

HOSPITAL INFANTIL "VIRGEN DEL ROCIO". SEVILLA (ESPAÑA).
SECCION DE MICROBIOLOGIA

Diagnóstico mediante inmunofluorescencia directa de las gastroenteritis por *E. coli*

Por:

Dr. R. TORRONTERAS,* Dr. C. CINTADO** y Lda. T. PRADOS***

Torronteras, R. y otros. *Diagnóstico mediante inmunofluorescencia directa de las gastroenteritis por E. coli*. Rev Cub Ped 53: 3, 1981.

Se investigan por el método de inmunofluorescencia directa las heces de 70 lactantes que presentaban gastroenteritis por *Escherichia coli* enteropatógeno, y se obtuvo el 100% de resultados concordantes con el coprocultivo. Un total de 50 lactantes sin gastroenteritis fueron utilizados como control, y el 6% (dos serotipos 055:B5 y uno 0128:B12) resultaron falsos positivos con respecto al coprocultivo. Solamente se obtuvieron 3 reacciones cruzadas (dos Arizona y un Providencia) del grupo de las 244 cepas bacterianas testadas con los inmunosueros específicos. Dada la gran sensibilidad y rapidez del método, se considera de gran utilidad en el diagnóstico de las gastroenteritis por *Escherichia coli* enteropatógeno, ya que evita tratamientos con antibióticos innecesarios y permite cortar la cadena epidemiológica mediante el aislamiento precoz del paciente.

INTRODUCCION

La gastroenteritis aguda (GEA) constituye una de las principales causas de morbilidad entre los niños de todo el mundo, y son especialmente susceptibles los recién nacidos y lactantes.

Entre las causas infecciosas de dicho síndrome la *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) representa casi $\frac{1}{3}$ de los casos de los enfermos en quienes se logra aislar el germen causal; ante

este hecho, y por la necesidad, tanto clínica como epidemiológica, es preciso obtener, por parte del laboratorio, un diagnóstico rápido de confirmación o exclusión de este tipo de gastroenteritis, requisito que reúne el método de inmunofluorescencia, ya que en contra de los medios convencionales que precisan alrededor de 48 horas para el aislamiento e identificación del organismo, con esta técnica, aparte de ser muy sensible y más económica, se necesita tan sólo de una o dos horas para conseguirlo.

La primera aplicación de inmunofluorescencia para la identificación de ECEP en las heces, fue realizada por *Witaker y colaboradores*¹ en 1958 en ocasión de una epidemia de GEA infantil por *E. coli* 0127:B8. En 1960, *Nelson y Witaker*² utilizaron 10 antisueros de conejos, mar-

* Jefe de la sección de microbiología. Hospital Infantil "Virgen del Rocío".

** Médico adjunto de la sección de enfermedades infecciosas. Hospital Infantil "Virgen del Rocío".

*** Farmacéutico adjunto de la sección de microbiología. Hospital Infantil "Virgen del Rocío".

cados con isothiocyanato de fluoresceína repartidas en dos mezclas, con lo que logran simplificar la técnica. Un año más tarde, Thomason y colaboradores²¹ preparan un conjugado nonavalente que agrupa los 9 serotipos de ECEP más usuales, lo que permitió un medio de pesquisaje eficaz. Desde entonces se han publicado distintos trabajos¹⁻⁶ en los que se aplica esta técnica con resultados satisfactorios, tanto de especificidad como de rapidez, e incluso de aumento de la positividad del método con respecto al coprocultivo.

MATERIAL Y METODO

Basándonos en estos antecedentes hemos ensayado este método en 70 casos de GEA por *E. coli* enteropatógeno, estudiados simultáneamente con el coprocultivo durante dos años en un porcentaje de los pacientes detectados en nuestro centro hospitalario.

Estudiamos las posibles reacciones antigénicas cruzadas frente a 224 cepas bacterianas intestinales, así como un estudio control en 50 lactantes que no tenían gastroenteritis. El método utilizado fue la técnica de inmunofluorescencia directa descrita para el estudio de enteropatógenos por Cohen y colaboradores,¹ en virtud de la cual se procede como sigue: sobre un porta se extiende una suspensión de heces al $\frac{1}{5}$ en suero fisiológico, se seca a 37° y se fija durante 1 minuto con alcohol. En un segundo paso se añade el antisero fluorescente nonavalente (Instituto "Pasteur") diluido al 1/20 en sustancia amortiguadora de fosfato pH 7.2; incubados los porta en cámara húmeda a 37° durante 30 minutos y lavados con sustancia amortiguadora, se observan al microscopio de fluorescencia con objetivo de 40 aumentos y, posteriormente, con el de 90 aumentos para la comprobación morfológica. En caso de positividad se repite la técnica con los conjugados monovalentes diluidos al 1/100.

RESULTADOS

Según se observa en el cuadro I, se han estudiado 32 casos producidos por el serotipo 0119:B14; 10 por el 0111:B4; 8 por los serotipos 055:B5 y 0126:B16; 4 por el 086:B6; y 2 por cada uno de los demás serotipos.

En todos ellos se pudo demostrar, tanto con el conjugado nonavalente como con el monovalente una reacción positiva, y fue observado en todos los casos un número superior a 100 colonias/campo. No se han observado reacciones cruzadas entre los distintos serotipos aislados (cuadro II).

En el grupo control de 50 lactantes sin signos o síntomas de gastroenteritis, obtuvimos una reacción positiva en 6. En tres de ellos se aislaron mediante el coprocultivo los serotipos 026:B6, 0128:B8, y quedaron los otros tres (6%): dos 055:B5 y un 0128:B12, como falsos positivos con respecto al coprocultivo.

En el grupo de las 244 cepas detectadas por inmunofluorescencia directa con antiseros nonavalentes y monovalentes de ECEP no hemos encontrado reacciones cruzadas, excepto en un caso de Providencia frente al 055:B5 y dos Arizonas con el 0127:B8 (cuadro III).

COMENTARIOS

Cuando ocurren síntomas diarreicos, los *E. coli* enteropatógenos están presentes en las heces virtualmente en cultivo puro y son fácilmente identificables.¹ En estas situaciones a veces es imprescindible un método de diagnóstico rápido que permita identificar el agente desencadenante, problema que nos lo soluciona la técnica de inmunofluorescencia.

A esta ventaja hay que añadirle la gran sensibilidad del método en virtud de la cual se puede detectar un número pequeño de organismos patógenos u organismos muertos o alterados por la acción antibiótica previa, y que no

CUADRO I

POSITIVIDAD DE LOS DISTINTOS SEROTIPOS
DETECTADA POR INMUNOFLUORESCENCIA

Serotipos	No. de casos	IFD*	%
0119:B14	32	32	100
0111:B4	10	10	100
055:B5	8	8	100
0126:B16	8	8	100
086:B6	4	4	100
026:B6	2	2	100
0125:B15	2	2	100
0128:B12	2	2	100
0127:B8	2	2	100
Total	70	70	100

CUADRO II

REACCIONES CRUZADAS ENTRE LOS DISTINTOS SEROTIPOS

Serotipos de E. coli	026: B6	055: B5	086: B6	0111: B4	0119: B14	0125: B15	0126: B16	0127: B8	0128: B12
026:B6	+	--	--	--	--	--	--	--	--
055:B5	--	+	--	--	--	--	--	--	--
086:B6	--	--	+	--	--	--	--	--	--
0111:B4	--	--	--	+	--	--	--	--	--
0119:B14	--	--	--	--	+	--	--	--	--
0125:B15	--	--	--	--	--	+	--	--	--
0126:B16	--	--	--	--	--	--	+	--	--
0127:B8	--	--	--	--	--	--	--	+	--
0128:B12	--	--	--	--	--	--	--	--	+

son cultivables con los métodos de estudio bacterianos usuales, como sucede en los portadores o en los niños tratados ambulatoriamente, quienes pueden ser el foco de transmisión de la enfermedad en instituciones cerradas;⁵ e igualmente permite en el transcurso del tratamiento asegurar la desaparición completa de los gérmenes patógenos y que cese el aislamiento del niño.

De hecho, 6 de nuestros pacientes sin gastroenteritis clínica presentaban en las heces ECEP: tres de ellos identificados por el cultivo y por anticuerpos fluorescentes y los otros tres únicamente por esta última técnica, lo que nos hizo pensar si se tratarían de verdaderos coli patógenos o eran enterobacteriáceas con similitud antigénica.

CUADRO III
REACCIONES CRUZADAS CON OTRAS ENTEROBACTERIACEAS

No. de cultivos en cada grupo	Grupos y microorganismos detectados	Reacción cruzada con: ECEP: 055:B5 0127:B8	Ausencia de reacción cruzada
60	Salmonellas B (20) Salmonellas C1 (8) Salmonellas C2 (16) Salmonellas D (16)		60
32	Shigellas flexneri		32
13	Shigellas sonnei		13
44	E. Coli		44
30	Providencia	1	29
30	Citrobacter freundii		30
35	Arizona	2	33

A este respecto han sido encontradas reacciones cruzadas con distintos serotipos de *Salmonellas*, *Shigellas*, *Providencia*, *Citrobacter* y *Arizona*;^{3,7,8} nosotros únicamente hemos detectado dichas reacciones con una cepa *Providencia* probablemente del serotipo 06 y dos de *Arizona* posibles 018 de las 244 ensayadas. Asimismo, *Thomason* describe reacciones cruzadas entre los serotipos de ECEP 0127:B8 y 0127 ab: B10, el 086:B7 y 020:B7 y 019 ab, y entre el 0127:B8 y 090 atribuidas por similitud antigénica O, B o ambas, pero no encontramos, al igual que otros autores,^{3,5,6,9} reacciones de interferencia entre los nueve serotipos de ECEP usua-

les, lo que unido al hecho de que todos los especímenes con *E. coli* enteropatógeno aislados fueran también detectados por el correspondiente antisuero fluorescente, sugiere que la técnica puede ser aplicada con éxito en la detección de estos organismos.

Por último queremos destacar, que si bien distintos autores^{4,9} consiguen aumentar las positividades enriqueciendo previamente la muestra en caldos de cultivo durante 10 a 20 horas, creemos que empleando una cuidadosa técnica¹⁰ este proceder no es necesario, al margen de restar al método la rapidez de diagnóstico que como ya hemos reflejado es una de sus virtudes más importantes.

SUMMARY

Torronteras, R. et al. *Diagnosis by direct immunofluorescence of gastroenteritis due to E. coli*. Rev Cub Ped 53: 3, 1981.

Feces of 70 infants who underwent gastroenteritis due to enteropathogen *Escherichia coli* are investigated by direct immunofluorescence and 100% results in accordance with coprocultures was obtained. A total of 50 infants no undergoing gastroenteritis were used as a control group, and 6% (two serum types 055:B5 and one 0128:B12) were false positives regarding to coproculture. Only three cross-reactions (two *Arizona* and one *Providencia*) were obtained from a total of 244 bacterial stocks tested by

specific immunosera. Because rapidity and high sensitiveness of the method, it is considered highly valuable for diagnosis of gastroenteritis due to enteropathogen *Escherichia coli*, since it avoid unnecessary antibiotic treatments and allow to interrupt epidemic outbreaks by patient earlier isolation.

RESUMÉ

Torrónteras, R. et al. *Diagnostic des gastro-entérites par E. coli au moyen de l'immunofluorescence directe*. Rev Cub Ped 53: 3, 1981.

Les auteurs analysent les fèces de 70 nourrissons présentant gastro-entérite par *Escherichia coli* entéropathogène au moyen de la méthode d'immunofluorescence directe; 100% des résultats étaient en concordance avec la coproculture. Un total de 50 nourrissons sans gastro-entérite ont été utilisés en tant que témoins, et 6% (deux sérotypes 055:B5 et un 0128:B12) ont été des faux-positifs par rapport à la coproculture. On n'a obtenu que trois réactions croisées (deux *Arizona* et un *Providencia*) du groupe des 244 souches bactériennes évaluées avec les immunosérums spécifiques. Etant donné la grande sensibilité et rapidité de la méthode, elle est considérée très utile dans le diagnostic des gastro-entérites par *Escherichia coli* entéropathogène, car elle évite l'emploi de traitements par antibiotiques qui ne sont pas nécessaires et permet de couper la chaîne épidémiologique moyennant l'isolement précoce du patient.

BIBLIOGRAFIA

1. Whitaker, J. A. et al. Rapid identification of Enteropathogenic "Escherichia coli" 0127:B8 by the fluorescent antibody technique. Am J Dis Child 95: 1, 1958.
2. Nelson, J.D.; J.A. Whitaker. Diagnosis of enteropathogenic "Escherichia coli" diarrhea by fluorescein labeled antibodies. J Pediatr 57: 684, 1960.
3. Thomason, B.M. et al. Rapid presumptive identification of enteropathogenic "Escherichia coli" in faecal smears by means of fluorescent antibody. Preparation and testing of reagents. Bull OMS 25: 137, 1961.
4. Cohen, F. et al. Immunofluorescence in diagnostic bacteriology. III the identification of enteropathogenic E. coli serotypes in fecal smears. Am J Dis Child 102: 82, 1961.
5. Le Minor, L. et al. Le dépistage rapide par la méthode de l'immuno-fluorescence des "Escherichia coli" entéropathogènes pour le nourrisson. Ann Pédiatrie 72: 493, 1962.
6. Meléndez, M. y otros. Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógenos en diarreas infantiles por el método de inmunofluorescencia. Rev Chil Pediatr 42: 169, 1971.
7. La Bree, E.H. et al. Serological identification of *Shigella Flexneri* by means of fluorescent antibody. J Bacteriol 78: 384, 1959.
8. Cherry, W.B. et al. Rapid presumptive identification of enteropathogenic "Escherichia coli" in faecal smears by means of fluorescent antibody. III Field evaluation. Bull OMS 25: 159, 1961.
9. Danielsson, D.; G. Laurell. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* 0111:B4 by means of fluorescent antibodies. Acta Pediatría 50: 339, 1961.
10. Thomason, B.M.; W.B. Cherry. Misure of fluorescent antibody tests for detection of enteropathogenic "Escherichia coli". Am J Dis Child 121: 450, 1971.

Recibido: enero 13, 1981.

Aprobado: enero 27, 1981.

Dr. R. Torrónteras

Sección de Microbiología.

Hospital "Virgen del Rocío".

Calle Manuel Siurot s/n Sevilla. España.