

Enfermedades Infecciosas y Microbiología

Volumen **22**
Volume

Número **3**
Number

Julio-Septiembre **2002**
July-September

Artículo:

E. Investigación básica

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

E-01

DESARROLLO DE UN PCR MULTIPLEX PARA IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA

Cerna Cortés J.*§; Nataro J. * y Estrada García T. §. §Dpto. de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN. México, D. F., *CDV Dpto. de Pediatría, Escuela de Medicina, Baltimore, Maryland.

Introducción: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) ha sido implicado como agente etiológico causal de diarrea persistente tanto en niños en países en vías de desarrollo, así como en países industrializados. Este organismo es definido por su patrón de adherencia agregativa sobre células HEP-2, sin embargo no todas las cepas de *E. coli* con este patrón son patógenas. Por lo que hay un deseo de basar la detección de estas cepas en la presencia de factores de virulencia. Varios de estos factores han sido localizados en un plásmido de 60-65 MDa, que recibe el nombre de adherencia agregativa (AA), dentro de este plásmido se incluyen el gen AspU que codifica para una proteína de 14 kDa y el gen AggR, el cual codifica para el activador transcripcional de la fimbria de adherencia agregativa (AAF/I). **Objetivo:** Este trabajo tuvo como fin el desarrollo de un PCR múltiplex para identificar y caracterizar cepas de EAEC patógenas. **Métodos:** Se seleccionaron iniciadores que reconocen regiones conservadas, para el gen AspU los iniciadores fueron diseñados en nuestro laboratorio, así como un iniciador para AggR, mientras que los otros tres iniciadores incluyendo los dos que reconocen el fragmento del plásmido AA (sonda AA o CVD432) fueron obtenidos de la literatura. El PCR múltiplex se estandarizó utilizando las cepas de EAEC de referencia: O42, JM221 y 17-2. Como control negativo se utilizaron las cepas de referencia 3030 y K12. Se realizaron ensayos de sensibilidad y especificidad. Para los ensayos de especificidad se utilizaron otras cepas patógenas de *E. coli*: ETEC 10407 (O78:H11), EHEC EDL933 (O157:H7) y EIEC E11 (O124:NM). Mediante este PCR múltiplex se analizaron varias cepas de EAEC de la colección del Dr. James Nataro previamente caracterizadas por ensayos sobre células HEP-2 y por colony blot utilizando sondas para los genes *AspU*, *AggR* y para el fragmento del plásmido AA. **Resultados:** Se realizó la estandarización del PCR múltiplex para EAEC, utilizando para ello la amplificación de los genes *AspU*, *AggR* y del fragmento del plásmido AA, cuyos productos del PCR son de 320, 457 y 629 pb respectivamente. La sensibilidad de esta técnica es de 471 ufc. No hubo amplificación con las cepas de referencia 3030, K12, EHEC, ETEC y EIEC. Existe una alta correlación entre el PCR múltiplex desarrollado y los ensayos sobre células HEP-2 y colony blot. Parece ser que las cepas aisladas de pacientes con diarrea presentan los tres factores de virulencia. **Conclusiones:** El PCR múltiplex desarrollado es específico y sensible. Está metodología permitirá realizar estudios epidemiológicos amplios de EAEC, lo cuál puede incidir en un tratamiento y en una profilaxis adecuada.

E-02

MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER GÁSTRICO EN GERBOS INDUCIDO POR HELICOBACTER PYLORI. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE APOPTOSIS

Gamboa-Domínguez A¹; Cervantes-González Ma^{2*}; Romano L¹; Ubbelohde T¹; Domínguez-Fonseca C²; Torres-Escobar A²; Juárez Rodríguez MD²; Ruiz-Palacios GM². ¹Departamento de Patología. ²Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCIMNSZ).

El adenocarcinoma gástrico es la 14ª causa de muerte en el mundo. En México el cáncer gástrico es la 2ª causa de muerte por tumores malignos. *Helicobacter pylori* es un carcinógeno tipo I asociado a neoplasias en estómago. La alta prevalencia de la infección en humanos contrasta con la baja incidencia de lesiones malignas en ese órgano, por lo que deben existir factores adicionales que sinergicen sus efectos. **Objetivos:** 1.- Identificar si el efecto carcinogénico de *H. pylori* se potencia con dos factores predisponentes de cáncer gástrico: dieta alta en sal y estrés. 2.- Caracterizar las alteraciones del ciclo celular de las células epiteliales gástricas en presencia de *H. pylori* utilizando los indicadores de alteración del ciclo celular: p53, p21, PCNA (Antígeno de Proliferación Nuclear Celular) y apoptosis mediante la técnica de TUNEL. **Metodología:** Estudio prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental. Con 280 gerbos (*Meriones unguiculatus*) hembras de 8 semanas de vida, libres de patógenos, se conformaron 7 grupos de 10 animales para sacrificarse en las semanas 1, 12, 52 y 68. Los grupos de *H. pylori* fueron inoculados con la cepa *Sydney*; estos fueron de la siguiente forma: *H. pylori*, dieta rica en sal (sal), N-methyl-N-nitrosourea (MNU), estrés, *H. pylori* + sal, *H. pylori* + estrés, y control. Los grupos se evaluaron en forma cegada de acuerdo a los siguientes criterios de lesión como son: inflamación, hiperplasia, atrofia, metaplasia, displasia y adenocarcinoma. Se hicieron tinciones inmunohistoquímicas de tejido desparafinado para p53, p21, PCNA y TUNEL. **Resultados:** Hasta el momento los grupos de las semanas 1 y 12 han sido sacrificados y analizados, observándose sinergismo en el desarrollo de gastritis de antro y cuerpo en los grupos de *H. pylori* + sal y *H. pylori* + estrés. El desarrollo de displasia

se presentó únicamente en la semana 12 en los grupos: *H. pylori*, *H. pylori* + sal, *H. pylori* + estrés. La expresión de p53 y PCNA se observó en mayor medida en los grupos con sinergismo de sal y estrés. Además, se observaron cambios de ciclo celular mediante la técnica de TUNEL en los grupos de *H. pylori* + sal. No se identificaron células marcadas con p21 en ninguna de las fases analizadas. **Conclusiones:** *H. pylori* se asoció al desarrollo de gastritis folicular, metaplasia y displasia en la fase aguda de la infección por *H. pylori*. Existe mayor proliferación de células epiteliales en los grupos de sinergismo con sal y estrés. La expresión de p53 como marcador de apoptosis se asoció principalmente al grupo de *H. pylori* + sal.

E-03

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ADENOVIRUS

Díaz de Jesús Benita*, Melo Munguía Martín, Astivia Anievas Rocío, Terán Vega Lizbeth, Soto Aburto Gisela y García Lozano Herlinda. Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). Carpio 470 México D.F. C.P. 11340. Tel/Fax 5342-0670. Correo electrónico: hgarcialozano@yahoo.com.mx

Introducción: Los Adenovirus (Ads) son la segunda causa de importancia en la gastroenteritis aguda después de los rotavirus. Están constituidos por una cápside proteica que protege al DNA viral de cadena sencilla (ssDNA); el tipo 40 (Ad40) y 41 (Ad41) están asociados con cuadros diarreicos. Se ha reportado, que las infecciones por Ads se presentan en niños menores de 2 años de edad y muestran muy poca variación estacional. En los países en desarrollo, existe una subnotificación de los casos de Ads debido a las limitaciones que existen en los métodos de diagnóstico. Estos virus presentan grandes dificultades para su aislamiento en cultivo celular; por lo tanto las técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han permitido grandes avances en el diagnóstico y caracterización molecular del virus. **Objetivo:** Detección de los Adenovirus por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de muestras diarreicas. **Material y métodos:** Se seleccionaron 42 muestras positivas a Ads por ELISA. Se sometieron a la amplificación del DNA viral por PCR con los oligonucleótidos Ads-1 y Ads-2. La extracción y purificación del genoma, se realizó por el kit QIAamp[®] DNA Blood de QUIAGEN. Las muestras diarreicas fueron de niños menores de 4 años procedentes de diferentes entidades geográficas durante el periodo 1999-2002. **Resultados:** La técnica de PCR se estandarizó utilizando el siguiente programa: 4 min a 94°C y 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 70°C, seguido de 7 min a 70°C y por último a 4°C. En el 69% de las muestras se obtuvo un producto de cDNA de 308 pb mientras que en el 31% no se observó dicho producto. **Conclusiones:** La PCR es un método alternativo para en el diagnóstico de los Ads. La purificación y eliminación de inhibidores presentes en heces es crucial para la optimización de la técnica. Los estudios epidemiológicos de las infecciones por Adenovirus serían de gran relevancia para conocer la prevalencia y estacionalidad del virus en el país.

E-04

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN *invA* DE SALMONELLA GALLINARUM

Figueroa Ochoa IM*, Verdugo Rodríguez A. Puente García JL.; López-Vidal Y. Departamento de Bacteriología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Objetivo: Determinar la presencia de *invA* en cepas de *S. gallinarum*; determinar el porcentaje de invasividad de las cepas, en cultivo de células epiteliales, definir la toxicidad en macrófagos y realizar mutagénesis dirigida insertando un casete de Km en *invA*. **Material y métodos:** Cepas de *Salmonella gallinarum* FVA-1, caldo y agar LB con y sin antibióticos, embriones de pollo Alpes II. Líneas celulares BAT, HeLa y macrófagos J774. Amplificación de la secuencia *invEABC* por PCR, interrumpir *invA* mediante el casete de Km. Clonar en pRE107 SacB, Ap^R digerido con *SalI-SstI*, obteniendo pMFO4. Transformar MFO4 en SY327 λ pir y conjugar con FVA-1. **Resultados:** Por medio de PCR se amplificó el gen *invA* de *S. gallinarum*, y se clonó directamente en el plásmido pCR-TOPO, obteniendo el plásmido pMFO1. Posteriormente el pMFO1 se digirió con *SalI-SstI* y el fragmento resultante fue clonado en el plásmido pKS, generando el plásmido pMFO2. Para realizar la mutación del gen *invA* se insertó el gen de resistencia a Km en los sitios de corte *Mlu-BamHI* construyendo el plásmido MFO3. Por otra parte se determinó el porcentaje de invasión de *S. gallinarum* cepa FVA1 el cuál corresponde al 0.89% \pm 0.32 en células HeLa y 0.07% \pm 0.03 en células BAT y 2.47 \pm 0.87 en macrófagos J774 y para *S. typhimurium* es del 5.69% \pm 0.89, 1.02 \pm 0.10 y 16.48 \pm 3.49 respectivamente. Así como el porcentaje de mortalidad, de macrófagos J774 infectados con ambas cepas; utilizando el colorante de exclusión azul de tripano y la observación de condensación de la cromatina al teñir los núcleos con yoduro de propideo. **Conclusiones:** Se tiene ligado el gen *invA* en el vector pCRT7 NT-TOPO (pMFO1) por lo que en trabajos futuros se puede expresar la proteína

InvA, así como complementar mutantes. *S. typhimurium* invade diez órdenes mas que *S. gallinarum*, la osmolaridad del medio juega un papel importante en la osmolaridad. A las 2h postinfección se detecta daño en la monocapa de cl BAT y HeLa, a las 6h la integridad de las monocapas está totalmente destruida. El daño en los macrófagos a las 2h postinfección es severo y a las 3h con *S. typhimurium* la mortalidad celular es mayor al 90% mientras que en los macrófagos infectados con *S. gallinarum* alcanza solamente el 65%. Conforme avanza el tiempo de infección aumenta el porcentaje de invasión y la citotoxicidad en macrófagos. Los macrófagos infectados con cepas de *Salmonella* presentan cambios morfológicos, tales como: redondeamiento celular, aumento de vacuolas citoplasmáticas y desprendimiento celular así como condensación y fragmentación del ADN, en una fracción del cultivo celular que depende de la cepa utilizada y del tiempo de infección. Se sospecha de la formación de loops en el operón ABC, entre el codón de inicio de *invB* y el de *invC*.

E-05

PATRÓN DE TERATOZOOSPERMIA EN INFECCIONES SEMINALES POR *C. TRACHOMATIS* Y *MYCOPLASMA* SPOBSERVACIONES BAJO MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRÓNICA

Dra. Guadalupe Gallegos-Ávila. Sección de Biología Celular y Laboratorio de Andrología del Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Introducción: Entre los parámetros seminales asociados a la infertilidad masculina están: la disminución del número, los defectos de la motilidad y vitalidad y las alteraciones morfológicas del gameto masculino. En décadas pasadas, estudios a nivel ultra estructural permitieron identificar defectos como la agenesia acrosomal, la ausencia de brazos de dineína, la disociación centriorial, la displasia de la vaina fibrosa y la descondensación de la cromatina, asociados a infertilidad masculina. Por otra parte, las infecciones por *Chlamydia Trachomatis* (*Ct*) y *Mycoplasma sp* (*My*), se encuentran presentes en más del 70% de los casos de infertilidad conyugal pero no hay una claridad en cuanto los mecanismos de patogenidad implicados a nivel celular. Un enlace entre los métodos microbiológicos y morfológicos puede ser útil para la caracterización de los mecanismos de lesión espermática en esas infecciones. **Objetivo:** Describir los cambios en la morfología espermática en pacientes infértiles, con infección por *Ct* y *My*. **Material y método:** Se seleccionaron 144 pacientes que acudieron para evaluación andrológica por infertilidad conyugal de causa no conocida y en los que se demostró la presencia aislada ó combinada de infección genital por *Ct*, *My*. Se incluyó un grupo control de 10 voluntarios sanos. En todos los casos se estudió la morfología espermática en Frotis Seminal Teñido por Método de Papanicolaou y en cortes finos del sedimento seminal, incluido en epoxiresina, por el método convencional. **Resultados:** A nivel de microscopia de luz, el porcentaje de espermatozoides de forma anormal fue de 70.4%. La presencia de vacuolas intranucleares (54%), la disminución del acrosoma (85%), la presencia de flagelos gruesos (40.8%), enrollados o plegados (81.5%) fueron los cambios observados con mas frecuencia. Con microscopio electrónico las deformidades nucleares y acrosomales fueron más evidentes observándose además la presencia de formaciones membranosas irregulares, múltiples secciones flagelares en espermatozoides con abundante citoplasma perinuclear, desarreglo y ausencia parcial de elementos de la vaina fibrosa y microtúbulos del axonema. El examen ultraestructural demostró que las vacuolas intranucleares y el citoplasma periflagelar contenían frecuentemente partículas de tipo bacteriano. Destacó también la consistente aparición de áreas de fusión entre membranas de espermatozoides y otras células presentes en el eyaculado. Abundantes partículas bacterianas de tamaño y forma compatible con *Ct* y *My*, se observaron tanto en el espacio extracelular como en el citoplasma de células inflamatorias con espermatozoides fagocitados. Las muestras analizadas del grupo control carecían de partículas bacterianas y presentaron un porcentaje menor (59.5%) de alteraciones, destacando los espermatozoides con excesivo citoplasma residual a nivel de la pieza media elongación del extremo apical del acrosoma. **Discusión y conclusiones:** Las infecciones seminales por *Ct* y *My*, cursan con lesiones espermáticas que generan un perfil de alteraciones morfológicas detectables a microscopia de luz y electrónica. La presencia de partículas bacterianas intranucleares puede estar en relación con la "avidez" por DNA extraño reportada para la cromatina espermática; el incremento de la capacidad fagocítica de las membranas espermáticas puede explicar el fenómeno de aglutinación espermática en ausencia de anticuerpos aglutinantes.

E-06

MACROPINOCITOSIS COMO UNA VÍA DE ENTRADA PARA *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* EN CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS

García-Pérez B^{1,2}, Jiménez-Sánchez G¹, Soriano-García D¹, Villegas-Castrejón H², Luna-Herrera J¹. ¹Laboratorio de Inmunoquímica II, ENCB, IPN, Carpio y Plan de Ayala, México, D.F.; ²Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, México D.F.

Introducción: La endocitosis es el proceso de captación de proteínas de membrana, lípidos y grandes moléculas o partículas dentro de las células. En las células eucariotas hay diversas formas de endocitosis, las más estudiadas son la endocitosis mediada por receptores, dependiente de clatrina y la fagocitosis. La macropinocitosis es otra forma de endocitosis considerada hasta hace poco como una rareza biológica. Este proceso involucra la formación de lamelipodios (ruffles) dependiente de actina, que son extensiones de membrana plasmática parecidos a sabanas soportadas por una red de filamentos de actina. La macropinocitosis no requiere la participación de receptores celulares específicos pero necesariamente ocurre durante la estimulación de una respuesta fisiológica particular. **Objetivo:** Estudiar el mecanismo de interiorización de *M. smegmatis* en células no fagocíticas y compararlo con el inducido por *M. tuberculosis*. **Material y métodos:** Se prepararon monocapas de dos líneas celulares no fagocíticas (A549 y MLg) y se infectaron con *M. smegmatis* con el fin de determinar las UFC a diferentes tiempos postinfección. Se llevaron a cabo ensayos de espectrofluorometría en placa para cuantificar la macropinocitosis de las células infectadas por *M. smegmatis* y células tratadas con productos derivados de *M. smegmatis*. Técnicas de microscopia electrónica de transmisión, de barrido y de fluorescencia se realizaron en células infectadas con *M. smegmatis* y/o tratadas con productos derivados de *M. smegmatis*. **Resultados:** Los ensayos de multiplicación intracelular mostraron que *M. smegmatis* fue capaz de infectar ambas líneas celulares, aunque fue más eficiente en la infección de las células A549. Sin embargo, se observó una eliminación de la bacteria a partir de las 24 h postinfección. Los ensayos de microscopia electrónica mostraron claramente la formación del ruffling de membrana alrededor de los bacilos presentes en la superficie celular. La microscopia de fluorescencia reveló cambios en la distribución de los filamentos de actina de las células infectadas o tratadas con productos derivados de *M. smegmatis* en comparación con las células sin infectar. La macropinocitosis se cuantificó usando un marcador de fase fluida, estos ensayos mostraron un aumento significativo en la captación de fluido extracelular en las células que se infectaron o se trataron con productos derivados de *M. smegmatis*. **Conclusiones:** Estos estudios indican que durante la infección *M. smegmatis* induce una serie de rearrreglos en el citoesqueleto celular que conducen a la formación de lamelipodios y la consecuente interiorización de la bacteria a través de un proceso conocido como macropinocitosis. Es bien conocido que proteínas de virulencia secretadas por bacterias como *Salmonella* y *Shigella* inducen la macropinocitosis, en comparación nuestros resultados demuestran que los lípidos y otros productos de secreción de *M. smegmatis* son capaces también de inducir el fenómeno macropinocítico. En este mismo modelo, *M. tuberculosis* demostró la capacidad de inducir la macropinocitosis de manera similar ha *M. smegmatis*, sin embargo el destino final de las bacterias interiorizadas fue diferente dependiendo de la virulencia de cada especie, siendo una eficientemente eliminada (*M. smegmatis*) y la otra sobreviviendo y multiplicándose intracelularmente (*M. tuberculosis*).

E-07

METALOPROTEASAS DE MATRIZ PROVENIENTES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DAÑO TISULAR

Sandoval Sandoval C, Herrera Barrios MT, Sarabia León MC, Castillo Sánchez D, Iturria Rosales C, González-Ávila G*. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Objetivo: En este trabajo se analizó la presencia y actividad de dos metaloproteasas de matriz (MMPs), MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), provenientes de *Mycobacterium Tuberculosis*, como parte de los mecanismos moleculares involucrados en la destrucción tisular que ocurre en la tuberculosis pulmonar. **Método:** El estudio se realizó en el medio de cultivo y en el sonicated de *M. Tuberculosis* cepa H37Rv considerada como patógena, y en el medio de cultivo de la cepa no patógena H37Ra. Después de cultivar los bacilos por 7 semanas, el medio de cultivo se filtró y se concentró. Los bacilos se sonicaron. A ambas muestras se les determinó actividad gelatinolítica utilizando un sustrato radiactivo, y por zimograma en geles de poliacrilamida a los que se les incorporó gelatina. Se realizó también Western blot para la identificación de MMP-2, MMP-9, MT-1-MMP y TIMP-2. **Resultados:** Se encontró actividad gelatinolítica tanto en el medio de cultivo como en el sonicated de la cepa patógena H37Rv (260.4 ± 38.3 y 285 ± 24.7 mg de gelatina degradada por mg de proteína incubada respectivamente). El zimograma reveló la presencia de MMP-9 activa. Se encontraron también bandas de alto peso molecular con actividad enzimática. En la cepa H37Ra no fue posible detectar actividad gelatinolítica por ninguno de estos métodos. El Western blot mostró bandas de 85, 92 y 180 kD (MMP-9, proMMP-9 y polímeros de MMP-9), así como bandas de 65 y 72 kD (MMP-2 y proMMP-2) en ambas cepas. Por esta técnica fue posible también identificar MT-1-MMP en sus formas activa y como zimógeno (bandas de 56 y 66 kD respectivamente), así como bandas de alto peso molecular. El Western blot para TIMP-2 demostró la presencia de una banda de 21kD (TIMP-2 libre), banda de 70 kD que son complejos TIMP-2/MMP-2, y bandas de alto peso molecular (110 kD)

que corresponderían a complejos de activación proMMP-2/TIMP-2/MT-1-MMP. **Conclusiones:** Ambas cepas de *M. Tuberculosis* poseen MMPs con diferencias en el estado de actividad enzimática. La presencia de actividad de MMPs, específicamente MMP-9, en la cepa patógena la capacita para degradar componentes del tejido conjuntivo, lo que hace posible su participación directa como parte de los mecanismos moleculares involucrados en la necrosis caseosa, licuefacción tisular, y formación de cavernas en la tuberculosis pulmonar. Además, células que participan en la reacción inflamatoria provocada por el bacilo podrían participar en la activación de la MMP-2 presente en el *M. Tuberculosis* aumentando así el daño tisular.

E-08

COLONIZACIÓN SIMULTÁNEA CON MÚLTIPLES CUASIESPECIES Y MÚLTIPLES CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* EN DIFERENTES REGIONES DEL ESTÓMAGO

González Valencia G*, Atherton JC, Camorlinga PM, Dehesa M, Muñoz PL, Muñoz O, Torres J. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, HP CMNSXXI Coordinación de Investigación Médica.

Objetivos: Documentar colonización simultánea de cuasiespecies vs múltiples cepas de *Helicobacter pylori* (*Hp*) en diferentes regiones del estómago. **Material y métodos:** Se estudiaron ocho pacientes adultos a los cuales se les tomaron biopsias de antro, cuerpo fondo e incisura para el cultivo de *H. pylori*. Se aislaron de 6 a 7 colonias de cada sitio (~28 colonias por paciente) a las cuales se les extrajo DNA. Para estudios sobre macrodiversidad se realizó RAPD-PCR; para estudios de microdiversidad se tipificaron por PCR alelos de *vacA*, y se detectaron *cagA*, *picB* y *cagPAI*. **Resultados.** Siete pacientes presentaron aislados de *Hp* con un patrón RAPD, otro presento aislados con tres diferentes patrones, sugiriendo respectivamente colonización con una sola cepa y con múltiples cepas. Los aislados de 3 de los 7 pacientes con un patrón RAPD fueron además *cagA* y *picB* positivos. Sin embargo se identifico más de un alelo de *vacA* entre los aislados de las cuatro regiones del estómago. Los aislados de otros 3 pacientes con un patrón RAPD, presentaron la combinación *vacA* s2m2 sin embargo difirieron en la presencia de *cagA*, *picB* o *cagPAI*. Seis pacientes estuvieron colonizados por una sola cepa que evoluciono a múltiple cuasiespecies. Un paciente más estuvo colonizado por múltiples cepas y dentro de cada cepa se documento la presencia de múltiples cuasiespecies. **Conclusión:** Se demostró que un solo huésped puede ser colonizado simultáneamente por múltiples cepas y múltiples cuasiespecies de *Hp*: Estos resultados sugieren que existe una alta recombinación entre cepas que coinfectan un individuo, lo que origina una alta diversidad genética.

E-09

PRINCIPALES COMPLICACIONES EN PACIENTES DE SAN MARTÍN TECUAUTITLÁN POR TRATAMIENTO POR PICADURA DE ALACRÁN DE PUEBLA, MÉXICO

*MCP. Tochimani Vázquez Rubén Darío., *M. en C. Gómez Beatriz Pulido., *E.M. Rocío Díaz Huerta., *E.M. Galiote Flores Alejandra., *E.M. García Aguirre Gloria Samanta., *E.M. Hernandez Flores Teresa., *E.M. Hurtado Madrid José., *E.M. Islas Jácome Francisco., *Medico Familiar José Jorge Díaz Orea., *a, b, D. en C. Huerta Orea Mirna Aurea. *Facultad de Medicina, BUA. *Unidad Medico familiar 57 IMSS. 13 Sur No. 2702 Col Volcanes C.P. 72000. Fax.2 29 56 48 y 2 29 55 00 est.6048.

Introducción: En México es el lugar donde ocurre el mayor número de accidentes por picadura de alacranes de 200,000 accidentes anuales. Es un problema de salud pública se reporta de un 20 a 40 %. En zonas rurales no se cuenta información y medicamentos apropiados para su tratamiento así como una terapéutica adecuada, capacitación médica en el tratamiento de las complicaciones al aplicar el suero antialacrán, se tienen reportadas como un 10 a 40% de los individuos, tan solo con cantidades usadas en la prueba de hipersensibilidad; a la fecha no se cuenta con información confiable sobre el número de complicaciones graves. Así como una terapéutica adecuada, capacitación médica en el tratamiento de las complicaciones al aplicar el suero antialacrán. **Objetivos:** Conocer: la incidencia por picadura de alacrán (*Centruroides limpidus limpidus*). Describir el tratamiento a seguir en las complicaciones. **Material y métodos:** Se trata de un estudio descriptivo, observacional. Se realizó en pacientes de San Martín Tecuautitlán en el periodo comprendido de Enero del 2001 a Agosto del 2001 que fueron atacados accidentalmente por alacrán (*Centruroides limpidus limpidus*), y presentaron sintomatología de intoxicación leve, moderada y severa, así como complicaciones posteriores al tratamiento antialacrán. **Resultados:** De 85 pacientes con diagnóstico de intoxicación por picadura de alacrán, siendo el género masculino el más afectado con un (50.5%). Los sitios anatómicos agredidos fueron: extremidades superiores (mano derecha), extremidades inferiores, gluteoestratamiento utilizados fue la prueba de sensibilidad, suero antialacrán, atropina, corticosteroides, gluconato de calcio, barbitúricos, antihistamínicos. Los síntomas

más frecuentes fueron: dolor en nariz, garganta, sialorrea, lengua gruesa, calambres, insuficiencia renal, escalofrío, estrabismo, ceguera, inquietud, fobia, taquicardia, choque, en estos se presento: choque anafiláctico en un 3%. **Conclusiones:** El suero antialacrán es el único tratamiento específico para la intoxicación por picadura de alacrán y es por lo tanto el recurso de primera elección, es preparado con venenos de las distintas especies más peligrosas de México y tiene la facultad de contrarrestar el veneno inoculado antes de que se fije en las conexiones neuronales. Sin embargo el médico general deberá considerar la complicaciones por el tratamiento antialacrán son poco frecuentes pero es necesario contar con algoritmo adecuado para su tratamiento. En las unidades médico rurales, se carece de medicamento básico, para el tratamiento de las complicaciones (shock anafiláctico) hidrocortisona y adrenalina.

E-10

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* EN POBLACIÓN MEXICANA POR LA TÉCNICA DE POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Majalca-Martínez Cristina^{1,3}, Aguilar-Soto Oscar.² y Giono-Cerezo Silvia. ¹Lab. Bacteriología Médica, Depto. Microbiología, ENCB, IPN ²Servicio de Cirugía Experimental, C.M.N. "20 de noviembre", ISSSTE. ³Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM. xmajalca@hotmail.com

Introducción: *Helicobacter pylori* es el agente etiológico de la gastritis activa y las úlceras pépticas, la persistencia de esta bacteria en el estómago incrementa el riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico. Esta es una infección bacteriana gastrointestinal muy común a nivel mundial, no se conoce su mecanismo de transmisión.¹ Los estudios genéticos han revelado una característica única del genoma de *H. pylori*, relacionada con su alta variabilidad genética. La diversidad puede ser resultado de rearrreglos genéticos dentro del genoma, causado por genes móviles por medio de transposones y recombinación entre secuencias repetitivas. La microdiversidad de *H. pylori* puede resultar por dos caminos: 1) la acumulación progresiva de mutaciones puntuales en diferentes cepas todo el tiempo ó 2) por transferencia horizontal de genes, seguida de un intercambio alélico entre cepas. Sin embargo, no existen evidencias sólidas para apoyar estas hipótesis. **Objetivo:** Determinar la diversidad genética de las cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de pacientes mexicanos adultos. **Material y métodos:** Cepas: Se utilizaron 209 cepas de aislamiento clínico del C.M.N. "20 de noviembre", del ISSSTE. Extracción de DNA.- Se utilizó la técnica rápida de extracción de DNA con Tioocianato de guanidina y sarcosinato. Técnica de AFLP³.- consiste en: restricción del DNA con 1 enzimas de restricción; la ligación de los adaptadores de doble cadena (ds) en los extremos de los fragmentos de restricción; la amplificación de los fragmentos de restricción usando iniciadores complementarios a los adaptadores y los sitios de restricción. Correr en electroforesis los fragmentos de restricción amplificados sobre geles de agarosa; y visualización de los patrones de DNA se hacen mediante revelado con Bromuro de etidio. **Resultados y discusión:** Se realizó la técnica de AFLP con las cepas de *H. pylori*, los resultados con las cepas clínicas muestran que los productos obtenidos por PCR en geles de agarosa al 2%, se pudo observar que no hubo diferencias sustanciales en los patrones de las clonas, pero sí se observaron entre las cepas. **Conclusiones:** La técnica de AFLP es un método de amplificación al azar en la cual utiliza condiciones de PCR extrínsecas. Los iniciadores para la amplificación conocidos como iniciadores AFLP, son generalmente de 17 a 21 nucleótidos de longitud y se alinean perfectamente con sus secuencias blanco (el adaptador y los sitios de restricción), así como también se alinean en un pequeño número de nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción. Esto proporciona ventajas al AFLP, como que sea una técnica confiable la cual no es afectada por variaciones pequeñas como las mutaciones silenciosas a lo largo del genoma.

E-11

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES GENOTIPOS DE *GIARDIA INTESTINALIS* EN NIÑOS HABITANTES DE LA CIUDAD CAPITAL DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ

*Martínez-Gallegos, M; Noriega-López, LG; Escudero-Lourdes, C. Departamento de Inmunología Celular y Molecular, Centro de Investigación y Estudios de Posgrado. Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Giardia intestinalis es el protozoario más comúnmente detectado como parásito humano en todo el mundo. Los diferentes aislados de *G. intestinalis* muestran diferencias genéticas que permite clasificarlas en los denominados Assemblage A (subgrupos I y II) y Assemblage B en base polimorfismos del gen de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y de una proteína rica en residuos de cisteína presente en la superficie del trofozoito del parásito. Existen muy pocos estudios sobre la prevalencia y el impacto biológico de estos genotipos en las comunidades locales y dado que ciertos genotipos son preferencial-

mente aislados de animales domésticos, los estudios de prevalencia de genotipos de *G. intestinalis* en el humano son importantes para evaluar su potencial zoonótico. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de los genotipos de *G. intestinalis* en niños de edad preescolar quienes representan la población más susceptible a adquirir infecciones por este parásito. Se obtuvieron muestras fecales de niños que asisten a escuelas de nivel preescolar en diferentes zonas de la capital del estado. Los quistes de *G. intestinalis* presentes en las muestras fueron aislados por centrifugación en un colchón de sacarosa 1M, sometidos a tratamiento ácido para facilitar la liberación de los trofozoítos y cultivados en medio TYI-S-33 en presencia de antibióticos hasta la obtención de cultivos axénicos. El análisis genético de cada uno de los aislados obtenidos para su clasificación dentro del Assemblage A o B se realizó mediante la amplificación de un segmento de 1.2 kb del gen de la GDH y análisis de restricción del fragmento amplificado con la enzimas Apa1, EcoR1 y Sac1. Los aislados que resultaron pertenecientes al Assemblage A fueron subclasificados en grupos I y II mediante la amplificación de un segmento de 0.52 kb del gen que codifica para una proteína de superficie y el subsiguiente análisis de restricción con la enzima Pst1. Diecisiete de los 23 aislados de *G. intestinalis* obtenidos (73.9%) fueron clasificadas dentro del Assemblage A, 9 de los cuales (50%) resultaron pertenecientes al subgrupo AI y 9 de ellas (50%) al subgrupo A-II. Dos de los aislados (8.6%) fueron clasificados como pertenecientes al Assemblage B e interesantemente, 3 aislados (13%) resultaron ser una mezcla de los genotipos A y B de *G. intestinalis*. Nuestros resultados son consistentes con reportes previos de prevalencia en otros países, los cuales muestran que la mayor parte de los aislados de *G. intestinalis* provenientes de humanos pertenecen a los genotipos I o II del Assemblage A y adicionalmente demuestran la posibilidad de co infección con cepas pertenecientes a ambos grupos genéticos.

E-12

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUE SE LIBERA AL MEDIO EN *BRUCELLA MELITENSIS*

Martínez Gómez D, Burgess R., Verdugo Rodríguez A. Laboratorio de microbiología molecular, FMVZ-UNAM

Objetivo: Identificar proteínas de secreción en *Brucella melitensis*. **Material y métodos:** *Brucella melitensis* cepa 133 (cepa nacional aislada de un brote en el norte del país) fue crecida en tres diferentes medios con el fin de evaluar cambios en los perfiles electroforéticos de proteínas de la membrana externa y posibles productos de secreción. Los medios usados fueron RPMI 1640, MEM y caldo *Brucella* suplementados o no con suero fetal bovino al 10% e incubados por 24 hrs. Transcurrido este tiempo las proteínas en el medio fueron recuperadas por precipitación con metanol. Las proteínas de la membrana externa fueron recuperadas por sonicación y tratamiento con Tritón al 0.5%, recuperadas finalmente por centrifugación. Las proteínas recuperadas fueron visualizadas en geles de poliacrilamida y evaluadas por Western blot utilizando sueros de cabra positivos por aislamiento bacteriológico. **Resultados:** Una proteína liberada al medio fue visualizada en geles de poliacrilamida y también reconocida por los sueros de las cabras en los ensayos de Western blot. La expresión de esta proteína estuvo aumentada en los medios RPMI 1640 y MEM adicionados con suero, otras proteínas también fueron visualizadas sin embargo su expresión no varío en ninguno de los tres medios utilizados. Los perfiles de proteínas de la membrana externa no muestran variación sólo en cantidad pues el crecimiento en medios adicionados con suero estuvo aumentada al doble que en medios sin suero, corroborado por conteo de UFC a las 16 horas. **Conclusiones:** Diversos reportes mencionan la existencia de sistemas de secreción en *Brucella*, sin embargo a la fecha ninguna proteína de secreción ha sido identificada. En este trabajo se identifica una posible proteína de secreción en *Brucella*. La cual fue inducida por la presencia de suero en el medio, este dato coincide con otros reportes donde se muestra que la adición de suero, produce la liberación de ciertas proteínas de la membrana externa, tal es el caso de ompA en *E. coli*. Sin embargo también podría tratarse de una proteína de secreción de *Brucella melitensis*, actualmente se continúa con la identificación de esta proteína. Ninguna de las proteínas identificadas es producto de la lisis.

E-13

AMPLIFICACIÓN DE DNA DE *BRUCELLA* SPP. A PARTIR DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES SOSPECHOSOS DE BRUCELOSIS

Martínez Gómez D., Vázquez Navarrete J. Instituto de Alergias y Autoinmunidad Dr. Maxiliano Ruiz Castañeda.

Objetivo: Estandarizar una técnica de PCR a partir de muestras de suero, para demostrar la presencia de DNA de *Brucella*. **Material y métodos:** Suero 10 personas negativas por las pruebas serológicas convencionales fueron utilizadas para la estandarización de la técnica de PCR. La extracción de DNA para la técnica de PCR se realizó por métodos estándares con modificaciones. Para la

estandarización de la técnica las muestras de suero de pacientes sanos fueron inoculadas con DNA de *Brucella*, en cantidades decrecientes con el fin de obtener la cantidad mínima detectable de ADN en la prueba, también se usó DNA de *Salmonella*, con el fin de verificar reacciones inespecíficas. En la obtención de ADN bacteriano se utilizó la técnica de CTAB. Los iniciadores utilizados amplifican un fragmento de 300 pb del gen de la proteína de 31 kDa de *Brucella*, los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. **Resultados:** Se desarrolló una metodología para extraer ADN de sueros humanos, de forma fácil y rápida, utilizando fenol saturado en vez de fenol equilibrado. Con esta metodología la obtención de DNA fue más eficiente de forma tal que en 300 ul de suero inoculado con 0.55 ng de ADN de *Brucella* fue posible lograr la amplificación del producto deseado. Muestras inoculadas con ADN de *Salmonella typhi* y *Proteus* fueron negativas. En ensayos preliminares con sueros de 12 pacientes, se obtuvo amplificación de ADN de *Brucella*. **Conclusiones:** La brucelosis se manifiesta en humanos, como clínicos muy inespecíficos, por lo que su diagnóstico requiere de la confirmación del laboratorio. Este trabajo muestra que es posible diagnosticar brucelosis de pacientes utilizando muestras de suero requeridas para el diagnóstico serológico. Una detección positiva de ADN mediante PCR puede ser indicativo de la presencia de este microorganismos en las muestras de los pacientes, pudiéndose considerar una prueba tan específica como el aislamiento bacteriológica solo que con una sensibilidad más alta.

E-14

ADENOVIRUS IDENTIFICADOS EN MUESTRAS DE PACIENTES MEXICANOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA

Mejía López Herlinda*, Barrera Badillo Gisela, López Martínez Irma, Iguala Vidales Miguel. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (InDRE), SSA.

Antecedentes: A la fecha se han identificado 51 serotipos de adenovirus. Las características clínicas de la infección por adenovirus varían de acuerdo al serotipo involucrado, y el grupo de edad afectado. En general causan infecciones autolimitadas. En pacientes inmunocomprometidos pueden causar infección generalizada. Algunos serotipos infectan el tracto respiratorio ocasionando faringitis, conjuntivitis, laringotraqueítis y bronquiolitis o neumonía, ésta última es la manifestación clínica más grave, sobre todo en niños pequeños, en los que pueden ser fatal. Se han descrito secuelas de daño pulmonar residual importante como bronquiectasias y bronquiolitis obliterante. Otros serotipos pueden causar infecciones conjuntivales gastrointestinales o urinarias. En México Pizarro y Cols. en 1962 y 1978, identificaron la presencia de adenovirus por fijación de complemento y la reacción de neutralización. En 1998, en el laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE se analizaron 567 muestras de pacientes que presentaron Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, resultando 204 positivas a adenovirus mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Además, se han remitido muestras de pacientes con infección respiratoria en diferentes épocas del año. **Objetivo:** Identificar los diferentes serotipos de adenovirus en muestras de pacientes con infección respiratoria aguda mediante la técnica de RFLP. **Material y métodos:** En este trabajo describimos la identificación y tipificación de adenovirus a partir de 126 muestras clínicas de pacientes con infección respiratoria aguda. La identificación del virus se realizó por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales. Las muestras positivas se inocularon en células HEP-2 de donde se obtuvo el aislamiento viral, se purificó el ADN del virión y posteriormente se trató con endonucleasas; el patrón de restricción se analizó en geles de agarosa. **Resultados y conclusiones:** Los resultados obtenidos mostraron la presencia de Ad1, Ad2 y con mayor frecuencia Ad5, por lo que podemos concluir que la metodología con enzimas de restricción es de gran utilidad en la tipificación de adenovirus y que permitirá obtener un estudio epidemiológico más detallado a cerca de los serotipos circulantes en nuestro país.

E-15

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULANS* NEGATIVA (SCN) CAUSANTES DE SEPSIS NOSOCOMIAL EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES

Miranda-Navales MG*, Leaños-Miranda B, Villegas-Silva R, Alpuche-Aranda C, González-Tejeda L, Solórzano-Santos F, Torres-López Javier. Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Deptos. de Neonatología, Infectología y Laboratorio Clínico, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS. Departamento de Medicina Experimental, UNAM.

Objetivo: caracterizar genotípica y fenotípicamente las cepas de SCN causantes de sepsis nosocomial, a través de los patrones genómicos por electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE), presencia del gene *mecA*, genes reguladores *mec I* y *mec R*, y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en dos periodos de tiempo (mayo-diciembre 2000 con el esquema empírico dicloxacilina/amikacina y enero-diciembre 2001 con el esquema empírico cefalotina/amikacina). **Material y métodos:** Diseño: cohortes no concurrentes. Se incluyeron

todas las cepas de SCN de recién nacidos con sepsis nosocomial, se les determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana por microdilución en caldo, detección de los genes *mecA*, *mecI* y *mecR*, y sus mutaciones por PCR. Se estableció la relación clonal de las cepas mediante el patrón genómico de ADN por PFGE. **Análisis estadístico:** prueba exacta de Fisher y χ^2 . **Resultados:** Se incluyeron 25 cepas en el primer periodo (22 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*) y 24 en el segundo (15 *S. epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 3 *S. hominis*, 1 *S. lugdonensis*, 1 *S. warnerii*). Clonas: 3 clonas en 22 cepas de *S. epidermidis* del primer periodo: 3A (13.6%), 1B (4.5%) y 2C (9%). 2do. periodo: 3 clonas en 15 *S. epidermidis* 1A (6.6%), 2B (13.3%), y 6C (40%), así como una clona de *S. haemolyticus* en tres pacientes. La resistencia para oxacilina, dicloxacilina, y amikacina fue similar en ambos periodos (mayor al 70%), cefalotina incrementó de 36% a 64.2% en el 2do. periodo. Las clonas C y H fueron multiresistentes. Todas las cepas resistentes a oxacilina tuvieron el gene *mecA*. En la mayoría de las cepas (> 75%) se detectaron los genes *mecI* y *mecR*, así como sus mutaciones. La tasa de infecciones por SCN disminuyó en el 2do. periodo (5.48 x 1,000 días/pac vs 2.4 x 1,000 días/pac). **Conclusiones:** Se encontró una clona que predominó en el 2do. periodo, aparentemente por selección a la presión antimicrobiana. No hubo correlación entre perfiles de susceptibilidad antimicrobiana y la presencia en particular de uno de los genes reguladores o sus mutaciones. Categoría D) Infecciones nosocomiales.

E-16

STAPHYLOCOCCUS HAEMOLYTICUS PRODUCTOR DE FACTOR DE ADHERENCIA, PRESENCIA DE OPERON DE ICA, Y ELEMENTO DE INSERCIÓN IS256 EN CEPAS AISLADAS DE UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES Miranda-Novales MG*, Leaños-Miranda B, Camacho-Velázquez M, González-Tejeda L, Villegas-Silva R, Solórzano-Santos F, Torres-López J. Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Deptos. de Neonatología, Infectología y Laboratorio Clínico, Hospital de Pediatría, CMN, Siglo XXI, IMSS. Coordinación de Investigación en Salud.

Objetivo: detectar la producción de PIA (factor de adherencia) en cepas de *S. haemolyticus* aisladas de la UCIN del Hospital de Pediatría, en forma cualitativa y cuantitativa, y la existencia de los genes del operon de *ica* (*ica A, B, C, D*), y el elemento de inserción IS256 por PCR. **Materiales y métodos:** Se incluyeron todas las cepas de *S. haemolyticus* aisladas de la UCIN durante 2000 y 2001, se identificaron por los sistemas API-Staph y Microscan. Se obtuvieron 19 cepas de 17 pacientes, 10 de sangre, 3 de LCR, 2 de pacientes colonizados y 4 ambientales. Se estableció la relación clonal mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). La producción de PIA se detectó mediante agar rojo Congo (cualitativa) y por ensayo de microplaca, con medición de la densidad óptica (cuantitativa). La presencia de los genes de *ica* y el elemento IS256 se efectuó por PCR. Se determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana por microdilución en caldo. **Resultados:** El patrón genómico de los aislamientos mostró la existencia de una clona en 4 pacientes, para un total de 10 cepas que fueron colectadas durante los meses de junio y julio 2001. Las 9 cepas restantes tuvieron un patrón no relacionado. La prueba de adherencia en microplaca no mostró diferencia para los aislamientos clasificados como clona o no relacionados (Clona H 0.332 vs NR 0.499). Todas las cepas fueron resistentes a oxacilina y dicloxacilina, 87.5% a amikacina y cefalotina, 83% a imipenem, 8.3% a tetraciclina y ac. Fusídico y 54.2% a estreptomycinina, ninguna a vancomicina. Sólo una cepa fue negativa a todos los genes de *ica*. En 52.6% se encontró el gene *icaD* y el elemento IS 256, tres cepas fueron positivas para todos los genes del operon. En una cepa no hubo correlación con el método de rojo Congo. **Conclusiones:** Este es uno de los primeros trabajos que reporta la existencia del operon de *ica* y la producción de PIA en cepas de *S. haemolyticus*, la diferencia en la expresión fenotípica pudiera deberse a los genes detectados, y al elemento de inserción IS256. Al igual que en *S. epidermidis*, la producción de PIA pudiera ser un factor de virulencia. Categoría E) Investigación biomédica.

E-17

β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS EN INFECCIONES EN PACIENTES AMBULATORIOS

Ma. Norma Montes Rodríguez*, Silvia Giono Cerezo. Lab De Bacteriología Médica, ENCB, IPN, Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Sto. Tomás, C.P. 11340, México, D.F. Tel. 57296000 ext. 62374. E-mail: indnorma@yahoo.com , sgiono@yahoo.com

Introducción: Las bacterias gram negativas son resistentes a los antibióticos β -lactámicos, por la producción de β -lactamasas lo que entorpece la terapia. En 1983 se encontró la primera cepa (*K. ozanae*) productora de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) se ha encontrado en diferentes géneros como *Ps. aeruginosa* y Enterobacterias. La selección ESBLs incluye sensibilidad a combinaciones de antibióticos β -lactámicos más clavulanato. **Objetivo:** Detectar ESBL en cepas de origen clínico por la técnica de difusión en disco

marcado por la NCCLS y confirmar la presencia por medio del CMI. **Metodología:** A partir de 25/164 cepas, posibles productoras ESBLs provenientes de pacientes ambulatorios con infecciones y una cepa de referencia (E. coli ATCC 25923), se determinó por el método de difusión de disco: CTX 30 μ g, CTX/AC 30/10 μ g/. Las cepas problema y la de referencia se ajustaron al 0.5 del nefelómetro de MacFarland diluido 1:10, en placas de Mueller Hinton. Se incubaron a 35 °C de 18 a 24 h., transcurrido el tiempo se observó, las cepas productoras ESBLs aumento del diámetro de inhibición \geq 5mm en las placas que tienen los discos con la cefalosporina y el clavulanato. Se determinó la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución seriada en agar a: CAZ de 0.25-128 μ g/ml, CTX 0.25-64 μ g/ml, CAZ / AC 0.25/4-128/4 μ g/ml, CTX / AC 0.25/4-64/4 μ g/ml. Las cepas se ajustaron al 0.5 del nefelómetro de MacFarland diluido 1:10, se inocularon con replicador de Steer en placas de Mueller Hinton. Las cepas productoras ESBLs disminuyen el crecimiento en 3 log₂ las placas que tienen la cefalosporina con el clavulanato. **Resultados:** Se encontraron 5 cepas productoras de ESBLs, 3/34 (1.22%) fueron Kp y 2/85 (1.83%) Ec, aisladas de sangre (3), secreciones de tejidos blandos (1) y orina (1). La disminución de la resistencia antimicrobiana se observó cuando en la combinación de cefotaxima con ácido clavulánico (por ejemplo, K. pneumoniae CTX 30mg=0mm y CTX/AC 30/10mg=022mm) y se confirmó con el método de concentración mínima inhibitoria (CMI). **Conclusiones:** La técnica de difusión de disco puede utilizarse como un método rápido de selección de ESBL's, aunque es recomendable realizar el método de CMI como marca la NCCLS para separarlas. Los microorganismos con ESBLs en infecciones severas de pacientes ambulatorios, fueron *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

E-18

MUTACIÓN DEL GEN QUE EXPRESA LA PROTEÍNA NS5A, RELACIONADA A FRACASO TERAPEÚTICO EN PACIENTES MEXICANOS CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C

Navarrete-Castro Rogelio, Martínez-Rodríguez Ma. de la Luz, Villarreal-Urenda Ma. del Carmen, Córdova-Mendoza Virginia, Enciso-Moreno Leonor, Calderón-Rodríguez Gloria Ma. Servicio de Adultos. Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández" CMN La Raza. Centro de Instrumentos. Coordinación de Investigación. IMSS.

Introducción: La hepatitis por virus C, es un problema de salud pública en el mundo. Los esfuerzos por ofrecer alternativa terapéutica se ve limitada por mutaciones intrínsecas al virus, específicamente en genes que expresan proteínas blanco de los antivirales. **Objetivo:** Evaluar si la presencia de mutaciones en el gen que expresa la proteína NS5A se encuentra relacionado a fracaso terapéutico, en pacientes mexicanos con hepatitis crónica por virus C. **Diseño:** Estudio prospectivo, comparativo, logitudinal. **Pacientes:** Se ingresaron 23 pacientes con edad mayor a 16 años, con diagnóstico de hepatitis crónica por virus C de acuerdo a los criterios internacionales, que fueron candidatos a tratamiento antiviral con interferón y ribavirina. Se excluyeron los pacientes que no terminaron el tratamiento y en quienes no fue posible evaluar la presencia de mutación. **Medición y seguimiento:** En forma inicial se determinó la carga viral inicial, genotipo, daño histológico, nivel de transaminasas, edad, género. Para la comparación de los grupos se realizó la secuenciación de ácidos nucleicos de la región ISDR del gen de la proteína NS5A. Se administró a todos los pacientes tratamiento con IFN α más ribavirina y al final del tratamiento se evaluó su respuesta virológica e histológica. Se consideró como fracaso virológico una carga viral detectable e histológico una disminución del índice de Knodel < 2 puntos al final del tratamiento. **Análisis estadístico:** Los datos generales se analizaron con frecuencias simples y medidas de tendencia central. Para evaluar la asociación entre la mutación y el fracaso terapéutico se calculó el riesgo relativo con razón de productos cruzados (RPC) con un IC 95%. Para evaluar si la asociación fue consistente se realizó un análisis secuencial y RR no sesgado. Posteriormente se realizó un análisis multivariado y regresión logística ponderada. Como pruebas de significancia se usaron t pareada y Fisher considerando un valor de p < 0.05. **Resultados:** De los pacientes seleccionados fueron 10 hombres y 13 mujeres. Diez de ellos presentaron más de una mutación en un aminoácido en la secuencia del gen que expresa la proteína NS5A y 13 de ellos no. Nueve de los 10 pacientes que presentaron mutación no tuvieron respuesta virológica y 6 no presentaron respuesta histológica en comparación con 5 y 4 de los que no presentaron mutación respectivamente. En el análisis univariado la presencia de mutación se relacionó a fracaso virológico (OR 14.4 C95% 1.70-121) y fracaso en la respuesta histológica (OR 3.37 IC90% 0.78-14.4). Así mismo, la sustitución de histidina por arginina en la posición 2218 se relacionó a fracaso virológico (OR 8.0 IC94% 1.27-50). En el análisis multivariado y regresión logística, la asociación de mutación con fracaso virológico es consistente tomando en cuenta carga viral, genotipo, índice de Knodell, niveles de ALT, co-Infección con otro genotipo, género y edad. **Conclusión:** En este estudio se observa un alto nivel de asociación entre la mutación del gen que expresa la proteína NS5A con una no respuesta virológica e histológica en pacientes mexicanos con hepatitis crónica por virus C, tratados en Ifn alfa más ribavirina.

E-19

PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS, HEMOLISINAS Y ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN ENTEROCOCOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

Quiñones Pérez D*; Del Campo R; Gómez Lus R. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Cuba, Hospital "Ramón y Cajal" y Universidad de Zaragoza, España.

Objetivos: Estudiar la prevalencia de actividad de proteasas (P), hemolisinas (H) y producción de bacteriocinas (B) en especies de enterococos de origen intrahospitalario. **Material y método:** Fueron estudiadas 99 cepas de enterococos (84 *E. faecalis*, 10 *E. faecium*, 2 *E. gallinarum*, 2 *E. casseliflavus* y 1 *E. durans-hirae*) de diferentes orígenes clínicos y coleccionadas durante el año 2001. Las especies fueron identificadas por el sistema automatizado WIDER. La actividad de proteasa se determinó en Agar Triptona Soya con 1,5% de leche descremada y la producción de hemolisinas en Agar Triptona Soya con 5% de sangre de caballo. Para detectar la producción de bacteriocinas fueron usadas 19 bacterias diferentes como indicadores de bacteriocinas, se empleó para ello el medio Triptona Soya semisólido y sólido suplementados con 0.3% de extracto de levadura. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo a través del método de proporciones. **Resultados:** El 65% de las cepas estudiadas produjeron al menos 1 factor de virulencia, un 45% fueron productoras tanto de bacteriocinas como de proteasas contrastando con una baja producción de hemolisinas (4%). *E. faecalis* fue el mayor productor de B, P y H (90%, 98% y 100%) seguido por los *Enterococcus. spp* (6,2%, 2,2%) respectivamente, no detectándose producción de hemolisina en estos últimos. Los factores de virulencia fueron más frecuentes en aislamientos de orina, hemocultivos y secreciones. La coproducción más frecuente fue de B + P. El 84% de las cepas productoras de bacteriocinas y el 78% con actividad de proteasa fueron multiresistentes. **Conclusiones:** Este trabajo muestra resultados novedosos al constituir el primer estudio sobre patogenicidad de enterococos en Cuba. Se corrobora la mayor virulencia de *E. faecalis* sobre *E. faecium* y *Enterococcus. spp*. Se aprecia una asociación entre factores de virulencia y resistencia antimicrobiana y la presencia de ellos puede estar implicada en la selección de determinadas cepas de enterococos para causar infecciones.

E-20

HETEROGENEIDAD EN LA ISLA DE PATOGENICIDAD DE *HELICOBACTER PYLORI* EN CEPAS AISLADAS DE PACIENTES NIÑOS MEXICANOS

*Reyes León A; *Torres López J; *Puente García JL; **Vázquez Ramos A; **González Valencia G*. *Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI, IMSS. México, D. F. **Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.

Antecedentes: Uno de los factores de patogenicidad asociados a *H. pylori* es la presencia de una Isla de Patogenicidad (*cag PAI*), ciertos genes de *cag PAI* tienen homología con genes de *Bordetella pertussis* y *Agrobacterium tumefaciens* los cuales están asociados a virulencia, por lo que se sugiere que algunos genes de *cag PAI* codifican para proteínas de sistema de secreción tipo IV mediante el cual se transloca y fosforila la proteína CagA, induciendo una serie de cambios en el citoesqueleto y una mayor capacidad de liberación de IL-8 en células epiteliales gástricas. **Objetivos:** Determinar la heterogeneidad en algunos genes de la Isla de Patogenicidad (*cag PAI*) de *H. pylori* en cepas aisladas de niños. **Material y métodos:** Se estudiaron 200 colonias de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas de antro y cuerpo de 10 niños con dispepsia. La bacteria se identificó con tinción de Gram y pruebas bioquímicas. La extracción de DNA de *H. pylori* se realizó por el método de isotiocianato de Guanidina. Se determinó la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag PAI* por Slot-Blot, se utilizó DNA de cepas de referencia 84-183 y 43-504 (*cagA C+*) y 86-313 (*cagA C-*). La ausencia de *cag PAI* se realizó por PCR para amplificar los flancos donde se inserta *cag PAI*. **Resultados:** Observamos heterogeneidad en la detección de *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10*; en la mayoría de colonias de cada paciente se detectaron los 4 genes, en varias colonias se detectó la presencia de 1, 2 o 3 genes. En cada uno de los niños se encontraron colonias con por lo menos 2 y hasta 6 patrones distintos considerando la presencia de los 4 genes de *cag PAI*. Observamos colonias que siendo negativas para los 4 genes, no se confirmó la ausencia de *cag PAI*. **Conclusiones:** En los aislados de *H. pylori* de niños existe mucha heterogeneidad en la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10*. Ha pesar de la ausencia de 1, 2, o 4 genes de *cag PAI* algunas cepas parecen conservar otros genes de la isla.

E-21

EFFECTO DOSIS RESPUESTA DE FRACCIONES DE *M. TUBERCULOSIS* H37RV SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-DR Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS

Roblero Ochoa SR*, Arce Mendoza AY, Torres López E, Salinas Carmona MC. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, UANL. *Facultad de Medicina Humana. Universidad Autónoma de Chiapas.

Objetivo: En el presente estudio se investigó el efecto de extractos proteicos. Polisacáridos y lipídicos de *M. tuberculosis* H37Rv sobre la expresión de las moléculas HLA-DR y B7 en monocitos humanos. **Material y métodos:** Se determinó el tiempo máximo de expresión de las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en monocitos humanos, estimulando células mononucleares (CMN) con lipopolisacárido e interferón gama. Se obtuvieron proteínas extracelulares, extracto celular, extracto polisacárido y extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv. Las proteínas extracelulares se obtuvieron del filtrado del cultivo precipitando con sulfato de amonio al 50%. las proteínas intracelulares (extracto celular) y el extracto polisacárido se obtuvo del bacilo deslipidizado con una mezcla etanol-éter. El extracto celular se obtuvo con Tris-HCl Acetato de magnesio 0.01 M y el extracto polisacárido con KC1 3 M y metanol. Los lípidos se obtuvieron al evaporar el éter en rotavapor, que se obtuvo en la deslipidización. Para la realización de este trabajo se estimularon 1×10^6 CMN con cuatro diferentes dosis de cada uno de los extractos obtenidos y con ácidos micólicos de *M. tuberculosis* (10, 50, 100 y 150 ug) y se determinó la expresión por citometría de flujo. Los resultados se obtuvieron como el porcentaje de células que expresaron ambas moléculas y se evaluaron por la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. **Resultados:** Al determinar la expresión de las moléculas B7-1 y B7-2 en monocitos humanos, se observó que la molécula B7-2 se expresa en mayor cantidad que la molécula B7-1. Se obtuvo una disminución en la expresión de la molécula B7-2 en monocitos humanos, con proteínas extracelulares a una dosis de 100 y 150 ug/mL y con el extracto lipídico a una dosis de 50 y 100 ug/mL. En la expresión de HLA-DR observamos incremento al estimular con todos los extractos obtenidos de *M. tuberculosis* H37Rv. **Conclusiones:** Probablemente se requiere cantidades mayores o al bacilo completo para disminuir la expresión de las moléculas HLA-DR y son las proteínas extracelulares y los componentes lipídicos de *M. tuberculosis*, los que afectan la capacidad coestimuladora de la célula presentadora de antígenos.

E-22

PRESENCIA DE CEPAS *HELICOBACTER PYLORI* CAG^A Y CAG^A EN BIOPSIAS GÁSTRICAS DE INDIVIDUOS CON GASTRITIS CRÓNICA, ÚLCERA DUODENAL Y ÚLCERA GÁSTRICA POR HIBRIDACIÓN *IN SITU*

*Romo González C; Torres López J; Camorlinga Ponce M; Santos Argumedo L. Muñoz O. Unidad de investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI, IMSS, México y Departamento de Biomedicina Molecular. Laboratorio de Inmunología. CINVESTAV.

Antecedentes: Un factor de virulencia importante de *Helicobacter pylori* (Hp) que se ha asociado a enfermedad es la presencia del gen *cagA*, el cual se encuentra dentro de la isla de patogenicidad de Hp (*cagPAI*). Las cepas *cagA*⁺ inducen la liberación de IL-8 en células epiteliales gástricas, también se ha sugerido que este tipo de cepas colonizan el estómago más eficientemente que cepas *cagA*⁻. Recientemente se ha reportado que las infecciones con cepas mixtas (*cagA*⁺ y *cagA*⁻) genotipificadas *in vitro* son muy frecuentes en nuestra población. **Objetivo:** Determinar la presencia de cepas Hp *cagA*⁺ y *cagA*⁻ en biopsias gástricas de adultos con enfermedad gastroduodenal por Hibridación *in situ* (ISH). **Material y métodos:** Fueron estudiadas biopsias gástricas de pacientes infectados con Hp incluidas en parafina: 4 con úlcera duodenal (UD), 4 con úlcera gástrica (UG) y 4 con gastritis crónica (GC) a las cuales se realizó hibridación *in situ* utilizando dos sondas marcadas con biotina, una para el gen *cagA* (sonda CagA) identificándola mediante un sistema de amplificación con tiramida-Cy3 y la segunda fue para un gen común de Hp el cual codifica para una proteína de membrana (sonda AgC) identificada con tiramida-FITC. La especificidad de las sondas fue comprobada en frotis de cepas de referencia Hp 8823 (*cagA*⁺) y 8822 (*cagA*⁻). La presencia de las cepas se observó en un microscopio de epifluorescencia y confocal. **Resultados:** La cepa de referencia 8823 híbrido con *cagA* observándose de color rojo (Cy3) y/o con *cagA*⁺ AgC color amarillo (combinación Cy3 y FITC), la cepa 8822 *cagA*⁻ solo híbrido con AgC color verde (FITC) indicándonos especificidad de las sondas. En todas las biopsias estudiadas de los pacientes con GC, UD y UG se encontraron cepas *cagA*⁺ (color rojo y/o amarillo) y cepas *cagA*⁻ (color verde) observándose un predominio de cepas *cagA*⁺. Cepas *cagA*⁺ fueron observadas principalmente en GC. La distribución de esta mezcla de cepas de Hp se encontró en moco, epitelio y glándulas gástricas. **Conclusiones:** Se observó la presencia de infección con cepas Hp *cagA*⁺ y *cagA*⁻ simultáneamente en diferentes sitios de la mucosa gástrica en biopsias de pacientes infectados. Predominando cepas *cagA*⁺ en todos los casos.

E-23

LA REMODELACIÓN FAGOSOMAL ES REQUERIDA PARA UN EFICIENTE PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS EXÓGENOS PRESENTADOS POR MACRÓFAGOS

EN EL CONTEXTO DE MOLÉCULAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I

Rosales-Reyes R., Alpuche-Aranda CM, Ramírez-Aguilar ML, Martín-Orozco N y Ortiz-Navarrete VF. Departamento de Biomedicina Molecular CINVESTAV-IPN, Departamento de Medicina Experimental, Hospital General de México, UNAM.

El macrófago procesa a *Salmonella typhimurium* dentro de un compartimento fagosomal, los productos del procesamiento como péptidos son liberados al medio extracelular, estos al unirse a moléculas del MHC-I presentes en la superficie del macrófago y de células vecinas son reconocidos por linfocitos TCD8 citotóxicos. El fagosoma donde *Salmonella* es procesada tiene características no ácidas y que aun no hemos caracterizado completamente. En este trabajo continuamos la caracterización del compartimento fagosomal donde *Salmonella* es procesada y mostramos que el fagosoma gigante que contiene a *Salmonella* (FG) durante los primeros 30' de estancia intracelular se fusiona con lisosomas (Lamp1*), 3hr después el FG pierde al marcador lisosomal Lamp1 sugiriendo un evento de remodelación fagosomal atribuible a la viabilidad bacteriana dado que bacteria muerta u ovoalbúmina retienen Lamp1 y con ello su permanencia en un compartimento fagolisosomal. Para corroborar este hallazgo aislamos fagosomas a partir de macrófagos de la línea celular IC21 infectados con *Salmonella* mediante un gradiente de percoll, durante la 1er hora de estancia intracelular el FG con una densidad de 1.056gr/mL se encuentra fusionado con lisosomas (b-hexosaminidasa*), 3 hr después la bacteria inhibe la fusión de mas lisosomas con el FG, acumulándose estos lisosomas en una fracción de 1.042 gr/mL (Lamp1*), y el FG permanece en una fracción de 1.100 gr/mL (Lamp1*), por el contrario el fagosoma que contiene a *Salmonella* muerta (FSM) se mantiene fusionado con lisosomas en una fracción de 1.042 gr/mL (β-hexosaminidasa*). De esta manera identificamos que el destino del procesamiento de bacteria viva y muerta es diferente y en ambos casos el macrófago secreta productos de procesamiento al medio extracelular. Para identificar el papel del FG y del FSM en el procesamiento y generación de péptidos que estabilizan moléculas del MHC-I realizamos ensayos de cocultivo en presencia de brefeldina A de células RMA-S (TAP2^{-/-}) y macrófagos infectados con *Salmonella* viva o muerta, los resultados muestran que el procesamiento a partir del FG es más eficiente que el del FSM. Con estos resultados concluimos que el macrófago utiliza esta vía como preferencial para la generación de péptidos de origen bacteriano y que son secretados al medio extracelular sin involucrar a la vía secretora clásica y por lo tanto proponemos que la remodelación fagosomal es un evento requerido para un eficiente procesamiento de antígenos exógenos.

E-24

ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD40 EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH
Rosas Taraco, Adrián*, Ayala Jacobo y Arce Mendoza Alma Y. Depto. Inmunología, Facultad de Medicina, UANL.

Introducción: El VIH conjuntamente con la tuberculosis se han convertido en las enfermedades más temidas actualmente. Por ello existen múltiples trabajos encaminados a elucidar la interacción huésped-parásito y las moléculas involucradas con dicha interacción. Hoy en día es conocido la participación de moléculas receptoras y/o co-receptoras para muchos microorganismos, pero no existen reportes de la expresión de estas moléculas en un grupo de individuos con VIH. **Objetivo:** identificar la frecuencia de los receptores celulares CD11c (CR4), CD14 y CD40, empleados por micobacterias y los co-receptores CCR5 y CXCR4, empleados por el VIH en pacientes con VIH. **Material y método:** La sangre completa heparinizada de individuos clínicamente sanos y pacientes con VIH fue incubada con anticuerpos monoclonales para cada uno de los receptores y co-receptores anteriormente mencionados y procesada para el análisis del porcentaje de células que expresan dichas moléculas por citometría de flujo. Los resultados por esta técnica muestran una diferencia significativa en el porcentaje de células que expresan el receptor CD40 en el grupo CD14 negativo, linfocitos (P < 0.05). Mientras, en el grupo de CD14 positivo (monocitos y granulocitos) no mostró una diferencia significativa en la expresión de receptores y co-receptores en las muestras analizadas. Por otra parte, en 2 pacientes con VIH con carga viral > 300,000 copias/mL la expresión de CD11c (13.61 y 14.04%, respectivamente) y CCR5 (7.6% y 15.34%, respectivamente) fue disminuida en la región CD14 negativa en comparación con los demás pacientes del mismo grupo. También uno de los pacientes con carga viral de 446,000 copias/mL mostró una disminución en el porcentaje de células que expresan el receptor CD40 (5.65%) y los co-receptores CCR5 (8.05%) y CXCR4 (31.09%) en la región CD14 positiva. Por lo tanto, concluimos que no existió diferencia significativa en la expresión de receptores y/o co-receptores en células de ambos grupos en la región 2. No existió diferencia significativa en el receptor CD11c y los co-receptores CCR5 y CXCR4 en la región 1 de ambos grupos, pero si se demostró una gran diferencia significativa en el porcentaje de células que expresaron el receptor.

E-25

LOS ASTROVIRUS HUMANOS ASOCIADOS CON LA GASTROENTERITIS AGUDA

Soto Aburto Gisela*, Astivia Anievas Rocío, Díaz de Jesús Benita, Melo Munguía Martín, Terán Vega Lizbeth, Méndez Pérez Héctor y García Lozano Herlinda. Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Carpio 470 México D.F. C.P. 11340. Correo electrónico: hgarcialozano@yahoo.com.mx

Introducción: Los Astrovirus humanos (AstV-Hs) son agentes virales comunes en la gastroenteritis infantil a nivel mundial. Presentan morfología en forma de estrella de 5 ó 6 picos, constituidos por una sola cápside proteica no envuelta que protege al RNA viral de cadena sencilla (ssRNA). Estudios epidemiológicos demuestran que su prevalencia es de 2.7 a 8.6%. Se reporta que la infección por AstV-Hs se presenta durante todo el año, aunque se observa un mayor número de casos durante el invierno; afectando principalmente a niños menores de 2 años. La infección por AstV-Hs es subnotificada en los países en desarrollo debido a las limitaciones que se tienen en los métodos de diagnóstico. **Objetivo:** Demostrar la asociación de los AstV-Hs a cuadros de diarrea aguda infantil. **Material y métodos:** Se seleccionaron 314 muestras de heces de niños menores de 4 años negativas a rotavirus y adenovirus de 1999-2002 de diferentes entidades de la República Mexicana. La presencia de AstV-Hs se detectó mediante un ELISA comercial (IDEIA™ Astrovirus, DAKO), el cual utiliza un anticuerpo monoclonal en una fase sólida para capturar el antígeno de AstV-Hs y un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa. Se realizó la lectura fotométricamente a una densidad óptica de 450 nm. **Resultados:** Los resultados revelaron 15 muestras positivas a AstV-Hs (4.7%), en las cuales se observó un mayor número de casos en niños menores de 1 año, con mayor frecuencia en el sexo masculino. La infección por AstV-Hs se presentó durante todo el año. **Conclusiones:** Se determinó que los AstV-Hs están asociados a la gastroenteritis aguda infantil, sin embargo es necesario realizar estudios epidemiológicos a nivel nacional para conocer la prevalencia y estacionalidad del virus.

E-26

INFECCIÓN EN PIEL POR MYCOBACTERIUM CHELONAE VAR CHELONAE POSIBLEMENTE RELACIONADO CON ACUPUNTURA EN UNA PACIENTE CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Soto Nieto GI.*, Chávez Mazari B., Sierra Madero JG. Departamento de Infectología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". México D.F.

Introducción: Las micobacterias no tuberculosas son un grupo de patógenos que pueden causar enfermedad local o diseminada y particularmente afectan la piel y tejidos blandos. *M. fortuitum* y *M. chelonae* se han asociado con adquisición nosocomial en cirugía y con brotes epidémicos asociados a catéteres. *M. chelonae* se encuentra en suelos, instrumental quirúrgico, líquidos para diálisis, y aguas de sistema municipales y hospitales. Los hospederos más frecuentemente involucrados en micobacteriosis cutánea son pacientes inmunosuprimidos, particularmente pacientes con cáncer y quimioterapia, enfermedades autoinmunes y trasplantados en los cuales se ha asociado el uso de esteroides como factor predisponente. **Caso clínico:** Mujer de 36 años de edad portadora de Lupus Eritematoso Sistémico con afección a piel, articulaciones y riñón motivo por lo cual recibió desde 1999 esteroides y bolos de ciclofosfamida. Al momento de su padecimiento actual recibía tratamiento con prednisona a dosis de 100 mg/d por actividad renal. Refirió haber sido sometida a sesiones de acupuntura. Su padecimiento actual lo inició en mayo 2001 al presentar en cara anterior de pierna izquierda ardor y úlcera dolorosa, de 1 a 2 cm de diámetro con eritema, formación posterior de nódulos eritematosos fluctuantes, los cuales se diseminan al resto de la extremidad en forma unilateral, son dolorosos y de aproximadamente 0.5 a 1 cm. Dichas lesiones llegan a producir incapacidad para la deambulación secundario al dolor. A su ingreso al hospital se encontró afebril, con fascies cushinoide, con edema + en miembros inferiores. Había una úlcera localizada en cara anterior, tercio medio de pierna izquierda de 1 cm con fondo limpio, borde eritematoso, sin secreción, dolorosa a la palpación, y múltiples nódulos de 1 a 2 cm, que sugerían eritema nodoso, únicamente se encontraban en la extremidad inferior izquierda. Sus laboratorios iniciales mostraron urea 100 mg/dL, creatinina 3.6 mg/dL, PPD 5 U. negativo y radiografía de tórax normal. Se tomó biopsia de piel la cual reportó dermatitis granulomatosa. Se aisló de dicha biopsia *Mycobacterium chelonae* var. *chelonae*. La paciente recibió tratamiento con quinolonas, cefalosporinas de tercera generación y macrólidos por 12 meses con mejoría en un 90% de las lesiones. Actualmente la paciente se encuentra en tratamiento de mantenimiento con quinolonas y macrólidos debido a que se intensificó la inmunosupresión con micofenolato además de la prednisona. **Discusión:** *M. chelonae* produce generalmente lesiones cutáneas múltiples y se presenta como nódulos subcutáneos eritematosos de evolución crónica. El antecedente

te de acupuntura en este caso aplicada en la misma extremidad es interesante como factor causal, pues se ha descrito relación de esta infección con traumatismos leves o inyecciones. Se debe de considerar la infección por micobacterias no tuberculosas en pacientes con lesiones cutáneas inflamatorias de larga evolución y con cultivos negativos, especialmente en el contexto de inmunosupresión.

E-27

ANÁLISE DA GRAVIDADE DOS PACIENTES INTERNADOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: UTILIDADE PARA O CONTROLE DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

Pinheiro SMC; Moreira LS; Costa KCC; Couto BRGM; Starling CEF*. Hospital Felício Rocho e Centro Universitário de Belo Horizonte—UNIBH, Belo Horizonte—MG—Brasil.

Introdução: As infecções hospitalares (IHs) são uma das principais complicações em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (CTI). Estas infecções são relacionadas à gravidade do paciente e à utilização de múltiplos procedimentos invasivos. Em um estudo prévio (PINHEIRO et al, 1999), o sistema de avaliação de gravidade ASIS Modificado, baseado no ASIS - Average of System of Illness Score (inicialmente utilizado pelo *Center for Disease Control and Prevention* – CDC no sistema NNIS) foi proposto e avaliado. **Objetivos:** neste trabalho, o ASIS Modificado (MASIS) é utilizado num experimento clínico aleatorizado com intuito de avaliar a sua aplicação como instrumento de intervenção para o controle de IH em unidades de terapia intensiva. Além de avaliar a sua utilidade na prevenção de IH, este estudo tem como objetivo avaliar a habilidade de diferentes enfermeiras em classificar os mesmos pacientes em uma das 5 categorias de gravidade do MASIS (A até E). **Métodos:** numa primeira etapa, os funcionários do CTI foram treinados sobre o MASIS e sua relação com IH: pacientes com MASIS = A têm o menor risco de IH e MASIS = E, o maior risco de IH. Após esta etapa, todos os 203 pacientes admitidos no CTI entre fev e set/2000 tiveram o seu escore MASIS definido. Entretanto, somente 90 pacientes, aleatoriamente escolhidos (44%), tiveram a sua gravidade exibida para os funcionários através de uma placa colocada no seu box. Quatro enfermeiras classificaram os 203 pacientes, em diferentes momentos. Uma das enfermeiras, a mais experiente da equipe (golden standad – GS), realizou a busca ativa no CTI usando os conceitos do CDC (1988/92). A concordância entre cada uma das três enfermeiras e a GS foi avaliada através do coeficiente kappa (K). A incidência de IH nos pacientes com identificação do MASIS (grupo G1) foi comparada com a incidência daqueles sem a placa com o escore MASIS no leito (grupo G2). **Resultados:** 34 pacientes (17%) tiveram 68 IH (17 pneumonias, 10 infecções urinárias, 9 sepses, 9 infecções gastrointestinais, 8 infecções de acesso vascular e 15 outras IHs). O risco de IH de acordo com o MASIS definido pela enfermeira GS foi: escore A = 0% (0/34); B = 16% (20/123); D = 30% (13/44) and E = 50% (1/2); com um coeficiente de Goodman-Kruskal de 0,60 ($p = 0.009$). A incidência de IH em cada grupo foi: G1 = 9/90 = 10% versus G2 = 25/113 = 22% (risco relativo = 0,45; $p = 0,03$). Coeficiente kappa para as 3 enfermeiras e a GS: K1 = 0,93 ($p < 0,01$), K2 = 0,93 ($p < 0,01$) e K3 = 0,91 ($p < 0,01$). **Conclusão:** a concordância na classificação do MASIS foi excelente. Além disto, o estudo mostrou que, se o profissional do CTI conhece o escore MASIS do paciente, o risco de infecção é reduzido.

E-28

PRESENCIA DE GENES QUE CODIFICAN PARA TOXINAS SIMILARES A LT EN PLÁSMIDOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS Y GALLINARUM AISLADAS DE HUMANOS Y AVES

^{a,b}Vázquez-Navarrete J*, ^bCórdova BC., ^{b,c}Martínez GD. y ^cVerdugo RA. ^aCENID-Microbiología, INIFAP-SAGARPA., ^bInst. de Alergias y Autoinmunidad MRC, ^cDepto. Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM.

Las enterotoxinas son el principal factor de virulencia en algunas enterobacterias. La toxina termolábil LT de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y la toxina colérica CT de *Vibrio cholerae* son las más estudiadas, sin embargo las toxinas STN de *S. typhimurium* y LT-like de *S. gallinarum* se han descrito últimamente. Los genes *eltAB* que codifican la toxina LT se localizan en un plásmido, mientras que los genes *ctxAB* que codifican para CT se localizan en el cromosoma. El objetivo del presente trabajo es identificar la presencia de los genes *eltAB* en diferentes fagotipos de *S. enteritidis* aisladas de aves y humanos. Se estudiaron 26 cepas, 12 de *S. enteritidis*, 11 de *S. gallinarum*, 1 de *S. pullorum* y 2 de *E. coli* enterotoxigénica. Los plásmidos fueron extraídos por lisis alcalina y el DNA cromosomal se extrajo con CTAB. Los genes *eltAB* fueron amplificados por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de los genes *eltAB* que codifican para LT de ETEC-H10407. El PCR se realizó en 50 µl, utilizando 3 µl DNA y 47 ml de premezcla conteniendo 0.5 unidades de DNA polimerasa. De las cepas analizadas, 7 de *S. gallinarum*, 1 de *S. pullorum* y

4 de *S. enteritidis* presentaron plásmidos de aproximadamente 85 kbs. Todas amplificaron un fragmento de aproximadamente 1,275 pb. Este fragmento corresponde a los genes *eltAB*. La presencia de estos genes en bacterias del género *Salmonella* es importante, ya que están involucrados en la virulencia. Trabajo financiado parcialmente por el proyecto: CONACYT-34747-B.

E-29

DISTRIBUCIÓN DE CLONAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE TERCER NIVEL EN LA CIUDAD DE MÉXICO, 1997-2001

Velázquez Meza ME.^{1*}, Soto Noguera A.¹, Carnalla Barajas MN.¹, Hernández M.¹, Solorzano Santos F.², González L.², Miranda G.², Echaniz Avilés G.¹ ¹Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México; ²Hospital de Pediatría, CMN, Siglo XXI, México.

Introducción: *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SAMR) es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en varias partes del mundo. Recientemente se ha visto la presencia de cepas resistentes a diversos antibióticos incluyendo la vancomicina. Las técnicas moleculares han sido utilizadas para el análisis epidemiológico de patógenos de importancia clínica. Una de las técnicas que se ha utilizado recientemente es la electroforesis de campos pulsados (PFGE) que permite la separación de fragmentos grandes de DNA, los cuales nos ayudan a comparar los patrones de restricción de las especies y diferencias en una misma especie. **Objetivo:** Conocer la distribución de las clonas de *S. aureus* meticilino-resistente, responsables de infecciones nosocomiales en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI durante el periodo de 1997-2001. **Metodología:** Se analizaron un total de 97 cepas de *S. aureus* meticilino resistentes, aisladas durante 1997-2001 en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI. Se realizó la identificación de la especie por medio de las pruebas de coagulasa y el método automatizado de MicroScan. La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se hizo siguiendo los lineamientos del NCCLS y el análisis de los patrones electroforéticos del DNA, se llevo a cabo por medio de la electroforesis de campos pulsados combinado con técnicas de hibridación con sondas específicas para el gen *mecA* y el transposon Tn554, las cepas fueron clasificadas en tipos clonales con base a la combinación de su polimorfismo para *mecA*, Tn554 y su patrón de PFGE. **Resultados:** Todas las cepas analizadas en este estudio presentaron una resistencia elevada a oxacilina. La distribución de clonas de las cepas estudiadas muestra la predominancia y persistencia de un único y específico tipo clonal (I::NH::M) entre los aislamientos pediátricos. Esta clona fue resistente a penicilina, oxacilina, y gentamicina. **Conclusión:** Este estudio documenta la predominancia y permanencia de clonas de *S. aureus* meticilino-resistentes durante largos periodos de tiempo dentro del ámbito hospitalario.

E-30

PRESENCIA O DESARROLLO DE ANTICUERPOS BACTERICIDAS EN CONTRA DE LA CEPA HOMÓLOGA DE S. PYOGENES, Y SU DISEMINACIÓN INTRAFAMILIAR

Villaseñor-Sierra A*¹, Santacruz-Nieto F², Flores-Sánchez J³, Sánchez-Corona J⁴, Stevens DL.⁵, ^{1,2,4}Lab. Microbiología Molecular CIBO, IMSS, Guadalajara., ^{2,3}PMC, UAG. Guadalajara., ⁵VAMC Boise Idaho, E.U.A.

Objetivos: Evaluar el desarrollo de anticuerpos opsonicos bactericidas (AcB) en contra de la cepa homóloga en casos índice, la diseminación intra-familiar (DiF) de la misma cepa y su asociación con ausencia de AcB. **Material y métodos:** Se incluyeron 21 pacientes; 19 con faringitis, 1 con absceso palatino y 1 con S. choque tóxico (SChT) por *S. pyogenes* con edades entre 2 y 69 años (mediana 11). Tiempo entre suero agudo (Sag) y convaleciente (Sconv) entre 40 y 534 días (mediana = 183). Los AcB contra la cepa homóloga o el aislamiento del caso índice fueron evaluados en 57 sueros mediante la prueba bactericida indirecta con pre-opsonización; 36 de 18 sueros pareados (agudo-convaleciente), 3 de Sconv, y 18 de miembros familiares de 3 casos (2 con faringitis y 1 con SChT). Los resultados se expresaron como índice bactericida (IB). **Resultados:** Hubo un incremento del IB entre el Sag (media = 4.95, SD 5.8) y Sconv (media = 332.7, SD 651.8) en 15/18 muestras pareadas ($P = 0.07$). En 3/18, el IB fue mayor en el Sag (media = 457.7, SD 62.4) que el Sconv (media = 13.9, SD 23) ($P = 0.01$). No hubo correlación ($r = 0.10$) entre el IB y el tiempo entre el Sag y Sconv. La DiF ocurrió en 0, 33 y 36% de los familiares de los 3 casos y no se asoció con la presencia o ausencia de AcB. **Conclusiones:** El desarrollo de AcB ocurrió en la mitad (55.5%) de los casos índice, por lo que es posible que solo la mitad de los pacientes sean inmunes para una nueva infección por cepas de serotipos homólogos. La diseminación intra-familiar ocurrió en la tercera parte de los miembros y no parece estar asociada con la presencia o ausencia de anticuerpos bactericidas.