enfriar o gelificar.
3. Esterilizar a 121°C por 20 minutos. Antes de que se solidifique, invertir los tubos para distribuir el carbón de manera uniforme.
4. Evitar calentamiento prolongado en frascos abiertos, dado que el agente reductor (Tioglicolato) es volátil.(93).

***MEDIO DE PRUEBA PARA ROJO DE METILO:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Polipeptona (BBL) o peptona con buffer (Difco)....	7
Glucosa.....	5
Fosfato dipotásico.....	5

PREPARACION:

1. Disolver los ingredientes en 1,000 ml de agua destilada por calentamiento suave.

2. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Se recomiendan los productos deshidratados de BBL y Difco, medio de RM-VP. El medio también se usa para la prueba de Voges-Proskauer.(93).

Agar.....3.5

pH final 7.3 mas o menos

PREPARACION:

Se suspenden 30 gramos del material seco en un litro de agua destilada. Mézclese bien y cuando se obtenga la suspensión uniforme, caliéntese agitando de cuando en cuando y hiérvase durante un minuto o hasta su disolución. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.(5).

***MEDIO DE MOVILIDAD: (MIO)**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Extracto de carne.....2.2

Peptona.....7.3

NaCl.....4.65

Agar.....3

Caldo nutritivo.....4

pH final 7

PREPARACION:

Disolver los componentes por calentamiento y dejar hervir por un minuto con agitación constante. Vaciar en tubos y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Una vez fuera, dejar los tubos en posición vertical. (5).

***MEDIO DE CLARK Y LUBS (CALDO RM/VP):**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Polipeptona o una peptona tamponada.....	7
Dextrosa (glucosa).....	5
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)(buffer).....	5
Agua destilada.....	1000ml

*Existen productos comerciales BBL y Difco.

PREPARACION:

1. Pesar exactamente las cantidades siguiendo las indicaciones del prospecto. Los diferentes productos pueden variar ligeramente.
2. Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
3. Calentar suavemente hasta su disolución.
4. Distribuir en tubos, aproximadamente 5 ml/tubo.
5. Método de esterilización:
 - A. Autoclave.
 - B. 121°C, 15 libras, 15 minutos.
6. Enfriar antes de su empleo y refrigerar para su conservación (4 a 10°C). (58).

***MEDIO SIM:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Trypticase.....	20.0
Thitone.....	6.1
Sulfato de hierro y amonio.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.2

ml en tubos con tapón con rosca y dejar solidificar en posición vertical.(5).

***AGAR UREA:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Peptona de gelatina.....	1
Dextrosa.....	1
NaCl.....	5
Fosfato monopotásico.....	2
Urea.....	20
Rojo fenol.....	0.012

pH final 6.8 ± 0.2 .

PREPARACION:

Disolver los componentes en el agua destilada y esterilizar por filtración. Por separado, suspender 15 g de agar en 900 ml de agua destilada, dejando remojar por 10 a 15 minutos; luego disolver por ebullición y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregarlos a los 100 ml de la base de urea estéril. Mezclar bien y distribuir en tubos estériles. Dejar solidificar el medio en posición inclinada, procurando tener fondos profundos. El medio solidificado debe tener un color amarillo rosado ligero. No volver a fundir el agar inclinado.
(58).

***AGAR TSI:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Polypeptona.....	20.0
Cloruro de Sodio.....	5.0
Lactosa.....	10.0
Sacarosa.....	10.0
Glucosa.....	1.0
Sulfato de amonio Ferroso.....	0.2
Tiosulfato de Sodio.....	0.2
Rojo Fenol.....	0.025
Agar.....	13.0
pH final 7.3 mas o menos	

PREPARACION:

Se suspenden 59.4 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Mézclese bien y caliéntese agitando de vez en cuando. Hiérvase durante 1 ó 2 minutos para disolver. Distribúyase en tubos de ensaye, llenándolos hasta su tercera parte. Esterilice a no más de 118°C durante 15 a 17 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada, de tal manera que produzcan fondos profundos. (5).

***AGAR UREA: (SEGUN CHRISTENSEN):**

PREPARACION:

Disolver el medio base (como se muestra en el siguiente medio de agar urea) en 900 ml de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfrair a 50°C y añadir 100 ml de solución de urea al 20% esterilizada por filtración. Poner en condiciones estériles 3

***AGAR TERGITOL 7:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Tergitol 7.....	0.1
Mezcla de peptonas.....	5
Extracto de levaduras.....	3
Lactosa.....	10
Agar.....	15
Azúl de bromotimol.....	0.025
Agua destilada	1,000ml
pH final 6.9±0.2	

Tergitol 7: Heptadecil Sulfato de sodio.(8).

PREPARACION:

Suspender 33 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y dejarlo remojar por 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente por un minuto dejando hervir. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, y si se desea agregar 3 m de una solución de trifenil tetrazolio estéril al 1%. Dejar enfriar a 45°C y distribuir en placas (8).

PREPARACION:

1. Mezclar y calentar agitando hasta que se forme la solución.
2. Dispensar para planos inclinados profundos y pasar por autoclave a 121°C durante 15 minutos.(53).

***AGAR SANGRE ANAEROBIO:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar soya tripticasa (BBL).....	40
Agar.....	5
Extracto de levadura.....	5
Hemina	5
L cistina.....	5
Solución de reserva de Vit. K1.....	1 ml
pH final 7.5	

PREPARACION:

Disolver la hemina y la L cistina en 5 ml de NaOH 1N antes de agregar los otro ingredientes.

La solución de reserva se hace agregando 1 g de vitamina K1 a 99 ml de etanol absoluto.

Disolver los ingredientes por calor, ajustar el ph y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta 50°C, añadir 50 ml de sangre ovina desfibrinada estéril. Mezclar y verter 20 ml en cada placa de Petri. El medio debe refrigerarse a 4°C.(20).

6. Agregar con precauciones de esterilidad 3-4 ml de rojo neutro acuoso 1% "certificado". Hervir la solución de rojo neutro en tubo 5 minutos antes de agregar al medio. (93).

7. Cuando está parcialmente enfriado volcar en cajas Petri, más o menos 18-20 ml/por caja. Dejar reposar con las tapas un poco abiertas una hora en un lugar libre de polvo a temperatura ambiente.

8. Guardar en refrigerador.

Hay muchas modificaciones del este medio. Varias preparaciones comerciales son excelentes; contienen 0.001 de cristal violeta/1.000ml de medio. (93).

***AGAR DE HIERRO KLIGLER (o KIA):**

FORMULA DE GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Peptona o polipeptona.....	20
Extracto de carne (optativo).....	3
Extracto de levadura (optativo).....	3
Lactosa.....	10
Glucosa.....	1
Cloruro de sodio.....	5
Citrato férrico de amonio.....	0.5
Tiosulfato de sodio.....	0.5
Agar.....	12 a 15
Rojo fenol.....	0.25
Agua destilada.....	1,000ml
pH final 7.5 mas o menos	

PREPARACION:

El azul de metileno puede agregarse en 0.5 ml de solución acuosa 2%; la eosina Y, en 2 ml de solución acuosa 2%.

Puede usarse medio EMB deshidratado preparado comercialmente.(93).

***AGAR MAC CONKEY:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Peptona.....	20
Cloruro de sodio.....	5
Glicolato de sodio.....	5
ó	
Tioglicolato.....	5
ó	
Bacto-sales biliares N° 3.....	1.5
Agar.....	13.5
Lactosa.....	10
Rojo neutro acuoso, 1%.....	3-4ml(93)

PREPARACION:

1. Suspender la peptona en 1.000 ml de agua destilada.
2. Agregar cloruro de sodio, glicolato de sodio y agar, Embeber 15 minutos; luego disolver por calentamiento.
3. Ajustar la reacción a pH 7.4.
4. Agregar la lactosa a agar caliente.
5. Esterilizar en autoclave 15 psi durante 20 minutos.

***AGAR CITRATO DE SIMMONS:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Fosfato Monobásico de Amonio.....	1.0
Fosfato Dipotásico.....	1.0
Cloruro de Sodio.....	5.0
Citrato de Sodio.....	2.0
Sulfato de Magnesio.....	0.2
Agar.....	15.0
Azul de Bromotimol.....	0.08

pH final 6.9 mas o menos

PREPARACION:

Se suspenden 24.2 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Dejese remojar durante 5 a 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando de vez en cuando hasta que el medio hierva durante 1 ó 2 minutos. Distribuyase en tubos y esterilizese en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja en posición inclinada, aunque también se puede emplear como medio en placas. (5).

***AGAR EOSINA Y AZUL DE METILENO (EMB):**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Peptona.....	10
Lactosa.....	5
Sacarosa.....	5
Fosfato dipotásico.....	2
Agar.....	13.5
Eosina Y.....	0.4
Azul de metileno.....	0.065

17. Volcar en placas 15-17 ml en cada una. Dejar secar con las tapas parcialmente abiertas durante una hora y media.

Pequeños cristales "como gotas de rocío" de desoxicolato de sodio aparecen en la superficie del medio durante el almacenamiento. Su presencia influye en la calidad del mismo. Estas "gotas" desaparecen cuando la placa se incuba. El medio de ADC puede conseguirse de manera deshidratada.

*No esterilizar en autoclave.(93).

***AGAR CITRATO:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar.....	20
Sulfato de magnesio.....	0.2
Fosfato dihidrogenado de amonio.....	1
Cloruro de sodio.....	5
Fosfato dipotásico.....	1
Citrato de sodio.....	2
Azul de bromotimol.....	0.08

pH final 6.9

PREPARACION:

Suspender los componentes en el agua destilada y dejar remojar de 5 a 15 minutos. Mezclar bien y calentar agitando hasta disolución completa. Distribuir volúmenes de 3 ml, en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Los tubos deben enfriarse en posición inclinada de manera que el medio de cultivo alcance una profundidad de 1 a 1.5 cm.(93).

Desoxicolato de Sodio.....	5.0
Agar.....	17.0
Rojo neutro.....	0.02

PREPARACION: (93)

1. Infundir 1.000 g de carne porcina magra molida en 3.000 ml de agua destilada 3 horas a temperatura ambiente.
2. Agregar 10 ml de ácido clorhídrico 1N y hervir 1 minuto.
3. Estrujar a través de gasa pequeñas cantidades por vez, y luego filtrar con papel de filtro.
4. Agregar al filtrado 10 ml de hidróxido de sodio 1N.
5. Hervir 1 minuto y diluir a 3.000 ml con agua destilada.
6. Agregar 30 g de peptona (Thio o Wilson B).
7. Ajustar la reacción a pH 7.5.
8. Hervir 5 minutos y filtrar con papel filtro.
9. Agregar 60 g de agar.
10. Agregar 15 ml de hidróxido de sodio 1 N.
11. Dejar embeber a temperatura ambiente 15 minutos.
12. Hervir en vapor 20 minutos.
13. Colocar en frascos de Erlenmeyer en cantidades de 1.000 ml (o más pequeñas).
14. Agregar lo siguiente: (93)

Lactosa	10.0 g
Citrato de sodio cristalino	20.6 g
Desoxicolato de sodio (optativo 10 ml de solución acuosa 0.355 de cloruro de plomo)	5.0 g
15. Ajustar a pH 7.4.
16. Guardar en refrigerador inmediatamente o agregar en seguida 2 g de citrato de hierro y amonio "escamas verdes" y 3 ml de solución acuosa 1% de rojo neutro.

***CALDO INDOL: (TRIPTOFANO):**

FORMULA EN GRAMOS POR 100 ml DE AGUA DESTILADA:

Peptona.....2
Cloruro de sodio.....0.5
DL Triptofano.....0.03
Agua destilada.....100 ml
pH final 7

PREPARACION:

Disolver los ingredientes y distribuirlos en tubos con tapón de rosca, 3 ml en cada uno. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. La determinación de indol se observa en un tubo inoculado con el microorganismo e incubando a 37°C por 24 horas, al cual se le añaden dos gotas de tolueno (para extraer el indol), se agita vigorosamente y se añaden dos gotas de reactivo de Kovac. Un color rojo indica que la prueba es positiva.(20).

Puede también utilizarse el reactivo de Erlich, para pruebas de indol omitiendose la adición de formol al medio.(46).

AGAR DESOXICOLATO-CITRATO (ADC)-

LEIFSON:

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Carne, Infusión de375.0
Lactosa.....10.0
Citrato de Sodio.....20.0
Citrato Férrico.....1.0

menos, y se agregan 20 ml. de una solución de yoduro. Mézclese y distribúyase en porciones de 10 ml. en tubos estériles. No se caliente después de haber agregado la solución de yoduro. El caldo base con Tetrionato se puede guardar durante algún tiempo, pero el medio ya completo se debe emplear el mismo día de su preparación.(5).

SOLUCION YODO-YODADA:

Yodo.....6g
Yoduro de potasio.....5g
Agua.....20 ml

***CALDO UREA:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Urea.....20
Fosfato monopotásico.....9.1
Fosfato disódico.....9.5
Extracto de levadura.....0.1
Rojo fenol.....0.01
pH final 6.9

PREPARACION:

Disolver los componentes en el agua pero sin calentar. Una vez disueltos, se pasa por un filtro bacteriológico para esterilizar. Pasar en volúmenes pequeños (0.5 a 2 ml) a tubos estériles.(93).

***CALDO GN:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Triptosa.....	20
Destroxa.....	1
d-Manitol.....	2
Citrato de sodio.....	5
Desoxicolato de sodio.....	0.5
Fosfato dipotásico.....	4
Fosfato monopotásico.....	1.5
Cloruro de sodio.....	5

PREPARACION:

1. Disolver en 1.000 ml de agua destilada.
2. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 10 psi (116°C) por 15 minutos.
3. La reacción final será pH 7.0.(5)(46).

***CALDO TETRATIONATO:**

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Polipeptona.....	5
Sales Biliares.....	1.0
Carbonato de calcio.....	10
Tiosulfato de sodio.....	30

PREPARACION:

Se suspenden 46 gramos del polco en un litro de agua destilada. Mézclase bien y caliéntese hasta ebullición. Se enfría a 45°C o

A P E N D I C E I

"MEDIOS DE CULTIVO"

CALDO NUTRITIVO:

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Trypticasa.....	2.5
Thiotone.....	2.5
Extracto de Carne de Res.....	3.0

PREPARACION:

Se disuelven 8 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Si es necesario, caliéntese suavemente para disolverlo. Distribuyase y esterilicese a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.(5).

*GELATINA NUTRITIVA:

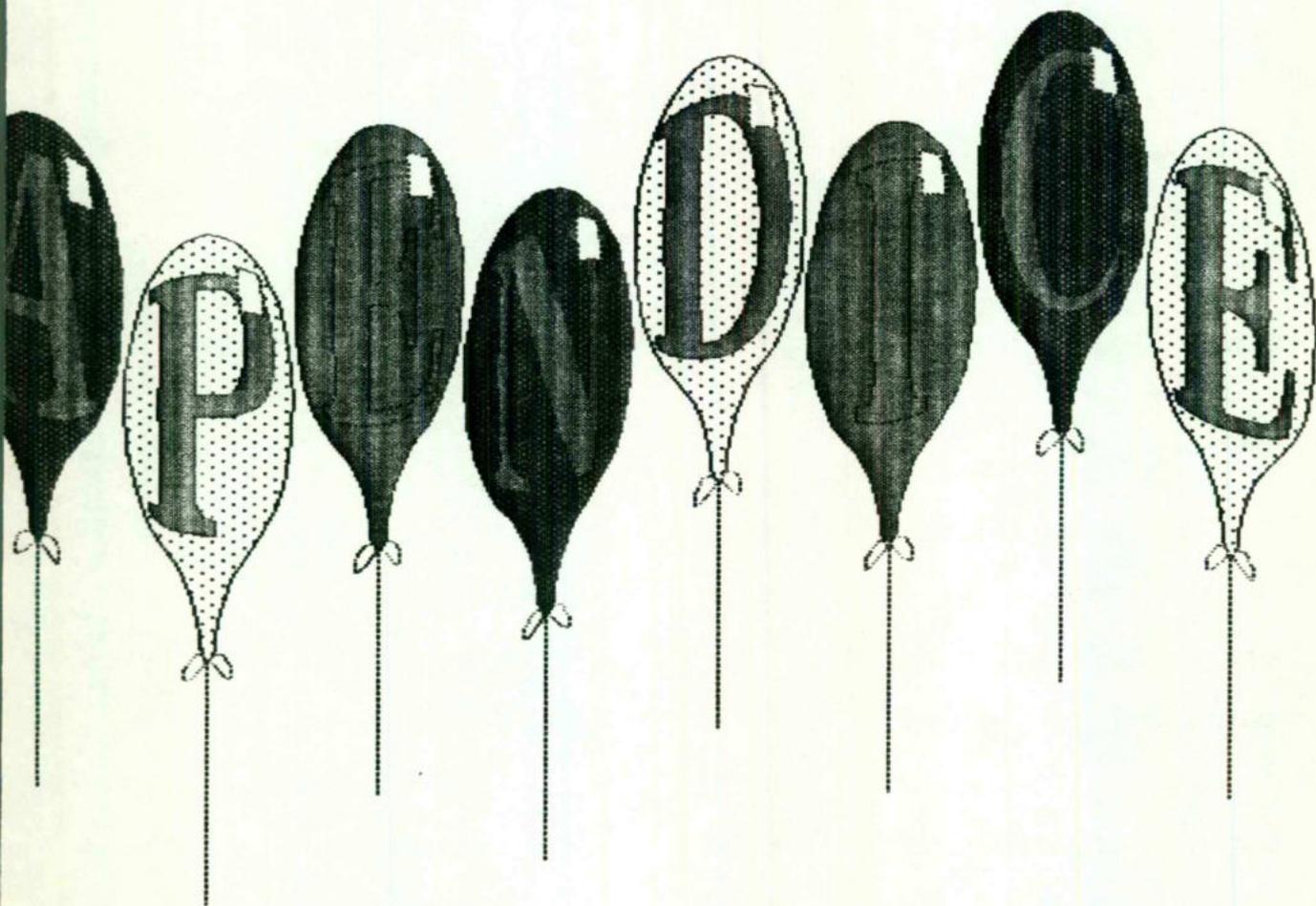
FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

BHI.....	8
NaCl.....	2.5
Gelatina.....	120
Glucosa.....	2.5

pH final 7.

PREPARACION:

Disolver los componentes por calentamiento y distribuir en tubos con tapón de rosca, 3 ml en cada tubo y esterilizar a 121°C por 15 minutos.(93).



E. 7) TRATAMIENTO:

Se espera que el tratamiento durante la gastroenteritis aguda proporcione protección mientras el paciente desarrolla una respuesta inmunitaria al microbio, con lo que disminuye el riesgo de bacteremia.(50).

Se recomienda farmacos antimicrobianos como: Ampicilina; trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) y un aminoglucósido parenteral.(50), el más eficaz segun los estudios efectuados es la ampicilina, aún cuando se produce la curación sin la administración de antibioticos.(84).

E. 8) EPIDEMIOLOGIA:

La EIEC es menos frecuente que la ETEC, pero en EUA es rara la diarrea por *E. coli* de tipo invasor, debido a que no se conoce su verdadera importancia, ya que no se dispone de un ensayo adecuado para su empleo en los laboratorios clínicos que permitan detectar estas cepas(39)(53), pero ha sido la causa más importante de incapacidad por corto plazo en Europa oriental y el sudeste de Asia(11). EIEC es causa poco frecuente de diarrea infantil y se transmite a menudo por alimentos contaminados.(50).

E. 9) PROFILAXIS:

Las consideraciones sobre este tema, son las mismas que se han mencionado anteriormente en el tema respectivo a ETEC. (ver página 220).

E. 4) MANIFESTACIONES CLINICAS:

Típicamente, los pacientes con diarrea por *E. coli* enteroinvasora manifiestan clínicamente, severos dolores abdominales, toxemia, tenesmo, diarrea acuosa seguida de una gran disenteria, consistiendo de escasas heces con moco, sangre y pus, leucocitosis inflamatoria (19)(50)((59). También se presenta fiebre (56), rara vez ocurre vómito con este tipo de *E. coli* y la duración de la enfermedad es mucho más breve (39).

E. 5) SEROGRUPOS "O" MAS FRECUENTES:

Están asociadas con un número relativamente pequeño de serotipos como son O28, O29, O42, O112, O115, O118, O121, O124, O136, O143, O144, O147, O152, O164. (59)(84)(95).

E. 6) INMUNIDAD:

E. coli enteroinvasora tiene antígenos de superficie que dan reacciones cruzadas con los de las shigelas y son esenciales para la virulencia. Los anticuerpos locales (IgA secretoria) se desarrollan dentro de la primera semana de la enfermedad y es probable que protejan contra ella. También se desarrollan anticuerpos circulantes, pero es dudoso que contribuyan a la protección. (50).

La estructura de la pared celular de esta bacteria determina la virulencia y puede proteger al organismo de la fagocitosis y la lisis.(50).

E.3) MECANISMO:

Las cepas de *E. coli* enteroinvasivas causan padecimientos parecidos a shigelosis y son capaces de producir infecciones extraintestinales generalizadas en el hombre y animales.(32).

Minsheu y col. 1978 y Eiwel en 1980, observaron la presencia de factores que ayudan a la patogenicidad de estas cepas invasivas y como favorecen su implantación en sitios extraintestinales. Estos factores son:(32)

- 1.- Biosíntesis de colicina V (Co V) que interfiere en los mecanismos de defensa del huésped.
- 2.- Adherencia específica a células blanco, asociándose a la capacidad de aglutinación de eritrocitos.
- 3.- Producción de hemolisinas que pueden ser factores citotóxicos.

(32).

Una característica de estas cepas es la de invadir y penetrar las células epiteliales del colon (12) y luego multiplicarse dentro de ellas (50). Las cualidades invasoras de esta bacteria y de las shigelas dependen de una plásmide transmisible (50), de 140 Mdaltos (posible enterotoxina citotóxica) (84).

notablemente en la prueba de Sereny, en donde EIEC y EPEC pertenecen a diferentes serogrupos "O", que no se traslapan y causan enfermedad con distintas características clínicas y epidemiológicas. (54)(56).

EIEC, puede ser diagnosticada por serotipificación de las cepas sospechosas de *E. coli*. La prueba de ELISA, sirve para determinar las proteínas de membrana externa probablemente asociadas con invasividad y por el empleo de sondas de DNA que seleccionan y marcan los genes para invasividad. (102).

E. 2) PATOGENIA:

Este segundo grupo de *E. coli* produce enfermedad disenteroide, similar a la infección por *Shigella* (50)(53) por su capacidad para penetrar e invadir las células mucosales, causando destrucción, con desprendimiento de áreas de revestimiento de la mucosa, debido a su multiplicación dentro de las células del epitelio intestinal (50)(53).

Se necesita de 2 a 100 millones de microbios para producir la enfermedad. La enfermedad por EIEC es poco frecuentes en lactantes (50).

También se ha dicho que las cualidades invasoras de estas bacterias dependen genéticamente de un largo plásmide transmisible (50)(59).

La capacidad de EIEC o de las shigelas, de invadir el epitelio intestinal intacto se puede demostrar en cultivo de tejidos o mediante la prueba de queratoconjuntivitis en cobayos (prueba de Sereny).(18)(50).

Los determinantes de virulencia de EIEC no se conocen claramente, algunas cepas de *E. coli* causan bacteremia y otras infecciones sistémicas y esta cualidad patógena se considera que está asociada a la presencia de ciertos factores auxiliares de la patogenicidad tales como : el antígeno polisacárido capsular K1 (1), una capacidad de sobrevivir en el suero y un sistema de captación de fierro el cual está codificado por plásmidos.(37). Sin embargo esto no es suficiente pues cualesquiera de las otras características metabólicas o superficiales podrían facilitar la invasión intestinal por *E. coli*. Las cepas EIEC, raramente invaden más allá de la mucosa intestinal; aunque la capacidad de captar o secuestrar una cierta cantidad de fierro para su crecimiento en tejidos, se considera como un atributo esencial de la mayoría de las bacterias patógenas, incluyendo EIEC; no obstante no se tiene ninguna evidencia que apunte hacia la relación directa entre la eficacia con la cual las bacterias adquieren el fierro y la virulencia(37).

Las EIEC, se asemejan a las EPEC en su capacidad de producir toxina semejante a *Shiga*, pero no producen las toxinas convencionales LT y ST; sin embargo, estos dos grupos EIEC y EPEC son claramente diferentes, como lo revela su comportamiento en modelos experimentales de patogenicidad,

TABLA No. 14.

SEROGRUPOS DE E. coli ENTEROINVASIVA Y CRUCE ANTIGENICO CON Shigella.

SEROGRUPO O	TIPO DE RELACION ANTIGENICA	
	E I E C	IDENTIDAD
028 ac		<i>S. boydii</i> 13 b
029		
042		
0112 ac		<i>S. dysenteriae</i> 2 <i>S. boydii</i>
0124 c		<i>S. dysenteriae</i> 3
0136 d		<i>S. dysenteriae</i> 3
0143		<i>S. boydii</i> 9 b
0144		<i>S. dysenteriae</i> 3.
0152		<i>S. dysenteriae</i> 2.
0164		<i>S. dysenteriae</i> 3
0167		<i>S. boydii</i> 3

a. Título de la reciproca absorbible solo parcialmente.

b. En duda.

c. Es el más común E I E C.

d. También con *S. boydii* y anticuerpo anti-0136.

Tomado de: Sansonetti y col. Microbiology ASM 1985.

TABLA No. 13

BIOTIPOS DE *E. coli* ENTEROINVASIVA (E I E C), COMENSAL Y SHIGELLA
SP.

CARACTERISTICA	BIOTIPO (% POSITIVIDAD)		
	<i>E. coli</i>	&EIEC	SHIGELLA
LISINA DESCARBOXILASA	88.7	0	0
CITRATO DE CHRISTENSEN	24.2	8.3	0
MOVILIDAD	69.1	7.2*	0
LACTOSA	90.0	30.9	-0.3#
GAS DE GLUCOSA	91.1	73.2	6Ü
SALICINA	40	20.6	0
RHAMNOSA	82.3	57.7	16.6

* Solo 0124

De las cepas probadas 49.4% de *S. dysenteriae* y 95% de *S. sonnei* son O-nitrofenol B-D Galactopiranosido positivo.

Ü De *S. flexneri*, 18.1% son positivos.

& *E. coli* Enteroinvasiva.

Tomado de: Sansonetty y col. Microbiology ASM. 1985.

XIV.E)

E s c h e r i c h i a c o l i ENTEROINVASIVA

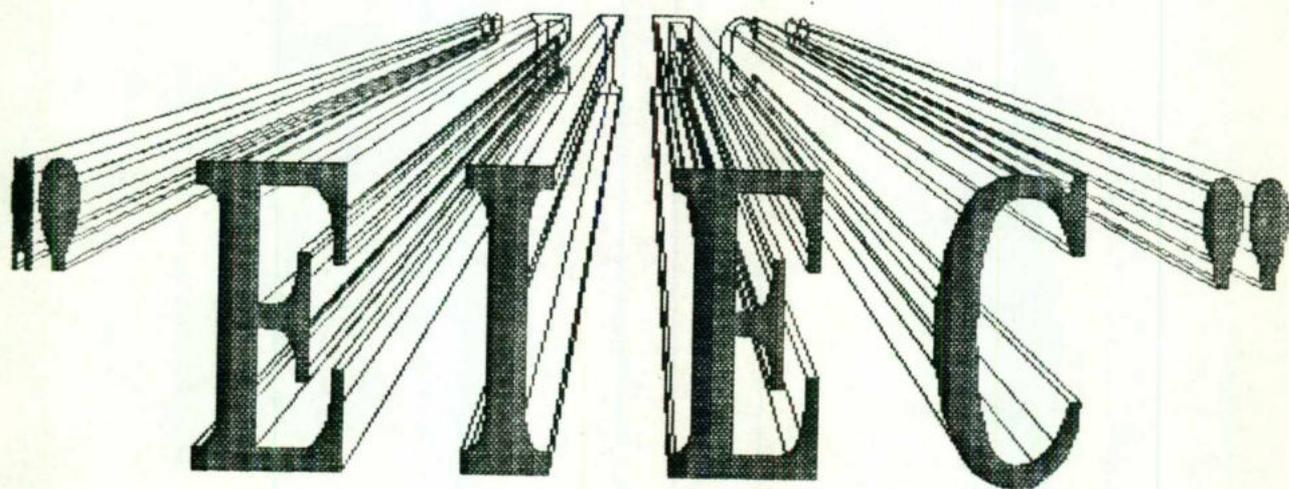
E.1) GENERALIDADES Y

ANTECEDENTES HISTORICOS:

Sakasaki y col. (1967) demostraron que algunas cepas de *E. coli* podían causar una enfermedad disentérica, casi coincidentalmente con el descubrimiento de ETEC. En 1971, Dupont y col. describieron que ciertas cepas de *E. coli* con capacidad invasiva daban un cuadro clínico disentérico de enfermedad diarreica en voluntarios semejante al de *Shigella*. Estas bacterias por lo tanto han sido designadas *E. coli* disentéricas o enteroinvasivas (EIEC) y pertenecen a un número limitado de serogrupos "O" (ver tabla No. 13).(22).

La patogénesis inducida por EIEC de disenteria fue estudiada por Dupont y col. en (1971).(95).

Las cepas EIEC tienen una estrecha semejanza con las shigelas, no solamente en la enfermedad clínica que causan, sino también en términos de sus reacciones de fermentación, antígenos de superficie (tabla No. 14) y respuesta en modelos experimentales de enteritis (18). La patogénesis de la diarrea inducida por EIEC parece involucrar la penetración del epitelio intestinal al igual que en la shigelosis, siendo el colon atacado principalmente seguido de una multiplicación bacteriana dentro de las células epiteliales.(48).



Mathewson sugiere que las cepas de *E. coli* que son adherentes a células Hep-2, pero que no pertenecen a los serogrupos clásicos de EPEC, es decir EAEC, pudieran tener importancia etiológica en los adultos con diarrea del viajero a los que no se les aisló ningún otro patógeno diarrogénico.(62). En países en desarrollo se ha encontrado esta cepa EAEC, como una diarrea persistente en niños en lactancia.(4).

D. 9) PROFILAXIS:

Las consideraciones sobre este tema, son las mismas que se han mencionado anteriormente en el tema respectivo a ETEC.(ver pa. 220.).

D. 7) TRATAMIENTO:

Los antibioticos usados pueden ser cualquiera de los antes mencionados para las cepas EPEC o ETEC, no se han hecho estudios del antibiotico mas adecuado para este tipo de cepas, ya que es más recomendable la inmunidad que presenta el organismo ante esta bacteria.(33). Cravioto y col. apoyan la posibilidad de usar la leche materna como vehículo de vacunación pasiva contra cepas de EAEC aisladas en niños pequeños con diarrea, a través de incrementar y mantener constante la presencia de factores específicos de protección al principio de su vida .(51).

D. 8) EPIDEMIOLOGIA:

En estudios que se han hecho en México se encontró una prevalencia de 14.9% de EAEC en pacientes con diarrea y 7.6% de EAEC en pacientes sanos (62). La siguiente tabla, muestra los resultados que obtuvo Mathewson e indica la distribución de los microorganismos enteropatógenos identificados en este caso particular cepas de EAEC en los 188 pacientes con diarrea del viajero.

*DISTRIBUCION DE MICROORGANISMOS ENTEROPATOGENOS ENTRE LOS
188 ADULTOS CON DIARREA DEL VIAJERO*

ENTEROPATOGENO	No. PACIENTES	(%)
<i>Escherichia coli</i> Enteroadherente	28	(14.9)

(62).

D. 4) MANIFESTACIONES CLINICAS:

Solo se han reportado diarreas (en algunos casos graves) pero sin sangre ni leucocitos fecales en niños y adultos (61).

D. 5) SEROGRUPOS "O" MAS FRECUENTES:

Hasta la fecha no se ha determinado si estas cepas pertenecen a un grupo restringido de serogrupos "O" como lo están las otras categorías.(62), lo que si se sabe es que pertenecen a un serogrupo "O" único.(61).

D. 6) INMUNIDAD:

No existe duda que la lactancia al seno materno tiene un efecto de protección contra infecciones en niños pequeños. Los datos presentados por Cravioto y col. (1990), lo demuestran y apoyan la hipótesis de que esta protección es específica y está dirigida contra factores de patogenicidad utilizados por bacterias para causar enfermedad. En la leche se detectó factores globulínicos y no globulínicos contra adhesinas utilizadas por cepas enteroadherentes de *Escherichia coli* para causar enfermedad en humanos. Aunque la producción de estos factores no fue constante a través del tiempo, aun en la misma mujer, los resultados reflejan una relación entre la respuesta en leche materna y la presencia de cierto tipo de cepas o sus productos en los hijos de estas mujeres.(51).

D. 2) PATOGENIA:

Otros estudios recientes hechos por Bernadette y col. (1990) demuestran que la nueva categoría de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) es llamada originalmente *E. coli* enteroadherente-agregativa, la cual es de particular interés, debido a sus propiedades microbiológicas infrecuentes y su incriminación epidemiológica como una causa de diarrea persistente en lactantes en algunos países en desarrollo.(4).

Hay evidencias que sugieren que las cepas EAEC, son identificables por su particular patrón de adherencia a células Hep-2 que es claramente distinguible, tanto de adherencia localizada, como de adherencia difusa (Nataro y col. observaciones no publicadas)(56), no producen enterotoxinas y solamente se han involucrado con pacientes que presentan "diarrea del viajero" (4)(33).

D. 3) MECANISMO:

En varias investigaciones se ha comprobado que las cepas enteroadherentes, actúan con un mecanismo muy específico, causando cambios morfológicos en la célula del huésped, destruyendo el citoplasma apical de la célula epitelial de la mucosa intestinal debido a su gran adherencia a células Hep-2 y produciendo diarrea grave.(33).

Mathewson y col. (1985), describieron este grupo a partir de un estudio realizado con 188 viajeros que estuvieron en México y que presentaron diarrea y con 92 viajeros sanos de donde los aisló. Los criterios que definen a *E. coli* enteroadherente (EAEC) se caracterizan porque presentan adherencia a células Hep-2, se encontró una prevalencia de 14.9% EAEC en pacientes con diarrea y de 7.6% EAEC en pacientes sanos. (62).

Mathewson y col. (1986), realizaron un estudio en voluntarios a los cuales desafiaron con cepas EAEC, encontrando que al menos una cepa produjo diarrea sin sangre ni leucocitos fecales. (61).

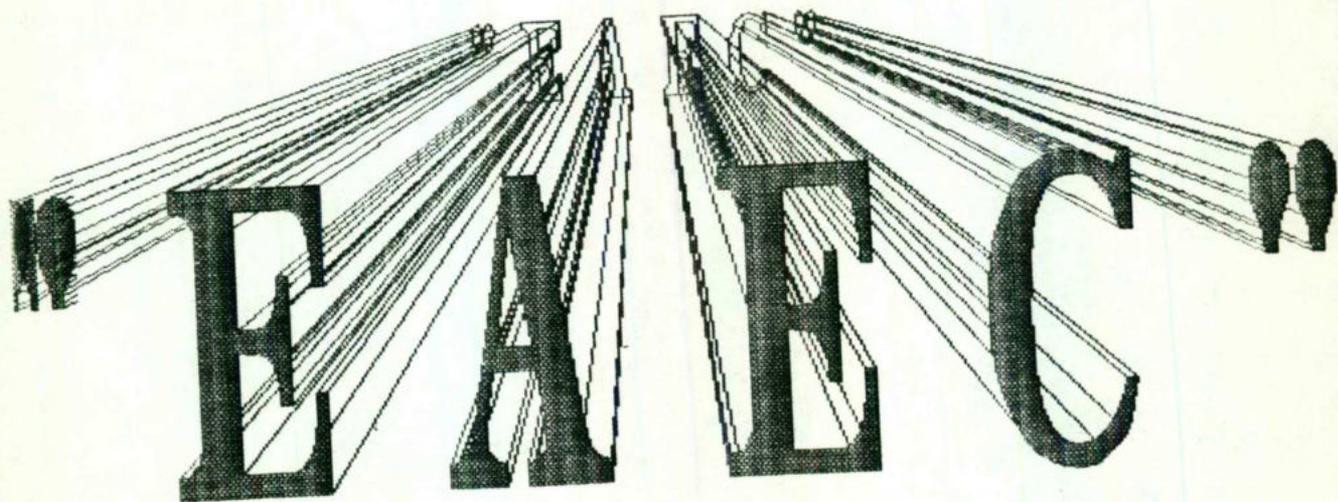
Estudios que se han hecho demuestran que hay varias categorías de *E. coli* que se han identificado y que causan diarrea en varios ambientes epidemiológicos y por varios mecanismos patogénicos. Más recientemente se ha definido una nueva categoría basada en su patrón de adherencia a células Hep-2 en cultivo, estos patrones de adherencia se han identificado que son la adherencia local, la adherencia agregativa y la adherencia difusa. La *E. coli* local adherente está asociada con ciertos serogrupos de EPEC clásicos y con la presencia de una adhesina no fimbrial medida por un plásmido llamado factor de adherencia de EPEC. La *E. coli* de tipo agregativo son pertenecientes a un serogrupo "O" único y la *E. coli* de adherencia difusa ocurre predominantemente entre los serogrupos no-EPEC y tiene una adhesina fimbrial. (97).

*E s c h e r i c h i a c o l i*ENTEROADHERENTED. 1) GENERALIDADES YANTECEDENTES HISTORICOS:

Escherichia coli enteroadherente (EAEC), es la categoría más recientemente descrita de *Escherichia coli* diarrogénica, se caracterizan por presentar una adherencia a células Hep-2, pero curiosamente son EAF-negativas, no producen enterotoxinas y no pertenecen a los serogrupos clásicos de EPEC. (33) (62).

Cravioto y col. (1979), en su descripción original de adherencia a células Hep-2, publicó que el 29% de 17 cepas de *E. coli* aisladas de brotes de diarrea no eran EPEC ni ETEC y presentaron adherencia a células Hep-2. Estas cepas eran posible que hubieran causado los brotes de diarrea, curiosamente 3 de esos 5 brotes de diarrea fueron adultos, mientras que las cepas EPEC que mostraron adherencia a células Hep-2, habían sido generalmente encontradas como causa de diarrea en niños. (97).

Estos estudios son los que apoyan fuertemente el que la adherencia a células Hep-2 puede ser un factor de virulencia en cepas de *E. coli*, independientemente del serogrupo y que las cepas EAEC posiblemente pueden representar otro grupo de *E. coli* diarrogénica; por esta razón, se sugirió que *E. coli* enteroadherente se tome como otra categoría de *E. coli* y así evitar confusiones con cepas que pertenecen a los serogrupos EPEC. (62).



La metodología utilizada en este trabajo, influye en la producción y selección del efecto de ambas toxinas, aunque podría tratarse de dos toxinas iguales con nomenclatura diferente, o que realmente estemos frente a dos toxinas diferentes.(104).

O'Brien y col. (1987) (71), señalan que la toxina descrita por Padhye y col. (1987) (79), es la misma que la que ellos llaman SL2, sin embargo ellos mismos indican que su hipótesis se confirmaría o se rechazaría si se hiciera una prueba de neutralización con anticuerpos contra la toxina semejante a Shiga y la toxina descrita por Padhye.(79).

Sin embargo, actualmente la nomenclatura no está aún definida, así los investigadores de Canadá e Inglaterra continúan llamando **toxina Vero** a la citotoxina obtenida de una cepa H-30 ó O157:H7 y los investigadores de Estados Unidos de Norteamérica la llaman **toxina semejante a Shiga**, por la metodología empleada, podría tratarse de la misma toxina, con nombre diferente.(104).

los que ellos obtuvieron en relación con la producción de dos toxinas semejantes a Shiga (SL1 y SL2), y observaron que Scotland llamó VT1 a la que neutralizó con suero anti-Shiga y VT2 a la que no se neutralizó, lo cual ellos encontraron que SL1 se neutralizó con anticuerpos anti-Shiga y SL2 no se neutralizó. Por lo tanto, ellos propusieron que lo que Scotland llamó VT1 pudiera ser llamada "toxina semejante a Shiga 1" y VT2 como "toxina semejante a Shiga 2".(104).

Zepeda y col. (1985), realizaron una cinética de crecimiento bacteriano con la cepa H-30 (O26:H11), en la cual se utilizaron dos metodologías diferentes para la obtención de citotoxinas I. Se utilizó el sobrenadante libre de células de un cultivo de caldo soya tripticaseína, incubado durante 24 horas y éste se inoculó a un cultivo de células Vero (Konowalchuck y col. 1977) II. Utilizaron el sintético llamado Syncase, el cual fué tratado previamente con fierro, presente en el medio y se inoculó a un cultivo de células HeLa (O'Brien y col. 1982)(105).

Ellos encontraron dos actividades citotóxicas a partir de cultivo de soya tripticaseína, una presente en el sobrenadante y otra a partir del sonicado bacteriano. Sin embargo, solo encontraron una sola actividad a partir del cultivo en el medio Syncase, a partir del sonicado bacteriano, no encontrando actividad citotóxica en el sobrenadante. Estos resultados hicieron pensar a los autores la existencia de dos toxinas diferentes que podían ser producidas por la misma cepa (H-30), esto fué confirmado más tarde por Scotland y Stockbine.(91)(104).

de un rompimiento proteolítico y consecuente reducción de enlaces disulfuro de la subunidad A. El fragmento A 1 dentro del citosol unido al ribosoma 60S dirige para la inhibición de síntesis de proteínas y produce la muerte de la célula.(71).

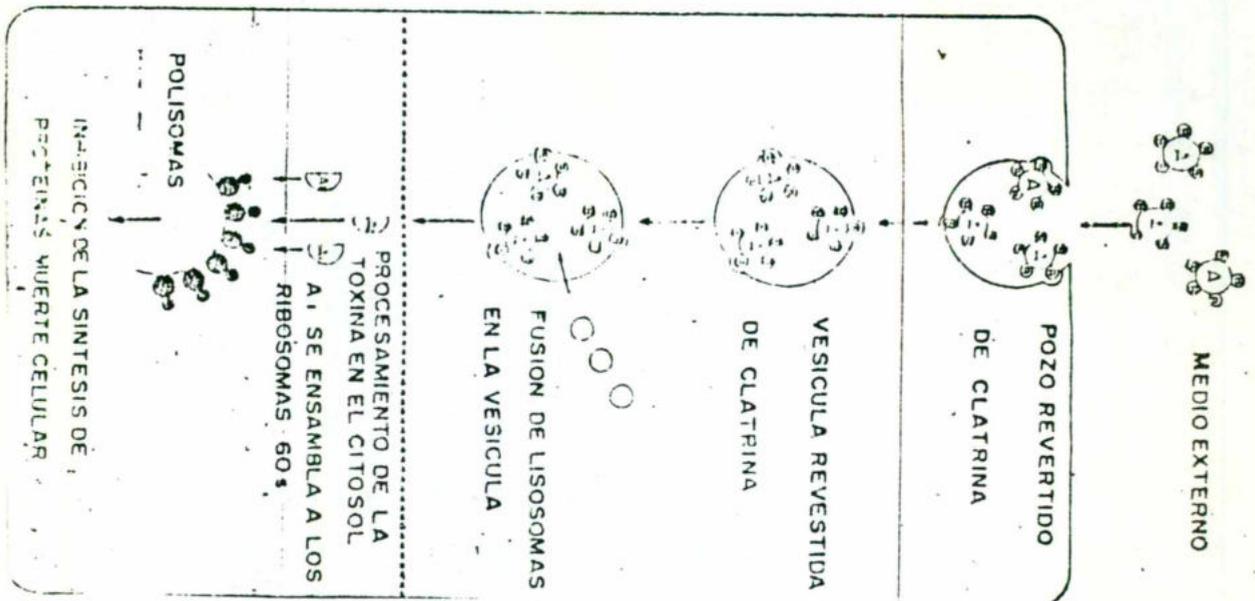


Fig. No. 18.

3) POSIBLE RELACION ENTRE LA TOXINA VERO Y LA TOXINA SEMEJANTE A SHIGA:

La primera descripción de la toxina Vero se hizo empleando una cepa EPEC por Konowalchuck y col. en 1977, denominada como cepa H30 de *E. coli* (O26:H11) y aparentemente parece ser la misma toxina que la toxina semejante a Shiga 1. O'Brien y col. (1982).(72).

Strockbine y col. (1986), analizaron los resultados obtenidos por Scotland y col., sobre su estudio de las dos variedades antigénicas de VT (VT1 y VT2) y los compararon con

La toxina semejante a Shiga 1, obtenida de una cepa de *E. coli* H30 y de una cepa de *E. coli* 933, tiene las mismas actividades biológicas que la toxina de Shiga como son: citotoxicidad para células HeLa y células Vero, enterotoxigenicidad para asa ligada de conejo y letalidad al ratón. Por analogía con la toxina de Shiga, la base molecular para estas tres actividades biológicas, se postula que es la inactivación catalítica de los ribosomas 60S en células sensibles de mamíferos y que expresan el receptor. Esta analogía ha sido bien confirmada en un modelo experimental, en el cual utilizaron preparaciones crudas de *E. coli* productoras de toxina semejante a Shiga 1 y se inhibió la síntesis de proteínas en células HeLa.(71).

El receptor para la toxina semejante a Shiga 1, fue identificado como el mismo que se ha descrito para la toxina de Shiga.(71).

La figura No. 18, muestra un diagrama del posible mecanismo de acción de la toxina semejante a Shiga 1, elaborado con los datos experimentales que se tienen hasta la fecha.(71). Esta figura muestra el modelo de la entrada endocítica mediada por el receptor de la toxina semejante a Shiga 1 en una célula de mamífero (adaptada por O'Brien). La toxina semejante a Shiga 1, entra por endocitosis mediada por un receptor específico. La subunidad B de la toxina, se une a un receptor presente en la célula mamífera. El pozo cubierto de clatrina se invagina y se forma así, la vesícula cubierta. La vesícula formada puede fundirse como lisosomas. El fragmento enzimático activo A1 se expone en la toxina semejante a Shiga 1 y por él, alcanza el citosol, aunque no se conoce como se libera, se cree que requiere

la toxina semejante a Shiga y el fago 933W, que también codificó para la toxina semejante a Shiga; pero que no fue seroneutralizada con anticuerpos anti-Shiga. En un grupo de 50 cepas altamente productoras de citotoxina, la actividad no fue neutralizada con anticuerpos anti-Shiga en 11 cepas; pero si, con anticuerpos obtenidos de la toxina codificada por el fago 933W; de tal manera, que la toxina que es seroneutralizada con anticuerpos anti-Shiga se le llamó "Shiga-like" 1 y la que no fue seroneutralizada se le llamó "Shiga-like" 2.(104).

Strockbine y col. (1986), trabajaron con la cepa C600 (933W), de la cual obtuvieron la toxina semejante a Shiga 2 y ensayaron las actividades biológicas de ésta, determinando que presenta las mismas propiedades biológicas que la toxina semejante a Shiga 1; pero la toxina semejante a Shiga 2 es más letal para el ratón y es menos citotóxica que la toxina semejante a Shiga 1.(104).

O'Brien y col. (1987), trabajaron con la toxina semejante a Shiga 1 y determinaron su estructura. Ellos indicaron que la toxina semejante a Shiga 1 está constituida de una subunidad A y cinco subunidades B, que es semejante a la toxina de Shiga y a las subunidades purificadas de la toxina semejante a Shiga, obtenidas de una cepa H30 y una cepa 933, fueron indistinguibles de las obtenidas de la toxina de Shiga de la cepa 60R de *S. dysenteriae*. Los resultados mostraron que la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1, tiene un peso molecular de 32,000 y la subunidad B tiene un peso molecular de 7,700. La estructura de la toxina semejante a Shiga 2 hasta ahora no ha sido determinada.(81).

citotóxica, letalidad al ratón, enterotoxicidad en asa ligada de conejo y estabilidad al calor, es estable a 65°C por 30 minutos.(71).

O'Brien y col., en un pequeño reporte, encontraron que 3 cepas pertenecientes al serotipo O157:H7 producen la citotoxina semejante a Shiga, que compartía las mismas características de la toxina del bacilo de *Shiga*, por lo que propusieron que la toxina que Konowalchuk llamó VT y la toxina que ellos llamaron semejante a *Shiga* son iguales y que debe llamarse solo semejante a *Shiga*.(41)(104).

Newland y col. (1985), lograron clonar el gen presente en el DNA de un fago de la cepa 933 (O157:H7), que codifica para la producción de la toxina semejante a *Shiga*, confirmando que el fago contiene información, por lo que se le llamó fago-convertidor de la toxina semejante a *Shiga*.(41)(104).

Strockbine y col. (1985), publicaron la caracterización de anticuerpos monoclonales obtenidos de la cepa H30 de *E. coli* que neutraliza la actividad citotóxica, enterotóxica y la letalidad al ratón, los cuales están unidos por medio de la proteína A de *Staphylococcus aureus* para producir un reactivo de coaglutinación que resultó ser útil para detectar las cepas altamente productoras de la toxina semejante a *Shiga*.(41)(104).

Stockbine y col. (1986), trabajaron con la cepa 933 que pertenece al serotipo O157:H7 y lograron separar dos fagos; el fago 933J, que lisogenizó a la cepa K12 y codificó para

semejante a la toxina de Shiga y por lo tanto, le denominaron toxina semejante a *Shiga* o "*Shiga-like*"(72)(104).

En el mismo reporte, se clasificó a las cepas estudiadas en 4 categorías: la categoría 1, corresponde a cepas de *E. coli* y una *Pseudomona aeruginosa* que producen una citotoxina que no es neutralizada por anticuerpos anti-Shiga. La categoría 2, consistió en cepas de *E. coli* que producen trazas de citotoxinas que son neutralizables con anticuerpos anti-Shiga, en esta categoría se encuentra la cepa K12 de *E. coli* que no es patógena. La categoría 3, comprende cepas que producen niveles de toxina bajos o moderados seroneutralizables; cabe señalar que en esta categoría se encuentran también una cepa de *Salmonella typhimurium*, una cepa de *Shigella flexneri*, la cepa H10407 de *E. coli* que es la cepa utilizada como referencia para la producción de las enterotoxinas LT y ST, y la cepa RDEC-1 que es una cepa que produce diarrea en conejos y se comporta como las cepas EPEC humanas. (41)(104).

La categoría 4, son cepas altamente productoras de la toxina, en donde se encuentran la cepa H30 de *E. coli* y la cepa 60R de *Shigella dysenteriae*. Actualmente, sabemos que la cepa O157:H7 es altamente productora de la toxina semejante a Shiga y lógicamente caería en esta categoría(94)(104).

O'Brien y col. (1983), utilizaron la cepa H30 para purificar la toxina semejante a Shiga, encontrando un peso molecular de 48,000 daltones y difiere de la toxina de *Shiga*, que tiene un peso molecular de 58,000, no obstante comparten características como son: punto isoeléctrico, capacidad

En apoyo a los estudios realizados por Scotland y col. (1985) sobre la existencia de dos variedades antigénicas de citotoxina Vero, Padye y col. (1987); encontraron una cepa O157:H7 (932) aislada de un sujeto con colitis hemorrágica, que producía una citotoxina VT, la cual causaba lesiones en el colon y una subsecuente colitis hemorrágica en ratones. Esta toxina no fue neutralizada con anticuerpos anti-Shiga y presentó características fisicoquímicas diferentes a la toxina que se neutralizaba por anticuerpos anti-Shiga, lo que haría suponer la existencia de dos variedades antigénicas de VT.(79).

2) CITOTOXINA SEMEJANTE A SHIGA ("Shiga-like") DE *Escherichia coli*:

O'Brien y col. (1982), trabajaron con la misma cepa que trabajo Konowalchuck y col. (1977), la H-30, la cultivaron durante 48 hrs. en un medio sintético llamado Syncase, el cual fue tratado por un agente quelante como el Chelex-100 que atrapa el Fe presente en el medio; el crecimiento bacteriano fue pasado a través de una prensa French, de manera que se obtuvo todo el material intracelular, se sometió a diálisis exhaustiva y éste se inoculó a células Hela (carcinoma de cervix); en donde se observó lisis celular. La lisis celular fue inhibida con anticuerpos dirigidos contra la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (bacilo de Shiga) y en una prueba de inmunodifusión los anticuerpos contra la toxina del bacilo de Shiga se obtuvieron bandas de identidad frente a la toxina obtenida de la cepa 60R de *Shigella dysenteriae* y la cepa H30 de *E. coli*; por lo que se dedujo que la citotoxina obtenida de la cepa H30 de *E. coli* era

Scotland y col. (1985), reportaron que existen dos variedades antigénicas de VT, la primera con capacidad de ser neutralizada por el antisuero anti-Shiga (antisuero contra *Shigella dysenteriae* tipo 1) por lo que propusieron que se le llamara VT 1 y la segunda que no fué neutralizada con antisuero anti-Shiga propusieron que se le llamara: VT 2; se estableció además ese año, que es posible que las dos variedades antigénicas pudieran estar presentes en una sola cepa.(91).

Karmali y col. (1985), confirmaron los resultados obtenidos por Scotland y col. (1985) que aseveran que existen dos distintas toxinas Vero (VT 1 y VT 2) en cepas de *E. coli* O157:H7, relacionadas serológicamente, ya que hay una hibridización (no muy grande) entre los fragmentos de DNA que codifican para VT 1 y VT 2.(44).

Willshaw y col. (1987) trabajaron con los fagos que codifican para la producción de citotoxinas Vero (VT1 y VT 2); ellos encontraron que los fagos que codifican para las dos citotoxinas VT 1 ó VT 2 obtenidas de cepas de *E. coli* con serotipo O157:H7 y O157:H- que eran indistinguibles morfológicamente. El tamaño de genoma fágico y su patrón de DNA obtenido por medio de enzimas de restricción fueron similares. Estos fagos fueron morfológicamente diferentes al fago que codificó para la toxina VT 1, aislada de una cepa con serotipo O26:H11. Sin embargo, la región clonada de VT 1 del fago originado de una cepa de *E. coli* O157:H7 fue idéntico a la región VT 1 clonada previamente de un fago obtenido o inducido por una cepa de *E. coli* O26:H11 (H19).(94)(101).

En 1978, Konowalchuk y col., reportaron dos variantes moleculares de la toxina VT, una de punto isoeléctrico de 7.2 y otra de 6.8, siendo predominante la de 7.2, con un peso molecular de aproximado de 28, 000 daltones.(41).

Wilson y col. en 1980, encontraron que no todas las cepas 026 producen la toxina VT y que otros serotipos también la pueden producir. Estos reportes fueron muy pequeños y aislados, lo que no provocó interés de parte de la comunidad científica en esa época. Sin embargo, Scotland y col. trabajando con cepas EPEC encontraron que los serogrupos 026 y 0128 fueron productores de toxina VT.(41).

Johnson y col. (1983), encontraron al serogrupo 026 en 78 cepas aisladas de colitis hemorrágica en Canadá, que eran productoras de VT en un 70%; el resto pertenecían al serotipo 0157:H7 y ambas presentaban en forma característica y consistente la de ser fermentadoras tardía de sorbitol.(41).

Smith y col. (1983), reportaron que la toxina Vero producida por las cepas de los serogrupos 026 y 0128, estaba codificada por un fago. Sin embargo, la toxina VT por una cepa de cerdo P101 (0141) no fué codificada por el fago. En este mismo estudio realizaron pruebas de neutralización cruzada con cepas de diferentes orígenes y mostraron que por lo menos hay tres variedades antigénicas de VT: las de cepas de origen humano, las de cepas de origen porcino y las obtenidas a partir de una cepa de *P. aeruginosa*, en las cuales no hubo reacción cruzada de neutralización.(41).

C. 11) DIFERENTES CLASES DE CITOTOXINAS
ENCONTRADAS EN E. COLI
ENTEROHEMORRAGICA:

I) CITOTOXINA VERO (VT) DE Escherichia coli:

En 1977, en Canadá, Konowalchuk y col., fueron los primeros en publicar la producción por ciertas cepas de *Escherichia coli* de una toxina termolábil distinta a las toxinas termostables (ST) y termolábil (LT) hasta el momento descritas. La característica principal de la toxina era su actividad citotóxica sobre células Vero (riñón de mono verde africano)(94). Konowalchuk utilizando el sobrenadante libre de células de una cepa H30 (O26), inoculó un cultivo de células Vero, observando que a las 24 horas, las células iniciaron un proceso de lisis que fué total e irreversible a los cinco días; este efecto no se presentó en células CHO (ovario de hamster chino). Como sólo causaba efecto citotóxico sobre las células Vero la llamaron VT ó toxina Vero(41), esta fue lábil al calor y usando membranas de ultracentrifugación se dedujo un peso molecular aproximado de 10, 000 a 30, 000 daltones (47).

Los anticuerpos obtenidos contra la citotoxina VT neutralizaron la actividad citotóxica de la cepa H30(O26), que se utilizó como referencia para la producción de la toxina VT. Sin embargo, en otras dos cepas no se logró neutralizar el efecto con el uso de anticuerpos contra la citotoxina VT.(47).

no se recomienda el uso de la terapia antimicrobiana en la colitis hemorrágica, en algunos casos la terapia con randomizina ha sido eficaz.(83).

C.9) EPIDEMIOLOGIA:

Recientemente (1982) se ha demostrado que el serotipo O157:H7, se encuentra asociado en cuadros y brotes de colitis hemorrágica que se han presentado en niños y adultos en Estados Unidos, como consecuencia del consumo de hamburguesas mal cocidas (84). En varios estudios se han obtenido datos clínicos y epidemiológicos extensos sobre los pacientes con HUS en Washington del oeste (83). Desde 1982, aparecieron contribuciones sobre la epidemiología de las infecciones por *E. coli* O157:H7, y aún no ha sido bien establecido que la carne pudiera ser su reservorio natural.(83).

C.10) PROFILAXIS:

Las consideraciones sobre este tema, son las mismas que se han mencionado anteriormente en el tema respectivo a ETEC. (ver página 220).

C. 6) SEROGRUPOS "O" MAS FRECUENTES:

La colitis hemorrágica es una infección entérica recientemente reconocida, debida a cepas de *E. coli* de un serotipo específico denominado O157.(53), aunque recientemente también se han involucrado los serogrupos O26:H11 y O111:H-.(33).

C. 7) I N M U N I D A D:

Karmali y col. (1985), en pacientes con síndrome urémico hemolítico, encontraron cepas productoras de VT, además determinaron la presencia de citotoxina Vero en heces de los pacientes y respuesta de anticuerpos en el suero de los mismos, estos anticuerpos tenían capacidad de neutralizar la actividad tanto de la citotoxina producida por las cepas; así como, la actividad citotóxica presente en las heces. Además, el suero del paciente también neutralizó la actividad presente en el espacio periplásmico de las cepas productoras de VT, utilizando para ello polimixina B que provoca la liberación al sobrenadante de la citotoxina.(44).

C. 8) TRATAMIENTO:

Los lactantes, niños y adultos con gastroenteritis, necesitan reposición de líquidos. Puede ser necesaria la hospitalización si hay un déficit de líquidos (> ó= 5) o no se tolera la hidratación oral.(50). Después de 10 días con diarrea, la mayoría de los pacientes destinados a tener "HUS"

Estas cepas causan diarrea severa caracterizada por sangre visible en las heces, muchos de los casos descritos han sido adquiridos mediante el consumo de hamburguesas parcialmente cocinadas.(53). Diferentes datos sugieren que *E. coli* O157:H7 es la causa predominante y posiblemente exclusiva de HUS ó síndrome urémico hemolítico.(53).

C.4) MECANISMO:

Las cepas de *E. coli* asociadas con colitis hemorrágica produce una citotoxina para células Vero (Verotoxina) y HeLa que parecen ser idénticas a la shiga-toxina de *Shigella dysenteriae*(53)(84), la producción de estas citotoxinas es el mecanismo de patogenicidad de este grupo (33) se cree que esta toxina daña a las células vasculares endoteliales, produciendo hemorragia hacia el lumen intestinal (53)(84).

C.5) MANIFESTACIONES CLINICAS:

EHEC, se manifiesta como un tipo de disenteria distinta a la clásica, donde no hay inflamación y hay enteroinvación de la mucosa, con la aparición de sangre en heces (53), típicamente el paciente es afebril, pero en el comienzo de la enfermedad puede ser confundida por colitis isquémica y que puede conducir a la muerte.(59).

Estos hechos hicieron que Levine y col, (1987) propongan al serotipo O111:H- como integrante de la categoría de *Escherichia coli* enterohemorrágica (56). En el mismo año Levine y col. observaron que el serogrupo O111 hibridizó con la sonda de DNA preparada a partir del plásmido de la cepa O157:H7 VT+.(55)(56)..

C. 2) GENERALIDADES:

Una nueva clasificación de cepa de *E. coli*, se ha considerado, la *E. coli* enterohemorrágica. Este grupo ha adquirido gran importancia ya que produce diarrea con sangre tanto en niños como adultos.(32).

Escherichia coli O157:H7, ha surgido como un patógeno de importancia en Canadá y Estados Unidos en donde se han descrito múltiples reportes de brotes de colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y diarreas en guarderías y en comunidades (23).

C. 3) PATOGENIA:

Recientemente estudios han demostrado que *E. coli* es capaz de producir toxinas parecidas a Shiga (toxinas semejante a Shiga ó SLT; Verotoxinas), que son los agentes etiologicos en la mayor parte de casos del Síndrome urémico hemolítico (HUS).(83).

aproximadamente 60 Md, que no hibridiza con la sonda del gen para EAF (factor de adherencia para la EPEC) y algunas veces se ve asociada con diarrea con sangre (57).

Tzipori y col. (1985), usando microscopia electrónica vieron que la cepa O157:H7 ataca, destruye las microvellosidades del enterocito y causa una lesión que asemeja a las que causan los serotipos clásicos de *E. coli* enteropatógena (99). Sin embargo, esta lesión que causan las cepas enterohemorrágicas y la lesión que causan las cepas enteropatógenas se pudieron diferenciar mediante la infección de cerdos gnotobióticos con estas cepas. La infección por EPEC lesiona todo el intestino del cerdo, hay infiltración por polimorfonucleares y la lesión se ve menos severa; en cambio, la infección por EHEC lesiona solamente el ciego y el colon, no hay infiltración de polimorfonucleares y la lesión es más severa comparada con las EPEC.(99).

Karmali y col. (1985), en un estudio que realizaron, donde asocian el síndrome urémico hemolítico con la infección de *E. coli* productora de toxina Vero, encontraron el serotipo O111:H- de *E. coli* aislado de un paciente con SUH, como cepa altamente productora de toxina Vero. Este hecho fue confirmado más tarde por el mismo Karmali y col. (1986), se empleo el suero del paciente de su estudio anterior, del cual se obtuvo la cepa de *E. coli* O111:H-, este suero neutralizó completamente a la toxina Vero obtenida de una cepa de *E. coli* O26:H11. (55)(56).