

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: SALUD**

**TESIS:**

**ANTIGENO (*Escherichia coli*) PARA DETERMINAR INMUNIDAD EN  
PERSONAS EN RIESGO – CAJAMARCA - PERÚ. 2018**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

Presentada por:

**M.Cs. DOLORES EVANGELINA CHAVEZ CABRERA**

Asesor:

**Dr. MANUEL SALOMÓN RONCAL ORDÓÑEZ**

Cajamarca - Perú

2018

COPYRIGHT C 2018 by  
**DOLORES EVANGELINA CHÁVEZ CABRERA**  
Todos los derechos reservados

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: SALUD**

**TESIS APROBADA:**

**ANTIGENO (*Escherichia coli*) PARA DETERMINAR INMUNIDAD EN  
PERSONAS EN RIESGO – CAJAMARCA - PERÚ. 2018**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

Presentada por:

**M.Cs. DOLORES EVANGELINA CHAVEZ CABRERA**

**JURADO EVALUADOR**

Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez  
Asesor

Dra. María Eugenia Urteaga Becerra  
Jurado Evaluador

Dr. Carlos Manuel Rosales Laredo  
Jurado Evaluador

Dra. Sara Elizabeth Palacios Sánchez  
Jurado Evaluador

Cajamarca – Perú

2018



# Universidad Nacional de Cajamarca

## Escuela de Posgrado

CAJAMARCA - PERU

### PROGRAMA DE DOCTORADO

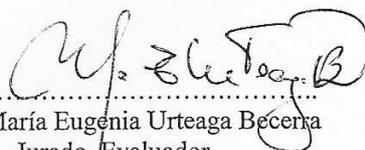
#### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS

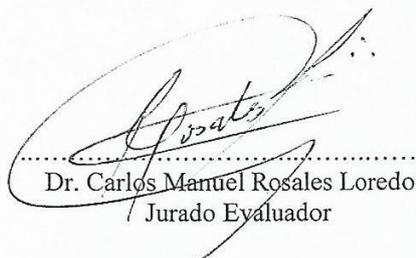
##### MENCIÓN: SALUD

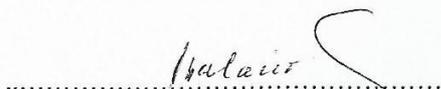
Siendo las cuatro de la tarde del día jueves trece de diciembre del año dos mil dieciocho, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por la Dra. Sara Elizabeth Palacios Sánchez, Dra. María Eugenia Urteaga Becerra, Dr. Carlos Manuel Rosales Loredó, como integrantes del jurado titular; y en calidad de Asesor, el Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **ANTIGENO (Escherichia coli) PARA DETERMINAR INMUNIDAD EN PERSONAS EN RIESGO-CAJAMARCA-PERÚ. 2018**; presentada por la **M.Cs. DOLORES EVANGELINA CHÁVEZ CABRERA**, con la finalidad de optar el Grado Académico de **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, Mención **SALUD**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó ..... *APROBAR* ..... con la calificación de ..... *DIECISIETE* ..... la mencionada Tesis; en tal virtud, la **M.Cs. DOLORES EVANGELINA CHÁVEZ CABRERA**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, Mención **SALUD**.

Siendo las...*6:00*... horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

  
.....  
Dra. María Eugenia Urteaga Becerra  
Jurado Evaluador

  
.....  
Dr. Carlos Manuel Rosales Loredó  
Jurado Evaluador

  
.....  
Dra. Sara Elizabeth Palacios Sánchez  
Presidente-Jurado Evaluador

## **DEDICATORIA**

A:

Mis queridos padres **FÉLIX y MARÍA LAURA**,  
que desde el cielo guían mis pasos; a mis hijos  
**SONIA, ROSARIO, ROGER y DANIELITO**,  
mi fuerza incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

**A:**

La Universidad Nacional de Cajamarca,  
mi Alma Mater.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	v
<b>AGRADECIMIENTO</b>	vi
<b>ÍNDICE</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi

## **CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN**

1.1 Planteamiento del problema	2
1.1.1. Contextualización	2
1.1.2. Descripción del problema	2
1.1.3. Formulación del problema	2
1.2. Justificación e importancia	3
1.2.1. Justificación científica	3
1.2.2. Justificación técnica práctica	3
1.2.3. Justificación institucional y personal	3
1.3. Delimitación de la investigación	3
1.4. Limitaciones	4
1.5. Objetivo general	4

## **CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO**

2.1. Antecedentes o marco referencial	5
2.2. Bases conceptuales	8
2.2.1. Bacteria	8
2.2.2. Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	9
2.2.2.1. Características microbiológicas de <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.2.2. Categorización taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.2.3. Viotipos de <i>Escherichia coli</i>	13
2.3. Bacteria patógena	15
2.4. Patogenicidad bacteriana	15
2.5. Virulencia	15

2.6. Inóculo	16
2.7. Antígeno	16
2.7.1. Clasificación de antígenos	17
2.7.2. Determinante antigénico o epítope	18
2.8. Anticuerpo	19
2.8.1 Moléculas que participan en el reconocimiento del antígeno	20
2.8.2. Células generadoras de anticuerpos	20
2.8.3. Células de respuesta a la inmunidad específica	21
2.8.4. Función de los anticuerpos en el reconocimiento de los antígenos	21
2.8.5. Distribución molecular y purificación de las moléculas de anticuerpos	22
2.8.6. Acciones de los anticuerpos	22
2.9. Inmunidad	23
2.9.1. Inmunidad Innata o inespecífica	24
2.9.2. Inmunidad adquirida	24
2.9.3. Inmunidad pasiva	24
2.9.4. Inmunidad activa	25
2.10. Respuesta inmunitaria	26
2.10.1. Respuesta inmunitaria primaria	26
2.10.2. Respuesta inmunitaria secundaria	26
2.11. Patogenicidad	27
2.12. Patogénesis	27
2.13. Endotoxina	27
2.14. Población en riesgo	27

### **CAPÍTULO III**

#### **PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y VARIABLES**

3.1. Hipótesis	28
3.2. Variables/ Categorías	28
3.3. Operacionalización y categorización de los componentes de las variables	29

**CAPÍTULO IV**  
**MARCO METODOLÓGICO**

4.1. Ubicación geográfica	30
4.2. Métodos de la investigación	30
4.3. Diseño de la investigación	34
4.4. Población, muestra y unidad de análisis	34
4.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información	35
4.6. Material biológico	35
4.8. Equipos, materiales e insumos	36
4.9. Matriz de consistencia	38

**CAPÍTULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION**

5.1. Presentación de resultados	39
5.1.1. Comprobación de <i>E. coli</i> .	39
5.1.2. Reacción de antisuero con antígeno	39
5.1.3. Reacción antígeno – anticuerpo	39
5.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados	39
5.3. Contrastación de hipótesis	42

<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>49</b>

## RESUMEN

La presente investigación de tipo experimental, tuvo como objetivo, determinar la capacidad detectora de inmunidad para *Escherichia coli* en personas en riesgo en la Distrito de Cajamarca, frente a un antígeno de *Escherichia coli* estandarizado en condiciones de laboratorio. El antisuero, se obtuvo por inoculación del antígeno inactivo de suspensión bacteriana de *E. coli* a conejos (*Oryctolagus cuniculus*) raza Nueva Zelanda. El suero con anticuerpos se obtuvo a 28 días de iniciado el programa de inoculación del antígeno, en los respectivos especímenes. Verificándose la presencia de anticuerpos, por medio de la reacción de aglutinación en las 10 diluciones (1:10 a 1:5120), con el respectivo antígeno. El antígeno confrontado, con el suero y sangre de personas, se obtuvo aglutinación. Concluyendo que el 91.7 de las personas en estudio han generado anticuerpos a este aislamiento.

**Palabras claves:** Antisuero, antígeno, *Escherichia coli*

## SUMMARY

The objective of this experimental research was to determine the immunity detection capacity for *Escherichia coli* in people at risk in the District of Cajamarca, against a standardized *Escherichia coli* antigen under laboratory conditions. The antiserum was obtained by inoculation of the inactive antigen of bacterial suspension of *E. coli* to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) breed New Zealand. The serum with antibodies was obtained 28 days after the start of the antigen inoculation program, in the respective specimens. Verifying the presence of antibodies, by means of the agglutination reaction in the 10 dilutions (1: 10 to 1: 5120), with the respective antigen. The antigen was confronted, with the serum and blood of people, agglutination was obtained. Concluding that 91.7 of the people in the study have generated antibodies to this isolation.

**Keywords:** Antiserum, antigen, *Escherichia coli*

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

En el cuerpo humano, hay aproximadamente diez veces más células bacterianas que células humanas, distribuidas preferentemente en la piel y tracto digestivo. (1); normalmente el hombre alberga alrededor de 400 especies de microorganismos que superan los 1250 g, equivalente al peso del hígado; de éstas el 80% (1000 g) se encuentran en el intestino, 20 g en la boca, 30 g en vagina y 200 g en la piel; cada uno de éstos podrían invadir tejidos, causando enfermedad y muerte (2), pero gracias al efecto protector del sistema inmunitario hace que la mayoría de éstas sean inofensivas o beneficiosas (1), reconociendo a los microorganismos dañinos y a las células malignas, como entes extraños en el cuerpo, por lo que son rechazados, permitiendo preservar la identidad e integridad caso contrario se produce la enfermedad (2).

Por naturaleza, en el intestino grueso del hombre prospera diferentes especies de bacterias, destacando *Escherichia coli*, que corresponde al grupo de eurobacterias Gram negativas no fotosintéticas; que es uno de los integrantes más característicos de la flora intestinal normal de los mamíferos y un importante patógeno causante de enfermedades intestinales y del tracto urinario (3), las mismas que estando en poblaciones mínimas no hacen manifiesto de su virulencia, hasta ocurrir un desorden fortuito que en oportunidades causan infecciones (4), alterando la fisiología inmunológica del individuo, conduciéndolo a la enfermedad que puede causar la muerte (2).

Por otra parte, el individuo atacado puede defenderse del patógeno en forma total o parcial, según el balance que se establezca entre la patogenicidad de la bacteria y la eficacia de respuesta inmunitaria natural, adquirida, activa o pasiva del hospedero;

evidenciada a través de la presencia de anticuerpos específicos, siendo responsables las células polimorfonucleares, monocitos, dentríticas, linfocitos y plaquetas, originadas en la médula ósea provenientes de una célula pluripotencial o célula basal, debido a influjos especiales, posiblemente de tipo hormonal, recibidos en su microambiente (2).

Frente a la problemática expuesta se desarrolló la presente investigación que nos permitió determinar inmunidad de personas en riesgo a un aislamiento de *Escherichia coli*.

## **1.1. Planteamiento del problema**

### **1.1.1. Contextualización**

En el Perú, de acuerdo al informe sobre servicios de Agua potable y saneamiento reporta que el 90% de la zona urbana y el 61% cuenta con agua potable; el 81% de la zona urbana cuenta con saneamiento mientras que en la zona rural sólo tiene un 36%, conduciéndolos preferentemente a adquirir enfermedades gastrointestinales, que con el tiempo posiblemente en ellos van adquiriendo inmunidad.

### **1.1.2. Descripción del problema**

Teniendo en cuenta que la población cajamarquina, en un 100 %, no cuenta con servicios básicos óptimos, estamos expuestos a adquirir frecuentemente infecciones gastro intestinales, que en la mayoría de personas presenta manifestaciones clínicas y otros no, a pesar que sus condiciones de vida son insalubres. Esta característica nos condujo a realizar la presente investigación, con el propósito de determinar la existencia o no de inmunidad a través de un antígeno conocido.

### **1.1.3. Formulación del problema**

¿Cuál es la capacidad detectora de inmunidad para *Escherichia coli*, en personas en riesgo de la comunidad de Cajamarca, frente a un antígeno de *E. coli* estandarizado en condiciones de laboratorio.

## **1.2. Justificación e importancia**

### **1.2.1. Justificación científica**

En el tracto digestivo del hombre, específicamente en el intestino grueso, prosperan, variantes de la bacteria *Escherichia coli*; cuyas poblaciones en cantidades naturalmente normales, no causan daño; a excepción cuando ocurren desordenes fisiológicos, que permiten incrementar su población, ocasionando infecciones intestinales; con síntomas de diarrea en el paciente; además pueden causar infecciones del tracto urinario (3), que en circunstancias conducen a la muerte (2).

### **1.2.2. Justificación técnica-práctica**

Las enfermedades gastrointestinales producidas por *Escherichia coli* se ha convertido en un problema de salud pública por su alta incidencia y prevalencia, principalmente en los países en desarrollo como el nuestro. Este tipo de infecciones se debe a que no existe una adecuada, conducción de cultivos, manipulación de alimentos y saneamiento básico; condición que ha traído como consecuencia, que la población expuesta, en algunos casos ha adquirido inmunidad a través del tiempo. Razón por lo que se organizó y desarrolló la presente investigación; cuyo objetivo fue comprobar la existencia de inmunidad a un determinado aislamiento de este patógeno.

### **1.2.3. Justificación institucional y personal**

Teniendo en cuenta el artículo 7, de la Ley Universitaria 30220, referida entre ellas, a la investigación científica. En la Universidad Nacional de Cajamarca, periódicamente se reportan resultados de diferentes investigaciones; que se toman en cuenta, para solucionar problemas a nivel local, regional y nacional. La presente investigación, servirá como fuente de información y punto de partida para otras investigaciones, relacionadas a la presente.

## **1.3. Delimitación de la investigación**

- La presente investigación, se desarrolló teniendo en cuenta información científica.

- La cepa de *Escherichia coli*, se obtuvo del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- Se utilizaron dos conejos (*Oryctolagus cuniculus*) raza nueva Zelanda.
- Se aplicó el consentimiento informado, a las personas que participaron voluntariamente en el estudio.
- Se practicó, la no malificencia.
- La investigación fue autofinanciada.

#### **1.4. Limitaciones.**

En el Perú el tema de salud para los habitantes, tiene un fuerte componente cultural, de manera particular en Cajamarca, en donde la población se caracteriza por ser multidiversa, en el cual los preconceptos en relación a someterse a pruebas diagnósticas, son limitantes y negativas, sobre todo cuando se trata de procedimientos invasivos como la extracción de sangre. Esta situación es un gran impedimento para lograr su aceptación de participación como unidad de estudio en cualquier trabajo de investigación, pues existe la creencia que cuando se extrae pequeñas cantidades de sangre, pueden hacerles daño o quien hace el procedimiento lo puede hacer con fines comerciales. Es el caso del presente estudio, en el cual hubo una negativa rotunda a participar. Razón por la cual apenas se logró el consentimiento informado de doce personas mayores de edad.

#### **1.5. Objetivo general**

Determinar la capacidad detectora de inmunidad para *E. Coli* en personas en riesgo de la comunidad de Cajamarca, frente a un antígeno de *Escherichia coli* estandarizado en condiciones de laboratorio.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación o marco referencial

Pasteur determinó que las enfermedades contagiosas tienen como causa gérmenes microbianos infecciosos; éstos (antígeno) atenuados por el tiempo, al ser inoculados a hospederos susceptibles, generan anticuerpos de protección, en animales y el hombre (inmunidad); como lo demostró en el año de 1881, luego de administrar antígenos del carbunco en ganado ovino y vacuno; con este conocimiento, preparó la vacuna en base a células bacterianas inactivas (primera vacuna de la historia); investigaciones posteriores le permitió desarrollar la vacuna contra la rabia o hidrofobia, obtenida a través de anticuerpos del mismo virus, generada por inoculaciones sucesivas en conejos. La efectividad de esta vacuna, se probó con éxito el 6 de julio de 1885 con el niño Joseph Meister (5).

El científico Andreas Greinacher, de la Universidad de Greifswald (Alemania), reportó que los pacientes afectados por el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS), ocasionado por una cepa virulenta de *E. coli*; además de segregar el veneno “shigatoxina”, forman autoanticuerpos, que actúan destructivamente contra su propio organismo, provocando aumento de coagulación de la sangre; limitando el suministro sanguíneo a importantes regiones cerebrales y renales. Éstos son generados sólo por algunos pacientes, cuyos síntomas de gravedad, corresponden a alteraciones de consciencia y epilepsias (6).

En el año 1981, el Programa de Control de Enfermedades Diarreicas de la Organización Mundial de la Salud, según estudios en diferentes países del mundo, ha llegado a la conclusión que los agentes etiológicos más frecuentes son los enteropatógenos que causan diarrea en niños de los países en desarrollo; destacándose los rotavirus, *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *Shiguella* sp. y *Campilobacter jejuni* (7).

*E. coli*, es considerada una de las bacterias productoras de diarreas en humanos en el mundo; habiéndose tipificado nueve categorías según su virulencia y el consecuente cuadro clínico. Una categoría es nominada *E. coli* enterohemorrágica (ECH), que corresponde a la cepa 0157:H7; ésta provoca severa colitis hemorrágica, con escaso o sin leucocitos en las heces. En los países desarrollados la susceptibilidad a este patógeno se presenta en personas hasta la edad de 15 años; en cambio en los países en desarrollo como el nuestro las infecciones mayormente se dan en niños de 1,5 años, indicando probablemente transmisión doméstica, desde el adulto, que no enferma por inmunidad (8).

En el Perú, entre los años 2003 – 2005, se presentaron once casos de infección por *E. coli* 0157:H7, procedentes de Arequipa, Lima ciudad, Lima Este, Puno y La Libertad (8).

El Instituto Nacional de Salud a través del informe “Indicadores del programa articulado nutricional, según monitoreo nacional de indicadores nutricionales 2008 – 2009”, reporta que, a nivel nacional, del 100% de hogares, con niños menores de 36 meses, el 39% de éstos disponían de agua libre de coliformes fecales y *E. coli* bacteriológicamente negativo; el 3,2% de niños menores de 36 meses, los hogares rurales tenían “saneamiento básico” (9).

En estudios de 8003 cepas de *E. coli* diarrogénicas (DEC), en niños de las zonas periurbanas de Lima, se determinó que la prevalencia promedio global de cepas que provocan diarrea fueron 4 243 cepas; de estas el 9,9 % corresponden a *E. coli* enteroagregativa (EAEC); 8,5 %, a enteropatógena (EPEC); 6,9 % enterotoxigénica (ETEC); 4,8 % *E. coli* difusamente adherente (DAEC); 0,8 % productora de toxina shiga (STEC); 0,6 % enteroinvasiva (EIEC). Los principales patotipos en 3,760 muestras control; el 10,9 % fueron del orden enteropatógena (EPEC) y 10,4% fueron enteroagregativa (EAEC) (10).

En la investigación “Patotipos diarreagénicos emergentes de *Escherichia coli* en Colombia” se concluyó que los patotipos diarreagénicos de *E. coli* fueron identificados en 9, 3% (29/311) de casos y en 10% (30/299) de controles. Todos los patotipos de *E. coli* con excepción de la *E. coli* productora de toxina Shiga se detectaron. Las diferencias entre los patotipos de *E. coli* de casos

y controles no fue estadísticamente significativa. Se identificaron dos cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) con adherencia agregativa y formación de biopelículas similares a *E. coli* enteroagregativa (ECEA). Adicionalmente, Rotavirus, Norovirus GI/GII, Astrovirus y Sapovirus fueron identificados en casos con frecuencias entre 0,3 a 9,6% y en controles de 0,7 a 2,3%. Salmonella, Campylobacter jejuni, Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica y Giardia lamblia se detectaron tanto en casos y como en controles. Se concluye que los patotipos diarreagénicos de *E. coli* son frecuentes en niños con diarrea y sin diarrea. Se reportan ECEI emergentes con fenotipos de adherencia celular y formación de biopelículas similares a la ECEA (11).

En el estudio “Presencia de *E. coli* enteropatógenas en pacientes con diarrea aguda” concluye que la frecuencia de presentación de las categorías enteropatógenas en los pacientes de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) fue enteroinvasivas 11,8%; enterohemorrágicas 10,4%, enterotoxigénicas 0,69%. Por carencia de inmunosueros específicos no se estableció la frecuencia de presentación del tipo enteropatógenos clásicos. No obstante, los resultados obtenidos infieren su participación causal. Los porcentajes de aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteroinvasiva muestran la necesidad de instrumentar este tipo de diagnóstico (12).

La investigación “Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela, demostró la importancia de aplicar pruebas moleculares en la identificación de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea de diversa gravedad (13).

En la investigación “Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia”, han sido detectadas en heces fecales de niños con diarrea cepas de ECET, ECTS, ECEP y ECEA, siendo ECET el agente más frecuente. Se estima que la contaminación del agua y los productos alimentarios son las fuentes más importantes de transmisión de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) por *E. coli*. Estudios demuestran que hasta 30% de los productos alimentarios para consumo están contaminados con cepas enteropatógenas de *E. coli* (14).

## 2.2. Bases Conceptuales

**2.2.1. Bacteria**, microorganismo unicelular procariota miden de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  (15), pertenecen al reino Protista (16), estructuralmente están conformadas por una membrana citoplasmática (15), que presenta invaginaciones, denominadas mesosomas, donde se encuentran enzimas que intervienen en la síntesis de ATP (17), rodeada por la pared celular rígida, constituido por péptidoglucano (15), no presenta núcleo definido por no estar delimitado por una membrana (17); el citoplasma viscoso contiene nucleóide que posee la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas aparecen fragmentos circulares de ADN denominado plásmidos, con información genética (4); además contiene ribosomas, un cromosoma de doble hebra de ADN (15), fimbrias o pili, que intervienen en el intercambio genético (17), carece de mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico (15), aparato de Golgi (18).

Morfológicamente las bacterias Gram negativas, varían de bacilos a cocos simples, hasta géneros que poseen prostecas, yemas y cuerpos fructíferos, la mayoría presentan flagelos que ayudan a la locomoción (16), éstos son rígidos y se encuentran implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal (1), por la presencia y disposición de éstos, las células bacterianas adquieren distintas denominaciones; son átricas cuando no poseen flagelos, anfótricas cuando se ubican en un extremo de la célula bacterianas, lofótricas en ambos lados y perítricas en toda la superficie (16).

Fisiológicamente son diversas unas son autótrofas, quimiolitótrofas, capaces de utilizar compuestos inorgánicos reductores como fuente de energía, a través de la oxidación y la síntesis de proteínas (19), a la actualidad no se ha determinado la forma de metabolismo, morfología y la estrategia de reproducción (20).

Se estima que la cantidad de bacterias en nuestro planeta está, en el orden de  $5 \times 10^{30}$  células; el carbono que posee esta población, equivale al de todas las plantas de la Tierra y que la cantidad de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) es 10 veces mayor de la totalidad de la biomasa vegetal; esta característica constituye la reserva de nutrientes para la vida, encontrándose en el suelo y el agua (17).

De acuerdo a la forma de vida se categoriza en saprofitas, simbioses, parásitas y patógenas, éstas (21), pertenecen al dominio bacteria con variabilidad morfológica y fisiológica (17); las mismas que son medianamente virulentas y muy virulentas (21). En la división phylum se encuentran las proteobacterias que es la división más amplia de bacteria y dentro de esta se encuentran *Escherichia coli* (17).

**2.2.2. Generalidades de *Escherichia coli***, descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*, posteriormente a *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (21), es microbiota normal del tracto gastrointestinal del hombre y numerosos animales; en el ser humano constituye el microorganismo aerobio más abundante, alcanza concentraciones bacterianas en las heces del orden de  $10^9$  bacterias por gramo (30), organismo procarionte, peritrica, gram negativa, anaerobia facultativa, de vida común en los intestinos de los animales, y por ende en las aguas negras (21), con pocas exigencias nutritivas, por lo que crece en medios comunes (22); peculiaridad que lo ha hecho estar presente en todo el planeta.

En neonatos humanos *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal, se establece en las mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 horas después de la primera comida; esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo (21); constituye la mayoría de la flora comensal anaerobia facultativa funciona simbióticamente sintetizando complejo B como la B<sub>2</sub> y la vitamina K e incluso compete con gérmenes ajenos a la flora normal, por ejemplo produciendo ácidos activos contra ciertas Siguellas y las microcinas B17 y J25 (23), no forma esporas, no produce β-glucoronidasa, no fermenta sorbitol, pero si glucosa y lactosa. Este microorganismo vive en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos (22). A diferencia de otros coliformes puede desarrollarse a 45°C; es relativamente resistente a los agentes externos (21).

Cuando la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, se convierte en comensal de flora intestinal; facilitando la absorción de nutrientes para el hospedero. El contenido del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente tienen unas  $10^{12}$  bacterias

por gramo; *E. coli* conforma el 0,3%, ésta se reproduce en la parte superior del intestino delgado; cada persona tiene en su intestino tres o cuatro serotipos que pueden ser diferentes en los diversos tramos intestinales, de los que uno o dos son residentes habituales y los otros son transeúntes, manteniendo cierto equilibrio, pero también hay frecuentes cambios, de modo que pueden predominar algunos serotipos unas semanas hasta ser substituidos por otros (22). Existe cierto predominio de las cepas más resistentes sobre las otras, pero en ciertas condiciones, especialmente por cambios alimenticios. El predominio puede ser muy grande y se favorece la enfermedad y la transmisión (21).

Existen cepas virulentas y no virulentas; entre las primeras destaca *E. coli* O157:H7, viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, a pesar de ser inocua produce una potente toxina que puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico. En 1982, se reportó en EE. UU, como la causante de diarreas agudas; cuyo inóculo provino de carne de vacuno contaminada (21).

En 1996, cerca de Seattle (Washington) se produjo un brote a causa de esta bacteria, que se encontró en botellas de zumo de manzana de la marca Odwalla; muchas personas, entre ellas bebés y niños, murieron después de tomar este zumo. La bacteria entró en las botellas porque las manzanas que se exprimieron contenían excrementos de venados de la zona y no hubo ningún tipo de pasteurización (3).

*Escherichia coli* (*E. Coli*) forma parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización.

A principios de la década de los 40, Bray y Beavan, en Inglaterra, demostraron con rigurosos estudios epidemiológicos y microbiológicos, que cepas de *E. Coli* pertenecientes al serogrupo O111 se asociaban a brotes epidémicos de enteritis graves en lactantes ingresados en hospitales. Esta correlación epidemiológica se demostró para otros serogrupos de colibacilos como el O26, el O55 y otros, aunque no se pudo precisar el mecanismo de patogenicidad. Estas cepas se han

venido conociendo bajo la denominación de *E. Coli* enteropatógena clásica (ECEP clásica). Posteriormente se descubrió un grupo de cepas de *E. Coli* de serogrupos diferentes de los anteriores, que causan enteritis por un mecanismo invasor rigurosamente idéntico al de las shigelas (*E. Coli* enteroinvasora: ECEI). Desde finales de los 60 también se conocen otros serogrupos que producen enteritis por liberación de enterotoxinas de dos tipos, termoestable (ST) y termolábil (LT); este grupo de cepas se denominan *E. Coli* entero toxigénica (ECET) (22).

Existen dos mecanismos de patogenicidad de ECEI y de ECET, cuyas características mostraron que no eran invasoras ni producían toxinas. Levine y sus colaboradores demostraron en voluntarios humanos el poder patogénico de algunas de estas cepas (24).

*E. coli*, vive en el intestino, la mayoría de éstas son inofensivas; sin embargo, algunos tipos pueden causar diarrea; como el tipo de *E. coli* que causa la “**diarrea del viajero**”; otro tipo induce la “**diarrea hemorrágica**”, conduciendo a insuficiencia renal y muerte, principalmente en niños y adultos con sistemas inmunológicos debilitados (22).

El medio que conduce a adquirir esta bacteria, es a través del consumo de alimentos contaminados; también ocurre con bañistas y deportistas de natación, cuando estos tragan el agua de piscinas abastecidas con fuentes de agua contaminadas con desechos humanos (22).

En los Estados Unidos de Norte América, se ha reportado que anualmente 48 millones de personas se enferman por consumir alimentos contaminados; siendo los causantes comunes: bacterias y virus (25).

La principal patogenia, corresponde a infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa (21).

La *E. coli*, está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad,

patogenicidad y toxicidad. En países sub desarrollados, se presentó casos de muerte en niños de 1 – 8 años (21).

**2.2.2.1. Características microbiológicas de Escherichia coli**, este género fue aislado por Theodor Escherich en el año de 1919, morfológicamente cada célula se caracteriza por ser de forma cilíndrica, de 2.0 - 6.0 x 1.1 – 1.5 µm, en la mayoría de veces se encuentran solitarias a veces formando grupos de 2, su pared celular está constituida por una estructura rígida que le da la mureina, como también por polisacáridos como el N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N- y ácido acetil murámico (MueNAc) y otros polipéptidos como L alamina, D-ácido glutámico, ácido L-meso- diamino –pimélico (DAP) y de alamina. La membrana celular está constituida por un millón de moléculas de lipopolisacáridos (LPS), distribuidos en 3 cadenas de lípido: **1.** lípido A (endotoxina), **2.** lípido B, que es una región de fosforilatos y **3.** lípido O es un polímero antígeno inmunogénico, donde se repiten de 1 a 40 unidades de oligosacáridos. Los flagelos en disposición peritrica son de 1 a 5 unidades por célula, miden 20 nm de diámetro y superan los 20 nm de longitud, están constituidos de subunidades de una proteína llamada flagelina, determinada por el gen *fli* (Cgen) (4).

Además de poseer flagelos en su superficie, que sirve para su motilidad, presenta pelos o fimbrias que contienen las mismas proteínas de los flagelos denominados también pili, prospera en medios de cultivo con agar, formando colonias circulares de 2 a 3 mm de diámetro, formando polisacárido alrededor de su membrana celular; las colonias son planas abultadas y de consistencia seca, que en su máximo crecimiento pueden llegar a 5 mm de diámetro (4).

Durante su metabolismo fermentan glucosa y otros carbohidratos, produciendo piruvatos que se transforman en ácidos láctico, acético y fórmico. Las razas fisiológicas de esta bacteria y otras Gram negativas son resistentes a los antibióticos hidrofóbicos como a los macrólidos, novobiocinas, rifampicinas, actimicinas D y cido fusídico. Bioquímicamente son oxidasa negativa quimiorganotróficos (4). *E. coli* y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo (26).

**2.2.2.2. Categorización taxonómica de *Escherichia coli*,** especie que se encuentra en el grupo Bacteria Phylum VII Proteobacteria, sección XIX Gama Proteobacterias, clase I: Zymobacteria, orden XII Enterobacteriales; familia I Enterobacteriaceae; género *Escherichia*; especie *E. coli* (17).

**2.2.2.3. Biotipos de *Escherichia coli*.**

**a. *Escherichia Coli* Enteropatógena (ECEP),** causa diarrea en humanos, conejos, perros y caballos, al igual que la enterotoxigénica, pero la etiología y los mecanismos moleculares de colonización son diferentes; carece de fimbrias y no produce las toxinas ST y LT, pero utilizan la proteína intimina, una adhesina, para adherirse a las células intestinales. Este virotipo posee una serie de factores de virulencia que son similares a los que se encuentran en *Shigella*, como la toxina shiga. La adherencia a la mucosa intestinal causa una reordenación de la actina en la célula hospedante, que induce una deformación significativa. Estas bacterias son moderadamente invasivas: penetran en las células hospedadoras provocando una respuesta inflamatoria. La causa principal de diarrea en los afectados por esta cepa son los cambios provocados en la ultraestructura de las células intestinales (21).

**b. *Escherichia Coli* Enterotoxigénica (ECET),** tiene características similares a *Vibrio cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados (21).

**c. *Escherichia Coli* Enteroinvasiva (ECEI),** es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal (21).

**d. *Escherichia Coli* Enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH)**, la convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de STEC (Shiga Toxin *Escherichia coli*) para este grupo, debido a que estas bacterias producen una toxina citotóxica para células Vero de cultivo de similaridad estructural a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Las STEC *E.coli* toxina shiga producen verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (lo anterior más afección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocitopénica trombótica (lo de antes más afección del sistema nervioso central). Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las verotoxinas, también llamadas “Toxinas Shiga”, no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia (21).

**e. *Escherichia Coli* Enteroagregativa (ECEA)**, sólo encontrada en humanos. Presenta fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos. Se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre. No son invasivas. Producen hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas (21).

**f. *Escherichia coli* de adherencia difusa (ECAD)**, se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos (21).

En junio del 2011, científicos chinos, estudiando el genoma de una nueva cepa de *Escherichia coli* 0104, determinaron genes resistentes a ocho tipos de antibióticos y la capacidad de producir enzimas especiales, dándole la característica de especiales; esta nueva cepa muestra resistencia a: penicilinas, tetraciclinas, ácido nalidixico, trimetoprina-sulfametoxazol, cephalosporina, amoxicilina / ácido clavulánico, piperacilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam (27).

### **2.3. Bacteria patógena**

Las diferentes especies de bacterias zoonóticas, tienen la capacidad de producir enfermedad, cuando existen condiciones adecuadas en el hospedero susceptible y terminan ocasionando infección de acuerdo a la virulencia (1).

### **2.4. Patogenicidad bacteriana**

Es una cualidad intrínseca (1), que posee cualquier especie bacteriana, para ocasionar enfermedad en un hospedador humano susceptible (15), que se encuentra relacionado con a) las lesiones en los tejidos, a través de sus metabolitos, enzimas y toxinas, b) es importante recalcar el efecto de las toxinas; cuando éstas son expulsadas se nombran exotoxinas y tienen la particularidad de transportarse a través de la sangre; actuando a distancias sobre cualquier órgano sensible. Las toxinas que se mantienen en el soma celular, se nombran glucoproteicas o endotoxinas; éstas sólo se disipan, cuando la célula bacteriana se muere; dando origen a las infecciones generalizadas o septicemias. Este tipo de toxinas las provocan las bacterias gram negativas (1).

### **2.5. Virulencia**

Capacidad relativa que tiene una bacteria para vencer los mecanismos de defensa (2), se relaciona con la aptitud de patogenicidad (15), que es una forma de medir ésta y está relacionado con la dosis o número de células del patógeno, que induce al desarrollo de una enfermedad en un tiempo determinado; depende básicamente de: a) las características particulares del microorganismo, b) los mecanismos de resistencia de la célula huésped (2), creando en ellos alteraciones fisiológicas y morfológicas, hasta inducir la muerte (1). En la naturaleza, cada especie dañina se manifiesta como de baja virulencia, *Streptococcus salivarius* que se encuentra en la boca y faringe, no produce enfermedad, pero si llega a situarse en una válvula cardíaca dañada (bacteriemia) y si se multiplica, causa destrucción lenta y continua; las de moderada virulencia, como *Escherichia coli*, que se encuentra dentro del colon, cuando se desplazan a tejidos adyacentes causan infecciones agudas; la especie *Bordetella pertusis*, que no pertenece a la flora normal, pero si aparece es

altamente infecciosa causando tos ferina; corresponden al grupo de alta virulencia; las de extrema virulencia como *Yersinia pestis*, es altamente infecciosa conduciendo a la muerte (15).

La virulencia puede estar atenuada; esta característica es la base del principio de vacunación o puede estar totalmente activa; capaz de ser transmitida de un sujeto a otro; puede ser fijada por liofilización, con fines de investigación La puerta de entrada de las bacterias zoonóticas en su hospedero, para provocar infección, está relacionado con su virulencia (1).

## **2.6. Inóculo**

Para el caso específico de las bacterias, el inóculo corresponde al soma unicelular que facilita su multiplicación en el hospedero, produciendo o aumentando su inmunidad (28).

## **2.7. Antígeno**

Proviene de las palabras griegas,  $\alpha\upsilon\tau\iota$  = anti = opuesto o con propiedades contrarias y  $\gamma\epsilon\nu$  = geno, generar, producir, que genera o crea oposición (29). Es toda sustancia compuesta por proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos de los microorganismos infectantes antígeno (30), que al ser inyectado a un animal de sangre caliente induce la formación de anticuerpos (21) y es capaz de inducir una respuesta inmune en un hospedero y reaccionar específicamente con las células y moléculas (anticuerpos) que se producen en esta respuesta (30).

Para ser antígeno, una molécula de éste, debe poseer *epítomos*, los que sirven para ser reconocidos por los linfocitos, facilitando la reacción con una sola molécula de anticuerpos. Los *epítomos*, en las proteínas son lineales y conformacionales; es lineal, cuando está formado por una sola secuencia y conformacional por poseer una estructura tridimensional (30). La zona donde el antígeno se une al anticuerpo recibe el nombre de epítopo o determinante antigénico, mientras que el área correspondiente de la molécula del anticuerpo es el paratopo (31).

Considerado también como una molécula capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos. Así dentro de esta definición de antígeno se

incluyen las moléculas que, previa presentación antigénica, son capaces de desencadenar la activación de células “T” citotóxicas capaces de destruir las células diana sin la participación de anticuerpos (16).

En la superficie de los glóbulos blancos existen pequeñas estructuras químicas dispuestas en forma de antena, capaces de provocar la formación de un anticuerpo que se fija en ellas específicamente; este antígeno se denomina Mac; fue el primero aislado en el sistema de leucocitos del humano (HLA = Human Leucocyte Antigen); de allí la importancia capital de los antígenos en la defensa del organismo contra toda agresión exterior o interior, basándose en la capacidad de distinguir entre constituyentes propios del individuo y de lo extraño a él; defensa y salvaguarda de “lo propio” y destrucción y eliminación de lo “no propio” (32).

### **2.7.1. Clasificación de antígenos**

**a. Antígenos exógenos**, ingresan al cuerpo desde el exterior; por inhalación, ingestión o inyección. Son tomados en las células presentadoras de antígenos (CPAs), mediante endocitosis o fagocitosis y procesadas en fragmentos. Las CPAs presentan los fragmentos a los linfocitos “T” colaboradores ( $CD4^+$ ) con ayuda de moléculas de histocompatibilidad (CMH) de clase II en su superficie. Algunos linfocitos “T” pueden reconocer de manera específica la dupla péptida: CMH, es entonces cuando son activados y comienzan a secretar citoquinas, o sustancias que a su vez pueden activar linfocitos ( $CD8^+$ ), células productoras de anticuerpos o linfocitos B, macrófagos, y otras partículas (33).

**b. Antígenos endógenos**, se generan al interior de una célula, como resultado del metabolismo celular normal, o debido a infecciones virales o bacterianas intracelulares. Los fragmentos de esos antígenos son presentados sobre la superficie celular en un complejo con moléculas MHC de clase I. Si son reconocidos por linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ) activados, éstos secretan varias toxinas que causan la lisis o apoptosis (muerte celular) de la célula infectada. Para prevenir que las células citotóxicas destruyan células normales que presenten proteínas propias del organismo, estos

linfocitos T autoreactivos son eliminados, como resultado de la tolerancia; también conocida como selección negativa (33).

**c. Auto-antígenos**, se refiere a una proteína o complejo de proteínas normal; constituido por ADN o ARN, fácilmente reconocido por el sistema inmune. Ocurre en pacientes que sufren de alguna enfermedad autoinmune específica. En condiciones normales, estos antígenos no deberían activar el sistema inmune; pero debido principalmente a factores genéticos y ambientales, se ha perdido una correcta tolerancia inmunológica en esos pacientes (33).

**d. Antígenos tumorales**, denominados también neoantígenos, son presentados por moléculas MHC I o MHC II, del complejo mayor de histocompatibilidad, que se encuentran en la superficie de células tumorales, llamadas antígenos tumorales específicos (TSA) y generalmente, son resultado de una mutación específica, en cuyo caso será reconocido por linfocitos B. Comúnmente existen los antígenos que son presentados por células normales y tumorales, llamados antígenos asociados a tumores (TAAs). Los linfocitos T citotóxicos que reconocen esos antígenos son capaces de destruir la célula tumoral antes de que proliferen o haga metástasis (33).

**e. Antígenos nativos**, son aquellos, que aún mantienen su forma original y no han sido procesados por una célula presentadora de antígeno (CPA) en partes más pequeñas. Los linfocitos T no se pueden unir a los antígenos nativos, ya que necesitan de la ayuda de células presentadoras de antígenos (CPAs) para que los procesen, mientras que los linfocitos B, sí pueden ser activados por esta clase de antígenos (33).

### **2.7.2. Determinante antigénico o epitope**

Es la zona del antígeno, en la que reside la antigenicidad; constituye la conformación molecular de la superficie del antígeno, capaz de combinarse específicamente con una zona complementaria que existe en el anticuerpo (2).

Los anticuerpos son específicos para un antígeno, pero un antígeno puede tener varios anticuerpos específicos. Cada anticuerpo se acopla a la zona determinante antigénico o epitope del antígeno;

son formas moleculares reconocidas por los anticuerpos y las células del sistema inmune adaptativo específico. Un antígeno puede tener varios epitopos diferentes o idénticos. Los anticuerpos son específicos para los epitopos y no para el antígeno en su conjunto (2).

## **2.8. Anticuerpo**

Es una glicoproteína, formadas por las células “B” activadas o células plasmáticas. Cada célula “B” tiene anticuerpos unidos a su superficie, que poseen dos sitios de combinación (bivalente); algunos de éstos se combinan para dar lugar a anticuerpos multiméricos con hasta 10 sitios de combinación (20). Estas proteínas, llamadas inmunoglobulinas (Ig), son producidas por el sistema inmunitario como reacción ante un antígeno, por la infección de un microorganismo (30) y están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas con dos cadenas pesadas constituidos aproximadamente por 440 aminoácidos y dos ligeras formadas por 220 aminoácidos; ambas idénticas, conectadas unas con otras a través de puentes de disulfuro (20), inician sus efectos biológicos al unirse al antígeno (33), provocando la respuesta inmune debido a que las estructuras del antígeno y anticuerpo son complementarias (30).

Las inmunoglobulinas, de mayor importancia son la Ig M, Ig G e Ig A, éstas se producen en diferentes momentos durante la infección. Los primeros anticuerpos que aparecen ante una infección primaria son las Ig M, que tienden a desaparecer entre tres a seis meses después. Más tarde aparecen los anticuerpos Ig G, que son las más abundantes y perduran en la sangre de por vida, aunque no esté presente el patógeno (30); constituye el 80% de Ig; además de estar en plasma sanguíneo también está en los fluidos tisulares, actuando contra bacterias y partículas virus, opsonizando a los invasores y neutralizando toxinas, activan la vida clásica del complemento; es la única capaz de atravesar la placenta y proporcionar inmunidad natural en el útero y al recién nacido (20).

### 2.8.1. Moléculas que participan en el reconocimiento del antígeno

En el sistema inmune adaptativo hay tres tipos de moléculas que intervienen en el reconocimiento del antígeno **a)** Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) que se presentan como receptores de membrana en los linfocitos B, o son secretados por éstos, una vez que se han transformado en plasmocitos, **b)** El receptor T (TCR) de los linfocitos T, que según el tipo de cadena que lo forme, puede ser  $\alpha$  o  $\delta$ . La función de éstos últimos es todavía confusa, mientras que el papel del receptor  $\alpha$  está bien establecida, y se vincula con el reconocimiento de péptidos unidos a receptores denominados moléculas del complejo mayor de compatibilidad (MHC), **c)** Las moléculas de MHC son el tercer tipo de estructura que participan en el reconocimiento del antígeno (2).

El reconocimiento del antígeno por las Igs y los TCRs es de muy alta especificidad, en cambio las moléculas de MHC interactúan con el antígeno con baja especificidad. Existen dos tipos de receptores MHC, de clase I y clase II. Mientras que los primeros están presentes en todas las células nucleadas, los últimos están restringidos a un número limitado de células del sistema inmune. De estos tres, los anticuerpos se distinguen por ser los que tienen mayor capacidad para seleccionar entre antígenos diferentes y por su mayor fuerza al antígeno (2).

### 2.8.2. Células generadoras de anticuerpos

Corresponden a una célula común, denominada célula progenitora pluripotente, la misma que da inicio a todas las células sanguíneas; su diferenciación inicia en la etapa fetal, para durar toda la vida; residiendo principalmente en la médula ósea. Ya diferenciada da origen a dos células; **a) progenitora mielocítica** a partir de la cual originan diferentes células con funciones específicas como las células formadoras de colonias “**CFU eritroides**” que dan origen a los eritrocitos; las células “**megacariocitos**” a las plaquetas; “**CFU de basófilos**” a basófilos; “**CFU de eosinófilos**” a eosinófilos y a los “**CFU de granulocitos y monocitos**”, que dan lugar a células dentríticas, como también a neutrófilos y monocitos que estos últimos también dan origen a células dentríticas

y a macrófagos y la **b) progenitora linfocítica**, que dan origen a los “linfocitos B”, “linfocitos T” y los “linfocitos citolíticos espontáneos (NK)” (18).

Las distintas clases de Ig, se producen en diferentes momentos durante la infección, los primeros anticuerpos que aparecen ante una infección primaria son las Ig M, pero también son las que desaparecen entre tres a seis meses; más tarde aparecen anticuerpos Ig G. Considerando que el sistema inmunitario posee memoria, en caso de una reinfección se produce una respuesta inmune secundaria, con mayor rapidez y mayor producción de Ig G (30).

El lugar de formación de anticuerpos, depende de la vía de administración del antígeno; cuando es inyectado intravenosamente, el bazo es el responsable y si es administrado por vía subcutánea, intradérmica o intraperitoneal, los responsables son los ganglios linfáticos. Después de la primera inyección de un antígeno, con el cual el animal entra en contacto por primera vez, existe un lapso, denominado periodo latente; antes de que haga su aparición en la circulación algún anticuerpo, seguido por un aumento gradual en el título. Esta reacción a una reacción única se denomina respuesta primaria (34).

### **2.8.3. Células de respuesta a la inmunidad específica**

Corresponden a una clase leucocitos conocidos como linfocitos; éstos se encuentran en la sangre en la linfa y en los órganos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, apéndice, amígdalas, timo, placas de Peyer); se distinguen las **células T o linfocitos T**, responsable de inmunidad mediada por células y las **células B o linfocitos B**, que se encargan de la producción de anticuerpos. La respuesta inmune específica se compone de la respuesta inmune celular y la humoral; la primera está basada en la respuesta específica de los linfocitos T, contribuyendo a activación de células macrófagos; mientras que la inmunidad humoral, genera anticuerpos a través de un tipo especial de linfocitos B, en colaboración con otras células, como los macrófagos y linfocitos T. (30).

### **2.8.4. Función de los anticuerpos en el reconocimiento de los antígenos**

Las moléculas de los anticuerpos se une a la membrana, actuando como receptores del antígeno de la célula B. La interacción del antígeno con los anticuerpos de la membrana sobre las células

B, constituye una fase de reconocimiento de la inmunidad humoral (16); como principales mecanismos de defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas (30). Los anticuerpos, son también producidos por la progenie de células B, en una forma secretora, que se diferencia en respuesta a la estimulación antigénica. Éstos, se unen al antígeno y desencadenan varias de las funciones efectoras del sistema inmunitario. La especificidad de la fase efectora se debe a la interacción antígeno anticuerpo; pero las propias funciones efectoras no suelen ser específicas para el antígeno desencadenante. De hecho, estas funciones están a menudo mediadas por porciones de la molécula de anticuerpo que están en lugares diferentes del de la unión al antígeno (16).

#### **2.8.5. Distribución molecular y purificación de las moléculas de anticuerpos**

Los anticuerpos se encuentran en varias localizaciones anatómicas: a) dentro de los compartimentos unidos a la membrana citoplasmática (retículo endoplasmático y aparato de Golgi) y sobre la superficie de los linfocitos B, que son las únicas células que los sintetizan; b) en el plasma de la sangre y en menor grado, en el líquido intersticial de los tejidos, donde se acumulan los anticuerpos secretados por las células B; c) sobre la superficie de ciertas glándulas efectoras, como los fagocitos mononucleares, las células agresoras naturales (NK) y los mastocitos que no sintetizan anticuerpos pero tienen receptores específicos para unirse a anticuerpos; d) en los líquidos secretados como el moco y la leche, a las cuales se transportan de forma específica anticuerpos (35).

Cuando la sangre forma un coágulo, los anticuerpos quedan en el líquido residual llamado suero. A una muestra de suero que contenga un gran número de anticuerpos que se unan a un antígeno en particular se le denomina antisuero (33).

#### **2.8.6. Acciones de los anticuerpos**

Por naturaleza la unión de antígeno anticuerpo constituye una asociación bimolecular específica y que en los vertebrados es indispensable, porque de ello depende, la protección frente a la

invasión de los agentes infecciosos y no infecciosos; produciéndose un recubrimiento parcial al invasor extraño, por parte de los anticuerpos; etiquetándolo para potenciar su identificación por parte de otros componentes inmunitarios innatos y adaptativos (20).

En la mayoría de casos, el nivel máximo de anticuerpos en sangre, se detecta entre tres y cinco semanas después de iniciada la infección, en donde, el anticuerpo se une de manera específica al antígeno que ha dado origen a la respuesta inmune; debido a que las estructuras de ambas moléculas se complementan como una llave a su cerradura (30).

Frente a la invasión de microorganismos extraños al cuerpo, los anticuerpos mecanismos de acción a) **neutralización**, donde los anticuerpos inactivan toxinas extra celulares de bacterias, formando el complejo toxina anticuerpo, que posteriormente es fagocitado por macrófagos o queda incapacitado para interaccionar con los receptores de las células diana, para entrar en ella; **opsonización**, en este proceso los anticuerpos recubren a los microorganismos invasores, preparándolos para su reconocimiento e ingestión por las células fagocíticas y la presencia de **complejos inmunitarios**, que se forman cuando ocurre entrecruzamiento de anticuerpo y antígeno, en donde el primero tiene dos sitios de unión antígeno y el segundo posee dos determinantes antigénicos, dando lugar a complejos inmunitarios (20).

Si los antígenos están constituidos por moléculas solubles y el complejo alcanza un tamaño suficiente grande, se produce la precipitación por reacción de la precipitina del anticuerpo. Cuando el complejo inmunitario implica el entrecruzamiento de células o partículas se produce una reacción de aglutinación, el anticuerpo responsable se denomina aglutinina (20).

## **2.9. Inmunidad.**

Cualidad que adquieren los organismos superiores a resistir enfermedades, que es consecuencia del resultado de células memoria que reconocen los antígenos a los que han sido expuestos (28); existen factores no específicos que tienden a protegernos de la enfermedad, como también otros agentes altamente específicos elaborados por el organismo en respuesta al reto, procedente de un

germen patógeno determinado. A ellos se debe que la mayoría de las personas contraen una sola vez muchas de las enfermedades comunes adquiriendo en consecuencia inmunidad para las mismas (36).

### **2.9.1. Inmunidad Innata, o inespecífica**

Es el sistema de defensa con la que nació la persona y que lo protege contra todos los antígenos (37); constituyen las barreras que impiden que los materiales dañinos ingresen en el cuerpo y forman la primera línea de defensa en la respuesta inmunitaria. Las células corporales tienen proteínas que son antígenos, entre ellos un grupo llamado antígenos HLA; el sistema inmunitario aprende a ver estos antígenos como normales y usualmente no reacciona contra ellos (28). Abarca el reflejo de la tos, enzimas de las lágrimas y de los aceites de la piel, el moco, que atrapa bacterias y partículas pequeñas, la piel, el ácido estomacal, sistema de complementos del cuerpo (interferon, interleucina que causan la fiebre. Si un antígeno traspasa estas barreras, es atacado y destruido por otras partes del sistema inmunitario (35).

### **2.9.2. Inmunidad adquirida**

Es la inmunidad que se desarrolla con la exposición a diversos antígenos. El sistema inmunitario de la persona construye una defensa contra ese antígeno específico (35). La inmunidad adquirida se debe a la inducción de inmunidad humoral (mediados por una familia de glucoproteínas, estructuralmente relacionadas llamadas anticuerpos) frente a toxinas microbianas (33).

### **2.9.3. Inmunidad pasiva**

Cuando la persona expuesta al patógeno no sintetiza anticuerpos; éstos se producen en un cuerpo diferente del nuestro, es el caso de recién nacido (a), toda vez que ellos nacen con los anticuerpos que la madre les transfiere a través de la placenta, desaparecen entre los 6 y los 12 meses de edad; brinda protección inmediata contra un antígeno (35); también se debe a la inyección de antisuero, que contiene anticuerpos formados por otra persona o animal; funciona más rápidamente que la activa, pero sus efectos dura un tiempo más breve (28). La inmunoglobulina sérica (administrada

para la exposición a la hepatitis) y la antitoxina para el tétano son ejemplos de inmunización pasiva (35).

#### **2.9.4. Inmunidad activa**

Cuando el organismo está expuesto a un determinado antígeno; el sistema inmune comienza a funcionar produciendo clones de células plasmáticas o células T citotóxicas que ayudan a detener la infección. A la vez que se produce éstas también se producen clones de células de memoria permaneciendo en el organismo mucho después de que la infección termina. Algunas viven varios meses o años; otras toda la vida (28).

El sistema inmunitario incluye ciertos tipos de glóbulos blancos al igual que sustancias químicas y proteínas de la sangre, como anticuerpos, proteínas del complemento e interferón (37). Algunas de éstas atacan directamente las sustancias extrañas en el cuerpo, mientras que otras trabajan juntas para ayudar a las células del sistema inmunitario (35).

Los linfocitos son un tipo de glóbulos blancos, existen leucocitos del tipo B y T; los primeros se convierten en células que producen anticuerpos, los cuales se adhieren a un antígeno específico y facilitan la destrucción del antígeno por parte de las células inmunitarias; mientras que los segundos, atacan los antígenos directamente y ayudan a controlar la respuesta inmunitaria (37). También liberan químicos, conocidos como citoquinas, los cuales controlan toda la respuesta inmunitaria (35).

A medida que los linfocitos se desarrollan, aprenden normalmente a diferenciar entre los tejidos corporales propios y las sustancias que normalmente no se encuentran en el cuerpo. Una vez que se forman las células B y T, algunas de ellas se multiplican y brindan “memoria” para el sistema inmunitario, lo que le permite responder más rápida y eficientemente la próxima vez que la persona esté expuesto al mismo antígeno impidiendo la aparición de la enfermedad (35).

## **2.10. Respuesta inmunitaria.**

Es el contacto prolongado del hospedador con el patógeno, conduciendo a nuevas y específicas reacciones de defensa (21), del cuerpo, defendiéndose así mismo; al reconocer y responder a los antígenos (virus, hongos, bacterias) que son moléculas que se encuentran en la superficie de las células y que parecen extrañas y dañinas; manifestándose con inflamación de los tejidos que son lesionados cuando éstos liberan químicos, incluyendo histamina, bradiquinina y prostaglandinas, permitiendo que los vasos sanguíneos dejen escapar líquido hacia los tejidos. Esto ayuda a aislar la sustancia extraña del contacto posterior con tejidos corporales, el sistema inmunitario los reconoce, reduce la toxigenicidad y el poder invasor del patógeno, hasta que las defensas constitutivas del hospedador puedan llegar a destruirlo y eliminarlo (35).

La respuesta inmunitaria ocurre por producción de anticuerpos circulantes secretados y por la producción de células específicas sensibles al antígeno (21).

### **2.10.1. Respuesta inmunitaria primaria**

Se produce ante la presencia, por primera vez, de un antígeno. El sistema inmunitario detecta el antígeno, lo identifica y en último lugar sintetiza los anticuerpos correspondientes; a medida que disminuye la concentración de antígenos también se reduce la concentración de anticuerpos (21).

### **2.10.2. Respuesta inmunitaria secundaria**

Originada por la entrada de un antígeno que anteriormente ya había provocado una respuesta inmunitaria previa (21), se caracteriza porque se estimula con una cantidad mucho menor de antígeno, produce más cantidad de anticuerpos, es más rápida y duradera (37).

Hallazgos de los investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, sostienen que la respuesta inmunitaria es interferida, frente a los niveles de la proteína, llamada DUSP6, la misma que aumenta de forma constante a medida que las personas envejecen, entorpeciendo la capacidad de una importante clase de células inmunitarias de responder a los gérmenes invasores o a las vacunas diseñadas para proteger de esos gérmenes nocivos (38).

### **2.11. Patogenicidad**

Se refiere a la capacidad que tienen los patógenos para penetrar en un huésped y causarle modificaciones estructurales o funcionales, manifestándose a través de la enfermedad (33).

### **2.12. Patogénesis**

Proviene del griego πάθος, páthos, sufrimiento y γένεσις, génesis, origen, describe el origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella. Lo que con los métodos de las ciencias naturales se describiría como “desarrollo de una enfermedad” se identificará también como patomecanismo (16).

### **2.13. Endotoxina**

Son lipopolisacáridos de la capa externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., el lípido es el responsable de la toxicidad, constituyen las moléculas mediadoras del daño producido por estos gérmenes. Los lipopolisacáridos están constituidos por moléculas que tienen como núcleo básico central y común a todos ellos el lípido “A”, principio tóxico. Éste actúa estimulando a las moléculas para producir “caquexina” que impide el metabolismo de los lípidos, acumulándolos para producir una hipertrigliceridemia por trastorno enzimático y lleva a la caquexia en procesos crónicos, pero que en las infecciones agudas es el responsable del shock por Gram negativas (33).

### **2.14. Población en riesgo**

Son las personas que conforman conglomerados poblacionales, con ciertas características biológicas, físicas, entorno social; donde existen condiciones de insalubridad, saneamiento deficiente, estilos de vida negativos para la salud; situaciones desfavorables para la comunidad y que tienen mayor probabilidad de contraer enfermedades. Son considerados los niños, embarazadas, mujeres en período de lactancia, adultos mayores (38), considerado también como el incremento a la exposición y el aumento de la población a la susceptibilidad (23).

## CAPITULO III

### PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y VARIABLE

#### 3.1. Hipótesis

**Hipótesis alterna.** Existe capacidad detectora de inmunidad para *E. Coli* en personas en riesgo de la comunidad de Cajamarca, frente a un antígeno de *Escherichia coli* estandarizado en condiciones de laboratorio.

**Hipótesis nula.** No existe capacidad detectora de inmunidad de inmunidad para *E. Coli* en personas en riesgo de la comunidad de Cajamarca, frente a un antígeno de *Escherichia coli* estandarizado en condiciones de laboratorio.

#### 3.2. Variables/categorías

**Variable independiente:** *E.Coli* estandarizado, (antígeno).

**Variable dependiente:** inmunidad a *E. coli*. (anticuerpo)

### 3.3. Operacionalización y categorización de los componentes de las hipótesis

Variables	Categorización	Operacionalización
Independiente	Antígeno: <i>Escherichia coli</i>	<p>a) Aislamiento, purificación, identificación y multiplicación del microorganismo <i>Escherichia coli</i>, en medio de cultivo Mc. Conkey.</p> <p>b) Estandarización e inactivación de <i>E. coli</i>.</p> <p>c) Inoculación de <i>E. coli</i> (antígeno), a conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), siguiendo programa establecido</p> <p>d) Prueba de título a diferentes diluciones del suero con anticuerpos.</p> <p>e) Confrontación de antígeno con antisuero en diferentes diluciones</p>
Dependiente	Inmunidad a <i>E. coli</i>	<p>El sistema inmunológico, de humanos tiene la capacidad de detectar, moléculas, microorganismos y partículas virus, para generar anticuerpos como defensa. Este principio se determinó a través del presente trabajo de investigación. Comprobándose a través la aglutinación entre sangre humana y el antígeno constituido por células estandarizadas de <i>E. coli</i> (antígeno).</p> <p>a) Confrontación de antígeno con sangre humana.</p> <p>b) Aglutinación positiva (+).</p>

## CAPITULO IV

### MARCO METODOLÓGICO

#### 4.1. Ubicación geográfica

La presente investigación se desarrolló, en los laboratorios de Microbiología y Fitopatología de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicado en el campus universitario, carretera Baños del Inca km 3, a 2700 msnm, 7°10'48'' de latitud sur y 78° 06'48'' de longitud oeste.

#### 4.2. Métodos de la Investigación

En la presente investigación se utilizó los métodos analítico y deductivo; porque se basan en la experimentación y la observación de los fenómenos en estudio

##### 4.2.1. Alimentación de conejos

Los especímenes, antes de ser expuestos al programa de inoculación del antígeno (células muertas de *E. coli*) fueron alimentados con conejina, durante 20 días; incrementando su peso en 102 y 120 g respectivamente (4,382 y 4,886 g).

A partir del primer día de iniciado el programa de inoculación del antígeno hasta su finalización, los animales tuvieron la misma alimentación.

##### 4.2.2. Obtención de suero testigo

De cada conejo se extrajo 10 ml de sangre; la misma que se dispuso en dos tubos, con su identificación respectiva. Después de 20 minutos de reposo del tejido sanguíneo, se extrajo el suero, disponiéndolos en otros dos tubos, guardándolos en refrigeración al polo; el mismo que se utilizó posteriormente como medio de comprobación.



**Fig. 1.** Tejido sanguíneo y suspensión de suero, de conejos (Octagulus )

#### **4.2.3. Obtención del antígeno.**

a) **Aislamiento de *E. coli***, la muestra de *E. coli* fue obtenida del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, cepa comprobada a través de la coloración de Gram, y los ensayos bioquímicos respectivos.

b) **Conservación de *E. coli***, con la finalidad de obtener células jóvenes de *E. coli*, para ser conservadas en agua destilada estéril. Del medio de cultivo original se sembraron en dos nuevas placas de Petri con medio Mac Conkey, se incubó a 30 °C por 24 horas; parte de estas colonias se dispusieron en dos tubos de ensayo “tapa rosca” conteniendo agua destilada estéril, conservándose en refrigeración a 8 °C.

c) **Preparación de la suspensión *E. coli*, como antígeno**, la otra parte de colonias nuevas fueron extraídas, con un asa de siembra y se dispusieron en dos tubos de ensayo, que contenían 10 cc de la solución salina al 0.85 %; inmediatamente después de dejar la primera porción del signo bacteriano, en la solución salina, se agitó, con agitador eléctrico; observando la turbidez respectiva; este proceso se realizó por tres oportunidades, hasta obtener una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$ , por  $\text{cm}^3$ ; verificándose la turbidez a través de la coloración de la escala de McFarlan.

**d) Preparación del antígeno**, las suspensiones de las células bacterianas de *E. coli*, para ser utilizadas como antígeno fueron inactivadas, sometiéndolas a temperatura estable de 70 ° C, durante dos horas, en “baño maría”. La comprobación de muerte de estas células se verificó, después de haber realizado siembra en medio Mac Conkey, que después de 24 horas de incubación entre 30 ° C, no hubo presencia de crecimiento de colonias.

#### **4.2.4. Obtención de anticuerpos, originados por la inoculación de células muertas de *E. coli*, en conejos**

Se inoculó la suspensión de células muertas de *E. coli*, en la vena exterior de la oreja de cada conejo, según el programa de la tabla 1.

**Tabla 1.** Programa de inoculación del antígeno (*E. coli*) a conejos, para obtener el antisuero o suero con anticuerpos.

<b>Día</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Vía</b>
1	0.1	Intra venosa
3	0.1	
6	0.3	
8	0.5	
10	0.5	
14	1.0	
17	1.0	
20	2.0	
23	2.0	
28	Prueba de titulación	

En el primer y tercer día se inyectó 0.1 ml; al sexto día 0.3 ml; en el octavo y décimo día 0.5 ml; a los catorce y diecisiete días 1 ml; a los veinte y veintitrés 2 ml; realizando la prueba de titulación a los 28 días, con el objeto de determinar la presencia de anticuerpos formados por la inducción de un aislamiento de *E. coli*, en el tejido sanguíneo de estos animales; la misma que consistió en extraer 10 ml de sangre de cada conejo; obteniendo el suero, para ser confrontado con el antígeno (suspensión de *E. coli* muertas), en las diluciones 1:20; 1:40; 1:80 y 1:160.

Procedimiento que se basó en el fundamento científico que todo antígeno (células muertas, proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos que se inyectan a un animal de sangre caliente induce a la formación de anticuerpos, provocando inmunidad; en la mayoría de casos, el nivel máximo de anticuerpos en sangre se detecta entre 3 y 5 semanas después de iniciada la infección, en donde, el anticuerpo se une de manera específica al antígeno que ha dado origen a la respuesta inmune; debido a que las estructuras de ambas moléculas se complementan como una llave a la cerradura, como lo mencionan De la Rosa, Prieto y Navarro (2011); Stanier, Adelberg y Ingraham (1986) y Madigan, Martinko y Parker (2003).

#### **4.2.5. Prueba de título.**

Concluida la inoculación intravenosa del antígeno (células muertas de *E. coli*), a los conejos, se procedió a realizar la “**prueba de título**”, utilizando ciertas diluciones (1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 y 1:640) del suero con anticuerpo éstas, mezcladas con 0.5 ml de antígeno, dio reacción positiva (+), formándose un precipitado lechoso en el fondo del tubo. Con esta evidencia se procedió a extraer la sangre de los especímenes, para obtener el suero para ser utilizado en la mezcla del antígeno y determinar hasta que dilución se evidencia presencia de anticuerpos inducidos por *E. coli*.

#### **4.2.6. Proceso para determinar anticuerpos, originados por *E. coli*, en la sangre de conejos.**

Para averiguar hasta que dilución del antisuero, es factible determinar anticuerpos por aglutinación, se experimentó con 10 diluciones de antisuero, desde 1:10 hasta la dilución 1:10250, para ello se utilizó 10 tubos de ensayo, con solución salina al 0.85 %.

En el primer tubo se colocó 0.9 ml de solución salina y a los nueve restantes 0.5 ml.

Al primer tubo se agregó 0.1 ml de antisuero (suero con anticuerpos), se agita y se dejó en reposo, esta dilución corresponde a 1:10; de ésta se extrajo 0.5 ml y se agregó al segundo tubo obteniendo la dilución 1:20, se agita y se vuelve a extraer 0.5 ml, para agregar al tercer tubo, obteniendo la

dilución 1:40. Este procedimiento se repite hasta el décimo tubo obteniendo la dilución 1:5120 del antisuero.

Posteriormente, a los tubos, que contiene al antisuero diluido (suero con anticuerpos) se agrega 0.5 ml de antígeno (Células muertas de *E. coli*), se agita y se deja en reposo; cuando la reacción es positiva (+), en el fondo del tubo se observará un precipitado blanco o aglutinación y si es negativa (-), no existe aglutinación.

#### **4.2.7. Reacción; antígeno – anticuerpo.**

Para determinar la presencia de anticuerpos, en el plasma sanguíneo de personas, que coincidan, con el antígeno motivo de la presente investigación; se realizó el enfrentamiento del antígeno (*E. coli*), con la sangre de 12 personas en riesgo.

El ensayo consistió en obtener una gota de sangre de cada una de las 12 personas, dispuestas en láminas porta objetos, a las se agregó una gota del antígeno (células muertas de *E. coli*) conservado, realizando el mezclado respectivo.

#### **4.3. Diseño de la investigación**

El estudio fue de tipo experimental, descriptivo, cualitativo, debido a que se aisló y reconoció la bacteria de *Escherichia coli*, que inoculado vía intravenosa a conejos, se obtuvo la formación de anticuerpos a este aislamiento, que se comprobó con el enfrentamiento del antígeno con los anticuerpos generados a través de la formación de precipitados en diferentes diluciones de 1:10 hasta 1:5120

#### **4.4. Población, muestra, unidad de análisis y unidades de observación**

##### **4.4.1. Población y muestra**

Estuvo conformada por 12 personas.

#### **4.4.2. Criterios de inclusión**

- Personas trabajadores de limpieza pública expuestas a adquirir enfermedades gastrointestinales.
- Personas que dieron su consentimiento informado.

Las razones que explican el número reducido de la muestra de estudio, se ha explicado en el rubro de limitaciones, agregando además que estos trabajadores pueden considerarse de alto riesgo ya que la manipulación de residuos sólidos provenientes de la recolección de basura del servicio municipal, lo realizan sin los implementos básicos de protección para este tipo de trabajo, y por lo tanto tendrían mayor probabilidad a ser afectados por microorganismos patógenos, en este caso por *E. Coli*, situación que se ve agravada por la omisión medidas de higiene, en especial del lavado de manos.

#### **4.4.3. Unidad de análisis**

Cada muestra de sangre obtenida de las 12 personas que autorizaron la extracción de la misma..

#### **4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información**

Se hizo uso de; la técnica documental la cual nos permitió la recopilación de la información necesaria en la presente investigación que sustentan los fenómenos y procesos; la técnica de campo que permitió la observación del experimento para contrastarlo la teoría con la práctica en la búsqueda de la verdad objetiva.

#### **4.6. Material biológico**

a) **Cepa de Escherichia coli**, la misma que se purificó en el Laboratorio de Microbiología y multiplicó en el Laboratorio de Fitopatología.

b) **Dos conejos (*Oryctolagus cuniculus*)**, blancos raza Nueva Zelanda, de 4.280 y 4.766 Kg de peso.

c) **Doce persona voluntarias**, expuestas a la manipulación de residuos sólidos de la ciudad de Cajamarca.

#### **4.7. Equipos, materiales e insumos, etc.**

##### **4.7.1. Equipo de Laboratorio**

a) **Equipo óptico**: estereoscopio, microscopio, cámara fotográfica.

b) **Equipo de esterilización y asepsia**: cámara de flujo laminar, incubadora, autoclave, estufa, mechero Bunsen, mechero con alcohol, asperjador de alcohol.

c) **Equipo de extracción de sangre**: marca PHLEGM SUCTION 7E-A.

##### **4.7.2. Materiales**

a) Material de vidrio: vasos, erlemeyers de diferente capacidad, placas Petri, tubos de ensayo con tapa rosca de 15 cc de capacidad y termómetro.

b) Insumos Medio de cultivo MacConkey: para 1000cc de medio se utilizó:

0,0005 ml de cristal violeta

7,5 g de Agar

10 g de Peptona

5 g de D-Sorbitol

0,75 g de sal biliar

2,5 g cloruro de sodio

0,015 ml de rojo neutro

c) Reactivos: para realizar la coloración de Gram, de *E. coli*, a través del proceso modificado por Nyfel, se utilizó:

Solución de cristal violeta:

Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Alcohol etílico 96 – 97 %	20.0 ml
Glicerina	80.0 ml
H <sub>2</sub> O destilada	100.0 ml

Solución de lugol:

Iodo	1.0 g
KI	2.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	100.0 ml

Solución de safranina:

Solución acuosa de safranina	1%
Solución de cloruro de sodio al	0.85 %

#### 4.8. Matriz de consistencia metodológica

Título: ANTIGENO ( <i>Escherichia coli</i> ) PARA DETERMINAR INMUNIDAD EN PERSONAS EN RIESGO – CAJAMARCA - PERÚ. 2018							
Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores/ cualidades	Fuente o instrumento de Recolección de datos	Metodología	Población y muestra
¿Cuál es la capacidad detectora de inmunidad frente a <i>Escherichia coli</i> , de un antígeno de <i>E. coli</i> estandarizado en condiciones de laboratorio en personas en riesgo de la ciudad de Cajamarca 2018?	Determinar la capacidad detectora de inmunidad, frente a <i>Escherichia coli</i> de un antígeno de <i>E. coli</i> estandarizado en condiciones de laboratorio en personas en riesgo de la comunidad de Cajamarca. 2018.	<p><b>Ha.</b> Existe capacidad detectora de inmunidad frente a <i>Escherichia coli</i>, de un antígeno de <i>E. coli</i> estandarizado en condiciones de laboratorio en personas en riesgo de la ciudad de Cajamarca. 2018.</p> <p><b>Ho.</b> No existe capacidad detectora de inmunidad frente a <i>Escherichia coli</i>, de un antígeno de <i>E. coli</i> estandarizado en condiciones de laboratorio en personas en riesgo de la ciudad de Cajamarca. 2018?</p>	<p><b>Independiente</b> Antígeno: <i>Escherichia coli</i> estandarizado.</p> <p><b>Dependiente</b> Capacidad detectora de inmunidad a <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Obtención del suero de conejo con anticuerpos del aislamiento de <i>E. coli</i></p> <p>Reacción de aglutinación positiva</p>	<p>Obtención de suero de conejo sin anticuerpos. Obtención del suero con anticuerpos a diluciones diferentes del suero con anticuerpos. Reacción de aglutinación de suero con anticuerpos con la sangre humana</p>	<p>a) Aislamiento, purificación, identificación y multiplicación del microorganismo <i>Escherichia coli</i>, en medio de cultivo Mc. Conkey.</p> <p>b) Estandarización e inactivación de <i>E. coli</i>.</p> <p>c) Inoculación de <i>E. coli</i> (antígeno), a conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), siguiendo programa establecido</p> <p>d) Prueba de título a diferentes diluciones del suero con anticuerpos.</p> <p>e) Confrontación de antígeno con antisuero en diferentes diluciones</p>	<p><b>Población</b> 12 personas en riesgo</p> <p><b>Muestra</b> El 100% de la población</p>

## CAPITULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Presentación de resultados

5.1.1. Comprobación de *E. coli*, la muestra se comprobó que:

Es una bacteria anaeróbica facultativa

Reacción a la tinción de Gram negativa (-)

Reacción a catalasa positiva (+)

Reacción a la oxidasa negativa (+)

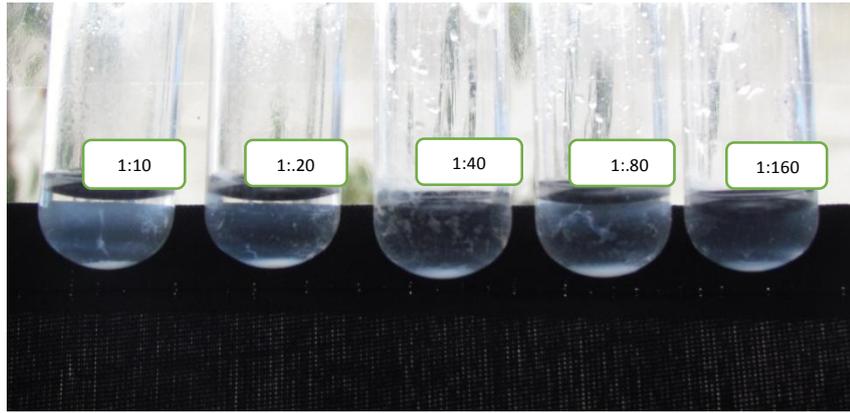
Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Brock.

5.1.2. Reacción de antisuero con antígeno

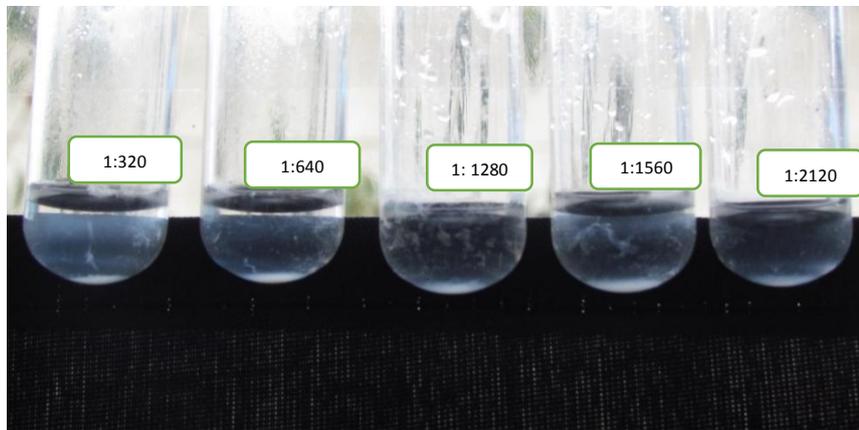
#### 5.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

**Tabla 2.** Reacción positiva (+), del antígeno (células muertas de *Escherichia coli*), en 10 diluciones de antisuero (suero con anticuerpos de *E. coli*).

Nº tubo	NaCl 0.85 %	Antisuero mL	Dilución	Antígeno mL	Dilución Final	Aglutinación
1	0.9	0.1	1:10	0.5	1:20	+
2	0.5	0.5	1:20	0.5	1:40	+
3	0.5	0.5	1:40	0.5	1:80	+
4	0.5	0.5	1:80	0.5	1:160	+
5	0.5	0.5	1:160	0.5	1:320	+
6	0.5	0.5	1:320	0.5	1:640	+
7	0.5	0.5	1:640	0.5	1:1280	+
8	0.5	0.5	1:1280	0.5	1:2560	+
9	0.5	0.5	1:2560	0.5	1:5120	+
10	0.5	0.5	1:5120	0.5	1:10250	+



**Fig. 1.** Reacción de aglutinación de cinco diluciones (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160) del anticuerpo con el antígeno (células muertas de *E. coli*)



**Fig. 2.** Reacción de aglutinación de cinco diluciones (1:320, 1:640, 1:1280, 1:15600 y 1:2120) del anticuerpo con el antígeno (células muertas de *E. coli*)

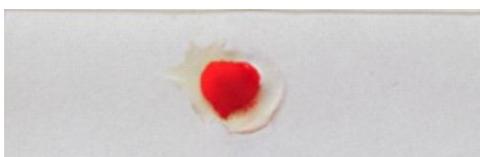
- Imágenes que muestran reacción de aglutinación del antígeno con el anticuerpo



**Muestra 1**



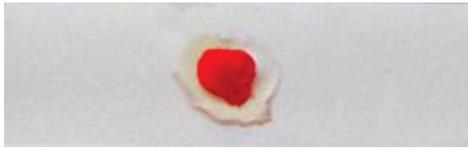
**Muestra 2**



**Muestra 3**



**Muestra 4**



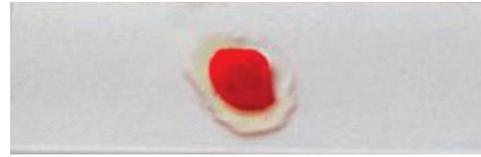
**Muestra 5**



**Muestra 6**



**Muestra 7**



**Muestra 8**



**Muestra 9**



**Muestra 10**



**Muestra 11**

La reacción positiva (+) del antígeno con el antisuero (suero con anticuerpos), nos demuestra que las células muertas de *E. coli*, inyectadas a los conejos se movilizaron a través del tejido sanguíneo del animal y que por naturaleza fisiológica se dispusieron en la linfa y órganos linfoides como el bazo; en estos órganos se activaron las células responsables de la formación de anticuerpos; como se pudo comprobar al realizar el ensayo de la presencia de anticuerpos en condiciones “in vitro”, como se muestra en la tabla 2 y figuras 1 y 2.

En la tabla 2, se muestra la reacción positiva (+), del antígeno estandarizado (células muertas de *Escherichia coli*), en 10 diluciones de antisuero (suero con anticuerpos de *E. coli*); resultado considerado como respuesta primaria, que contrarresta la infección del aislamiento de esta *E. coli*. Estos resultados refrendados por Stanier RY, Adelberg EA, Ingrahan, quien afirma que, cuando ocurre el ingreso de microorganismos dañinos al cuerpo humano; las células responsables de inmunidad, que son los linfocitos T, intervienen activando a los linfocitos B, para generar la formación de los respectivos anticuerpos.

Los resultados del ensayo anterior; donde se demostró la presencia de anticuerpos en el tejido sanguíneo de los conejos (*Oryctolagus cuniculus*), causados por la presencia del antígeno, constituido por la dilución de células de un aislamiento de *E. coli*, nos condujo a continuar la investigación, utilizando sangre de personas voluntarias; cuya forma de trabajo, en la mayoría de ellas, es el recojo de residuos sólidos, de la ciudad de Cajamarca.

Para comprobar la presencia de anticuerpos en humanos, como medida de protección, ante una futura infección, por parte de un aislamiento idéntico al aislamiento de *E. coli*, que utilizamos como antígeno; determinamos que, al enfrentar una gota de sangre de las personas en riesgo, con una alícuota del antígeno (*E. coli* conocido), obtuvimos reacción de aglutinación o reacción positiva en 11 personas; de las 12 que constituyeron la muestra de estudio, que porcentualmente equivale a 91.7% resultado que coinciden con Madigan (2003), quien manifiesta que la aglutinación ocurre cuando un anticuerpo se encuentra con un antígeno que forma parte de una célula o de una partícula insoluble y que sirve para la identificación de patógenos y de sus productos. Refrendando también a la presente investigación, está el reporte de De la Rosa y Navarro (2011) quienes afirman que la aglutinación es positiva cuando se emplea como antígeno una suspensión del microorganismo que queremos diagnosticar y se enfrenta al suero. En este caso, el resultado positivo (+), del suero de las personas en riesgo, indican la existencia de anticuerpos, debido a que las inmunoglobulinas, frente al antígeno reaccionaron con aglutinación.

La reacción positiva, determinó que las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpo y las moléculas del complejo mayor de compatibilidad (MHC), que están en la sangre de las personas, respondieron reconociendo al antígeno estandarizado, a través de aglutinación; resultado que coinciden con el reporte de Rojas Montoya (1999).

### **5.3. Contrastación de hipótesis**

Si existe capacidad detectora de inmunidad frente a *Escherichia coli*, de un antígeno de *E. coli* estandarizado en condiciones de laboratorio en personas en riesgo de la ciudad de Cajamarca. 2018.

## CONCLUSIÓN

El antígeno de *E. coli* estandarizado en condiciones de laboratorio en la UNC, tiene capacidad detectora de inmunidad frente a *Escherichia coli* en un 91.7% de personas en riesgo estudiadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manovsky de Eulacio C. Identificación de bacterias patógenas.: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de parasitología; 1982.
2. Rojas Montoya. Inmunología. Undécima ed. Medellín Colombia.: Corporación para Investigaciones Biológicas.; 1999.
3. Stanier RY. Microbiología. Segunda ed. Barcelona. España.: Reverté, S. A.; 1996.
4. Brenner J, Krieg NR, Staley T. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. The gammmaproteobacteria. Segunda ed.: BOARD.; 2005.
5. De Kruif P. Los cazadores de microbios.. Septima ed. México: Epoca. S. A. ; 1989.
6. Escherichia Coli. [Online].; 2011 [cited 2017 Agosto 15. Available from: <https://www.buenastareas.com/ensayos/Escherichia-Coli/2589599.html>.
7. Manual de tratamiento de la diarrea. Trece ed. Washington. E.U.A: Organización Panamericana de la Salud.; 1987.
8. Huapaya B. Etiología de la diarrea con sangre en poblaciones de zonas de riesgo E.coli Entero hemorrágica (ECEH) y otras Escherichacoli Shigatoxina (STEC). Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud; 2005. Reporte N° 85.
9. Universidad de Santander UDES. Innovaciencia. [Online].; 2017 [cited 2017 Agosto 16. Available from: <http://revistas.udes.edu.co/site/index.php/innovaciencia/index>.

10. Ochoa T. Frecuencia y patotipos de Escherichia coli diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011; 28(1).
11. Farfán García. Patotipos diarreagénicos emergentes de Escherichia coli en Colombia. *Revista INNOVACIENCIA*. 2017; 5(1).
12. Barreto Argilagos , Hernández Cisneros I, Santiago García , Ortiz López. Presencia de E. coli enteropatógenas en pacientes con diarrea aguda. [Online].; 2001 [cited 2017 Julio 25. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552001000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552001000200008).
13. Michelli E, Millán , Rodulfo , Michelli , Luiggi , Carreño , et al. Identificación de Escherichia coli enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela. [Online].; 2016 [cited 2018 Setiembre 12. Available from: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2928>.
14. Gomez O. Enfermedad Diarreica Aguda. Echericha Coli enteropatogena.. *Revista Chilena de Infecctología*. 2014 Octubre; 31(5).
15. Kenneth J, Ryan , George Ray C. *Microbiología Médica*.. Quinta ed. A. IES, editor. México: McGRAW HILL. ; 2011.
16. Masson. *Tratado de Microbiología*. Cuarta ed.; 1996..
17. Madigan T, Martinko J, Parker J. *Biología de los microorganismos de Brock*.. Décima ed. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A. ; 2003.

18. Murray R, Rosenthal S, Pfaller. Microbiología Médica. Setima ed. Barcelona España.: Editorial ELSEVIER.; 2013.
19. Wikipedia. Litótrofo - Quimiolitótrofos. [Online].; 2017 [cited 2018 Agosto 14. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Lit%C3%B3trofo>.
20. Willey M, Sherwood , Woolverton. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Setima ed. España: McGRAW HILL. INTERAMERICANA DE ESPAÑA.; 2009.
21. Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham. Microbiología.. Cuarta ed. España: Ediciones REPLA, s,a.; 1986.
22. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli.. ClinMicrobiol. 1998.; 11(1).
23. Karch H, Bielaszewska M, Bietzan M, Bietzan M, Schmidt. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 1999.
24. Frias C. Estudio de los factores de patogenicidad en E Coli enterohemorrágica. Barcelona; 1996.
25. MedlinePlus. Enfermedades transmitidas por alimentos. [Online].; 2018 [cited 2018 Agosto 15. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/foodborneillness.html>.
26. Garcia. Morfología de E. Coli y sus. [Online].; 2017 [cited 2017 Marzo 13. Available from: <https://es.scribd.com/document/339019576/Morfologia-y-Fisiopatologia-de-E-Coli>.
27. Adams M. Natural Neuws. Formatos científicos.; 2011.

28. Oram R. *Biología Sistemas vivos*. Primera ed.: McGraw- Hill Interamericana; 2007.
29. Antígeno. [Online].; 2014 [cited 2017 Enero 13. Available from:  
<https://es.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%ADgeno>.
30. De la Rosa Fraile M, Prieto Prieto , Navarro M. *Microbiología en ciencias de la salud*.  
Conceptos y aplicaciones. Tercera ed. España: Editorial ELSEVIER. ; 2011.
31. *Revista Científica*. “Medicina”. 2005; 64(4).
32. Dausset J. *Inmunología celular y molecular*. España ; 2008.
33. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología Celular y Molecular*.. Segunda ed.:  
Editorial Interamericana- Hill; 1995..
34. Brock T, Smith D, Madigan. *Microbiología*.. Cuarta ed. México : PRENTICE –  
HALL HISPANOAMERICANA S.A.; 1984.
35. Firestein GS. *Mechanisms of inflammation and tissue repair*.. Veinticuatro ed.  
Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
36. *Inmunización pasiva*. [Online].; 2005 [cited 2017 Mayo 10. Available from:  
<https://www.historyofvaccines.org/es/contenido/articulos/inmunizaci%C3%B3n-pasiva>.
37. Goronzy JJ, Weyand CM. *The innate and adaptive immune systems*.. Veinticuatro ed.  
Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.

38. Iáñez Pareja. INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNITARIO. [Online].; 1999  
[cited 2017 Noviembre 8. Available from:  
[https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap\\_01.htm](https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_01.htm).

**ANEXO 1**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

“Antígeno de *Escherichia coli* PARA DETERMINAR INMUNIDAD EN PERSONAS EN RIESGO- CAJAMARCA-PERÚ.2018”

Yo,

.....

..... con DNI .....

después de haber recibido la información sobre la investigación que está realizando la M.Cs. Dolores Evangelina Chávez Cabrera; acepto colaborar y participar, en forma voluntaria, en el presente estudio, en donde se me va a extraer dos gotas de sangre sin que me cause ningún perjuicio para mi salud y doy el consentimiento respectivo.

Firmado a los .....del mes de.....del 2018.