EL USO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES
EN EL ESTUDIO DE ALGUNAS
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

IV

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE ANTICUERPOS
FLUORESCENTES Y CON EL CULTIVO EN EL ESTUDIO
DE LAS INFECCIONES POR *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROPATOGENA*

DR. JORGE OLARTE **

DR. MANUEL RAMOS ALVAREZ ***

DRA. EMMA GALINDO **

EL MÉTODO de los anticuerpos fluorescentes ha sido aplicado con éxito en el diagnóstico rápido de las infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena.^{2, 5, 8} Hemos tenido oportunidad de probar esta técnica, y compararla con los métodos ordinarios de cultivo, en una epidemia de diarrea en niños prematuros, causada por *E. coli* 0126:B16, así como en estudios realizados en 10 cadáveres de niños que murieron con infecciones originadas por diversos serotipos de colis patógenos.

MATERIAL

Infección por E. coli 0126:B16 en niños prematuros. Durante los meses de junio, julio y agosto de 1962, cierto número de niños atendidos en la Sala de Prematuros del Hospital Infantil de México se infectó con una cepa de *Escherichia coli* 0126:B16. Algunos de estos niños desarrollaron diarrea, en tanto que otros no presentaron el padecimiento. Los aspectos clínicos de la epidemia serán discutidos en otro trabajo, limitándonos, por ahora, a presentar los resultados de la

* Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 3 de abril de 1963.

** Laboratorio de Bacteriología Intestinal. Hospital Infantil de México.

*** Laboratorio de Virus. Hospital Infantil de México.

fluorescencia y del cultivo obtenidos con los hisopos rectales tomados a 10 de estos niños, en los que los dos procedimientos se llevaron a cabo en forma simultánea. Todos los niños estudiados recibieron tratamiento con neomicina.

Infección por diversos tipos de colis patógenos en niños que murieron con diarrea. De un grupo de 100 niños a los que se practicó autopsia, muertos por diferentes causas, se seleccionaron 10 en los que la diarrea fue la enfermedad principal y en los que, además, se encontró en los cultivos alguno de los tipos enteropatógenos conocidos de *Escherichia coli*. De cada uno de estos niños se tomó, en el momento de la autopsia, muestras del contenido del tubo digestivo así como trozos de la propia pared intestinal, a diversos niveles, incluyendo recto, colon, ileon, yeyuno, duodeno y estómago.

MÉTODO

Cada una de las muestras tomadas con hisopos, así como los trozos de intestino, una vez triturados, fueron sembrados en los medios de cultivo usados habitualmente en el aislamiento de *E. coli*. La identificación de los gérmenes encontrados en los cultivos se llevó a cabo en la forma conocida.⁶

A partir de los hisopos, así como de los triturados, se hicieron frotis. Además, antes de triturar los tejidos, se hicieron preparaciones por el método de impronta. Todos estos frotis e impronta, destinados al estudio de la fluorescencia, se dejaron secar a la temperatura ambiente, después de lo cual fueron fijados, por un minuto, en acetona.

Se utilizaron 11 sueros 0B anti *E. coli* 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0111:B4, 0112:B11, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0127:B18 y 028:12, marcados con isothiocianato de fluoresceína. Dichos sueros fueron obtenidos de la casa Difco.

Los frotis e impronta, fijados y secos, fueron cubiertos con una gota de cada uno de los sueros fluorescentes mencionados, habiendo sido incubados en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C, después de lo cual se eliminó el exceso del conjugado lavando las preparaciones con solución amortiguadora Difco FTA. Este lavado se repitió dos veces, sumergiendo los frotis por espacio de 10 minutos cada vez y cambiando la solución. Las preparaciones así lavadas se secaron con papel filtro y se montaron entre lámina y laminilla, usando una mezcla de glicerina y suero fisiológico de pH 7.2. En general, se siguió el método recomendado por Cherry et al.¹

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio ordinario, iluminado con una lámpara Leitz de luz ultravioleta, provisto de los filtros necesarios.¹ Se utilizó el condensador de campo oscuro.

RESULTADOS

Como puede verse en el cuadro 1, de un total de 33 hisopos rectales tomados a los niños prematuros, 13 fueron negativos tanto al cultivo como a la fluorescencia. En los 20 hisopos restantes se demostró la presencia de *E. coli* 0126:B-16, en 12 ocasiones, por los dos procedimientos; en 7 por la fluorescencia únicamente, y en un caso sólo al cultivo.

CUADRO 1

Estudio comparativo del Coprocultivo y del método de fluorescencia directa en una epidemia de diarrea causada por *Escherichia Coli* 0126 B16. Servicio de Prematuros, Hospital Infantil de México, 1962

Nº del Caso	Fechas en que se tomaron los hisopos rectales. Resultado del cultivo y de la fluorescencia																
	J u n i o												J u l i o				
	4	5	13	20	22	25	3	10	C	F	C	F	C	F	C	F	
P- 3	0	0	+	+													
P- 4	+	←	0	0	0												
P- 5	0	0	+	+		0	←	+		0	←	+	0	0			
P- 7	+	+	+	+	+	+	0	←	+		0	←	+				
P- 8	0	0	+	+													
P- 10	+	+				+	+			+	+						
P- 11	0	0							+	+	+	+					
P- 12	0	0								0	←	+	0	←	+	0	0
P- 13	0	0								+	+	0	0	0	0	0	0
P- 14	0	0								0	←	+	0	0	0	0	0

C = COPROCVLTIVO F = FLUORESCENCIA + = POSITIVO 0 = NEGATIVO ← = DISCREPANCIA

De 60 muestras tomadas a diferentes niveles del tubo digestivo a 10 niños que murieron de diarrea aparentemente causada por diversos tipos de colis patógenos (cuadro 2), 19 muestras fueron negativas tanto al cultivo como a la fluorescencia; 37 fueron positivas por los dos procedimientos, habiéndose identificado *E. coli* 0111:B4 en tres casos, *E. coli* 0126:B16 en tres casos, *E. coli* 086:B7 en dos casos y *E. coli* 0125:B5 en los otros dos. En las cuatro muestras restantes el cultivo fue positivo en tanto que la fluorescencia se mostró negativa.

DISCUSIÓN

El hallazgo en dos ocasiones de fluorescencia positiva para *E. coli* 0126:B16 en los niños prematuros P-5 y P-6 (cuadro 1), con cultivos negativos en las mismas muestras, es fácil de interpretar, ya que estos niños mostraron cultivos posi-

En algunos de estos casos mortales de diarrea causada por colis enteropatógenos se tomaron cortes de aquellas porciones del intestino que mostraban lesiones macroscópicas, principalmente ileon y colon, habiéndose podido observar, por medio de la inmunofluorescencia, la localización de dichas bacterias al nivel de la lámina propia, en las ulceraciones de la mucosa y en la luz del intestino. Tiene especial interés señalar que en cierto número de estos niños se encontraron, por el método de la fluorescencia, acúmulos de colis en el tejido bronco-pulmonar, hecho que pudiera estar relacionado con la patología respiratoria que estos enfermos presentan con relativa frecuencia en el curso de la enteritis. Las observaciones anteriores son motivo de investigación especial.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la inmunofluorescencia representa una ayuda importante en el diagnóstico rápido de las infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena. Sin embargo, no puede aceptarse, por lo menos con la experiencia actual, como un sustituto del cultivo. Es un auxiliar en el estudio de epidemias, así como en la observación longitudinal de portadores, siempre y cuando el diagnóstico haya sido comprobado en algún momento por medio del aislamiento e identificación inequívoca del germen. Recientemente, Davis y Ewing³ encontraron que las relaciones antigénicas existentes entre diversos grupos de enterobacterias y los tipos serológicos conocidos como colis enteropatógenos, pueden dar origen a diagnósticos equivocados por lo que los autores hacen hincapié en la necesidad de que el diagnóstico primario sea confirmado por medio del cultivo.

Usada como un arma para determinar la localización de los colis a distintos niveles en los tejidos del aparato digestivo, así como en otros órganos, y establecer la correlación de su presencia con el tipo de reacción histológica y las lesiones que se encuentran, la inmunofluorescencia parece ofrecer perspectivas extraordinarias halagadoras. Esta última aplicación es igualmente prometedora en el estudio de la patología de otras infecciones intestinales, como salmonelosis, shigelosis e infecciones por virus enteropatógenos.

Conviene aclarar que de acuerdo con los estudios realizados por LaBrec, Formal y Schneider,⁴ y por Thomanson, Cherry y Edwards,⁷ la inmunofluorescencia no ha podido usarse en el diagnóstico rápido de las infecciones por *Shigella* y por *Salmonella*, debido a la existencia en la flora normal del intestino humano de una gran variedad de gérmenes que toman la fluorescencia cuando se usan conjugados elaborados con los sueros ordinarios de grupo para *Shigella* y *Salmonella*, mostrándose el sistema completamente inespecífico.

REFERENCIAS

1. Cherry, B. W., Goldman, M., y Carski, T. C. Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Diseases. U.S.P.H.S. Publication N° 729, 1960.
2. Cherry, W. B., Thomanson, B. M., Pomales-Lebrón, A., y Ewing, W. H. Rapid Presumptive Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Faecal Smears by Means of Fluorescent Antibody 3. Field Evaluation, Bull. Org. Mond. Santé 25: 159, 1961.
3. Davis, B. R., y Ewing, W. H. Serologic Relations that may Lead to Erroneous Diagnoses of *Escherichia coli* Infections by Means of Fluorescent Antibody Technics, Am. J. Clin. Path., 39:198-202, 1963.
4. LaBrec, E. H., Formal, S. B., y Schneider, H. Serological Identification of *Shigella Flexneri* by Means of Fluorescent Antibody, J. Bact., 78:384, 1959.
5. Nelson, J. D., y Whitaker, J. Diagnosis of Enteropathogenic *E. coli* Diarrhea by Fluorescein-Labeled Antibodies, J. Pediat., 57:684, 1960.
6. Olarte, J., Ramos Alvarez, M., y Galindo, E. Aislamiento de *Shigella*, *Salmonella* y *Colis* Enteropatógenos de los Hisopos Rectales de 802 casos esporádicos de diarrea. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx., 14:257, 1957.
7. Thomanson, B. M., Cherry, W. B., y Edwards, P. R. Staining Bacterial Smears with Fluorescent Antibody: VI Identification of *Salmonellae* in Fecal Specimens, J. Bact. 77:478, 1959.
8. Whitaker, J., Page, R. H. Stulberg, C. S., y Wuelzer, W. W. Rapid Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* 0127:B8 by the Fluorescent antibody technique. AMA. Amer. J. Dis. Child., 95:1, 1958.