



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



ESTANDARIZACION DE UN ESTUCHE SEROLOGICO PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCIONES DIARREICAS CAUSADAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVA

Elaborado por: Lic. Romelia Gómez Bernal

Tutor: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya Esp.

Dra. Raquel Calderón Morales MsC

**Trabajo de Grado para optar al título de:
Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud mención en
"Microbiología"**

La Paz-Bolivia
2016

DEDICATORIA

A mi papa Antonio, por todo su amor. A mi esposo Ronald y a mis hijitos Fabián, Israel y Lucia, por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haber permitido que se cumpliera un anhelo tan grande en mi corazón.

A mis asesores, por el esfuerzo conjunto, Dr. Fernando y Dra. Raquel, al brindarme su apoyo y compartir toda su sabiduría y experiencia para la realización de este trabajo.

Por su apoyo a la Dra. Soto y a mí querida amiga Sonia, y a la Sra. Sarita de Mercado, quienes me brindaron aliento en los momentos difíciles.

Al Instituto SELADIS por albergarme todo este tiempo y a toda la planta docente del Instituto que no solo nos imparte conocimientos si no también valores y principios

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

I. INTRODUCCION.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
IV. ANTECEDENTES.....	5
V. MARCO TEÓRICO.....	8
1. Escherchia coli.....	8
1.1 Aspectos Generales.....	8
1.2 Estructura antigénica de Escherichia coli.....	13
1.2.1. Estructura antigénica.....	13
1.2.1.1. Antígenos O.....	13
1.2.1.2. Antígenos H.....	13
1.2.1.3. Antígenos k.....	14
1.3. Fisiopatología.....	15
1.4. Diarrea y Nutrición.....	19
1.5. Diagnóstico etiológico.....	20
1.5.1. Diarrea causada por cepas Escherichia coli enteroinvasiva.....	21
1.5.2. Escherichia coli en el agua.....	22
1.5.3. Escheriachia coli por el contacto de persona a persona.....	23
2. Fisiopatogenia.....	23
2.1. Clínica.....	23
2.2. Métodos auxiliares del diagnóstico.....	24
2.3. Tratamiento.....	25
2.4. Medidas de prevención y control.....	25
3. Escherichia coli enteroinvasiva.....	26
3.1. Epidemiología.....	27
4. Incidencia.....	28
5. Período de incubación.....	29

6. Virulencia.....	29
6.1. Modo de transmisión.....	30
6.2. Mecanismos patogénicos.....	30
7. Diagnóstico laboratorial.....	37
7.1. Pruebas Bioquímicas.....	38
8. Antígeno.....	40
8,1 Antígenos bacterianos.....	41
8.2 Producción de anticuerpos.....	41
8. 3. Vías de administración.....	42
8.4 Métodos de administración de antígeno.....	43
8.5 Consideraciones para elegir al animal de estudio.....	43
8.6 Antisuero.....	44
8.7 Características de la Inducción de la Respuesta Inmune.....	44
8.8 Producción del antígeno.....	46
VI. OBJETIVOS.....	48
1. Objetivo general.....	48
2. Objetivos específicos.....	48
VII. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	48
1. Equipos.....	48
2. Materiales.....	49
3. Reactivos.....	49
VIII .DISEÑO METODOLÓGICO.....	50
1. MODELO TEÓRICO.....	50
a. Población de estudio.....	51
b. Diseño del estudio.....	51
c. Aislamiento de la cepa.....	51
1.1 Caracterización serológica.....	52
1.1.1 Pruebas en placa.....	52
1.2. Obtención del Antígeno de Escherichia coli.....	53

1.3. Producción de anticuerpos contra EIEC.....	54
2. Determinación de la especificidad del antisuero obtenido.....	55
3. Proceso de especificidad por absorción del antisuero obtenido.....	56
4. Titulación del antisuero contra Escherichia coli enteroinvasiva.....	57
4.1. Prueba de titulación en tubo del antisuero obtenido.....	57
4.2. Prueba de titulación en placa del antisuero obtenido.....	58
5. Conservación del antisuero obtenido.....	59
IX. RESULTADOS.....	60
1. Obtención del antisuero.....	60
1.1. Tipificación de cepas de E.coli enteroinvasiva.....	60
2. Inoculación del antígeno atenuado en el conejo.....	63
3. Pruebas de Especificidad inter especies del Antisuero producido.....	64
4. Adsorción de anticuerpos de Shigella y E. coli enteropatogena.....	65
5. Titulación del antisuero obtenido.....	67
5.1. Titulación del antisuero obtenido por el método de placa.....	67
5.2. Titulación del antisuero obtenido por el método de tubo.....	67
6. Conservación del antisuero obtenido.....	68
X. DISCUSIÓN.....	69
XI. CONCLUSIÓN.....	71
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	73

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	Pag 10
Tabla N°2. Valoración del grado de deshidratación (ESPGHA, 2001)	Pag 20
Tabla N°3. Esquema de inmunización rápido de un conejo	Pag 50
Tabla N°4. Esquema de diluciones para titulación en tubo del antisuero	Pag 57
Tabla N°5 Esquema de diluciones para titulación en placa del antisuero	Pag 58
Tabla N° 6. Pruebas bioquímicas de las 15 cepas de <i>E. coli</i> enteroinvasiva	Pag 61
Tabla N°7. Determinación serológica por kitt comercial para EIEC	Pag 62
Tabla N°8 .Evaluación del tiempo de sonicación para producción de antígeno soluble de <i>E.coli</i> enteroinvasiva	Pag 63
Tabla N°9. Pruebas de aglutinación del antisuero obtenido con cepas de enterobacterias	Pag 65
Tabla N°10. Pruebas de especificidad del antisuero después del proceso de adsorción con cepas de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> enteropatógena.	Pag 66
Tabla N° 11. Título aglutinante del antisuero obtenido por el método de titulación en placa	Pag. 67
Tabla N° 12. Título aglutinante del antisuero obtenido por el método de titulación en tubo	Pag. 68

RESUMEN

Las infecciones diarreicas han sido y son un problema latente en nuestra población, y una de las causas es la infección producida por *Escherichia coli enteroinvasiva*, siendo un problema para los pacientes que han cursado con esta bacteria. En la actualidad su detección es difícil debido a que no existen antisueros en el mercado que nos ayuden a su identificación.

El objetivo principal del presente trabajo ha sido la estandarización de un estuche serológico para el diagnóstico de infecciones diarreicas, producidas por *Escherichia coli enteroinvasiva* partir de la Inmunización de un conejo para la obtención de un antisuero que detecte a esta bacteria.

Las conclusiones de este trabajo demuestran que es posible producir un antisuero contra *Escherichiacolienteroinvasiva*, de forma específica y que no de reacciones cruzadas contra otras enterobacterias que se aíslan en coprocultivos.

Palabras claves antisuero, inmunización, reacciones cruzadas, coprocultivo

SUMMARY

Diarrheal infections have been and are a latent problem in our population, and one of the causes is the infection produced by *enteroinvasive Escherichia coli*, being a problem for the patients who have been with this bacterium. At present its detection is difficult because there are no antisera in the market that help us to identify them.

The main objective of the present work was the standardization of a serological kit for the diagnosis of diarrheal infections, produced by *Escherichia coli enteroinvasive* from the immunization of a rabbit to obtain an antiserum that detects this bacterium.

The conclusions of this work demonstrate that it is possible to produce an antiserum against invasive *Escherichia coli*, specifically and not of cross-reactions against other Enterobacteria that are isolated in co-cultures.

Keywords antisera: immunization, cross-reactions, co-culture

1. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial, las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs), son un problema importante de salud en la población infantil. La enfermedad se evidencia más en los países en vías desarrollo, donde se producen anualmente entre 4,6 a 6 millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil. Se produce un promedio de 3 episodios de diarrea por año en niños menores a 5 años y una tasa global de mortalidad promedio de más de 10.000 niños por día. (*Encuesta Nacional de Demografía, 2008*)

La OMS relaciona mortalidad infantil con el nivel de desarrollo de un país. En el 2008, la cantidad mundial de muertes por país por diarrea en niños menores de 5 años fue estimada en 1.87 millones. En África y el Sureste asiático explican casi el 78% de las muertes. El Ministerio de Salud reportan a la diarrea infecciosa como la tercera causa de consulta externa en todos los grupos etarios, hasta el año 2007. (*Carrión Alcides, 2012*)

Las infecciones en general, especialmente las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs) constituyen un serio problema de salud pública en Bolivia. En el año 2010, la prevalencia de diarrea en nuestro país era del 18,4%. Como lo señalan los últimos datos de la Escuela de Salud de SEDES- La Paz. (*SEDES, 2010*)

La información prestada por SEDES-La Paz, de los episodios diarreicos atendidos por 1000 en menores de 5 años, comparativo de 1999-2003 fue de: 184 en el año 1999 fue de 210 en el año 2000 de 203 en el año 2001 fue de 265 en el año 2002 y 2003 fue de 297 en promedio. Lo que significa un aumento en los casos registrados en aproximadamente 20 casos promedio por año.

En la escuela de salud de SEDES, se obtuvieron datos de diarreas agudas en la ciudad de La Paz, en el año 2009 se reportaron 155 567 casos donde 79 958 eran en niños y 75 609 eran en niñas en edades comprendidas entre el primer año de vida al noveno año de vida. En el año 2010 se registraron 68 217 casos de diarrea con el mismo margen de edades de las cuales 36 449 eran niños y 31 768 eran niñas. (SEDES, 2010).

La mortalidad infantil en menores de cinco años se redujo en 41% entre 1990 y 2011, según un informe de la Unicef (Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia). Bolivia aún se encuentra entre los países que registran más de 50 muertes por cada 1.000 nacidos, señala el reporte. (Galindo y Pérez, 2012)

Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 7 600 niños cada año en el mundo. La diarrea puede durar varios días y puede privar al organismo del agua y las sales necesarias para la supervivencia. La mayoría de las personas que fallecen por enfermedades diarreicas en realidad mueren por una grave deshidratación y pérdida de líquidos. Los niños malnutridos o inmunodeprimidos son los que presentan mayor riesgo de enfermedades diarreicas potencialmente mortales. (OMS, 2013)

Actualmente es posible identificar el agente en el 50 a 84% de los episodios de EDAS. Los virus conforman cerca del 40% de todos los casos de diarreas en países en desarrollo. La infección por Rotavirus causa 600.000 muertes al año. Dentro de las bacterias *Shigella*, *E. coli enteropatógena* (ECEP), *E. coli enterohemorrágica* (ECEH), *Salmonella* y *Campylobacter* son las frecuentes. El síndrome disentérico es habitualmente causado en nuestro país son ECEH y *Shigella* y muy ocasionalmente parásitos como amebas, *Isoospora Belli*. (Dr. Harris 2010).

En Bolivia, las EDA se presentan en alrededor del 30% de la población total de niños menores a 5 años, produciéndose anualmente más de 12.000 muertes. En la ciudad de Cochabamba similar a otras regiones de Bolivia, las EDA son una de las principales causas de consulta y hospitalización en la población infantil.

En esta afección se ha involucrado además de otros patógenos entéricos una variedad de agentes causales de origen bacteriano como *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* diarreogénicas.

La *Escherichia coli* esta comúnmente asociada a formas endémicas e incluye al menos 6 categorías patogénicas bien definidas, las cuales comprenden a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Escherichia coli* adherente difusa (DAEC) (Hannaoui, 2010)

II. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país por las condiciones socioeconómicas y culturales de la población se tiene una gran incidencia de enfermedades diarreicas, siendo el Laboratorio de Microbiología, el que juega un papel importante en la identificación del agente bacteriano en estudio.

En cuadros diarreicos agudos se requiere de métodos rápidos que presenten alta sensibilidad y especificidad. Uno de los problemas con los que debe tratar el laboratorio es el costo de los reactivos y la falta de suministro por parte de las Casas Importadoras debido a un retraso en Aduanas o envío Aéreo, por tanto el Laboratorio de Microbiología en general utiliza los cultivos y antisueros como medios para realizar el diagnóstico de *Escherichia coli enteroinvasiva*.

Por esta razón, el presente trabajo de investigación pretende hacer una primera aproximación hacia la producción de antisueros que sean de sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica aceptable para identificar a *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC), como causante de las enfermedades diarreicas agudas presentes en niños de más de 5 años así como adultos, a demás sin olvidar a la tercera edad que también puede sufrir de cuadros diarreicos que conllevan inestabilidad de electrolitos líquido corporal.

Este test de aglutinación puede ayudarnos a realizar un diagnóstico precoz en 24 hrs, partiendo del cultivo primario, ya que la preparación de una galería de pruebas bioquímicas nos tomaría 24 hrs más de espera para el paciente, logrando así ayudar al médico a que se pueda aplicar tratamiento temprano y oportuno.

Así mismo este trabajo pretende dar las recomendaciones necesarias para mejorar la calidad de antisueros que se puedan producir en el futuro en nuestro país.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En nuestro país y particularmente en el Departamento de La Paz, un problema de gran incidencia en nuestra niñez son las enfermedades diarreicas.

El diagnóstico preciso del agente bacteriano causante del cuadro diarreico, es una necesidad para realizar un tratamiento correcto, evitando así el uso indiscriminado de antibióticos. En este entendido los Laboratorios de Microbiología juegan un papel importante en la identificación del agente bacteriano causal.

Por esta razón, este trabajo se propone hacer una primera aproximación hacia la producción de antisueros contra *Escherichia coli enteroinvasiva*, que daría lugar a una identificación precisa de esta entero bacteria y sería un primer paso a la producción de otros antisueros para bacterias importantes como son la *Escherichia coli enteropatogena* y *Salmonella spp.*

IV. ANTECEDENTES

En Uruguay en el trabajo realizado para la detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos por identificación bioquímica de las cepas *Escherichia coli* enterotoxigénica (STEC) El serotipo de las cepas STEC se determinó por reacciones de aglutinación utilizando antisueros contra los antígenos "O" y "H" disponibles en el mercado de Denka Seiken Co Tokyo, Japan y sueros policlonales preparados en el Departamento de Bacteriología y Virología. (Varela, 2008)

En México en el centro de CENA VECE, se han realizado investigaciones para producir y distribuir antisueros de calidad controlada, para ser utilizados principalmente por los

laboratorios que conforman la Red Nacional de Laboratorios de Salud pública (RNLSP), por el laboratorio de cólera y enterobacterias del InDRE con actividades de referencia y control de calidad, en la confirmación serológica de *Salmonella*, *Shigella*, *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139 y *E. coli* O157, H: 7 (*Producción de antisueros*, CENA VECE, 2011)

En el Centro Nacional de investigaciones Científicas de Cuba, se realizó una Evaluación en modelos animales de cepas vivas atenuadas de vibrio cholerae O139.

A partir de un pre cultivo en Agar sangre, se inoculó a 37 °C. y las células se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min y se re suspendieron en una solución de PBS después de haber retirado el sobrenadante. En el estudio se emplearon 20 conejos Nueva Zelanda blancos (1.5 - 1.8 Kg de peso). Se inoculó 1 ml. de la suspensión bacteriana en el duodeno. Se utilizó complemento humano purificado, a una concentración final de 25 %. El título se definió como el inverso de la mayor dilución del suero en la que se apreció inhibición del crecimiento bacteriano, reflejado por la invariabilidad del color en el medio de cultivo (*Talera Ledon*, 2010)

En un estudio similar en Bogotá en el año 2006, se realizó un proceso de sonicación y radiaciones ionizantes, radiaciones gama. La sonicación se llevó a cabo en un equipo Ultrasonic Homogenizer (Cole Parmer), en ciclos de dos minutos con pulsos de 9.9 segundos y cinco segundos de descanso a temperatura de 4°C, con una amplitud de 35 por ciento; cada ciclo se repitió tres veces, para lograr la obtención de antígeno K para evitar su desnaturalización. (*Carmen*, *Producción de vacunas*, 2010, Cuba)

Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de

Tucumán para detectar *Escherichia coli enteroinvasiva* la cual fue aislada de carne molida. (Jure, 2010)

En Lima Perú, Junio de 2010 se realizó un estudio de comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia Coli enteropatogénica* (EPEC). (Luque, *Comparación de diagnóstico de Serología contra PCR*, 2010)

En otro estudio realizado en la Universidad libre de Brucelas, se realizó también un estudio sobre la obtención de Antisueros policlonales y estudio de las fimbrias como factores de colonización en cepas de *Escherichia coli* que causan diarreas en cerdos. (Rodríguez, 2009)

V. MARCO TEÓRICO

1. *Escherichia coli*

1.1 Aspectos Generales.

Escherichia coli se halla involucrada en problemas gastrointestinales, así como en infecciones urémicas y neonatales.

La *Escherichia coli* fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán *Theodore Escherich*, quien la denominó bacteria *Coli Comunne* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos (*Blanco, E. coli patógena 2000*)

La *Escherichia coli* al ser una bacteria gram (-), tiene la estructura celular que se muestra en la *figura 3*, donde los diferentes componentes que forman parte de su estructura pueden ser blanco antigénico del sistema inmune del ser humano.

Los serotipos se asocian con virulencia. Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F). es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular

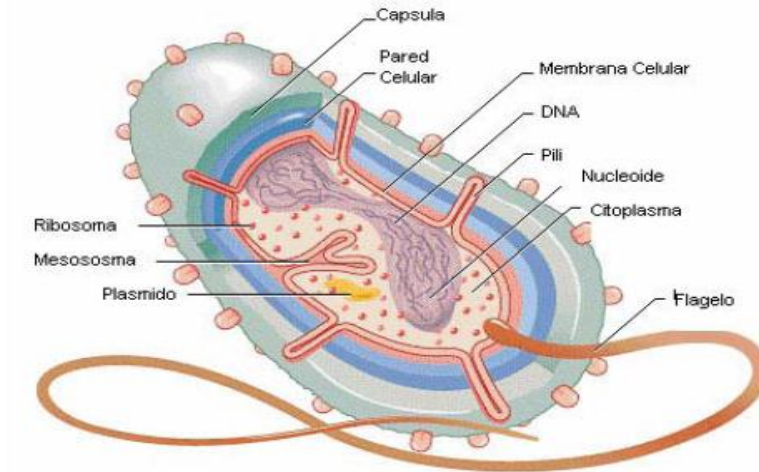


Fig. 1. Estructura de una Bacteria gram (-)

<http://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com> .(consulta agosto 2011)

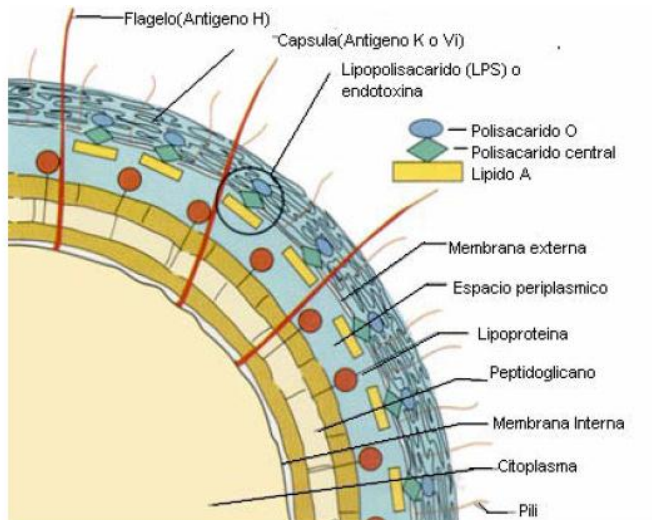


Fig. 2. Disposición estructural de la pared

<http://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/consulta> agosto 2011)

Tabla N° 1**IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE ESCHERICHIA COLI**

Prueba Bioquimica	% de Positividad
Oxidasa	0
Produccion de Indol	98
Rojo de Metilo	99
Voger-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
TSI (H ₂ S)	1
Hidrólisis de Urea	1
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenildesaminasa	0
Lisina Descarboxilasa	90
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 26 °C	95
Fermentacion de Lactosa	95
Fermentacion de manitol	98
Hidrólisis de la esculina	35
Nitrato a nitrito	100
DNasa	0
ONPG	95

Modificado de Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* Salud Pública México 2002 (<http://bvs.insp.mx/rsp/articulos>)

Principales características bioquímicas se indican en la Tabla N°1. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera un microorganismo de flora normal. (Rodríguez, Guadalupe 2012)

La mayoría de los enteropatógenos bacterianos y no bacterianos producen diarrea acuosa aguda, por lo que esta condición es clínicamente inespecífica.

En Estados Unidos, el sub registro de casos de diarrea acuosa aguda causada por patógenos entéricos detectables es importante, incluyendo la mayoría de los casos de diarrea por *Salmonella* y *Campylobacter*, se estima que la causa se identifica en menos del 3% de los casos. Para agravar el problema de las tasas de identificación bajas, muchos de los agentes potencialmente importantes que causan diarrea acuosa no son detectables mediante las pruebas de rutina utilizadas en los laboratorios de diagnóstico; estos agentes son *E.coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva, vibriones no coléricos y Rotavirus.

Las cepas específicas de *E. coli* diarreogénica poseen características clínicas y epidemiológicas y requisitos de detección diferentes. Por lo tanto, no es apropiado referirse a la diarrea por *E. coli* sin tener en cuenta el tipo específico. (Herbert L. DuPont, 2009)

1.2. Estructura antigénica somática de *Escherichia coli*

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. (*Escherichia coli* enterohemorrágica, 2013)

Posee tres antígenos:

- Antígeno O: somático (grupo).
- Antígeno H: flagelar (tipo).
- Antígeno K: de superficie, asociado al grupo.

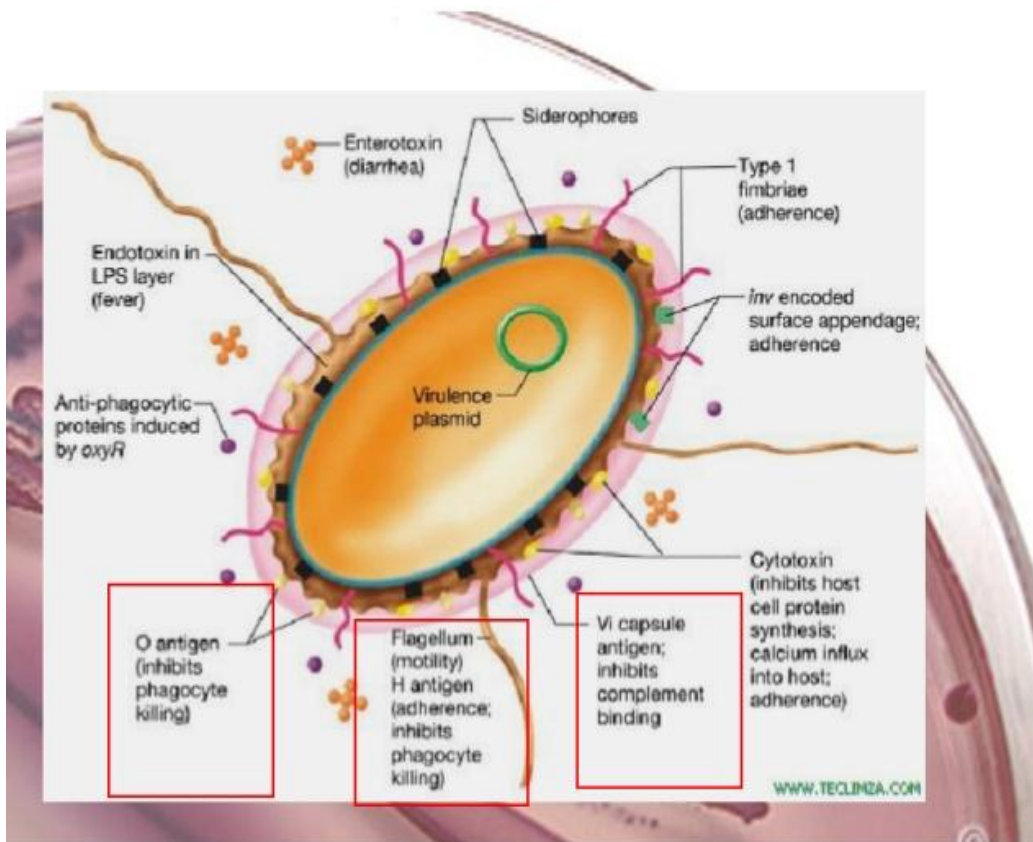


Fig. 3 Estructura antigénica (www.Tequimiza.com, revisado diciembre 2013)

1.2.1 Estructura antigénica.

Básicamente la estructura antigénica de *Escherichia coli* es similar a la de otras entero bacterias, con dos clases de antígenos principales presentes; antígenos O y antígenos H. En algunas cepas se encuentra un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K (de superficie) de otros géneros; ya que anteriormente se pensó, que se relacionaba con la virulencia, éste antígeno se denominó antígeno VI. (Mejía Bernardo 2012)

1.2.1.1 Antígenos O

Son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida. Existen numerosos antígenos O, a pesar de ello son los factores O principales, los que sirven para caracterizar los diferentes tipos antigénicos, son 153 tipos de antígenos O, denominados de O1 a O157, siendo la *Escherichia coli* O124: H7

Son termoestables resisten el calentamiento de 100 a 120 °C y son el primer grupo de antígenos que debe determinarse cuando se trata de serotipificar una cepa de *Escherichia coli*. (Mejía Bernardo 2012)

1.2.1.2. Antígenos H

Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado.

Se conocen actualmente 51 tipos de antígeno H, denominados H1 a H53, termolábiles.

1.2.1.3 Antígenos k

Los antígenos K (capsula) son termoestables e inhiben la aglutinación con sueros específicos anti O, ya sea en células vivas o formolinizadas, se encuentra rodeando la célula a manera de envoltura, o bien como capsula rudimentaria (existe una excepción: el antígeno K 88, de naturaleza proteica que existe como pelos o fimbrias). Se conocen tres variedades de antígeno K en base algunas características físicas y se les denomina L, B y A. (Mejía Bernardo 2012)

El antígeno K debe ser eliminado por calor cuando se trata de determinar el serogrupo al cual pertenece una cepa particular de *Escherichia coli*. Existen 91 antígenos K reconocidos se denomina K 1 a K 91

La denominación de serotipo de *Escherichia coli*, se reserva para la expresión de los 3 grupos de antígenos presentes en una cepa O 76, K 80, H 2.

Cuando no se expresan los antígenos K o H entonces se utiliza el término "serogrupo" O 78, K 80 Cuando se trata de una cepa inmóvil o a capsulada debe hacerse notar en la expresión de su serotipo O 78, K 80 y H-, O78; K80, H2.

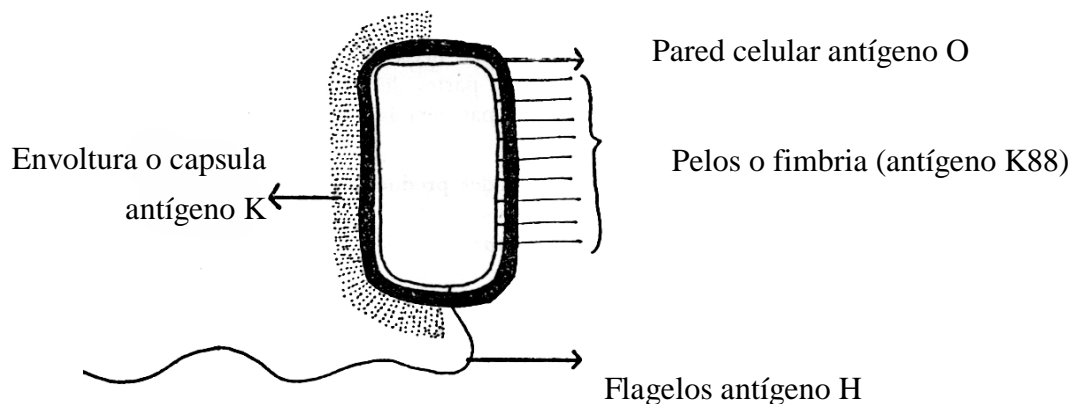


Fig. N° 6. Localización de los antígenos O, K y H de *Escherichia coli*

(<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>)

La compleja estructura antigénica se basa en antígenos O-, K- y H-. Los antígenos O son lipopolisacáridos (LPS), componentes estructurales de la membrana externa. Una estructura química diferente de LPS corresponde a una distinta especificidad serológica. Las cepas de bacterias que poseen el antígeno O forman colonias brillantes sobre medios de cultivo sólidos, por lo que se denominan formas S (ingl. smooth). Los antígenos K son componentes capsulares. Sin embargo, no todas las cepas llevan antígenos K. Las cepas de esta estructura antigénica suelen ser más bien tóxicas y resistentes a la fagocitosis. Las colonias de las cepas bacterianas con mucha sustancia capsular tienen un aspecto mucoso. Las proteínas de los flagelos constituyen antígenos H. (*Mejía Bernardo 2012*)

A pesar de ser *Escherichia coli* la bacteria más estudiada en cuanto a su fisiología y genética, curiosamente los mecanismos patogénicos que operan en las enfermedades producidas por este germen no han sido estudiados con la atención necesaria. Sólo recientemente algunos investigadores en varias partes del mundo se han preocupado por diversos aspectos de la patogénesis de la colibacilosis. (*CENAVECE, 2011*)

1.3. Fisiopatología:

Escherichia coli se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad. Sin embargo, existen varios tipos de *E. coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos. (*Iguchi et al., 2009*).

Los tipos involucrados en infecciones extraintestinales se han denominado ExPEC3. Causantes de enteritis o enfermedad diarreica; siendo las principales *E. coli*

enteropatógena, E. coli enteroinvasiva, E. coli enterohemorrágica E. coli enterotoxigénica. (Iguchi et al., 2009).

En términos generales, la diarrea de causa infecciosa se produce cuando el volumen de agua y electrolitos presentado al colon excede su capacidad de absorción, eliminándose de forma aumentada por las heces.

La gran pérdida de líquidos y electrolitos puede derivar en un cuadro de deshidratación. Esto es más frecuente en el niño pequeño por tener una mayor área de superficie corporal en relación con el peso que el adulto y, por lo tanto, unas mayores pérdidas insensibles.

En estas edades entre el primer año de vida y los nueve años hay también un riesgo nutricional más importante por existir una gran respuesta catabólica frente a las infecciones y una depleción de las reservas nutricionales más rápida que en el adulto. Los factores que influyen en la afectación nutricional son, en primer lugar, la disminución de la ingesta calórica por la hiperoxia concomitante y la restricción alimentaria habitualmente indicada, y en segundo lugar, la posible existencia de mal absorción de nutrientes secundaria a la lesión intestinal. (Rodríguez, Hannaoui Sociedad de Microbiología, Venezuela, 2009)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) invade las células epiteliales de la mucosa intestinal, provoca la lisis de la vacuola endocítica y se multiplica en el citoplasma. Se extiende a las células epiteliales adyacentes puede alcanzar la submucosa.

Las toxiinfecciones alimentarias surgen de dos mecanismos fisiopatológicos: uno tóxico y otro invasivo. En el proceso toxico la bacteria se fija a la superficie del epitelio digestivo sin destruirlo. Es posible que la bacteria no se fije y sin embargo emita toxinas. También, frecuentemente, con la comida contaminada, únicamente se ingieren las toxinas

responsables de las manifestaciones clínicas. Las toxinas dan lugar a una secreción activa de electrolitos y de agua por las células epiteliales del intestino, sin lesión anatómica. Están constituidas por 2 porciones: la porción B que permite a la toxina fijarse a la superficie del epitelio sobre receptores específicos (gangliósidos) y penetrar en el citoplasma de la célula intestinal; la porción A que lleva la actividad enzimática de la toxina. (*Rodríguez, Hannaoui 2009*)

Se producen dos tipos de toxinas: la toxina termolábil (LT), que aumenta la concentración intracelular de AMP cíclico por estimulación de la adenilato ciclasa (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxinógeno, estafilococos); la toxina termoestable (ST), que aumenta el GMP cíclico en el enterocito (*Escherichia coli*).

La acción de las toxinas lleva a una pérdida de agua y de iones cloro a la altura de la luz digestiva al principio de la diarrea como se observa en la figura 3. (*Fisiopatología de las toxiinfecciones alimentarias, La Plata 2008*)

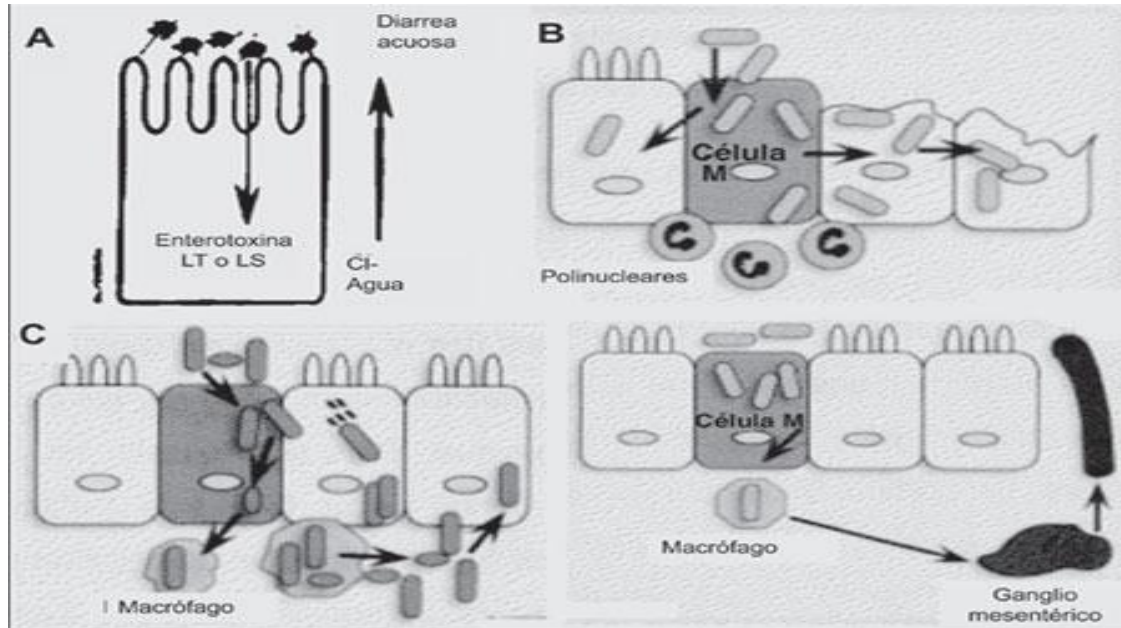


Figura 4. Fisiopatología de las toxiinfecciones alimentarias A. Proceso tóxico; B. Proceso invasivo; C. Caso particular de las salmonellas.(<http://www. Acta bioquímica clínica latinoamericana, versión On-line ISSN 1851-61141 La Plata ene. /mar. 2008>)

En el proceso invasivo las bacterias invaden las células intestinales y en ellas se multiplican hasta su destrucción. Los mecanismos de entrada de las bacterias al epitelio, esencialmente dependen de la puesta en marcha de una cascada de señales que inducen a cambios en el citoesqueleto, que favorecen la invasión por medio de vacuolas de endocitosis. Clásicamente, penetran en las células M situadas en las placas de Peyer (*Acta de Bioquímica, 2008*)

Las lesiones de la mucosa digestiva se extienden poco a poco. El paso del epitelio conlleva una reacción inflamatoria intensa con llegada masiva de polinucleares neutrófilos y de macrófagos. El pus y la mucosidad se van a producir en la luz del tubo digestivo. Lesiones de los conductos microvasculares y capilares explican la presencia de sangre en las heces.

Las lesiones anidan preferentemente en el colon. El cuadro clínico es el de un síndrome disentérico. (*Lavigne, Toxoinfecciones alimentarias, 2008*)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) produce una diarrea abundante acompañada por fiebre alta que se parece a la diarrea originada por *Shigella*. (*Figueroa Paola, Enterobacterias, 2009*)

1.4. Diarrea y Nutrición

La diarrea aguda induce efectos adversos sobre la nutrición por variadas causas:

Vómitos, mala absorción, hipercatabolismo, anorexia, y suspensión o dilución inmotivada de la alimentación. En este último caso hay claramente un factor iatrogénico, el que constituye hoy en día un serio problema global que conspira contra el tratamiento racional de la diarrea.

Como habitualmente no se dispone de un peso previo, se realiza esta valoración mediante escalas clínicas. Recientemente han sido publicadas por la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) las "Guías prácticas para el manejo de la gastroenteritis en niños", en las que se establece un conjunto de signos y síntomas para estimar el grado de deshidratación. (*Healthwise, 2011*)

La deshidratación se considera según esta pérdida como:

- a. Leve pérdida < del 5% del peso corporal.
- b. Moderada pérdida del 5-10% del peso corporal.
- c. Grave pérdida > 10% del peso corporal.

	Estado general	Ojos	Lagrima	Boca y lengua	Sed	Piel	% - peso	Déficit estimado de líquidos
No signos de deshidratación	Bueno, alerta	Normal	Presente	Húmeda	Normal	Pliegue: retracción inmediata	Menor a 5	< 50
Deshidratación leve/moderada	Intranquilo, irritable	Hundidos	Ausente	Seca	Sediento	Pliegue: retracción lenta	5 a 10	50 a 100
Deshidratación grave	Letárgico o inconsciente	Muy hundidos y secos	Ausente	Muy seca	Bebe poco o es incapaz de beber	Pliegue: retracción muy lenta	Mayor a 10	> 100

TABLA2. Valoración del grado de deshidratación (ESPGHA, 2001)

(http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/2-diarrea_aguda.pdf)

1.5. Diagnóstico etiológico

A lo largo de los años se han tratado de identificar datos de la historia clínica y la exploración física en niños con diarrea que permitan predecir la probable etiología bacteriana o vírica de la misma.

Se han establecido como parámetros clínicos que pueden sugerir el origen bacteriano de la enfermedad la edad mayor de 3 años, el comienzo brusco de la diarrea, la ausencia de vómitos, la hipertermia y la presencia de sangre macroscópica en heces. (*Healthwise, 2011*)

No obstante, dado que el conocimiento del agente causal no va a influir la mayoría de las veces en el abordaje terapéutico de la diarrea, porque independiente del germen causante del cuadro diarreico, sólo estaría indicado realizar el estudio microbiológico de heces en los casos de:

- (a) inmunodeficiencias
- (b) diarrea mucosanguinolenta
- (c) ingreso hospitalario,
- (d) diagnóstico dudoso,
- (e) diarrea prolongada.

1.5.1. Diarrea causada por cepas *Escherichia coli* enteroinvasiva

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC), tiene factores de adherencia e invasión de la mucosa. Los principales serogrupos O (que vienen de su estructura antigénica- polisacárido O) son: O11, O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152, O164, O167 y O173.

Escherichia coli enteroinvasiva, son cepas capaces de invadir las células. Clínicamente se manifiestan como un cuadro similar a la disentería bacteriana, con una incidencia elevada de fiebre y diarrea sanguinolenta. Las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivas, se detectan en el cultivo como colonias lactosa-negativas, y se confirman por sondas de ADN o por PCR para genes asociados a la virulencia. (García A, 2010)

El reservorio de la bacteria *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) es el hombre y afecta a todos los grupos de edad. La enfermedad diarreica aguda es endémica en los países en desarrollo y representa hasta el 5 % de los episodios. Es posible contraer una infección por

Escherichia. coli al entrar en contacto por excrementos, o heces, de seres humanos o de animales. Esto puede suceder cuando bebe agua o come alimentos que han sido contaminados con excremento. (García A, 2010)

Escherichia. coli puede llegar a la carne durante el procesamiento. Si la carne infectada no se cocina a 160°F (71°C), las bacterias pueden sobrevivir e infectarle cuando come la carne. Esta es la manera más común en que las personas en los Estados Unidos se infectan con *Escherichia. coli*. Cualquier alimento que ha estado en contacto con carne cruda también puede infectarse. (Ecured cu/com. 2013)

Otros alimentos que se pueden infectar con *Escherichia coli* incluyen:

- Leche o productos lácteos crudos. Las bacterias pueden propagarse de las ubres de una vaca a su leche. Revise las etiquetas de los productos lácteos para asegurarse de que contengan la palabra "pasteurizado". Esto significa que el alimento se ha calentado para destruir las bacterias.
- Frutas y vegetales crudos, como la lechuga, los brotes de alfalfa, o la sidra sin pasteurizar u otros jugos sin pasteurizar que han entrado en contacto con excremento de animales infectados. (Ecured cu/com. 2013)

1.5.2. *Escherichia coli* en el agua

El excremento de los seres humanos o de los animales infectado con *E. coli* a veces puede encontrarse en lagos, piscinas y suministros de agua. Las personas pueden infectarse cuando el suministro de agua de una ciudad o de un pueblo contaminados no han sido tratados en forma adecuada con cloro (lejía) o cuando las personas tragan de manera accidental agua contaminada mientras nadan en un lago, en una piscina o en un canal de riego.

1.5.3. *Escherichia coli* por el contacto de persona a persona

Las bacterias también pueden propagarse de una persona a otra, por lo general, cuando una persona infectada no se lava bien las manos después de una evacuación del intestino. La *Escherichia coli* puede propagarse de las manos de una persona infectada a otras personas u objetos (*Healthwise, 2011*)

2. Fisiopatogenia

2.1. Clínica:

El período de incubación es de 10-18 horas. Las manifestaciones clínicas son fiebre, vómitos, diarrea acuosa o diarrea con moco o diarrea sanguinolenta, dolor cólico abdominal, tenesmo y malestar general.

Puede provocar hipoglucemia en los desnutridos. Es más frecuente la diarrea acuosa similar a la producida por *Escherichia coli enterotoxigenica* (ETEC). Las deposiciones disintéricas se presentan en un bajo porcentaje de casos.

Definición de caso sospechoso: Enfermedad diarreica aguda.

Definición de caso confirmado: Caso sospechoso con identificación de *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC).

Definición de Diarrea acuosa o con moco o con sangre con cólicos abdominales que se presentan en niños y adultos que han sido contaminados con *Escherichia coli enterinvasiva*

2.2. Métodos auxiliares del diagnóstico:

Existen y aun se estudian y proponen varios métodos y/o estrategias para diagnosticar a *Escherichia coli enteroinvasiva*, estas difieren en complejidad, sensibilidad, especificidad y costo.

El aislamiento permite su caracterización por una variedad de métodos, incluyendo serotipificación O: H, caracterización del fago, polimorfismo de los fragmento de restricción, electroforesis en gel de campo pulsado, amplificación y secuenciación del ADN, entre otros, algunos de los cuales, son de uso limitado en el laboratorio clínico, por su elevado costo y necesidad de personal especializado, pero son de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, en un brote.

Comercialmente se encuentran disponibles varios reactivos de aglutinación al látex, para detectar el antígeno O157 y H7, y así confirmar las colonias sospechosas. También pueden usarse métodos de ELISA para la detección rápida del antígeno O157 en muestras fecales, los cuales tienen buena sensibilidad otra limitante es la incapacidad de reconocer la cepa O157 cuando su concentración es menor al 1% de la flora gastrointestinal.

Dentro de los métodos auxiliares de diagnóstico contamos con el examen coproparasitológico; cultivo y pruebas serológicas de aglutinación con antisueros comerciales, utilizando el serotipo con el antisuero, y estos han incrementado su uso en el laboratorio clínico por su bajo costo y fácil realización, sin embargo, se debe tener presente que no todos los serotipos, son verdaderamente patogénicos, pues el marcador del serotipo no le confiere patogenicidad a la cepa; o la similitud de algunos antígenos, puede dar falsos positivos Para estos casos ha sido propuesto el uso de la prueba de la Reacción de la Cadena de polimerasa (PCR), la cual puede reducir el alto grado de falsos positivos

obtenidos por serotipificación El análisis de PCR de muestras aisladas de cultivos fecales, es probablemente el método más sensible y específico; pero la mayoría de los laboratorios carecen de la capacidad de investigación por PCR o de análisis de verocitotoxicidad, emplean métodos tales como, ELISA para detección de stx y enterohemolisina (*Villalobos Ericka, 2009*)

Identificación de *Escherichia coli enteroinvasiva* en muestra de heces (obtenida en los primeros seis días de enfermedad) por sonda DNA, pruebas por Cadena de la polimerasa (PCR) y ELISA para el gen IpaC, necesario para la invasión. (*Igichi 2009*)

2.3. Tratamiento:

Debe realizarse el tratamiento de sostén mediante la adecuada reposición de las pérdidas con sales de rehidratación oral. El tratamiento específico con antibióticos está indicado únicamente en los casos de diarrea grave. La selección del antibiótico a utilizar se realizará según el perfil de sensibilidad de *Escherichia. coli* en el área. (*Sedes 2010*)

2.4. Medidas de prevención y control:

Debe garantizarse el saneamiento básico mediante la provisión de agua segura y la eliminación sanitaria de excretas. La educación para la salud, especialmente referida a la higiene personal y la higiene de los alimentos, es el otro pilar fundamental para evitar la infección.

Frente a la ocurrencia del caso deben tomarse las medidas de aislamiento entérico tanto en la hospitalización, como en el hogar, es decir, debe separarse todos los artículos como

plato, cuchara, vaso del enfermo del resto de la familia o pacientes hospitalizados. (Benjamin, Franklin 2012)

3. *Escherichia coli* enteroinvasiva

El grupo *E.coli enteroinvasiva* y *Shigellas sp.* Se encuentran relacionados genética y bioquímicamente. Se asocia fundamentalmente con brotes de origen alimentario por alimentos importados, siendo responsables de la "diarrea del viajero".

El mecanismo de patogenicidad de *E.coli enteroinvasiva* es la invasión del epitelio del colon, sin producción de toxinas LT y ST, dando lugar a una diarrea disenteriforme acuosa que se manifiesta con sangre y mucosidad en heces acompañado de fiebre y dolor abdominal (Todar, 2008).

En algunos casos sólo se produce diarrea, siendo difícil diferenciarla de la producida por *Escherichia coli* enterotoxigénica

El grupo de *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC) y *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInv, que codifica para proteínas, como

por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis. (Turuel Nicolas, 2013)

Los síntomas característicos en personas infectadas por *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indiferenciable de la que produce *Escherichia coli enterotoxigenica* (ETEC). Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

El diagnóstico de EIEC se hace por prueba *in vivo* como la de Sereny, que es la inoculación de un cultivo puro de la bacteria en un ojo de un cobayo en el cual después de 24 a 96 h se produce una ulceración en el ojo, pero también hay métodos inmunológicos y moleculares, ELISA para el gen *ipa C*, necesario para la invasión, Hibridación por sondas derivadas del plásmido pInv. (Turuel Nicolas, 2013)

3.1. Epidemiología

Las diarreas de causa bacteriana en el niño se presentan en forma epidémica en los meses de calor, en las poblaciones menos desarrolladas, y las de causa vírica en los meses de frío en las poblaciones desarrolladas.

Las infecciones entéricas son raras en el primer año de vida, aumentan con el destete, pero si cuando este ocurre en los primeros seis meses de edad; el periodo más frecuente de la diarrea se da en el primer año de vida con serias consecuencias para la nutrición, crecimiento y supervivencia del niño. El significado de la estacionalidad, es decir, la época del año, primavera y verano, no puede ser ignorado, puesto que es uno de los factores

determinantes de la pobreza en áreas rurales y que pueden inducir a epidemias comunitarias de meses e incluso años de duración. (*Roman Enriqueta 2009*)

Los factores determinantes pueden ser:

a) **Ambientales:** como toma de agua inadecuada o contaminada, falta de facilidades sanitarias, mala higiene personal y doméstica, inadecuado almacenamiento y preparación de alimentos, malas prácticas cuando se retira el pecho materno y búsqueda tardía de atención médica.

b) **Del huésped:** Como, desnutrición, deficiencias inmunológicas (la enfermedad infecciosa es el resultado de un desequilibrio entre los factores de virulencia de una cepa bacteriana particular y los mecanismos de defensa de un determinado huésped en contra de este último), factores genéticos, ausencia de lactancia materna. (*Infección por Escherichia coli, Healthwise 2011*)

4. **Incidencia:**

La incidencia real es desconocida pues pocos laboratorios pueden identificar estos microorganismos. La *Escherichia coli enterotoxigenica* es la causa más común de diarrea en el viajero. La *Escherichia coli enteroinvasiva* y la *Escherichia coli enteropatogena* infectan principalmente a los niños menores de 2 años en los países en vías de desarrollo.

La *Escherichia.coli enteropatogena* se ha reportado como causa importante de diarrea en el recién nacido cuando se produce una contaminación por el biberón o mala manipulación por parte de la madre, esto en bebés que no gozan de la lactancia materna. (*Infección por Escherichia coli, Healthwise 2011*)

La *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) aparece en la década del 80 en casos esporádicos y en brotes epidémicos fundamentalmente en países desarrollados. El serotipo más observado en EEUU, Europa y Japón ha sido O-157. En Latinoamérica se han registrado muy pocos casos, solo en países como Brasil.

5. Período de incubación:

La incubación oscila entre 12 y 72 horas en el caso de *Escherichia coli* enterohemorrágica se produce entre 60 a 60 horas, en el caso de la *Escherichia coli* enterotoxigenica es de 60 horas. La transmisibilidad se desconoce, pero se supone que puede transmitirse 1 semana.

6. Virulencia:

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.

La *Escherichia coli* rica está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C.

La *Escherichia coli* enteroinvasiva es inmóvil, no fermenta la lactosa, invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal.

6.1. Modo de transmisión:

El hombre constituye el principal reservorio para casi todos los tipos reconocidos de enteropatógenos de *E. coli*. Se transmite por vía fecal oral, de persona a persona en hogares y centros de atención de niños y ancianos. La transmisión más frecuente es por agua y alimentos contaminados. Como el organismo puede vivir en el intestino del ganado saludable, la carne puede contaminarse durante el proceso de sacrificio por contacto fecal. (*Carrión Alcides, 2011*)

La bacteria intestinal *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) tiene un período de incubación medio de tres a cuatro días y la mayoría de pacientes se recupera en diez días, pero en una pequeña parte de los pacientes -principalmente niños y personas mayores la infección puede llevar al Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad grave que se caracteriza por causar insuficiencia renal aguda.

Una vez que aparece el SUH, se genera la enfermedad en toda su gravedad, con un riesgo de mortalidad entre el 3 y el 5 por ciento, siempre según la OMS.

6.2. Mecanismos patogénicos.

El mecanismo patogénico que ocasiona la diarrea es variable, y está en dependencia del grupo o categoría de *Escherichia coli* que infecte al individuo. Así podrá existir:

- Invasividad.
- Adherencia a la superficie de la mucosa.
- Producción de enterotoxinas.
- Producción de citotoxinas.

En *Escherichia coli enteroinvasiva* el mecanismo de patogenicidad (figura 7) es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las micro vellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula a través de una fagocitosis "no profesional," lo que afecta el borde de cepillo del enterocito.

La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y de ella pueden distinguirse dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias a la célula del huésped.

Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas; la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfo nucleares y macrófagos, desencadenan el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*.

Su mecanismo patogénico tiene características muy parecidas a las de la *Shigella*, tanto en su capacidad de colonizar, invadir y destruir los enterocitos del colon, propiedades que se codifican genéticamente por ADN cromosomal y de plásmidos. La *Escherichia coli enteroinvasiva* posee un plásmido de 120 mil kilodaltons que guarda cierta homología con el plásmido de virulencia de la *Shigella*.

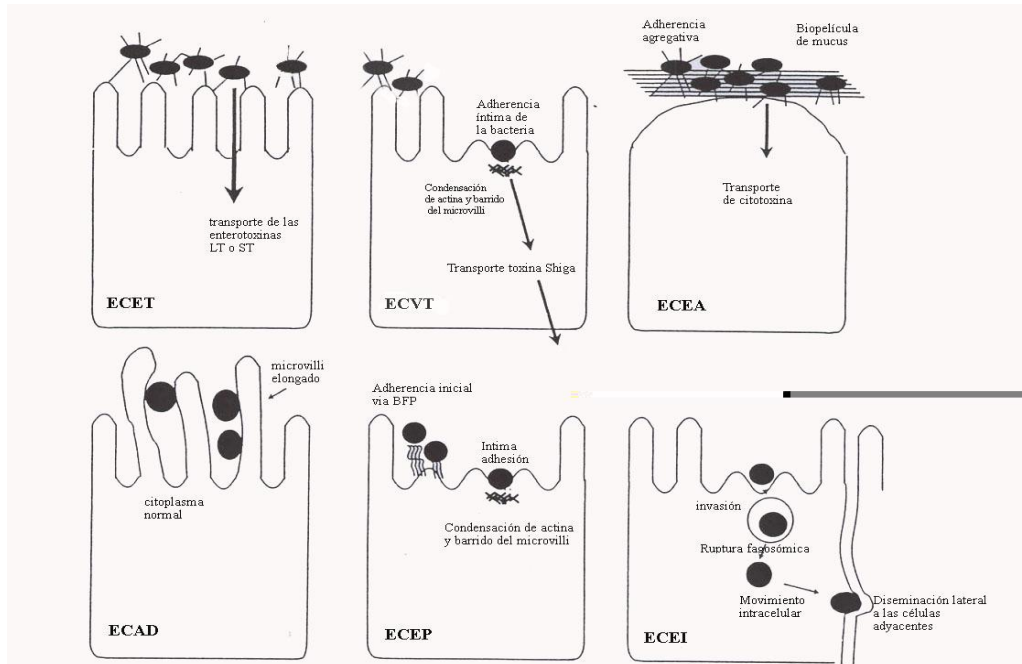


Figura 7. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli*. (Clínica Microbiológica, Ed. 2006)

La mayor parte de los pacientes infectados desarrollan una diarrea acuosa indistinguible de la provocada por otros grupos de *Escherichia coli* diarreagénicos. Solamente algunos pacientes presentan disentería, que se manifiesta con sangre, mucus y leucocitos en las heces y fiebre.

Las *Escherichia coli* enteroinvasiva son muy parecidas a *Shigella* ya que generalmente son incapaces de fermentar la lactosa, no son móviles, lisina descarboxilasa negativos y además poseen antígenos O que presentan reacción cruzada con los de *Shigella*. (Zeballos Alfredo 2012)

Los genes necesarios para la invasividad son llevados por un plásmido (pInv) de 120 Megadaltons en *Shigella sonnei* y por un plásmido de 140 megadaltons en las otras especies de *Shigella* y en *E. coli*.

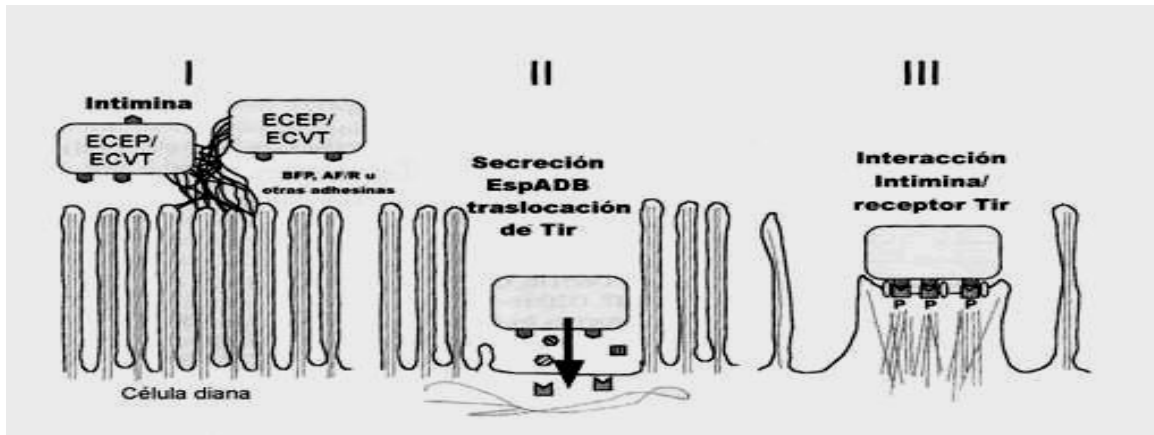


Figura 8. Modelo del desarrollo de la lesión de adhesión y borrado (attaching and effacing) de los *Escherichia coli* enteropatógenos (ECEP) y verotoxigénicos (ECVT). Basado en el original de Donnenberg et al.

Además también están implicados genes cromosómicos que regulan la transcripción de algunos de los genes plasmídicos. El modelo actual de patogénesis de *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva comprende los siguientes pasos:

- 1.- Penetración por endocitosis dentro de las células de la mucosa intestinal del colon
- 2.- Lisis de la vacuola endocítica
- 3.- Multiplicación intracelular
- 4.- Movimiento intracelular
- 5.- Diseminación lateral a las células adyacentes.

Los genes plasmídicos *mxi* y *spa* codifican para un aparato de secreción de proteínas de tipo III similar al que poseen los *Escherichia coli enteropatogena* y *Escherichia coli verotoxigenica*.

Este aparato se requiere para la secreción de múltiples proteínas de la membrana externa (OMP) que están implicadas en el proceso invasivo y que se denominan proteínas Ipa (invasion plasmid antigens) (Ipa A - IpaD). IpaC promueve la entrada de la bacteria en la célula, mientras que IpaB lisa la vacuola fagocítica e induce apoptosis en macrófagos. VirG (IcsA) es una proteína de superficie que es esencial para que se produzca la condensación de actina que facilita el movimiento de la bacteria a través del citoplasma.

La *Escherichia coli enteroinvasiva* producen una enterotoxina de 63 kilodaltons (ShET2) que se encuentra codificada en el gen plasmídico *sen*.

La detección de los *Escherichia coli enteroinvasiva* puede realizarse determinando su capacidad invasiva en el ojo de cobayas por el clásico ensayo de Serény ó en células de las línea Hep-2 y Hela, con un ELISA que localiza proteínas de la membrana externa, con pruebas genéticas (hibridación o PCR) que localizan genes de invasividad y por determinación del serogrupo o serotipo.

Los *Escherichia coli enteroinvasiva* pertenecen a un número reducido de todos los serotipos vistos, además el serotipo más frecuente es el O124:H7.

Este grupo está asociado con cuadros de disentería bacilar semejantes al de la *Shigella dysenteriae*; sin embargo, en todos los casos en los cuales se aisló *Escherichia coli enteroinvasiva*, no se presentó diarrea; lo anterior podría deberse a que se hicieron aislamientos de portadores asintomáticos o a la resistencia natural del huésped.

La diferenciación de cepas de *Escherichia coli* en base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares) se observa en la Fig. 9. Esta forma de clasificación serológica resulta muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *Escherichia coli*, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inocuas.

El antígeno O es un polisacárido termoestable (estable tras calentarlo a 121°C/2 h) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular. El antígeno K se corresponde con el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O inhibiendo su aglutinación.

Existen dos grupos de antígenos K (grupos I y II), que se corresponden con las variedades K(A) y K (L). Los antígenos K (L) se inactivan tras ser calentados a 100°C/1 h, mientras que son necesarias exposiciones de 121°C/2 h para inactivar la variedad K(A) que se asocia solamente a cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101.

La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por el método de contra inmunolectroforesis.

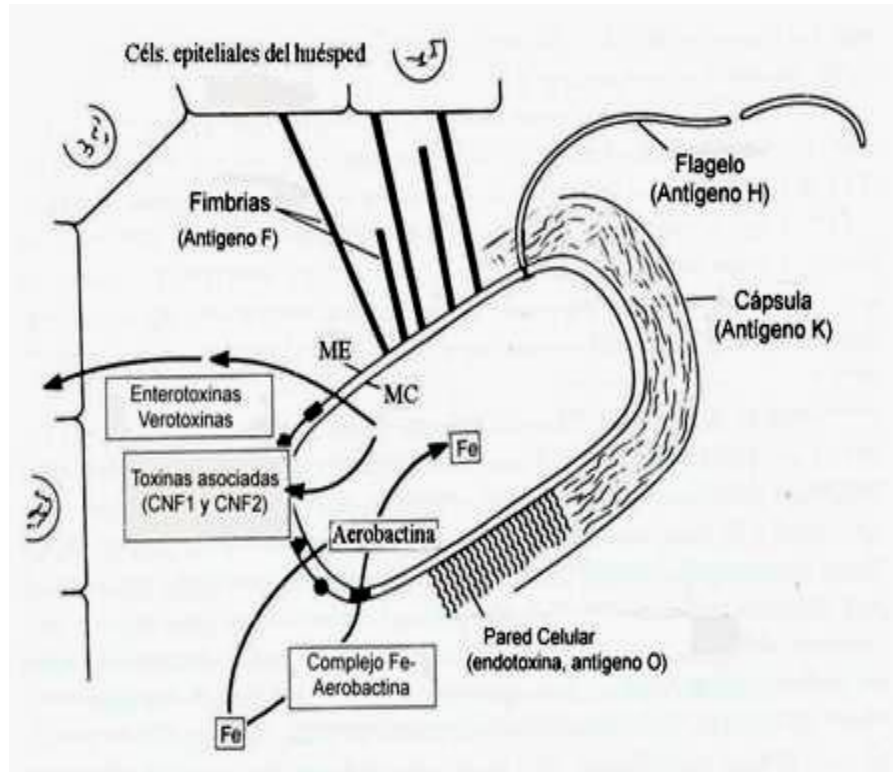


Figura 9. Esquema de la bacteria *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia. (<http://www.usc.es/ecoli/E.coli2.html>)

Se han detectado numerosas reacciones cruzadas entre los antígenos O y K de diferentes cepas de *Escherichia coli* y con los antígenos de otros géneros de enterobacterias. Por ello es muy importante emplear antisueros absorbidos para evitar falsas reacciones de aglutinación (Alcides, Daniel 2012)

7. Diagnóstico laboratorial:

Las muestras a procesar deben ser representativas del tipo de infección y pueden ser de heces (coprocultivo), orina (urocultivo), sangre (hemocultivo), exudado ó pus de una herida, una muestra de un líquido orgánico (ascítico, pleural, líquido cefalorraquídeo), bilis ó leche materna. Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *E. coli* son el agar Mac Conkey con lactosa y el medio eosina azul de metileno (EMB ó LEVINE). (Koneman, Elmer 2008)

La muestra clínica más difícil de valorar para el microbiólogo clínico es la procedente de personas ó animales con diarrea, ya que al sembrar las heces en el Agar Mac Conkey en el que se presentan como lactosa negativa, va a crecer casi siempre un abundante número de colonias de *Escherichia. coli*. Entonces, el problema consiste en diferenciar entre las cepas diarrogénicas de las no patógenas que forman parte del la flora bacteriana normal del intestino grueso.

Se trata de medios selectivos que diferencian las colonias en lactosa positiva y negativa. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son lactosa positivas, no se deben descartar el estudio de las colonias lactosa negativas, ya que entre el 5% de los *E.coli* que no son fermentadores de la lactosa se pueden encontrar cepas patógenas.

Así, la mayor parte de las *Escherichia coli enteroinvasiva* son lactosa positivas. En los urocultivos y hemocultivos también se emplea una placa de un medio no selectivo como el Agar sangre. Recuentos superiores a 10^5 unidades formadoras de colonias por ml. de orina son indicativos de una ITU (bacteriuria). En muestras procedentes de lugares ó líquidos (sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.) habitualmente estériles cualquier crecimiento es indicativo de infección.

Actualmente, la técnica más frecuentemente empleada para detectar los *Escherichia coli* diarrea génicos es hacer una PCR múltiple capaz de detectar los genes de virulencia más representativos de los *Escherichia.coli enteropetogena*, *Escherichia. coli enterotoxigenica*, *Escherichia coli enteroinvasiva*, *Escherichia coli verotoxigenica*, *Escherichia coli enteroagregativa*

Para efectos epidemiológicos es muy importante determinar el serotipo O: H de la cepa aislada. En el caso de aislar un ECVT O157:H7 convendría determinar su fago tipo y patrón de electroforesis en campos pulsantes (PFGE). Solamente en determinados laboratorios de investigación de referencia se realiza el serotipado completo, el fagotipado y la técnica de PFGE (La electroforesis en gel de campos pulsantes).

Es como una técnica de la huella dactilar considerada el estándar de [oro](#) para la tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto gram-positivas como los estafilococos, enterococos, y mycobacterias y gram-negativas como la *Escherichia coli*, otras *Enterobacterias* y *pseudomonas*. (Franklin, 2011)

7.1. Pruebas Bioquímicas.

El biotipado se puede realizar con una serie corta de pruebas bioquímicas: KIA A/A, prueba de TSI A/A, Producción de GAS, Indol (+), Rojo metilo (+), Voger Proskauer (-), citrato (+), SH₂ (-), Motilidad (+), Lisina (+), prueba de la ONPG (+), Ornitina (+) y ureasa (-).

No obstante, hay que tener en cuenta que hay cepas atípicas: indol (-), citrato (+), SH₂ (+) ó ureasa (+). (Rodríguez, 2012)

Producción de indol.

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden lograr la ruptura del triptófano, y de este modo producir indol, ácido pirúvico y amonio. El indol puede detectarse mediante el desarrollo del color rojo después de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Kovac).

Prueba de Rojo de Metilo.

Las bacterias que siguen la fermentación ácido mixto, producen suficiente ácido para mantener el pH por debajo de 4.4. La prueba del rojo de metilo proporciona características valiosas para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de glucosa.

Prueba de Vogler-Proskauer.

Esta prueba se basa en la conversión de acetyl-methyl-carbinol a diacetyl a través de la acción del hidróxido de potasio y el oxígeno atmosférico. El diacetyl se convierte en un compuesto rojo bajo la acción catalítica del alfa-naftol y la creatinina.

Utilización de Citrato.

El principio de la prueba de utilización de citrato es la de determinar la capacidad de un microorganismo para usar al citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. La producción de color azul en el medio de prueba, indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la utilización de citrato. El crecimiento visible también indica una prueba de resultado positivo.

Producción de Ureasa.

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio.

Descarboxilación de la lisina.

Muchas de las especies de bacterias poseen enzimas que pueden descarboxilar aminoácidos específicos en el medio de prueba. Las enzimas descarboxilasas remueven una molécula de CO₂ de un aminoácido para formar aminas reactivas alcalinas.

Siendo la cadaverina el producto de la descarboxilación de la lisina. Las aminas que resultan de la descarboxilación pueden ser detectadas por el cambio de pH alcalino.

8. ANTÍGENO.

Son antígenos las sustancias que introducidas al organismo de un animal adulto inducen una respuesta inmune, dando lugar a la producción de anticuerpos o la proliferación de células sensibilizadas con las que específicamente reaccionan.

Existen o pueden obtenerse antígenos a partir de ciertas sustancias, que fraccionadas pueden reaccionar con los anticuerpos (especificidad) pero no engendrarlos (poder inmunogénico), como Landsteiner las denominó haptenos. Estos a su vez pueden ser haptenos complejos cuando la reacción hapteno-anticuerpo efectuada in Vitro es visible o haptenos simples cuando ella no origina un fenómeno detectable a simple vista.

Los antígenos en su gran mayoría proteicos puede sufrir alteraciones derivadas de la acción de algunos agentes físicos o químicos .

El proceso de preparación del antígeno es por un método de desnaturalización, ya sea por calor, frío, químicos o por sonicación.

El antígeno obtenido posterior a la sonicación es inoculado en un animal de experimentación, en este caso un cobayo para estimular la producción de anticuerpos, que en algunos casos reacciona con la proteína primitiva, no así en otros, debido a las profundas modificaciones que pueden sufrir los determinantes antigénicos originales a causa de la desnaturalización de la proteína.

8.1 Antígenos bacterianos

Cuando una bacteria es inoculada a un animal se forma más de un anticuerpo policlonal y ello se debe a que un microorganismo debe ser considerado como un verdadero saco antigénico, dentro del cual se pueda encontrar antígenos diferentes, cada uno de ellos con la capacidad inmunogénica y en condiciones de originar anticuerpos. (ENDSA 2008)

Estos antígenos microbianos pueden ser proteínas que frecuentemente están situadas en la membrana celular y el espacio peri plasmático: Hidratos de carbono, que constituyen sobre todo los antígenos de superficie y en algunos particulares como el de las enterobacterias, complejos glucido-fosfolipídicos que son verdaderas endotoxinas y forman parte de la pared celular.

No todos los constituyentes antigénicos de una bacteria tienen la misma capacidad inmunogénica: algunos originan anticuerpos con suma facilidad, mientras que otros necesitan concentraciones altas para conseguirlo y casi siempre a un título o nivel exageradamente bajo.

8.2 Producción de anticuerpos.

La Producción de anticuerpos no es una práctica frecuente en los laboratorios, la diversa utilidad de estos reactivos justifica su producción mediante diferentes procedimientos.

El método convencional para obtener anticuerpos consiste en la inoculación del inmunógeno (Partícula o sustancia que induce una respuesta del sistema inmune) a animales inmunocompetentes este proceso es llamado *inmunización*. La inmunización se fundamenta en la respuesta de anticuerpos, la cual lleva a una serie compleja de mecanismos internos del animal la cual se puede manipular a través de :

- La potenciación del inmunógeno
- La dosis
- El intervalo entre las dosis
- La vía y el modo de administración

8. 3. Vías de administración.

Se pueden utilizar diferentes rutas para la administración del inmunógeno, como:

- Subcutánea
- Intradérmica
- Intramuscular
- Intraperitoneal
- Intravenosa
- Intracardiaca

8.4 Métodos de administración de antígeno:

- **Vía intercutánea:** Reacción de hipersensibilidad tipo IV, como la tuberculina.
- **Vía intraperitoneal:** Utilizada en cobayos
- **Vía intravenosa:** Eligiéndose con preferencia la oreja del conejo

Vía Intravenosa: como la de más fácil acceso, se realizaron inoculaciones de un antígeno atenuado de modo que el animal respondiera al estímulo de este y así producir anticuerpos que estarán dirigidos contra diferentes componentes del antígeno inoculado. Cada determinante antigénico podrá ser reconocido por más de un anticuerpo con diferentes afinidades. Esto se debe a que un determinante antigénico puede ser reconocido por más de un linfocito B.

El conjunto de anticuerpos producidos, secretados hacia el suero del animal inmunizado, constituye el antisuero (anticuerpos policlonales poliespecíficos).(*J.P. Lavigne 2008*)

8.5 Consideraciones para elegir al animal de estudio:

Bienestar animal: la extracción de los anticuerpos del animal se realiza de una manera no invasiva, minimizando el sufrimiento del animal, así como también permite la reducción en el número de animales necesarios para obtener una cantidad de anticuerpos determinada.

Científicas: permite el uso de estas inmunoglobulinas en sistemas de investigación y diagnóstico, permitiendo la obtención de anticuerpos contra antígenos mamíferos muy conservados filogenéticamente.

8.6 Antisuero.

Se denomina suero inmune o antisuero al suero de un animal que ha sido sometido a un proceso de inmunización y contiene anticuerpos específicos contra el inmunógeno inoculado. (Erika Josefina 2009)

8.7 Características de la Inducción de la Respuesta Inmune

La inducción de la respuesta inmune deseada en un organismo "virgen" (no debe confundirse con la primera dosis de vacuna, la cual puede ser aplicada en sujetos que ya tengan respuesta a la vacuna por haberse puesto en contacto previamente con el agente natural o por reacción cruzada) necesita garantizar tres aspectos esenciales.

El programa rápido: Se utilizan 2 conejos durante 2 meses, incluye 4 inmunizaciones, estaje de la muestra pre inmune, pequeño sangrado y sangrado final. Requiere 800 microgramos de proteína purificada. (EDSA 2008)

Programa de sangrado rápido para conejos						
Días	0	14	28	38	50	65
Inyección	1ra	2da.	3era		4ta	
Desangrar	Pre-			2+20 ml		60 ml
	inmune					
	2ml					

TABLA N° 3 Esquema de inmunización rápido de un conejo durante dos meses (Producción y purificación de Anticuerpos (<http://www.cultek.com/>))

Para que se produzca una adecuada inmunización de un animal de experimentación en primer lugar se debe producir la captura, proceso y presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos (CPA) asociados a moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (HLA en el humano).

En segundo lugar, que ocurra la interacción T-B para la producción final de anticuerpos funcionales.

En tercer lugar, es necesario lograr células T y B de memoria que mantengan la respuesta frente a futuras agresiones o re-exposiciones antigénicas.

La presentación antigénica a las células T se garantiza a través de la existencia del MHC, los que constituyen la expresión molecular de los genes de inmunorespuesta.

El Sistema Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es una región de genes de gran polimorfismo, cuyos productos están expresados en la superficie de una significativa variedad de células. Estos sitios fueron descubiertos en 1940 en situaciones artificiales de trasplante de tejidos de un individuo a otro. (*Cordero Zeballos, 2012*)

Las moléculas MHC proveen a las células de un sistema que les permite mostrar péptidos antigénicos a las células T, con el muestreo, por parte de estas últimas (de péptidos antigénicos) todo el organismo y el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas extrañas.

Clásicamente, existen dos tipos diferentes de productos de los genes MHC, relacionados con la respuesta inmune, llamados moléculas de clase I y de clase II, siendo en general las células T, capaces de reconocer antígenos foráneos unidos a moléculas de clase I ó II característica que da la restricción del reconocimiento. (*Luque Angela 2010*)

8.8 Producción del antígeno

La primera etapa en la purificación de proteínas es romper los tejidos y las células de un modo controlado. Utilizando procedimientos mecánicos suaves, denominados de homogeneización, las membranas plasmáticas pueden romperse de modo que liberan su contenido. Se pueden utilizar cuatro procedimientos empleados.

- a) Ruptura de las células con ondas sonoras de alta frecuencia (Sonicación)
- b) Se usa detergente suave para generar orificios en la membrana plasmática
- c) Se fuerza a las células a través de un pequeño orificio utilizando alta presión. Ruptura de las células entre un embolo que gira ajustadamente y a las paredes de un tubo de cristal. Cuando la homogenización se realiza cuidadosamente queda intacta la mayor parte de los orgánulos intramembranosos. *(ENDSA 2008)*

Dentro de ellos está la técnica de Sonicación que es un tratamiento de lisis celular por ultrasonido.

Para entender el proceso de sonicación, se puede decir que es el fraccionamiento sub celular de un conjunto de métodos y técnicas que tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular, ya sea éste un orgánulo (mitocondrias, núcleos, peroxisomas, etc.) una fracción de membrana (membrana total, plasmática, dominio baso lateral, dominio apical, etc.), complejos multiproteicos. *(Cely Rocio 2006)*

La sonicación como tal consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir asimismo las estructuras sub

celulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas. Se transmite una corriente eléctrica a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad generándose ondas de ultrasonido que generan millones de burbujas microscópicas, las cuales se expanden y colapsan contra las células causando la ruptura de su membrana (cito esqueleto de actina, micro túbulos, poros nucleares, etc.)
(Cely Rocio 2010)

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Estandarizar un protocolo para la producción de antisueros para el diagnóstico de infecciones diarreicas causadas por *Escherichia coli enteroinvasiva*.

2. Objetivos específicos:

- Producir anticuerpos anti antígenos totales contra *Escherichia coli enteroinvasiva* (EEIC)
- Establecer la especificidad interespecies de los anticuerpos anti *Escherichia coli enteroinvasiva* por el método de adsorción celular.
- Determinar el título del antisuero a partir del cual se considere como reactivo hacia los Antígenos de la bacteria.

VII. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.

1. Equipos.-

- ◆ Estufa (REITERM)
- ◆ Campana de flujo laminar (GELAIRE BVB A)
- ◆ Centrifugadora (HETTICH UNIVERSAL 32)
- ◆ Vortex (VELPSCIENTIFIC)
- ◆ Microscopio (Olimpus BH -2)
- ◆ Sonicador (SONICS MAT)
- ◆ Balanza (OHAUS)
- ◆ Peachimetro (OAKTON)

2. Materiales.-

Material biológico:

- Suero de conejo de castilla
- Cepas *Escherichia coli enteroinvasiva*.

Material de Laboratorio:

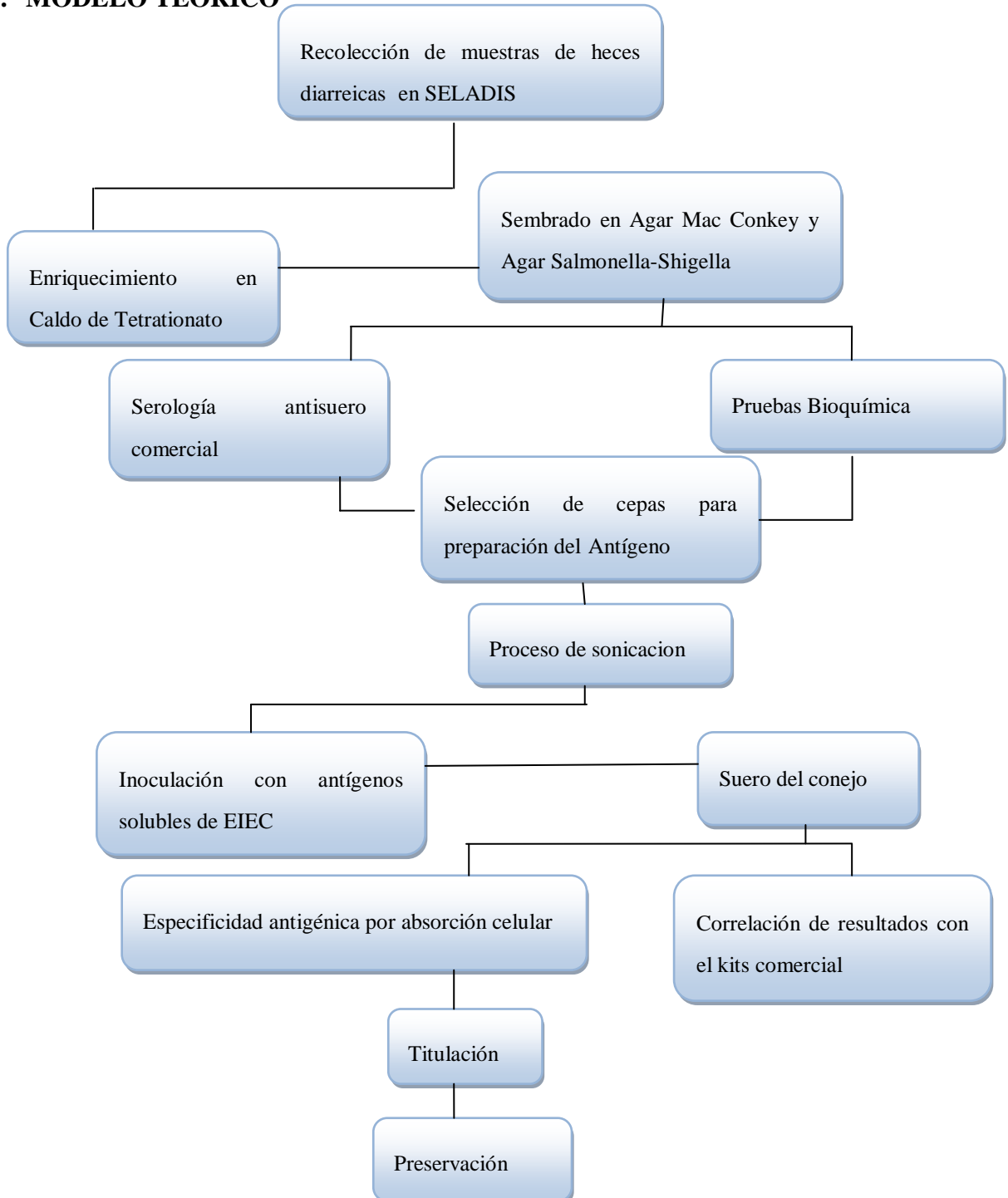
- ◆ Cajas Petri
- ◆ Viales
- ◆ Tubos de rosca de 10 ml
- ◆ Micropipetas de 1000 ul
- ◆ Micropipeta de 100 ul.
- ◆ Gradilla.
- ◆ Mechero
- ◆ Tubos colectores.

3. Reactivos:

- ◆ Agua destilada estéril (Bidestilada)
- ◆ Glicerol farmacéutico
- ◆ Agar Mac Conkey (Bio bras)
- ◆ Agar KIA (Difco)
- ◆ Agar LIA (Difco)
- ◆ Agar Citrato Simona (Bio Bras)
- ◆ Agar SIM (Bio Bras)
- ◆ Antisueros contra EEIC (Promier- Brasil)

VIII .DISEÑO METODOLÓGICO

1. MODELO TEÓRICO



A. Población de estudio

Se tomó como población de estudio a todas las muestras para coprocultivo remitidas al Laboratorio de Microbiología del Instituto SELADIS, entre los meses de Agosto a Noviembre del año 2005, cuyo agente causal del proceso diarreico fue confirmado por un métodos convencionales de cultivo y pruebas bioquímicas e identificación por un kitt serológico comercial contra *Escherichia coli enteroinvasiva*.

B. Diseño del estudio

Este estudio corresponde a un diseño experimental descriptivo

C. Aislamiento de la cepa:

Las muestras para coprocultivo que fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología del Instituto SELADIS, con procesos diarreicos y sospecha de infección fueron procesadas de la siguiente manera:

Se enriquecieron en caldo de Tetrionato por 2 horas previas a 35 °C, para luego ser sembradas en Agar Mac Conkey y Agar Salmonella – Shigella (SS) e incubadas a 35° y 37°.

Las colonias caracterizadas como lactosa positiva, se sometieron a pruebas bioquímicas, para determinar si se trataba de *Escherichia coli*. Para ello se realizó una batería de pruebas Bioquímicas con Agar Kliger o Agar TSI, Lisina descarboxilasa, Motilidad indol ornitina (MIO), Citrato Simons, Sulfuro indol motilidad (SIM) y Urea.



Fig.9 Pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* donde se observa la Prueba del TSI o KIA, LIA, MIO, Citrato, SIM, Urea (pruebas para identificación de microorganismos. <http://diagnosticopatya.blogspot.com/2008/10/>)

1.1. Caracterización serológica:

Las 50 muestras procesadas y confirmadas como *Escherichia coli*, fueron sometidas a una prueba serológica con antisueros comerciales por el método de aglutinación en placa con antisueros comerciales.

Se tomó una colonia de la muestra sembrada en Agar Mac Conkey, y se disolvió con solución fisiológica tanto en placa como en tubo para evaluar la presencia o ausencia de aglutinación.

1.1.1. Pruebas en placa

Para realizar esta prueba, se colocó en un portaobjetos una gota de solución fisiológica y se le agregó una colonia de la bacteria ya aislada, se mezcló de manera homogénea, y se le

añadió una gota del Antisuero comercial, mezclando manualmente o con ayuda de un vortex de placas automático.

Se consideró positivo si se presentó una aglutinación, que podía ser observada tanto macroscópicamente (a simple vista), como por microscopia (microscopio con un aumento de 10X). Se consideró negativa, cuando se evidenció la ausencia de aglutinación

En caso de colonias que no se disgregaron totalmente por ser colonias muy secas o rugosas, para ello se disolvió una colonia en un tubo de hemólisis con solución fisiológica en un volumen de 0,5 ml. se mezcló en forma mecánica con ayuda de un vortex. Se tomo una alícuota de 50 ul. del homogenizado y se mezcló con una gota del antisuero comercial.

1.2. Obtención del Antígeno de *Escherichia coli* enteroinvasiva

La obtención del antígeno (anti-antígeno de *Escherichia coli* enteroinvasiva se realizó a partir de las 15 cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, que habían sido discriminadas con pruebas Bioquímicas (galería de pruebas bioquímica) y serología (uso de antisueros comerciales) de las 50 cepas de *Escherichia coli*.

Se tomó con un asa bacteriológica una colonia de cada una de las 15 muestras seleccionadas, y se las disolvió en solución fisiológica (1 ml), esto para obtener un pool de bacterias que agruparon la mayor cantidad de serogrupos posibles.

Se debió hacer un ajuste de la concentración celular a 1×10^8 células/ ml escala de Mc. Farland 0,5.

Luego la suspensión bacteriana obtenida fue sometida a un proceso de sonicación por una hora a máxima amplitud, proceso realizado a 4° C para evitar cambios estructurales en las proteínas.

El producto del sonicado que presentaba ausencia de desarrollo bacteriano en Agar MacConkey y Agar Sangre, fue centrifugado a 1.500 rpm. Se utilizó el sobrenadante del centrifugado y se transfirió a un tubo estéril.

Se alicuotó en volúmenes de 150 ul, para evitar contaminaciones y se guardaron a -20 °C, hasta el momento de su uso.

1.3. Producción de anticuerpos contra *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Siguiendo un esquema de sensibilización rápido de antígeno sin adyuvante se procedió a trabajar con los conejos de castilla (*Oryctolagus cuniculus*) que tenían un peso inicial de 2 Kg, previos a la fase experimental.

Se siguió un protocolo rápido de inoculación, se inyectó 150 ul del antígeno atenuado soluble al conejo en estudio, utilizando para ello la vía intravenosa (vena media de la oreja del conejo).

Para la fase de inmunización se siguió el siguiente esquema: en las dos primeras semanas se inoculó a los conejos siete dosis de antígeno de 150 ul. Realizando el proceso día por medio.

En la tercera, cuarta y quinta semana se inoculó una dosis. Y finalmente en la sexta semana se aplicó una última dosis, haciendo un total de once inoculaciones para el animal de experimentación.

Después de haber transcurrido una semana de finalizado el proceso de inmunización, se tomó 5 ml. de sangre venosa del conejo. Para verificar si se había producido los anticuerpos contra *Escherichia coli enteroinvasiva* y no así un fenómeno de tolerancia al antígeno administrado.

Se realizaron pruebas de comparación por duplicado del antisuero obtenido con el antisuero comercial, donde se observó aglutinación positiva para ambos casos contra la cepa de *E. coli enteroinvasiva*.

Pasada la prueba anterior, se realizó una punción cardíaca al conejo de experimentación, obteniéndose 25 ml de sangre total, separando el suero del resto de componentes de la sangre que contenía los anticuerpos de *Escherichia coli enteroinvasiva*.

El suero obtenido se probó contra colonias de *Escherichia coli enteroinvasiva* previamente identificadas, se verificó así que se presentaba aglutinación

2. Determinación de la especificidad del antisuero obtenido:

La verificación de especificidad del antisuero obtenido, se realizó con pruebas de aglutinación frente a otras cepas de Enterobacterias, logrando descartar posibles reacciones cruzadas. Estas cepas fueron aisladas de muestras remitidas al Instituto SELADIS, las que fueron previamente identificadas con pruebas bioquímicas en género y especie en el Laboratorio de Microbiología.

Las cepas aisladas fueron caracterizadas como: *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* y *Escherichia coli enteropatogena*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. Además se utilizó cepas de *Escherichia coli* no patógena, que se eligieron al azar como control negativo (10 muestras), con las que también se realizó pruebas de aglutinación, por duplicado tanto con el antisuero comercial como con el obtenido en este estudio.

3. Proceso a la inducción de especificidad

Se verificó la especificidad del antisuero obtenido contra otras enterobacterias, por absorción, probando el antisuero contra otras especies como *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* y *Escherichia coli enteropatogena*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia coli no patógena*.

Para dicho propósito se preparó una suspensión bacteriana de 3ml de la cepa elegida a una concentración celular de 1×10^8 de la escala 0,5 de Mac Farland, al que se adicionó 3 ml. del antisuero obtenido. Ambos fueron homogenizados y luego incubados durante 10 min a $37^{\circ} C$ otorgando las condiciones necesarias para que se efectuó la unión antígeno-anticuerpo.

Pasada una hora, se centrifugo a 8.000 rpm por 20 min., se guardó el sobrenadante en tubos de ependorf nuevos y se desecho el sedimento (unión antígeno – anticuerpo).

Este proceso de absorción evitó la presencia de anticuerpos contra otras cepas de Enterobacterias con las podría existir una reacción cruzada.

4. Titulación del antisuero contra *Escherichia coli* enteroinvasiva:

Se utilizó dos métodos diferentes para obtener el título del antisuero obtenido en forma experimental.

4.1. Titulación por método en tubo del antisuero.

Se realizó diluciones dobles seriadas del antisuero obtenido, se dispuso de una serie de 7 tubos, uno con 1 ml de solución fisiológica y los demás con 0,5 ml siguiendo el siguiente protocolo de dilución.

DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Control (-)
Nº de pozo	1	2	3	4	5	6	7	8
Antisuero ul.	100	50	50	50	50	50	50	-
Sol. fisiol. ml	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Antígeno ul	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA Nº 4 Esquema de diluciones para la determinación del título aglutinante del antisuero contra *E.coli* enteroinvasiva.

Se mezcló con el antígeno añadiendo 0,5 ml de la suspensión de *E. coli* enteroinvasiva obtenida de un cultivo puro a cada uno de los tubos, incluido el número 7. Hay que tener en cuenta que cada tubo quedó diluido a la mitad. Se incubó a 37°C durante 24 horas, se tapó los tubos con para film 3 mm para evitar la evaporación de la solución.

La lectura de los tubos con células en suspensión (densidad óptica homogénea o similar a la del tubo control negativo) se consideró negativo.

Los tubos con grumos o agregados celulares en el fondo (densidad óptica menor a la del tubo control negativo) se consideró positivo. El resultado se expresa como título, que es igual al factor de dilución del último tubo positivo. (Díaz, Ramón, Gamazo Carlos, 2011)

4.2. Titulación por método de placa del antisuero:

Se utilizó placas de ELISA de base plana, en las que se realizó las diluciones. Se mezcló 100 ul. de suspensión de la bacteria y 50 ul. de antisuero, diluido en serie, se mezcló por 30 segundos en un rotor y luego se cargó en portaobjetos realizando la verificación de la aglutinación tanto en forma visual, como al microscopio.

DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Control (-)
Nº DE POZO	1	2	3	4	5	6	7	8
Antisuero ul	50	50	50	50	50	50	50	-
Sol. fisiol. ul	-	50	50	50	50	50	50	50
Antígeno ul	100	50	50	50	50	50	50	50

TABLA Nº 5 4 Esquema de diluciones para la determinación del título aglutinante del antisuero contra *E.coli enteroinvasiva*.

5 Conservación del antisuero.

Luego de la Titulación del antisuero producido contra *Escherichia coli enteroinvasiva* se lo conservó a -20 °C, previamente se hizo una mezcla volumen a volumen con glicerol grado farmacéutico. Finalmente se filtró utilizando millipore de 0,22 um de poro para eliminar cualquier partícula extraña.

IX. RESULTADOS

1. Obtención del antisuero:

1.1 Tipificación de cepas de E.coli enteroinvasiva.

Se aislaron 50 cepas de *Escherichia coli* de muestras de heces de coprocultivos que fueron remitidos al Laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS entre los meses de Agosto a Noviembre de la gestión 2005.

A las muestras se les realizó las pruebas Bioquímicas correspondientes y con las que se identificó *Escherichia coli* (*anexo 1*), inmediatamente fueron sometidas a pruebas serológicas con el uso de antisueros comerciales (bioBras de procedencia Argentina) con lo que se determinó solo 15 cepas de *Escherichia coli enteroinvasiva*.

Las otras cepas eran de otras Enterobacterias como *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, otras subespecies de *Escherichia coli*, siendo en su mayoría *Escherichia coli* no patógena.

TABLA N° 6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 15 CEPAS DE ESCHERICHIA. COLI ENTEROINVASIVA

N° de cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Prueba Bioquímica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Kliger	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
*SIM	- + +	- ++	- ++	- ++	- ++	- ++	- +-	- ++	- ++	- +-	- ++	- ++	- ++	- ++	- ++	- ++
*MIO	+ +-	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ +-	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	
Voger Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Citrato positivo, fermentadora de lactosa, sulfuro negativo, motilidad positiva e indol positivo, LIA positivo, Voger Proskauer negativo y Rojo de Metilo positivo.

TABLA N° 7: Determinación serológica por antisuero comercial

Numero de cepas	Serología positiva	Serología negativa
50	15	35

Determinación serológica evaluada por el uso de antisueros comerciales, obteniéndose 15 cepas positivas para *E. coli* enteroinvasiva y 35 cepas con serología negativa que solo corresponden a *E. coli* no patógena.

Las 15 cepas obtenidas fueron empleadas como pool para la producción antígeno soluble que luego fue sometido a un proceso de sonicación. Para tal efecto se evaluó el tiempo óptimo para la producción del antígeno soluble de *E. coli* enteroinvasiva.

Se comenzó con un ciclo de 30 segundos, se fue aumentando el tiempo paulatinamente hasta confirmar que a los 60 min, se obtenía el antígeno solubilizado y atenuado, hecho demostrado por la ausencia de crecimiento bacteriano luego de sembrar alícuotas de los diferentes tiempos propuestos del sonicado en medios de cultivo como Agar Mac Conkey y Sangre, tal como se observa en la Tabla N° 8

TABLA N°8. Tiempo de sonicacion

Tiempo Sonicación	Repique Agar Mac Conkey	Repique Agar Sangre
30 seg	Desarrollo	Desarrollo
3 min.	Desarrollo	Desarrollo
15 min.	Desarrollo	Desarrollo
30 min.	Desarrollo	Desarrollo
45 min.	Desarrollo	Desarrollo
60 min	Sin Desarrollo	Sin Desarrollo

2. Inoculación de antígeno atenuado :

El proceso de sensibilización en el conejo (animal de experimentación), se realizó en los once días estimados según el esquema de inmunización de la Tabla N° 3.

Cumplidos los catorce días de haber comenzado el proceso de inmunización, se tomó una muestra de 5 ml de sangre total, de la cual se obtuvo suero.

Se comenzó realizando pruebas con este suero obtenido como si se tratara del comercial, evidenciándose la aglutinación con la cepa de *E. coli enteroinvasiva*.

Se realizó una prueba previa con las cepas de *E. coli enteroinvasiva* para luego compararlos con los resultados del antisuero comercial, observándose el mismo grado de aglutinación con ambos antisueros.

3. Especificidad del Antisuero contra otras especies de Enterobacterias.

Obtenido el antisuero se verificó la especificidad del mismo. Se probó el antisuero obtenido contra otras cepas de Enterobacterias caracterizadas y tipificadas con anterioridad en el laboratorio de Microbiología del Instituto SELADIS.

Se trabajo con cepas de *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Entorobacter* y *Escherichia coli enteropatogena*, a demás de *Escherchia coli no patógena*.

Se preparó una suspensión bacteriana (concentración 1×10^8 células / ml. 0,5 en la escala de Mac Farland) de cada una de las cepas anteriormente citadas de las que se tomó una alícuota de 50 ul. Y se le agrego 50 ul del antisuero obtenido.

Se mezcló y se evidenció como se muestra en la Tabla N° 9 la ausencia de aglutinación o prueba negativa para las cepas de *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Escherichia coli no patógena*. Y se evidencio presencia de aglutinación o prueba serológica positiva para las cepas de *Shigella*, *Escherichia coli enteropatogena* y por supuesto la cepa de *Escherichia coli enteroinvasiva*. Las pruebas se realizaron por duplicado y se confirmó el mismo resultado, descartando interferentes o falsos positivos.

TABLA N° 9 Pruebas de aglutinación del antisuero contra cepas de otras Enterobacterias

<i>Microorganismos</i>	<i>Resultado de aglutinación observación directa</i>	<i>Resultado de aglutinación por observación microscópica</i>
Shigella spp.	+	+
Salmonella spp	-	-
Enterobacter	-	-
Proteus	-	-
E.coli no patógena	-	-
E.coli enteroinvasiva	+	+
E.coli enteropatogena	+	+

Se observo aglutinación con las cepas de *Shigella*, *Escherichia coli enteropatogena* y *Escherichia coli enteroinvasiva*

4. Adsorción de anticuerpos de Shigella y E. coli enteropatogena.

En las reacciones cruzadas del antisuero obtenido que se presentaron, con las cepas de *Shigella* y *Escherichia coli enteropatogena*, se sometió a un proceso de adsorción celular (Antígeno-anticuerpo), mezclando volúmenes iguales del antisuero con una suspensión

bacteriana, llevándola luego a Baño Maria por 10 minutos, y se centrifugó a 8.000 rpm. Eliminando el precipitado y almacenado el sobrenadante.

Como se observa en la Tabla N° 10, se realizó pruebas de aglutinación en placa, con el sobrenadante obtenido en un volumen de (50 ul.) contra una suspensión de una colonia de cepa pura de *Shigella* y *Escherichia coli enteropatogena*, en el mismo volumen, para su observación macroscópica y por microscopia de una reacción negativa o serología negativa, y se observó solo aglutinación positiva o reacción serológica positiva con la cepa de *Escherichia coli enteroinvasiva*. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado.

Tabla N° 10. Pruebas de especificidad del antisuero después del proceso de adsorción.

<i>Bacteria</i>	<i>Resultado de aglutinación observación directa</i>	<i>Resultado de aglutinación por observación microscópica</i>
<i>Shigella</i>	-	-
<i>E.coli no patógena</i>	-	-
<i>E. coli enteropatogena</i>	-	-
<i>E .coli enteroinvasiva</i>	+	+

Prueba de aglutinación con las cepas de *Shigella* y *Escherichia coli enteropatogena* y *Escherichia coli no patógena* como control negativo Se observó solo aglutinación positiva con la cepa de *Escherichia coli enteroinvasiva*.

5. Titulación del antisuero obtenido:

4. 1. Titulación del antisuero obtenido por el método de placa

Se realizó diluciones por duplicado en los pocillos de la placa de Elisa, donde se observó a través del microscopio y en forma visual, la aglutinación en el fondo hasta la dilución 1:64, además de verificarse la falta de aglutinación en el pocillo del control negativo.

TABLA N° 11. Título del antisuero por el método de titulación en placa

DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Control (-)
N° DE POZO	1	2	3	4	5	6	7	8
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	-	-

Se observa aglutinación hasta el pocillo 6, mostrando un título de 1:64, control de calidad muestra al pocillo 8 sin aglutinación, confirmándolo como control negativo de la prueba.

5. 2. Titulación del antisuero por el método de tubo:

Se realizó diluciones dobles seriadas del antisuero obtenido, se observó turbidez hasta la dilución 1:64, y confirmándose la ausencia de turbidez en el tubo del control negativo.

TABLA N° 12. Título aglutinante del antisuero por el método de titulación en tubo

DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Control (-)
N° de pozo	1	2	3	4	5	6	7	8
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	-	-

Se observa aglutinación hasta el pocillo 6, mostrando un título de 1:64, control de calidad se muestra al tubo 8 sin aglutinación, confirmándolo como control negativo de la prueba

Se consideró el método de titulación en tubo como más práctica para su uso en un estudio de esta índole, debida a su facilidad y mejor interpretación de resultados y revisión macroscópica.

6. Conservación del antisuero obtenido.

Luego de la Titulación del antisuero producido contra *Escherichia coli enteroinvasiva*, se uso el glicerol grado farmacéutico para la conservación del antisuero.

X. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se inoculó antígenos solubles de *Escherichia coli* enteroinvasiva a conejos de experimentación a una concentración de 1×10^8 células / ml 0,5 de la escala de Mac Farland, la inoculación de antígenos se realizó por vía venosa a concentraciones mayores a 1×10^8 UFC/ml, lo que indujo en los animales de experimentación aumento de la temperatura y estrés. Se eligió dicha vía debido a que se pretendía obtener anticuerpos del isotipo IgG.

En el trabajo publicado por Centro CENAVECE, de la Habana Cuba “Obtención de sueros contra *Vibrium cholerae*, se eligió la vía duodenal debido a que el interés era producir IgA tipo II, la cual es más resistente al pH y proteasas del tracto gastrointestinal, ambos trabajos pretendieron producir anticuerpos contra una Enterobacteria

El proceso de sonicación a diferencia del trabajo realizado en Bogotá, se tuvo que estandarizar el tiempo de sonicación, porque a diferencia de este trabajo, en el estudio mencionado se utilizó un ciclo de 30 seg, pero en nuestro estudio se necesitó un ciclo de una hora a demás se usó solución salina, para que el producto resultante después de la hora de sonicación fuera transparente en cambio con PBS, después de una hora de sonicación, produjo un producto negrozco.

Por otra parte en un trabajo similar realizado en Bogotá se realizó ciclos más cortos pero eran ciclos que se repitieron por tres veces y con solución PBS.

Se cumplió con el mismo protocolo que propusieron en este mismo trabajo para verificar que se había atenuado el antígeno, sembrando alícuota del sonicado en medio de Agar Sangre y Agar Mac Conkey, mientras que ellos usaron medio modificado LST con MUG.

El control del proceso de sonicado fue para evitar el riesgo de inocular microorganismos vivos por vía sistémica en el animal de experimentación, hecho que podría producir la muerte de éste por activación de un proceso inflamatorio sistémico, desencadenado por citoquinas pro inflamatoria producida en respuesta al Lipopolisacarido bacteriano u otras toxinas bacterianas.

En otros trabajos de producción de antisueros se ha empleado animales más grandes como corderos mientras que debido a criterios de espacio y practicidad se decidió elegir conejos de castilla.

En el trabajo de la Universidad de Bruselas se obtuvo anticuerpos policlonales contra las fimbrias de la cepa de *E. coli* y se uso adyuvante de Freud, debido a que las fimbrias están constituidas en gran proporción por polisacáridos que las hacen poco inmunogénicas.

En este trabajo también se uso una proteína fimbrica pero sin adyuvante de Freud, ya que había un alto contenido proteico que fácilmente estimula la producción de anticuerpos IgG.

Se eligió dos formas de titulación tanto la de tubo, como la de titulación en placa, para confirmar el título del antisuero obtenido, a demás de haberse concluido que el protocolo de titulación en tubo es el más sencillo debido a que se puede observar macroscópicamente la aglutinación y no así la Titulación en placa que requiere observación a través de un microscopio.

Se comparó el antisuero obtenido con el kitt comercial utilizado para la identificación de *E. coli enteroinvasiva* observándose una aglutinación similar entre ambos antisueros, cabe notar que es más intensa la aglutinación del kitt comercial, sin desmerecer al antisuero obtenido.

XI. CONCLUSIÓN

Se ha logrado optimizar las condiciones de producción de antígeno soluble de *Escherichia coli enteroinvasiva*, definiendo las condiciones necesarias del ensayo para la producción de antígeno atenuado, dirigido a la inoculación del animal en experimentación logrando así un modelo para la producción de antisuero a partir de cepas de *Escherichia coli enteroinvasiva* aisladas en el laboratorio.

Se ha logrado corregir las variables correspondientes como el tiempo de sonicación y el empleo de solución fisiológica en lugar de PBS para eliminar el riesgo de inocular microorganismos no atenuados que puedan involucrar un proceso sistémico no deseado, habiéndose obtenido los anticuerpos IgG deseados contra *Escherichia coli enteroinvasiva*.

Se ha logrado eliminar el riesgo de reacciones cruzadas con otras Enterobacterias por un proceso de adsorción garantizando la especificidad del antisuero producido.

Lo anteriormente mencionado, permitió lograr la producción del antisuero con un Título aglutinante de 1:64, en base a una respuesta inmune innata en el animal de estudio, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten demostrar la capacidad que tenemos de producción de anticuerpos de origen policlonal específicos contra un patógeno dado y abre la posibilidad de posteriores estudios en caminados a la producción de otro tipo de antisueros destinados a detectar Enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli enterohemorrágica*

Este trabajo muestra una investigación aplicada que puede ayudar al diagnóstico de laboratorio mediante la producción de kits serológicos caseros que coadyuven a un diagnóstico oportuno y eficiente y con similar especificidad y sensibilidad diagnóstica a la

de los kitts de aglutinación que son de difícil adquisición por parte de las Empresas Importadoras, a demás de ser un punto de partida para posteriores trabajos epidemiológicos en nuestro país.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ENCUESTA NACIONAL DE DEMOGRAFIA Y SALUD (ENDSA) 2011. Salud del Niño.
2. UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA DE ICA, Perú, 2012, Facultad de medicina humana, Alcides Carrión "Diarrea aguda infecciosa (<http://www.slodeshare.net>)
3. SEDES, Escuela de Salud de ciudad de La Paz. 2010 (www.sedeslapaz.gob.bo/index)
4. INFECCIÓN POR ESCHERICHIA COLI, HEALTHWISE, publicado el 13 de febrero del 2011 (<http://salud.univision.com/es/mini/infecci%C3%B3n-por-e-coli>)
5. DEL PUERTO CARMEN, et all "Sistema de lotes de Siembra de la cepa vacuna *Vibrio cholerae*" Instituto finlay. Centro de Investigacion-Produccion de vacunas y sueros. Ciudad de la Habana. Cuba. Vaccin Monitor Año 13 No. 1 Enero- Marzo del 2005 y revisado en Octubre 2010 (<http://www.journaldatabase.org>)
6. WINN, ALLEN, JANDA, KONEMAN "Diagnostico en Microbiologia", 6ta Edicion, Editoria Panoramica, 2008, Argentina.
7. LAVIGNE, JEANDROT, C. LECHICHE marzo 2008. "Toxiinfecciones alimentaria colectiva (TIAC)" Acta Bioquim. Clin. Latiam.v.42 n.1. L Plata.
8. CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS DE E. COLI, mayo 2012 <http://www.buenastareas.com/ensayo/Caracteristicas-Morfologicas-De-Escherichia>.
9. ALVAREZ MIRIAM, BUEZA JAVIER, España 2008 "Procedimientos en Microbiologia Clinica" Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas-Microbiologia Clinica. (Diagnostico microbiológico de las infecciones gastrointestinales).
10. CORDERO ZEBALLOS CARLOS, MÉNDEZ VARGAS CARLOS. BALLÓN RICARDO. Mayo 2012 "Diarrea en niños" .Revista Médicos Familiares Pol. 18 de (www.scielo.cl)

11. HANNAOUI RODRÍGUEZ ERICKA JOSEFINA, VILLALOBOS LUZ , 2009, Venezuela “Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología; revisión *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v29n1/art04.pdf
12. BENJAMÍN FRANKLIN, (2011) México, D.F. C.P. 11800 (<http://www.cenavece.salud.gob.mx>).
13. ROMÁN ENRIQUETA, y colaboradores 2009 “Diarrea aguda” (<http://aeped.es/prtovcolos/gastroentero/2.pdf>)
14. JURE, S. CONDORI, et. all Diciembre de 2010. “Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán” Rev. Argentina. Microbiología Vol 42.No 4. Buenos Aires. (<http://www.scielo.org.ar/scielo.php>)
15. TODAR, K., 2008“Pathogenic *E. coli*” /University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, (<http://www.textbookofbacteriology.net>)
16. LUQUE ANGELICA, MERCADO ERICK, Lima 2010 “Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia Coli* enteropatógena (EPEC) “Revista Gastroenterol .Perú, Volumen 30, No 2. (<http://www.scielo.org.pe>)
17. CENA VECE. Producción de antisueros en 2011, ciudad de México. (<http://www.cenavece.salud.gob>)
18. VARELA G, CHINENE I. Et. al,Abril /Junio de 2008. “Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay” Rev. Argentina. Microbiología. Vol 40 No 2
19. LOPEZ-ALVAREZ, México 2001“*Escherichia coli* mecanismo de patogenicidad” Departamento de Bacteriología – Facultad de Medicina. (www.fm.vz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/)

20. CELY ROCIO, ET AL "Producción de la proteína de choque HSC70 recombinante en Escherichia Coli BL 21 (DE3) para generar anticuerpos poli clónales", Revisado facultad de medicina unal. volumen 54 numero 3 Bogotá jul. 2006. (www.espatentes.com)
21. LEDÓN TALENA, FERRÁN BEATRIZ, VICHI JOIVIER, et al 2010 "Evaluación en modelos animales de cepas vivas atenuadas de vibrio cholerae O13" Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, pp. 1-12, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (<http://www.redalyc.org/>)
22. UNICEF "La Mortalidad infantil baja en el mundo; Bolivia mantiene índices"
23. INFORME 2012. (<http://www.la-razon.com/sociedad/mortalidad-infantil-Bolivia>)
24. OMS, Centro de Prensa "Enfermedades diarreicas 2013" (<http://www.who.int>)
25. HARRIS Y ARANCIBIA, 2010 "Diarrea Aguda con deshidratación", Rev. Universidad Católica de Chile ([http://escuelamed.puc.cl/publicación/pediatria/Hospital/diarrea Aguda.html](http://escuelamed.puc.cl/publicación/pediatria/Hospital/diarrea%20Aguda.html))
26. HANNAOUI ERIKA Y COLABORADORES "Escherichia coli diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. 2010. (<http://www.scielo.org.ve/pdf/ic/v51n4/art06.pdf>).
27. ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRAGICA, 2013 (<http://www.slideshare.net/NicolsTeruel/escherichia-coli-enterohemorrhagica>)
28. IGUCHI A, THOMSON NR, OGURA Y, SAUNDERS D, OOKA T, HENDERSON IR, HARRIS D, et al. 2009. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69. J Bacteriol. Jan 191 (1):347-54. doi:10.1128/JB.01238-08

29. INFECCION POR ESCHERICHIA COLI. ECURED,2016,
http://www.ecured.cu/index.php/Anexo:Infecci%C3%B3n_por_Escherichia_coli
30. GARCIA Y F. RODRIGUEZ, Enterobacterias, ,servicio de med int,complejo hospitalario,
31. ESPAÑA,2010http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
32. <http://www.infobae.com/2011/06/04/1026462-la-bacteria-e-coli-se-transmite-persona-persona>

ANEXOS

Figura N° 1



Fig. 1. Se observan colonias lactosa positivo de E. coli en Agar Mac Conkey.

Figura N° 2



Fig N °2 Se observan colonias de E. coli en Agar MacConkey y en Agar S.S.

Figura N° 3



Figura N°3. Proceso de sonicacion de la suspensión bacteriana aislada partir de colonias de *E. coli enteroinvasiva* que han sido determinadas previamente con un antisuero comercial

Figura N °1



Fig. N 1. Esquema de Inmunización de conejos, 2011 por InDRE

Figura N°4



Fig.N°4. Galería de pruebas Bioquímicas que se realizan para identificar una cepa de *Escherichia coli* , en la fotografía de izq a der se observa el tubo de Citrato, urea, Kligler, Lisina, Mio, Sim con la prueba de Indol positiva, VP, Rojo de Metilo y APP.