

11221

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO.**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

**DETECCION DE ENTEROTOXINA
TERMO-LABIL DE ESCHERICHIA COLI
POR NEFELOMETRIA DE RAYO LASER.**

**TESIS DE POSTGRADO
CURSO DE ESPECIALIDAD:
LABORATORIO CLINICO.
PATOLOGIA CLINICA.**

DR. JOSE ENRIQUE CERVERA BUSTAMANTE.

MEXICO, D.F.

1980-1982.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

I INTRODUCCION	página	4
II GENERALIDADES	" "	6
III MATERIAL Y METODO	" "	31
IV RESULTADOS	" "	35
V DISCUSION	" "	44
VI CONCLUSIONES	" "	46
VII RESUMEN	" "	47
VIII BIBLIOGRAFIA	" "	48

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**

LISTA DE CUADROS:

- Cuadro 1. Cuantificación y Electroforesis de Proteínas del Suero de Conejo y del Material conteniendo a la fracción gamma globulina.página 40
- Cuadro 2. Registro de Lecturas efectuadas en el Nefelómetro Laser de la dilución 1:5 del suero con las diluciones al doble del antígeno a partir de 1:5.página 41
- Cuadro 3. Registro de Lecturas efectuadas en el Nefelómetro Laser de la dilución 1:5 de la toxina con diluciones al doble del suero a partir de 1:5.página 42
- Cuadro 4. Registro de Lecturas efectuadas en el Nefelómetro Laser con las diluciones 1:5 y 1:10 del suero y 1:5 del antígeno a 37°C. y a temperatura ambiente.página 43

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Respuesta a la Inmunización con Enterotoxina Termo-Lábil de los Conejos I, II y III.página 38
- Figura 2. Inmunolectroforesis del suero de conejo (SC) y del material conteniendo a la fracción gamma globulina (MCFG).página 39

LISTA DE FOTOGRAFÍAS:

- Fotografía I. Ensayo con Asa Ligada de Intestino Delgado de Conejo.página 37

INTRODUCCION:

La enfermedad diarreica es una de las principales causas de mortalidad en nuestro medio en los niños menores de cinco años, y además es una causa importante de morbilidad en el adulto. En la actualidad hay pocos medios para prevenir la enfermedad aparte de los programas a largo plazo de mejoría de las condiciones higiénicas del agua y medio ambiente. Parte de la incapacidad para enfrentarse a este problema quizá esté en la diversidad de agentes etiológicos y la falta de medios adecuados de diagnóstico de la enfermedad diarreica.

Los estudios bacteriológicos de la diarrea en diferentes lugares generalmente están orientados a la búsqueda de unos cuantos agentes, la gran mayoría de los casos están asociados con un microorganismo no identificado por esos medios.

Escherichia coli cuando está confinada a su nicho ecológico usual en el intestino del hombre se ha considerado generalmente como flora normal, no dándole importancia en el reporte bacteriológico de laboratorio. Una excepción a esto ocurre cuando es encontrada en niños, principalmente los menores de dos años. Esta bacteria se podrá identificar como perteneciente a un pequeño grupo de serotipos llamados "enteropatógenos" y se podrá atribuir a ella la responsabilidad de la enfermedad diarreica.

En la década de los sesenta, la mayoría de la información sobre Escherichia coli se limitaba a los serotipos enteropatógenos. Después que se conocieron los estudios sobre la patogénesis del Cólera, en la cual se reconocía la participación de una enterotoxina como causa de la enfermedad diarreica, se dio mayor atención al estudio de pacientes con manifestaciones clínicas semejantes, lo cual ocasionó un incremento abrupto en la información concerniente a la enfermedad diarreica por Escherichia coli, que demostró que también es enterotoxigénica.

Sin embargo, a pesar de esto, el laboratorio clínico no cuenta en la actualidad con un método para identificar y diferenciar a -

Escherichia coli enterotoxigénica de una forma práctica y segura.

Los métodos existentes para detectar a esta bacteria productora de enterotoxina termo-lábil se pueden dividir de la siguiente forma: los estudios in vivo, y los estudios in vitro. Los primeros son ensayos que utilizan animales, generalmente conejos, lo cual es poco práctico y costoso para el laboratorio; los últimos generalmente comparten algunas dificultades, como son la calidad de los reactivos, costo y disponibilidad.

En este trabajo presentamos un análisis de la literatura existente sobre Escherichia coli productora de enterotoxina termo-lábil y los métodos que existen para su detección, con el fin de utilizar esta información para el desarrollo de un método que, por sus características, se pueda efectuar en el laboratorio clínico.

Además, también presentamos la primera parte de éste, que consiste en la detección de la enterotoxina en el nefelómetro de rayo - laser.

GENERALIDADES:

ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICA.

Escherichia coli es un bacilo gram negativo que coloniza el tracto gastrointestinal del hombre y animales. Fue aislado por primera vez de la materia fecal por Escherich en 1885 (1). Aunque por muchos años se sospechó como posible agente etiológico de las enfermedades diarreicas, esta asociación no fue correctamente establecida hasta 1945, cuando en un hospital se presentaron brotes de diarrea severa los cuales, se demostraron, eran producidos por serotipos específicos de Escherichia coli (2,3).

Pocos días después del nacimiento el recién nacido es colonizado por esta bacteria, en gran forma proveniente de la madre y del medio ambiente íntimo que le rodea. Este microorganismo rápidamente se establece en el intestino grueso como el habitante aerobio predominante (2,4). Por alguna razón no muy bien entendida - este microorganismo ocupa selectivamente sólo la parte distal del tracto gastrointestinal (4).

Desde hace muchos años ha sido inculpada como la causa de infección enteral neonatal en el hombre y animales domésticos. Esto - se refería principalmente a que ciertos serotipos llamados enteropatógenos de Escherichia coli, diferentes para cada especie animal, eran la causa de la mayoría de estas infecciones (1). Los primeros trabajos que permitieron establecer ésto fueron los publicados por Smith y Halls, en los cuales detallaban un análisis de las infecciones por varias cepas de Escherichia coli en diferentes especies de animales domésticos. Demostrando, además, que no sólo los cultivos bacterianos, sino también que el sobrenadante sin células de estos cultivos producía la acumulación de líquido en el asa ligada de intestino delgado. El producto que causaba esta acumulación de líquido en el asa intestinal se encontró en el medio de cultivo, esto es, en forma extracelular, y, ya que la endotoxina de estos cultivos no ocasionaba este efecto, Escherichia coli debía producir una enterotoxina que fuera responsable -

de esta acumulación de líquido (5). Posteriormente en estudios efectuados en Calcuta, se describió a esta bacteria productora de enterotoxina como la causante de una enfermedad severa semejante al Cólera en humanos. Sin embargo, las cepas productoras de esta enfermedad no pertenecían a algún serotipo enteropatógeno conocido previamente como causante de diarrea en el humano. Fue a partir de éste momento cuando se empezó a reconocer a Escherichia coli enterotoxigénica como una causa importante de diarrea en el hombre y animales, y a trabajar arduamente para describir al microorganismo, determinar su mecanismo de virulencia, así como caracterizar a sus enterotoxinas (3,6).

Otro de los problemas en los que se ha implicado a Escherichia coli enterotoxigénica es como causa frecuente de diarrea en los visitantes que vienen a México procedentes de los Estados Unidos, fenómeno que ocurre en todo el mundo y que se ha denominado "diarrea del turista" (2). En México la incidencia de diarrea debida a esta bacteria en los niños varía con el nivel socioeconómico, desde el siete por ciento, a nivel socioeconómico medio, hasta el cuarenta y siete por ciento, en aquellos de nivel socioeconómico bajo (7,8).

Para que este microorganismo cause enfermedad se requiere un inóculo con 10^6 a 10^9 bacterias, para lograr esto es necesario una fuente de infección altamente contaminada, o que se le de tiempo a la bacteria de replicarse y lograr este inóculo. Por esta razón la transmisión de este agente ocurre más de alimentos y agua contaminados que de persona a persona, y quizá podría ser ésta una de las explicaciones por las que es más frecuente en países en desarrollo (2).

La diarrea causada por esta bacteria es del tipo de la ocasionada por microorganismo no invasores. Cuando es ingerida, generalmente procedente de agua y alimentos contaminados, pasa al estómago y de ahí al intestino delgado del huésped susceptible, donde se multiplica y libera una enterotoxina que actúa sobre la mucosa

intestinal ocasionando gran pérdida de agua y electrolitos sin - provocar lesión histológica en las células epiteliales de la mucosa. No hay fiebre, o ésta es mínima en algunas ocasiones, y las evacuaciones son abundantes, acuosas, que pueden llevar rápidamente a la deshidratación; puede haber vómito y dolor abdominal leve. Este cuadro generalmente se autolimita (2,4,9).

Las cepas de Escherichia coli que se definen como "enterotoxigénicas" son aquellas capaces de producir enterotoxinas, las cuales son sustancias, generalmente proteínas, que ocasionan una respuesta secretora en un modelo intestinal (3). Al momento actual se conocen dos enterotoxinas producidas por Escherichia coli (1,2,3,4,9,10,11,12), aunque existe información que sugiere la existencia de otras con diferente mecanismo de acción (10,14). Estas enterotoxinas son: una de peso molecular elevado (20000 a 102000 d), termo-lábil, sensible al pH ácido, inmunógena y no dializable, y la otra de peso molecular bajo (1500 a 5000 d), termo-estable, resistente al pH ácido, no inmunógena y dializable (12). A la primera se le ha denominado más comúnmente "termo-lábil" (TL) y a la segunda "termo-estable" (TS). Esta clasificación en base a su estabilidad en relación a la temperatura, fue descrita en 1970, y establece que la enterotoxina que resista una temperatura de 100° durante 15 minutos es considerada termo-estable, y termo-lábil - cuando esto no ocurra; aunque se debe mencionar que la mayor parte de las preparaciones de ésta última son destruidas por temperaturas considerablemente menores, es decir, a 60°c. durante 30 minutos (4,10,12).

Control Genético de la Producción de Enterotoxinas.

La capacidad de producir enterotoxinas no está relacionada directamente al tipo serológico del microorganismo (9); aunque se ha observado en estudios efectuados en Etiopía y Bangladesh que los serotipos que se han reportado como más frecuentes relacionados a la producción de enterotoxinas son más constantes en mantener esta capacidad (13,15).

Se sabe que ambas enterotoxinas están controladas genéticamente por ADN que reside en plásmidos transferibles llamados Ent+ a otras cepas de Escherichia coli (3,4,9,10,12) y a algunas enterobacterias relacionadas (10,15). Estos plásmidos frecuentemente están asociados con la presencia de antígenos de adherencia, factores de resistencia a drogas, y en algunas cepas porcinas a la producción de una alfa hemolisina (12,16). Aunque los antígenos de superficie y la producción de toxinas son características independientes codificadas por plásmidos diferentes, ambas enterotoxinas son codificadas por el mismo plásmido o por plásmidos acoplados. Se han descrito dos tipos de plásmidos: un grupo homogéneo que controla la producción de ambas enterotoxinas, y un grupo heterogéneo que controla la producción exclusivamente de toxina termoestable (4).

Factor de Colonización.

La sola presencia del plásmido Ent+ no es suficiente para convertir a una cepa no productora de diarrea en una patógena. Ciertos antígenos de superficie son necesarios para que Escherichia coli con el plásmido Ent+ cause diarrea (9). Las cepas de Escherichia coli enterotoxigénica de lechones y becerros poseen estructuras semejantes a pilus, los antígenos K88 y K99 respectivamente. Estas estructuras median la adherencia de las bacterias al epitelio intestinal (15) y permiten que el microorganismo resista su eliminación debida a la peristalsis, además de que se multiplique cerca del sitio de acción de la toxina (12). Son específicos de especie, y se ha observado la existencia en algunos cerdos de receptores intestinales controlados genéticamente que les confieren susceptibilidad o resistencia a estos animales. Recientemente se han identificado antígenos semejantes en las cepas humanas y han sido designados como antígenos de los Factores de Colonización I y II (17,18). Estos factores de colonización están controlados también por plásmidos; y se han identificado plásmidos que transportan genes para la producción conjunta de factor de coloniza-

ción I y la toxina termo-estable. Además se han encontrado asociados en forma importante a ciertos serotipos, tales como el 078:H11 y el 078:H12 con el factor de colonización I, el 06:H16 y - - 06:H08 con el factor de colonización II (3,15). Se ha mencionado que estos factores de colonización no son prerequisites de virulencia, ya que algunas cepas que no los poseen han causado diarrea en voluntarios; esto sugiere que además de ellos puede haber otros factores de colonización en las cepas humanas (19). Estos - antígenos pueden observarse con microscopía electrónica como estructuras parecidas a filamentos asociadas a la superficie de la bacteria. Para poderlos diferenciar de los comúnmente llamados - pilis se ha utilizado a la hemaglutinación con eritrocitos "0" y "A" suspendidos en una solución de manosa al 1% (20).

Serotipificación.

Ya que los factores de virulencia de ésta bacteria están controlados por plasmidos, la serotipificación de estas cepas, para fines prácticos, no es útil. Se ha encontrado que Escherichia coli enterotoxigénica pertenece a una gran variedad de serotipos y, con raras excepciones, éstas no pertenecen al grupo denominado enteropatógeno.

Después de que se supo que la producción de enterotoxina estaba controlada por plasmidos transferibles, se postuló que virtualmente cualquier cepa de Escherichia coli podría volverse enterotoxigénica adquiriendo el plasmido apropiado. Señalándose que un paciente podría tener varios serotipos y enterotoxinas de Escherichia coli en la misma muestra diarreica (3,4). Sin embargo, recientemente se ha reportado que la presencia de ciertos antígenos O y H, en algunas ocasiones también el antígeno K, indican una alta probabilidad de que una cepa sea enterotoxigénica. Casi todas las cepas 078:H11 y 078:H12 son enterotoxigénicas, mientras que - cepas 078 sin estos antígenos H raramente lo son. De igual forma las cepas 06:H16. También se ha reportado una asociación entre -

el serotipo y tipo de enterotoxina; el serotipo O6:H16 casi siempre produce las dos enterotoxinas, mientras que los serotipos - O128 casi siempre producen toxina termo-estable. En cuanto a su distribución, se ha observado que algunos serotipos están delimitados a algunas áreas geográficas, como el O159:H en Japón, el - O139:H28 en Brasil, mientras que, otros como el O6:K15:H16, el - O78:H11 y O78:H12 se les puede encontrar mundialmente (3,13,15).

ENTEROTOXINA TERMO-LÁBIL DE *ESCHERICHIA COLI*.

La enterotoxina termo-lábil de *Escherichia coli* es una proteína muy parecida a la enterotoxina del Cólera (1,10,11,12,21,22). Contiene varias subunidades B, cuyo peso molecular es de 11780 - daltons (1,12,23) que permiten que la enterotoxina se fije a receptores en las células de los vertebrados, y una sola subunidad A, la cual se piensa pasa a través de la membrana plasmática a su sitio de acción en el citoplasma de la célula (10,12,24). Esta - subunidad A, que se estima tiene un peso molecular entre 25500 y 30000 daltons, contiene un enlace disulfuro; la tripsina y las - proteasas que contaminan en algunas ocasiones a la toxina, actúan sobre este enlace y generan dos fragmentos: el A₁ con un peso molecular entre 21000 y 23500, y el A₂ con un peso molecular de - 2500 a 5000 daltons (1,12,25).

El fragmento A₁ es una enzima que cataliza la transferencia intracelular de adenosina difosfato de ribosa del nicotinamida adenina dinucleótido oxidado a una subunidad reguladora de la enzima adenilciclase de 42000 daltons de peso molecular, incrementado - de esta forma la actividad de la enzima en las células blanco (24, 25,26).

Las unidades formadoras de la enterotoxina termo-lábil tienen - secuencias similares, pero no idénticas, a aquellas de las subunidades correspondientes de la enterotoxina del Cólera (21,27).

Analizando los productos enlazados por covalencia que se forman después de hacer reaccionar a la enterotoxina termo-lábil con un reactivo, el dimetilpimelidato, se encontró que cada molécula es-

tá compuesta de cinco subunidades B; probablemente dispuestas en forma de un anillo, con la subunidad A localizada en el eje de la simetría. También con difracción con rayos X de la toxina en forma cristalina se ha demostrado una simetría rotacional quíntuple. Cuando se separa de la molécula la subunidad A, al conjunto de cinco subunidades B se le denomina Coligenoide (en el caso de la enterotoxina del Cólera es Coleragenoide). Este componente a diferencia del de la toxina del Cólera puede asumir diferentes conformaciones que se reflejan en su capacidad de migración en la electroforesis en gel con sulfato dodecílico de sodio. A la forma que migra más rápidamente se denomina forma R, al parecer ésta es más compacta, se une mejor al sulfato dodecílico de sodio y se parece más a la forma natural de la toxina. Esta forma R puede convertirse a la forma más lenta o forma C, con tratamiento a temperatura de 50°C., o en presencia de galactosa; esto último ha llamado la atención ya que el residuo terminal y funcional del receptor en la superficie celular para la enterotoxina es una molécula de galactosa. Ya se sabe que la unión de la enterotoxina al receptor da lugar a la penetración de la subunidad A al citoplasma celular; no se saben bien los detalles de esto, pero algunas hipótesis invocan un cambio en la conformación del componente B cuando se une a la superficie celular (24).

Relación Antigénica con la Enterotoxina del Cólera.

Además de las similitudes químicas y físicas entre la enterotoxina termo-lábil de Escherichia coli y la enterotoxina del Cólera, ambas están antigénicamente relacionadas. Gyles y colaboradores fueron los que primero demostraron similitudes inmunológicas entre ambas toxinas (28). Posteriormente se demostró claramente que la antitoxina preparada contra la toxina del Cólera neutralizaba no solamente a antígenos homólogos sino también a la enterotoxina termo-lábil, y que la antitoxina preparada contra ésta, además de neutralizar a antígenos homólogos, lo hacía en un menor grado con la toxina del Cólera (29).

Inicialmente se pensaba que esta relación inmunológica afectaba exclusivamente a la subunidad B de las enterotoxinas; aclarándose después que ambas subunidades participan en esta relación. Mediante reacciones de neutralización y precipitación se ha demostrado que la enterotoxina termo-lábil tiene determinantes antigénicos - en común con cada una de las subunidades de la toxina del Cólera, además de que posee actividad antigénica específica. La existencia de estos determinantes antigénicos únicos fue establecida por la capacidad del antisuero absorbido contra Escherichia coli de neutralizar la actividad biológica de cada una de las preparaciones de la enterotoxina termo-lábil, pero no de la actividad biológica de la toxina del Cólera. Además de que en las reacciones de inmunodifusión cuando se utiliza antienterotoxina termo-lábil contra ambas enterotoxinas, se pueden encontrar reacciones de identidad parcial con la toxina del Cólera (30). Clements sugiere que los determinantes antigénicos no compartidos de la enterotoxina - termo-lábil pudieran representar un antígeno advenedizo que no es esencial para su actividad biológica (31).

Receptores para la Enterotoxina Termo-Lábil.

Los receptores para las enterotoxinas termo-lábil y del Cólera se han estudiado utilizando diferentes ensayos de captación directa, estudios de absorción y modelos de inhibición (32).

El gangliósido Gm_1 , es un ácido glucolípido que contiene ácido siálico y una molécula de galactosa terminal (33), se ha propuesto como el receptor natural para ambas enterotoxinas. Este gangliósido es el inhibidor más efectivo de las enterotoxinas. Se encuentra presente en la membrana plasmática de una gran variedad de células de los vertebrados, siendo particularmente abundante - en el tejido cerebral. El número de receptores en varios tipos - de células de diferentes especies va de menos de 100 en los eritrocitos humanos, hasta más de 10^7 en las células de cerebro de - cobayo. Al parecer la cantidad de toxina que se une a las células correlaciona con la cantidad de gangliósido en la membrana.

Aunque la mayor parte de la información no sugiere lo contrario, la posibilidad de que las enterotoxinas se unan a otros gangliósidos o glucoproteínas con moléculas de carbohidratos similares, o que el gangliósido Gm_1 sea solamente un constituyente del receptor natural, no puede ser excluida (12).

Mecanismo de Acción.

La enterotoxina termo-lábil, al igual que la toxina del Cólera, actúa sobre la enzima adenilciclase de la mucosa intestinal, dando lugar a un incremento en la concentración de AMP cíclico - en las células del epitelio intestinal (3,4,9,34).

La subunidad B es la parte de la molécula que se une al receptor, el gangliósido Gm_1 , en la célula intestinal. Esta parte no ejerce ningún efecto sobre la adenilciclase (1,10,12). El enlace entre el gangliósido y la subunidad B es muy fuerte, reportándose para éste constantes de disociación en el rango de 10^{-9} (12).

La subunidad A es una molécula no tóxica cuando se agrega a células intactas, pero cuando se agrega a lisados celulares es altamente activa. Su toxicidad reside en el péptido A_1 ; el fragmento A_2 no es tóxico y tampoco incrementa la toxicidad del fragmento A_1 (12,30).

Después de que la subunidad B se une al receptor en la superficie de la célula, la subunidad A se inserta en la membrana plasmática donde actúa sobre la adenilciclase (30). Este proceso de "reorientación" ocurre lentamente, es dependiente de la temperatura y requiere NAD. Por acción del fragmento A_1 el NAD se divide en adenosina difosfato de ribosa (ADFR) y nicotinamida. El ADFR se une en forma covalente a un receptor proteico en la membrana plasmática (26), este receptor parece ser la enzima guanosina trifosfatasa (GTFasa), la cual regula la actividad de la adenilciclase, transformando a esta enzima de su forma activa a una forma inactiva. La unión del ADFR a la GTFasa impide esta acción, dando lugar a una estimulación de la adenilciclase, enzima que convierte el ATP en AMP cíclico, ocurriendo un incremento de los niveles de éste último en la célula del epitelio intestinal (35).

La mayor parte del agua y sal que se absorbe en el intestino delgado ocurre debido a la presencia en la membrana del borde vellosos celular de un canal para el NaCl. Este proceso de absorción acoplada de NaCl es inhibido por el AMP cíclico, sin afectar a otros procesos como la bomba de sodio y la absorción de sodio acoplada a azúcares y aminoácidos neutros, debido a esto último. La pérdida de líquidos en los pacientes afectados puede reemplazarse oralmente agregando glucosa a las soluciones. Además de este efecto "antiabsorción", al parecer existe un segundo efecto que es la estimulación de la secreción activa. A diferencia del primero, que es ejercido sobre las células vellosas, éste ocurre en las células de las criptas de Lieberkühn, donde el AMP cíclico parece ser el mediador de la secreción de bicarbonato y agua (12,35). El resultado de estas acciones es la pérdida de líquidos y electrolitos importante que puede llevar fácilmente a la deshidratación y a la acidosis metabólica (2).

Condiciones de Cultivo para la Producción de Enterotoxina.

Para la producción de enterotoxina termo-lábil se han utilizado diferentes medios, como lo son: medio mínimo-sales, tripsina-glucosa-extracto de levadura, casaminoácidos-extracto de levadura y caldo de soya tripticasa (4). En publicaciones recientes se ha descrito las condiciones de crecimiento óptimas para la producción de enterotoxina termo-lábil, tanto como para cepas de origen humano, como de otras especies (36,37,38). No se han encontrado factores de crecimiento poco comunes. Algunas cepas producen buenos niveles de enterotoxina en un medio mínimo con sales y glucosa al 0.5% con un control adecuado del pH. Cuando se le agregan algunos aminoácidos a éste medio, la síntesis de enterotoxina se incrementa. La metionina, lisina y ácido glutámico son los que más estimularon a las cepas humanas. Al parecer no requieren vitaminas ni elementos de uso poco común en los medios de cultivo. El pH del medio es un factor importante; la producción se incrementa cuando éste es mayor de 7.5 (8.5 óptimo), y se ve disminuida cuando

do es inferior a esta cifra. La producción de enterotoxina puede ocurrir desde una temperatura de 30°C., aunque la mayoría ha estado a una temperatura de 37°C. (4).

Se han reportado algunos agentes que incrementan la liberación de enterotoxina termo-lábil, entre ellos la lincomicina (39), la mitomicina (40) y la polimixina-B (41). Al parecer estos agentes producen la lisis de la bacteria porque inducen el desarrollo vegetativo de un fago temperado.

En un cultivo de 6 horas, la polimixina-B induce la liberación rápida de enterotoxina termo-lábil de bajo peso molecular (20000 daltons). Esta enterotoxina posee la misma actividad biológica que la que tiene la enterotoxina liberada en forma normal en los cultivos de Escherichia coli enterotoxigénica (41).

Purificación de la Enterotoxina Termo-Lábil.

La purificación de la enterotoxina termo-lábil, a diferencia de la toxina del Cólera, ha presentado varias dificultades. Los primeros intentos realizados utilizando membranas para filtración y fraccionamiento con diferentes columnas de sefaroza (sephadex), no tuvieron éxito, ya que la actividad de la toxina se encontraba en varias fracciones colectadas (1). Posteriormente algunos grupos han trabajado consiguiendo preparar a la enterotoxina con relativa elevada pureza. Dorner y colaboradores utilizando una cepa de Escherichia coli productora de enterotoxina de origen porcino, y un procedimiento que consistía en que a partir del sobrenadante del cultivo éste se sometía a cromatografía en biogel agarosa y en sefadex G-75, posteriormente isotacoforesis en dos ocasiones, concentrando el material obtenido por diálisis al vacío y filtrándolo finalmente en sefadex G-50. De esta forma obtuvo una enterotoxina con un peso molecular estimado de 102000 daltons activa en ensayos de asa de intestino ligada y en permeabilidad en piel de conejos (42). Casi al mismo tiempo Finkelstein y colaboradores cultivando una cepa de origen humano logró obtener dos factores con reactividad en piel de conejo. El procedimiento que

utilizó consistía en que al sobrenadante libre de células se le sometía a precipitación con sulfato de amonio, luego cromatografía por filtración en gel, cromatografía por intercambio iónico y electroforesis en gel. Los productos obtenidos de aproximadamente 80000 daltons de peso molecular tienen actividad semejante al producto logrado por Dorner. Si se comparan con la toxina del cólera pura éstos fueron 10^6 veces menos activos en el ensayo con células de ovario de Hamster chino, 10^3 veces menos en piel de conejo y 10^2 veces menos en el asa ligada de intestino delgado. Además - de que la cantidad de proteína producida fue de 1/100 del producido por Vibrio cholerae (43).

Evans y colaboradores utilizando una técnica diferente con polimixina-B, centrifugación, precipitación del sobrenadante con sulfato de amonio y cromatografía por filtración en gel, obtuvieron un producto con un peso molecular aproximado de 20000 daltons, activo en el ensayo de permeabilidad vascular en piel de conejo y - en el asa ligada de intestino, que se neutraliza con suero antitoxina termo-lábil, antitoxina del Cólera y anticoleragenoide. Cuando utilizaban un cultivo de 18 horas, en lugar de un subcultivo - de 6 horas, obtenían un producto con similar actividad, pero de - un peso molecular mayor (40000 daltons) (41). Posteriormente utilizó esta técnica con polimixina-B y un procedimiento que consistía en que al precipitado con sulfato de amonio se sometía a un - proceso de retroextracción, cromatografía por filtración en gel, cromatografía por intercambio iónico y cromatografía por afinidad, obteniendo un producto de 20000 daltons que producía una sola banda de precipitación con varios antisueros producidos contra preparaciones crudas de la enterotoxina (44).

A pesar de los progresos logrados, la purificación, preparación en forma cristalina y caracterización correcta de la enterotoxina termo-lábil es materia aún de mayor investigación (21,22).

DETECCION DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE ENTEROTOXINA TERMOLABIL.

Para identificar a las cepas enterotoxigénicas es necesario demostrar que ellas producen enterotoxinas, ya que no tienen características coloniales, bioquímicas o serológicas que las distinguan de otras cepas de Escherichia coli (2,4,9).

La mayoría de las pruebas descritas para detectar a Escherichia coli enterotoxigénica se han desarrollado a partir de las pruebas utilizadas para la toxina del Cólera, aprovechando las semejanzas existentes entre estas dos enterotoxinas (1,3,4,9,10,12).

En las últimas tres décadas se han descrito dos tipos de pruebas con este fin: los ensayos "in-vivo" y los ensayos "in-vitro". Los primeros fueron los que aportaron la información acerca de los efectos fisiológicos y mecanismos de acción de éstas enterotoxinas (12). Inicialmente se utilizó el ensayo con asa ligada de intestino de conejo y de otros animales, posteriormente el ensayo de permeabilidad vascular en piel de conejo y los métodos de cultivo de tejidos. Más recientemente se han desarrollado pruebas inmunológicas que incluyen a la hemólisis inmune pasiva, el radioinmunoensayo, el inmunoensayo enzimático y la inmunodifusión en gel. Todas ellas presentan algunas dificultades en su realización, como el de ser laboriosas, su costo elevado, no ser tan específicas o requerir condiciones que son difíciles de estandarizar en un laboratorio clínico. Esto ha llevado a que en la mayoría de los laboratorios no se cuente con un procedimiento práctico y confiable para identificar a Escherichia coli enterotoxigénica (3,9,10).

Ensayos "In-Vivo":

El Ensayo con Asa Ligada de Intestino Delgado.

A principios de siglo, algunos grupos que trabajaban en el estudio del Cólera, pensaban que la toxina de Vibrio cholerae podía alterar la permeabilidad a nivel local de los capilares. Algunos estudios efectuados entonces, y el hecho de no encontrar células inflamatorias en las evacuaciones ni en la pared del intestino de

los pacientes con Cólera, reforzaba éstos conceptos.

Con base en lo anterior, De y colaboradores en 1953 en Calcuta, utilizando asas de intestino delgado de conejo aisladas mediante ligaduras de seda, pretendía estudiar los cambios en la permeabilidad vascular en este tejido después de administrar Vibrio cholerae vivos en cultivo en estos segmentos. El ensayo consistía en aislar una asa de intestino delgado, de aproximadamente 10 a 15 cm. de longitud ligando ambos extremos con seda quirúrgica; a éste segmento se le inyectaba una suspensión de Vibrio cholerae. Veinticuatro horas después se sacrificaba el animal y se examinaba el asa, la cual se encontraba dilatada debido a la acumulación de líquido en su interior, pudiéndose recuperar de éste a la bacteria. Las características citoquímicas de este líquido se encontraron semejantes a las de las evacuaciones de los pacientes con Cólera (45).

Aunque en este momento no se conocía a la enterotoxina como la causante, ni tampoco el mecanismo por el cual ocurría esto; este modelo experimental constituyó uno de los primeros y más importantes esfuerzos para demostrar una acción patógena en seres vivos.

En una considerable cantidad de pacientes con signos y síntomas de Cólera no se aislaba a Vibrio cholerae de su materia fecal; ésto se atribuía a una técnica de laboratorio defectuosa, y a pesar de que los resultados eran negativos, los casos se consideraban como Cólera. Estudiando cuidadosamente se encontró que en un buen número de ellos se aislaban cultivos puros de Escherichia coli, por lo que se decidió utilizar este ensayo de asa ligada para estudiar la acción de esta bacteria sobre la mucosa intestinal, encontrando, prácticamente, los mismos hallazgos que ocurren cuando se prueba Vibrio cholerae. En ésta ocasión, además, se observaron tres hechos importantes: primero, el pH del medio jugaba un papel clave en la actividad patogénica de la bacteria; segundo, cuando se probaron asas de intestino grueso no se obtuvo respuesta, por lo que se pensó en una acción específica sobre el intestino delgado; y tercero, al realizar el estudio serológico de las cepas probadas se encontró que algunas de ellas no pertenecían a

serotipos considerados patógenos (46).

Después de utilizar a este ensayo como un intento para demostrar y estudiar la acción de Escherichia coli sobre la mucosa del intestino delgado, se publicaron otros trabajos en los que se efectuaba algunas modificaciones para intentar explicar más claramente la patogenicidad de esta bacteria. Taylor y colaboradores en 1958 encontró que las variaciones reportadas en los resultados con este ensayo se reducían utilizando conejos de la misma cepa. No encontró diferencias cuando el pH del material de prueba se encontraba en un rango entre 6.2 y 8.4. Y falló al intentar demostrar que el efecto producido sobre la mucosa intestinal era ocasionado por productos de la bacteria (47).

Posteriormente se observó que la acumulación de líquido en el asa ligada era ocasionado por una enterotoxina, la cual estaba presente en el filtrado del cultivo o podría obtenerse al producir lisis de la bacteria (5,48,49,50,51). Un último hecho de gran trascendencia es que se demostró que era necesario que la bacteria productora de enterotoxina fuera capaz de proliferar en el intestino delgado adherida al epitelio (5,17,18). Cuando se probaron cultivos con bacterias en estas asas se observó que había acumulación de líquido sólo en aquellas en las que el ensayo se efectuaba en la misma especie de la que se aislaba el microorganismo, no ocurriendo así cuando se utilizaban filtrados sin células conteniendo a la enterotoxina (50).

Los estudios realizados para comparar la acción de las enterotoxinas de Escherichia coli y Vibrio cholerae, mostraron los mismos hallazgos, tanto en la mucosa intestinal, como en las características del líquido contenido en el asa ligada (pobre en proteínas, magnesio y calcio, y rico en potasio, sodio y bicarbonato) (52).

La respuesta del intestino delgado a la acción de las enterotoxinas termo-estable y termo-lábil de Escherichia coli es posible estudiarla con esta prueba. Esta difiere en una forma característica. La acumulación de líquido debida a la toxina termo-estable parece ser inmediata y llega a su máximo dentro de las 6 horas después de haberse administrado, además de ser independiente de la dosis. En

cambio para la termo-lábil, el establecimiento de la acumulación de líquido en el asa es dependiente de la dosis y alcanza niveles máximos mucho más tarde. Por lo anterior se recomienda que un ensayo con duración de 6 horas es adecuado para investigar la respuesta a la enterotoxina termo-estable, mientras que uno de 18 horas lo es para la termo-lábil (53).

Para este ensayo de asa ligada de intestino delgado se han utilizado diferentes animales, entre ellos: conejo, perro, cerdo, cabra, rata (5,48,54), y se ha encontrado que el que da mejores resultados es el de conejo, ya que es un animal que se puede controlar bien en el laboratorio, es menos costoso, dá resultados más reales y tiene poca mortalidad.

El Ensayo de Permeabilidad Vasculuar en Piel de Conejo.

Los estudios sobre la acción de filtrados de Vibrio cholerae después de su administración intradérmica demostraron que un componente termo-lábil ocasionaba eritema, edema e induración en el sitio de aplicación (55). Este procedimiento ha sido modificado administrando además un colorante que se une a las proteínas (el azul de Evans) y permanece en el área indurada. Este componente fue denominado "toxina cutánea" o más comunmente Factor de Permeabilidad Vasculuar (FP). Se encontró ser idéntico o de alguna forma asociado a la toxina del Cólera. Algunos investigadores encontraron que las dos actividades (diarreigénica y de alteración de la permeabilidad vascular) se encontraban asociadas en varios estadios de purificación y eran neutralizados en presencia de antisuero antitoxina (12), sin embargo al tratar a la toxina del Cólera a un pH bajo, se demostró una acción destructiva del factor de permeabilidad, sin pérdida de la actividad diarreigénica o toxigénica en modelos animales.

Este factor ha sido aislado también de cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli (56). También contiene actividad diarreigénica y algunos autores piensan que ésta es una característica importante de las cepas enterotoxigénicas aisladas de humanos (12).

Hay varios factores que influyen en la detección de la actividad

del factor de permeabilidad. Las deficiencias para reconocer estos factores pueden llevar a la incapacidad para demostrarla en cultivo de Escherichia coli enterotoxigénica. Uno de ellos es que el ensayo sólo ocurre cuando se prueba la enterotoxina termo-lábil, y algunas cepas de Escherichia coli producen además toxina termo-estable. Por lo que en las preparaciones obtenidas de medios de cultivo destinados a mejorar la producción de la primera es fácil detectar actividad del factor de permeabilidad, mientras que en aquellos con condiciones desfavorables para esto puede ser negativo. - Otros factores importantes son: el pH, el contenido del extracto de levadura del medio de cultivo (mínimo 0.02%) y la aereación del mismo. Con el cuidado de estos factores, Evans ha demostrado actividad del factor de permeabilidad en filtrados de cultivos después de 6 horas de inoculación con la cepa H10407 de Escherichia coli. - Los animales empleados (conejos) influyen también, a diferencia de con la toxina del cólera, se obtiene mejor respuesta cuando se utilizan conejos pequeños (56).

Hay poca experiencia reportada sobre este ensayo para Escherichia coli enterotoxigénica, entre ellas se han descrito diferencias en las respuestas con cepas de distintas regiones (57). De cualquier forma, aunque se han reportado algunas ventajas con este ensayo, como lo es el número de muestras probadas, las diferencias en la reproducibilidad, además de la serie de factores que influyen en el resultado, hacen que éste no tenga una aplicación práctica en el laboratorio clínico.

Ensayo en Conejos Lactantes.

Se ha demostrado que los conejos lactantes pueden responder a la administración oral de enterotoxina termo-lábil con incremento en el contenido del líquido intestinal. Este efecto se demostró máximo después de una dosis oral a las 5 horas, y los resultados se calculan basándose en el cociente entre el peso del intestino y el peso corporal después de la administración de la dosis. Después de 14 días de edad los conejos ya no responden adecuadamente, lo mismo ocurre cuando se les mantiene en ayuno prolongado previo al ensayo (58).

Ensayos "In-Vitro":

Cultivo de Tejidos.

Células Suprarrenales.

La línea celular Y-1, la cual responde a la toxina termo-lábil, a la del Cólera y a la Hormona Adrenocorticotrofica (HACT), y la mutante OS-3, han sido utilizadas para estudiar a estas sustancias - (59,60,61,62,63,64). Las células Y-1 cuando crecen como monocapas - confluentes sufren cambios metabólicos y morfológicos después de haberlas expuesto a las toxinas termo-lábil, del Cólera, a la HACT y al AMP cíclico. Las células se redondean y se desprenden del sustrato y secretan cantidades elevadas de delta-4,3 cetosteroides, que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente o fluorométricamente. Estos cambios correlacionan bien con niveles elevados de AMP cíclico intracelular. El redondeamiento celular es más sensible a los cambios en el AMP cíclico intracelular, y requiere solamente el 10% del incremento necesario para llevar a un aumento en la esteroidogénesis (12).

En la respuesta a la toxina termo-lábil y a la del Cólera de las células suprarrenales Y-1, se observa un periodo "lag" de 1 a 3 horas necesario para obtener redondeamiento celular (59,60,61). Esta respuesta puede ser saturada y alcanza niveles de meseta a una concentración aproximada de 1 ng./ml. para la toxina del Cólera. Requiere más de 2 horas para incrementar la producción de esteroides por arriba de niveles basales, y la magnitud del incremento de ésta está relacionado a la concentración de la toxina utilizada. La duración de la respuesta puede ser hasta de 72 horas. La subunidad A de ambas toxinas produce los mismo efectos que la molécula completa de las toxinas. Después de un periodo de incubación de 10 minutos seguido de un lavado enérgico, se observa la máxima estimulación. La preincubación de las células con toxoide (subunidad B) neutraliza la captación de las toxinas, y cuando se incuban las células Y-1 con gangliósido Gm₁ y posteriormente se exponen a las toxinas se incrementa su unión a la superficie celular (65). El pretratamiento de las toxinas con antitoxina o con antitoxoide neutraliza la res-

puesta, así mismo el pretratamiento con gangliósido Gm_1 . La exposición de las células Y-1 a la antitoxina durante el periodo "lag" - inhibe parcialmente la respuesta de estas células, la que disminuye conforme transcurre el periodo "lag" (61,66).

Los resultados obtenidos al utilizar las células suprarrenales - presentaron muchas características similares a las de aquellos estudios "in-vivo" (asa ligada de intestino). El periodo "lag" característico es observado tanto con la termo-lábil como con la toxina de el Cólera; estas toxinas probablemente se unen al mismo receptor - (Gm_1), el cual es diferente para las hormonas (HACT), aunque éstas tienen efectos similares (12).

La respuesta final puede ser inhibida en diferentes grados agregando antitoxina al sistema durante los primeros 10 minutos. Esta - inhibición puede estar relacionada a un paso reversible en la interacción de la toxina con los componentes de la membrana, y puede en parte ocurrir durante el periodo "lag" (59,60).

En esta prueba de células suprarrenales pueden ser ensayados varios cultivos en una forma relativamente poco costosa y rápida. Los problemas con estas pruebas celulares, es que requieren de facilidades y vigilancia estricta en el laboratorio, son difíciles, en algunas ocasiones, de estandarizar, y requieren experiencia de individuos que han tenido una amplia capacitación en éstas líneas de tejidos. Además, la reacción no es específica, como se menciona anteriormente, otras sustancias pueden estimular a las células suprarrenales para que sufran estos cambios.

Células de Ovario de Hamster Chino.

La línea clonal CHO-K1, derivada del ovario de Hamster Chino - (CHO), responde con cambios morfológicos y bioquímicos característicos después de tratarse con dibutiril-AMP cíclico, testosterona y - algunas prostaglandinas. Basándose en estos trabajos, Guerrant y colaboradores decidieron estudiar el efecto de las enterotoxinas termo-lábil y del Cólera sobre la concentración intracelular de AMP cíclico en este modelo, correlacionando los cambios en la concentración del nucleótido con los cambios morfológicos (67).

Los efectos de las toxinas termo-lábil y del Cólera sobre las células de ovario de Hamster chino y otros fibroblastos en cultivo, - es el de incrementar la síntesis de colágena y la adherencia al sutrato, además de la elongación de la célula tornándola claramente - bipolar y la pérdida de sus proyecciones celulares.

La correlación de estos cambios con el incremento del AMP cíclico por la acción de las toxinas, se ha evidenciado utilizando inhibidores de la enzima fosfodiesterasa. El incremento en la temperatura (más de 60^oc.) inactiva a ambas toxinas en este modelo. El coleragenoide inhibe a la toxina del Cólera, y el antisuero antitoxina del Cólera inhibe a ambas enterotoxinas. Los autores reportan que este ensayo, cuando se prueba a la toxina termo-lábil, es de 5 a 100 veces más sensible que el ensayo de permeabilidad vascular en piel de conejo y el asa ligada de intestino, y similar al de células suprarrenales (1,12,67).

Adipocitos.

Estas células responden de una forma parecida a las células suprarrenales. Se obtienen del tejido graso del epidídimo de la rata mediante digestión del tejido con colagenasa y flotación celular. - Las enterotoxinas termo-lábil y del Cólera, además de una serie de hormonas y drogas, pueden estimular a estas células dando lugar a - un incremento en el AMP cíclico intracelular con liberación de ácidos grasos y glicerol que puede ser medido espectrofotométricamente (12).

Células Vero.

Las células Vero, una línea celular derivada del riñón del mono verde africano, responde a la estimulación de las enterotoxinas termo-lábil y del Cólera con cambios morfológicos característicos (elongación y engrosamiento de la membrana celular) que se deben al - incremento del AMP cíclico intracelular ocasionado por las toxinas (68).

Determinación de la Actividad de la Adenilciclasa.

Después de que se obtuvo evidencia de que la acción de la toxina termo-lábil de Escherichia coli era secundaria al incremento del AMP cíclico intracelular y éste consecuencia de la estimulación de la enzima adenilciclase, se dieron a conocer algunos métodos que medían la actividad de esta enzima aplicados a la detección de la enterotoxina. Dorner y colaboradores escribieron un ensayo en el que la actividad de la enzima adenilciclase inducida por la enterotoxina termo-lábil es determinada por el método de dilución radioisotópica utilizando AMP cíclico marcado con tritio y partículas homogenizadas de membranas de células de miocardio de gato incubadas con toxina termo-lábil (69).

Se ha reportado que este ensayo ofrece algunas ventajas sobre los otros métodos empleados, como son disponibilidad, tiempo y sensibilidad, además de que se puede utilizar tanto como para medir a la toxina como los títulos de antitoxina en el suero. Los inconvenientes son que la preparación del antígeno es complicada y el uso de un compuesto radioactivo. Después de éste, son muy escasos los estudios que se han reportado; al parecer este tipo de ensayos requieren una mayor investigación en el laboratorio antes de que se valore su utilidad clínica.

Inhibición de la Hemólisis Inmune Pasiva y Hemólisis Inmune Pasiva.

La propiedad que tiene la enterotoxina termo-lábil de ser antigénica (1,2,3,4,9,10,11,12) se ha aprovechado para desarrollar métodos basados en la reacción antígeno-anticuerpo para detectar a la toxina. Entre ellos están los de inhibición de la hemólisis inmune pasiva (IHIP) y la hemólisis inmune pasiva (HIP).

El fundamento del primero es el siguiente: los eritrocitos de carnero sensibilizados con enterotoxina termo-lábil se hemolizan en presencia de un suero antitoxina termo-lábil y complemento. Esta hemólisis es inhibida por la incubación de la antitoxina con el sobrenadante de un cultivo de una bacteria presuntamente productora de -

enterotoxina en forma previa a la incubación con los eritrocitos - sensibilizados (70); y el del segundo: la enterotoxina termo-lábil proveniente de una bacteria aislada en un paciente es utilizada para sensibilizar eritrocitos de carnero. Los glóbulos rojos sensibilizados se lisan en presencia de antitoxina y complemento. La hemoglobina que se libera por la hemólisis es medida espectrofotométricamente a 420 nm. y la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de la enterotoxina (71). Estas pruebas se han reportado como muy accesibles y sensibles para detectar a la enterotoxina, sin embargo hay dos aspectos que cuidar para que esto ocurra, y es que hay que obtener un antígeno con un alto grado de pureza y un anticuerpo suficientemente potente y específico.

Estas pruebas se han comparado con el ensayo de células suprarrenales y se ha encontrado una buena correlación (70,71); sin embargo otros autores publican resultados diferentes, sobretodo cuando lo utilizan para detectar enterotoxina de cepas de diferentes fuentes animales (72). Esto los ha llevado a realizar algunas modificaciones a la prueba, como lo es el de utilizar una diferente solución amortiguadora (solución amortiguadora de veronal salina) adicionada de calcio y magnesio; cultivos estacionarios y mitomicina en lugar de cultivos en agitación y polimixina-B como inductora de la liberación de la enterotoxina, y quizá el que sea más importante, el de utilizar un anticuerpo de origen diferente, la antitoxina del Cólera, que, a diferencia de lo reportado en los métodos originales, dió mejor resultado (72,73,74).

Hemólisis Inmune Radial Simple.

Serafim y colaboradores recientemente publicaron el método de hemólisis inmune radial simple; éste tiene el mismo fundamento que los anteriores sólo que se realiza en un medio semisólido: en un medio de agarosa al 1% se mezclan eritrocitos de carnero sensibilizados con la supuesta enterotoxina; después de que se deja solidificar se perforan pocillos de 5 mm. de diámetro para colocar una determinada cantidad de antitoxina y complemento; después de un tiempo de incubación se mide el halo de hemólisis que se produce -

alrededor del pocillo, el cual es proporcional a la cantidad de enterotoxina (75). Los resultados de esta prueba se han comparado con los obtenidos con la hemólisis inmune pasiva encontrando una buena correlación, y casi sin reacciones falsas positivas cuando se utiliza a la antitoxina en la dilución adecuada.

Al parecer este tipo de pruebas es confiable, no tiene mayores - desventajas que los otros, es menos costosa y más fácil de realizar sin embargo su utilidad no será bien establecida hasta que las posibilidades de lograr un antígeno y un anticuerpo de buena calidad - sean óptimas.

Coaglutinación con Estafilococo.

En esta prueba se utiliza a la cepa Cowan I de Estafilococo aureus, que es rica en proteína A", adonde se pega el anticuerpo (antitoxina del Cólera) por su fragmento Fc, dejando libre el fragmento Fab, para que al reaccionar con la enterotoxina se produzca aglutinación. La prueba se ha realizado en tubo capilar y en placa, reportándose mayor sensibilidad con la primera. Se ha descrito una buena correlación de ésta prueba con el ensayo de células de ovario de Hamster chino y con la hemólisis inmune pasiva (76).

Esta es una prueba fácil de realizar aparentemente, y rápida, en la que creemos es necesario una mayor etapa de experimentación para valorar su utilidad.

Radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis se ha utilizado para desarrollar un método altamente sensible, para detectar a la enterotoxina termo-lábil - de Escherichia coli. Greenberg y colaboradores (77) y Ceska y colaboradores (78), han publicado un método de radioinmunoanálisis en fase sólida, que consiste en utilizar tubos de poliestireno a los que se pegan anticuerpos antienterotoxina termo-lábil producidos en la cabra, incubándose posteriormente con enterotoxina termo-lábil - marcada con I^{125} , y posteriormente enterotoxina sin radioactividad, para luego determinar la radioactividad que queda en los tubos en - un contador gamma.

Este tipo de ensayo se ha comprobado ser muy sensible, sin embargo los requerimientos de reactivos radioactivos y lo costoso del equipo, hacen del radioinmunoanálisis un procedimiento poco disponible para muchos laboratorios.

Inmunoanálisis Enzimático (ELISA).

La técnica de ELISA ha demostrado ser muy sensible para la detección de muchos agentes infecciosos. Yolken y colaboradores utilizaron esta técnica para detectar enterotoxina termo-lábil. La prueba aprovecha la reactividad cruzada con la enterotoxina del Cólera, y utiliza dos antitoxinas de ésta de diferente origen animal (burro y cobayo). Este método comparado con el ensayo de células suprarrenales y el radioinmunoanálisis, demostró tener una sensibilidad similar con la ventaja de ser más accesible (79).

Back y colaboradores reportaron una modificación a esta técnica, en la que utilizan al receptor natural para la enterotoxina, el gangliósido Gm_1 , de tipo comercial, en lugar de la antitoxina del cólera obtenida del burro, y una antitoxina termo-lábil de conejo. Esto al parecer disminuye el riesgo de reacciones inespecíficas e incrementa la sensibilidad (80,81). Aunque se ha reportado que pudiera haber sustancias en los medios que se han utilizado para cultivar a la bacteria, capaces de inhibir la unión de la enterotoxina con el gangliósido, además de que pudiera haber diferencias en la reactividad inmunológica entre las enterotoxinas de diferente origen (82).

Esta prueba además de probar enterotoxina proveniente del sobrenadante de cultivos, se ha utilizado para detectarla de la materia fecal de pacientes con diarrea por Escherichia coli enterotoxigénica (64); y ha demostrado ser poco más sensible que el ensayo con células suprarrenales.

El inmunoanálisis enzimático para detectar enterotoxina termo-lábil es una prueba que puede ser muy accesible, técnicamente es más sencilla de realizar que las demás, pueden efectuarse varias pruebas al mismo tiempo y es relativamente rápida. Las dificultades que presenta, y en gran parte las comparte con las demás, es la poten-

cia y especificidad del anticuerpo utilizado, las sustancias que puedan dar lugar a una inhibición inespecífica, y una mayor valoración en aquellos pacientes cuya materia fecal contenga muy poca cantidad de enterotoxina termo-lábil.

Doble Inmunodifusión (Prueba de Biken).

Esta prueba consiste en que en placas de agar conteniendo caseína, aminoácidos, extracto de levadura sales y antibióticos se cultiva a Escherichia coli enterotoxigénica y se induce la liberación de la enterotoxina termo-lábil con discos de polimixina-B. Las colonias se disponen en grupos de 4, en medio de las cuales se perfora un pozo donde se coloca suero antitoxina, después de 24 a 48 horas de incubación se observa una banda de precipitación entre la colonia productora de toxina y el pozo conteniendo al anticuerpo. Según los autores este método ha demostrado ser tan sensible como el ensayo con células de ovario de Hamster chino, sobretodo cuando se utiliza suero antitoxina termo-lábil en lugar de suero antitoxina del Cólera - (83). Los mismos autores han aprovechado esta técnica para utilizarla en la detección de enterotoxina termo-estable. En este caso, toman colonias de la placa de agar y la prueban en el ensayo de ratón lactante (84).

Esta prueba es poco costosa, se pueden realizar varias al mismo tiempo, no requiere aparatos complicados, pero tiene el inconveniente del tiempo en que tarda en realizarse (de 3 a 4 días).

MATERIAL Y METODO:

Producción de Enterotoxina Termo-Lábil.

Microorganismo.- La cepa H10407 de Escherichia coli fue utilizada como fuente de enterotoxina termo-lábil. Esta cepa se conservó en tubos conteniendo agar soya-tripticosa a 4°C.

El medio de cultivo y el procedimiento para cultivar la cepa y obtener y extraer la enterotoxina se basaron en los trabajos de Evans y colaboradores (41,44,53 y 56).

Medio de cultivo.- El medio empleado contiene los siguientes componentes por cada 100 ml. de medio:

Casaminoácidos (Difco)	2.00	g.
Extracto de Levadura	0.60	g.
Cloruro de Sodio	0.25	g.
Fosfato Dipotásico	0.871	g.
Sulfato de Magnesio	0.005	g.
Cloruro de Manganeso	0.0005	g.
Cloruro Férrico	0.0005	g.

El pH final del medio se ajustó a 8.4 con Hidróxido de Sodio 0.1 N.

Procedimiento de cultivo.- Se inoculó un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml. conteniendo 100 ml. de medio manteniéndose en agitación constante (100-120 rpm.) durante 18 horas a 35°C. De este primer cultivo se tomaron 10 ml. para inocular a cada uno de cinco matraces Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml. conteniendo 100 ml. cada uno de un medio de cultivo semejante, cuya única variación está en la concentración del extracto de levadura de 0.6 g. a 0.15 g. Estos medios se mantuvieron en agitación constante (100-120 rpm.) durante 3 1/2 horas a 35°C. Posteriormente las bacterias se recolectaron por centrifugación a 3000 xg durante 30 minutos a 4°C. desechándose el sobrenadante.

Estímulo para la liberación de enterotoxina con Polimixina B.- El paquete de bacterias obtenido se incubó con 50 ml. del medio original conteniendo sulfato de polimixina-B (laboratorios Zapata) a una concentración de 2 mg. por ml., durante 7 minutos a 35°C. agitando suavemente. Después se centrifugó a 3000 xg. durante 30 minutos a 4°C. desechando el paquete de bacterias.

Extracción de la enterotoxina con sulfato de amonio.- El sobrenadante obtenido se llevó a una saturación del 80% agregándose lentamente durante 30 minutos 60.5 g. de sulfato de amonio a 100 ml. de sobrenadante, dejándose reposar otros 30 minutos; todo esto se realizó a -4°C . El precipitado resultante fue recolectado por centrifugación a -16000 xg. durante 20 minutos a 4°C ., y disuelto en 7 ml. de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, para posteriormente someterlo a diálisis durante 48 horas contra esta misma solución amortiguadora a 4°C .

Conservación.- El dializado se conservó en alícuotas de 1.5 ml. a -30°C ., determinándose previamente la concentración de proteína por el método de Lowry (85).

Comprobación de la actividad de la enterotoxina termo-lábil mediante el ensayo de asa ligada de intestino de conejo.- En esta prueba se utilizaron conejos albinos de 2 a 2.5 kg. de peso que se mantuvieron en ayuno 24 horas previas al ensayo. Bajo anestesia general se hizo una incisión de 7 a 8 cm. en la línea media del abdomen, se aisló una asa de la parte media del intestino delgado de 40 cm. de longitud, en la cual, através de la pared se inyectaron 20 ml. de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 con dirección distal; del asa aislada se hicieron segmentos de 5 cm. de longitud con seda quirúrgica. En cada segmento se inyectó 1 ml. de material de prueba. Todo esto se efectuó por duplicado en dos conejos, utilizando a la solución amortiguadora de Tris-HCl como control negativo en forma alterna. Se suturó la pared abdominal y se mantuvo al animal en ayuno 24 horas, - después de las cuales se sacrificó con sobredosis de barbitúricos; se abrió la pared abdominal para revisar el intestino delgado, determinando la presencia de acumulación de líquido en los segmentos probados (45,46 y 53).

Producción de Anticuerpos Antitoxina Termo-Lábil.

Se utilizaron conejos albinos de 8 a 12 semanas de edad, a quienes se administró en forma intramuscular a la enterotoxina de la siguiente forma: la primera dosis consistió de 1 ml. de una mezcla de enterotoxina y adyuvante incompleto de Freund a partes iguales con una con-

centración de proteína de 2 mg./ml.; las siguientes dosis consistieron de enterotoxina disuelta en solución salina a una concentración de 2 mg./ml. de proteína; administrándose cada una de éstas a intervalos de cinco días (53). Para monitorizar los niveles de anticuerpos se realizó contraelectroforesis.

Extracción de la Fracción Gamma Globulina del Suero de Conejo.

Después de sangrar al conejo por punción cardíaca, se procedió a separar el suero por centrifugación y a extraer de éste la fracción gamma globulina de la forma siguiente:

1. Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio.
2. El suero de conejo se diluyó al 1:2 con solución salina al 0.85%.
3. El suero diluido se llevó al 45 por 100 de saturación con la solución de sulfato de amonio (preparada en 1); realizando esto a 4°C. y agitando durante 30 minutos.
4. El precipitado resultante se separó mediante centrifugación durante 30 minutos a 1500 xg a 4°C., resuspendiéndolo en un volumen semejante al del suero de solución amortiguadora de fosfatos-salina pH 7.2.
5. Los puntos 3 y 4 se realizan nuevamente en dos ocasiones, y el precipitado final se resuspende en un volumen mínimo de solución amortiguadora de fosfatos-salina para dializarse contra esta misma solución durante 24 horas a 4°C. (86).
6. El dializado se conservó en alícuotas de 1.0 ml. en congelación a -15°C., efectuándose previamente electroforesis y cuantificación de proteínas (85).

Ensayo en el Nefelómetro de Rayo Laser (Behring) del Sistema AntiEnterotoxina/Toxina Termo-Lábil.

1. Se hicieron diluciones al doble de la enterotoxina termo-lábil con solución salina a partir de 1:5 hasta 1:2560, y se probaron con una dilución del suero antienterotoxina de 1:5 cada una de ellas en el nefelómetro (100 y 100), registrándose las lecturas a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 70, 80, 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, cuadro 2.
2. Del suero antienterotoxina también se hicieron diluciones al doble

a partir de una dilución de 1:5 hasta 1:2560 con solución salina y se probaron con una dilución de enterotoxina de 1:5 cada una de ellas, - registrándose las lecturas como en el inciso anterior (cuadro 3).

3. Las diluciones 1:5 y 1:10 del antisuero antienterotoxina con la dilución del antígeno (enterotoxina) 1:5, cuyas lecturas mostraron una curva ascendente, se probaron nuevamente bajo las mismas condiciones y a 37°C, intentando acortar el tiempo de incubación (cuadro 4).

RESULTADOS.

Producción de Enterotoxina Termo-Lábil.

En las diferentes ocasiones en que se produjo enterotoxina termo-lábil se obtuvo un material, aproximadamente 10-12 ml. por cada 100 ml. de medio original con una concentración de proteína de 2.4 a 3.1 mg./ml.

Comprobación de la Actividad de la Enterotoxina en el Ensayo de Asa Ligada de Intestino de Conejo.

Este material conteniendo a la enterotoxina termo-lábil se probó por duplicado en el ensayo con asa ligada de intestino de conejo. Los segmentos en los que se probó este material presentaron acumulación importante de líquido, mientras que todos los segmentos en los que se probó la solución amortiguadora de Tris-HCl estaban colapsados sin tener líquido en su interior (fotografía I). En uno de los segmentos se probó este material después de haber sido sometido durante 15 minutos a una temperatura de 60°C.; el segmento inoculado no presentó acumulación de líquido.

Conservación de la Actividad de la Toxina en Relación al Tiempo.

Posteriormente se investigó el tiempo en que se podía conservar este material en congelación a -30°C. sin que perdiera su actividad en el ensayo con asa ligada de intestino de conejo. Se probaron materiales conservados durante 3 meses, 1 mes, 1 semana y 1 día, todos dieron lugar a una respuesta positiva.

Producción de Anticuerpos Antienterotoxina Termo-Lábil.

La respuesta que presentaron los conejos a la inmunización con el material conteniendo a la enterotoxina la podemos observar en la figura I. Después de la quinta dosis (25 días), los tres conejos presentaron niveles detectables de anticuerpos antitoxina termo-lábil en suero. Después de la treceava dosis estos alcanzaron niveles aceptables (1:8 los conejos I y III, y 1:16 el conejo II), por lo que se sangraron a los siete días de haberse aplicado esta última dosis los conejos I y II. Se separó el suero de éstos, y se extrajo la fracción gamma globulina.

Extracción de la Fracción Gamma Globulina.

Los resultados de la cuantificación de proteínas y de la electroforesis del material conteniendo a la fracción gamma globulina del suero de conejo los podemos observar en el cuadro I.

La concentración de proteínas en el suero fue de 1.51 g./dl., y en el material conteniendo a la fracción globulinica fue de 1.10 g./dl. - La concentración de albúmina disminuyó del 55.16% en el primero a 5.5% en el segundo; en cambio las globulinas aumentaron de un 44.84% en el primero a un 94.5% en el segundo, este incremento se debió principalmente a las beta (de 18.78% a 24.54%) y gamma globulinas (18.78% a 61.79%).

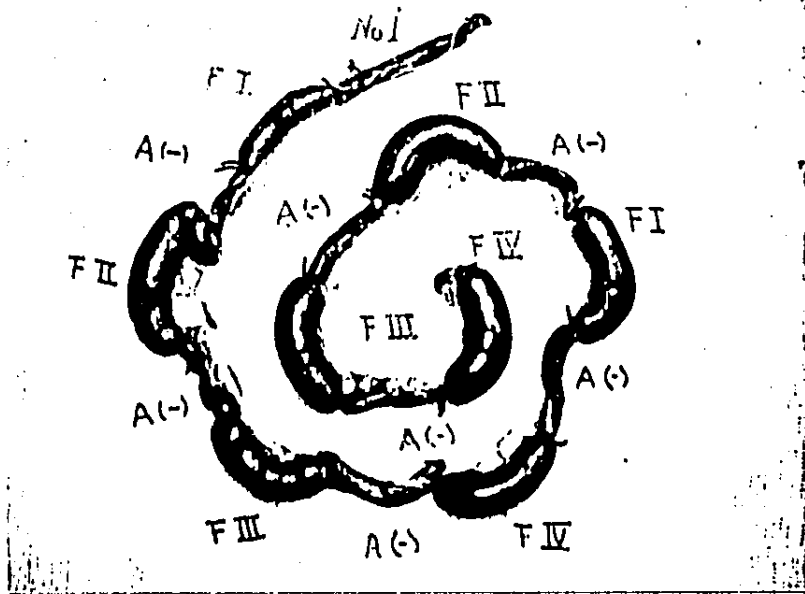
Inmunolectroforesis.

También a este material se le efectuó inmunolectroforesis encontrando la presencia de una sola banda, mismo hallazgo que se encontró en la electroforesis efectuada al suero de conejo antes de la extracción de la fracción globulínica (figura 2).

Ensayo en el Nefelómetro de Rayo Laser del Sistema Anti-Enterotoxina/-Toxina Termo-Lábil.

En los cuadros 2, 3 y 4 mostramos los registros de las lecturas efectuadas en el nefelómetro de rayo laser con las diluciones del suero antitoxina y toxina termo-lábil.

Como puede observarse las diluciones 1:5 y 1:10 del suero con la dilución 1:5 de la enterotoxina dieron lecturas ascendentes hasta alcanzar su punto máximo a los 70 minutos de incubación a temperatura ambiente. La incubación a 37°C. no acertó el tiempo de incubación, sólo mostró incremento en las lecturas en relación a las correspondientes incubadas a temperatura ambiente alcanzando su máximo punto en el mismo lapso de tiempo.



Fotografía I.

Ensayo con Asa Ligada de Intestino
Delgado de Conejo.

FI, FII, FIII y FIV: segmentos en los que
se inoculó enterotoxina termo-lá-
bil.

A(-): segmentos en los que se inoculó
solución amortiguadora de Tris-
HCl como control negativo.

No I: segmento no inoculado.

Títulos de An
ticuerpo anti
enterotoxina
por C.I.E.

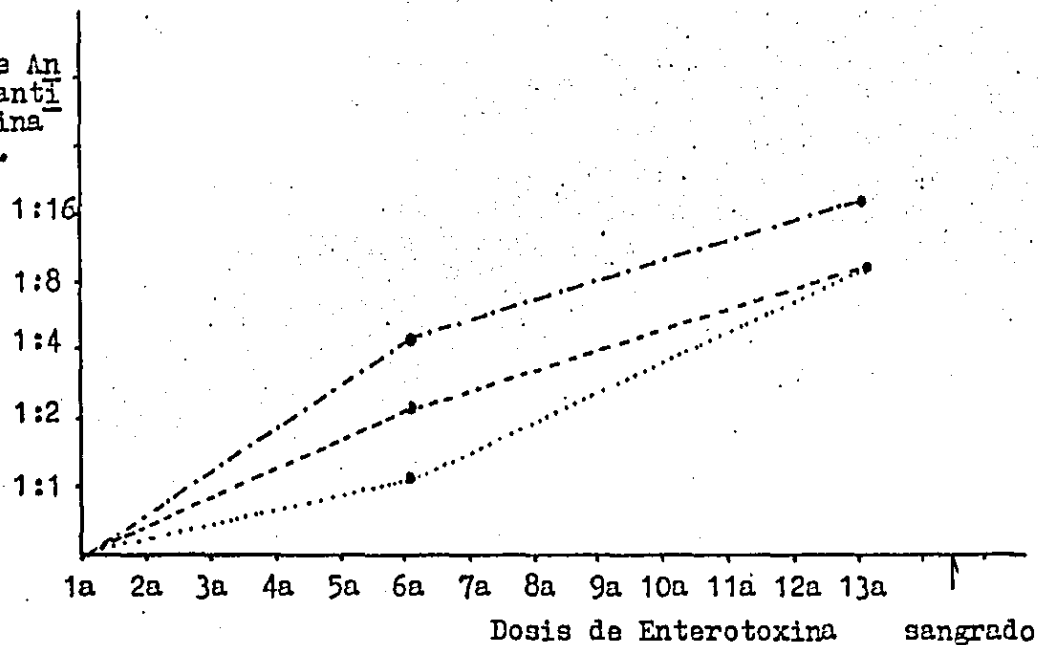


Figura 1. Respuesta a la inmunización con Enterotoxina
Termo-Lábil de los Conejos I, II y III.

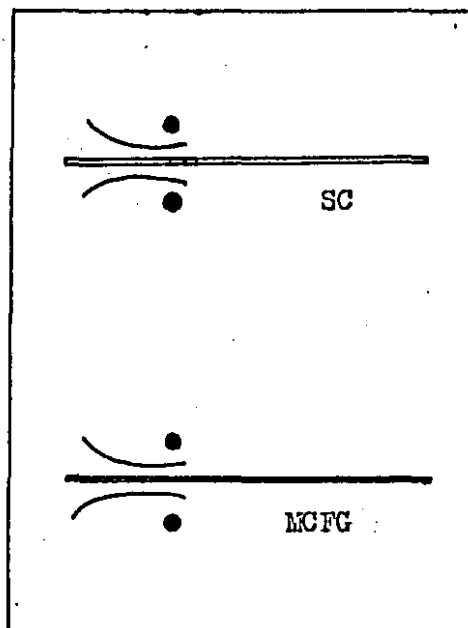


Figura 2. Inmunolectroforesis del Suero de Conejo (SC) y del Material conteniendo a la Fracción Gamma Globulina (MCFG).

	Suero de Conejo.		Material conteniendo a la Fracción Gamma Globulina.	
	g./dl.	%	g./dl.	%
Proteínas Totales	1.510		1.10	
Albúmina	0.833	55.16	0.06	5.5
Globulinas	0.677	44.84	1.04	94.5
alfa 1	0		0	
alfa 2	0.1098	7.28	0.09	8.17
beta	0.2836	18.78	0.27	24.54
gamma	0.2836	18.78	0.68	61.79

Cuadro 1. Cuantificación de Proteínas y Electroforesis del Suero de Conejo y del Material Conteniendo a la Fracción Gamma Globulina.

Cubeta	Dil.Ac.	Dil.Ag.	Lecturas a los:								
			5'	10'	15'	30'	45'	60'	70'	80'	90'
1	1:5	1:5	0.13	0.13	0.14	0.19	0.22	0.26	0.29	0.29	0.29
2	1:5	1:10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.13	0.14	0.16	0.16	0.16
3	1:5	1:20	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
4	1:5	1:40	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06
5	1:5	1:80	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
6	1:5	1:160	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
7	1:5	1:320	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
8	1:5	1:640	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05
9	1:5	1:1280	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
10	1:5	1:2560	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
11	1:5	S.Sal.	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

Cuadro 2. Registro de las Lecturas efectuadas en el Nefelómetro de Rayo Laser con diluciones del suero 1:5 y diluciones del antígeno al doble a partir de 1:5 hasta 1:2560.

Cubeta	Dil. Ac.	Dil. Ag.	Lecturas a los:								
			5'	10'	15'	30'	45'	60'	70'	80'	90'
1	1:5	1:5	0.17	0.16	0.17	0.19	0.25	0.27	0.31	0.31	0.31
2	1:10	1:5	0.10	0.10	0.10	0.12	0.17	0.21	0.24	0.25	0.25
3	1:20	1:5	0.10	0.11	0.11	0.11	0.13	0.15	0.16	0.16	0.16
4	1:40	1:5	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10
5	1:80	1:5	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09
6	1:160	1:5	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06
7	1:320	1:5	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05
8	1:640	1:5	0.08	0.06	0.07	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
9	1:1280	1:5	0.09	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04
10	1:2560	1:5	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
11	s.sal.	1:5	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04

Cuadro 3. Registro de las Lecturas efectuadas en el Nefelómetro de Rayo Laser con diluciones al doble del suero a partir de 1:5 hasta 1:2560 con una dilución de la toxina de 1:5.

Cubeta	Dil. Ac.	Dil.Ag.	Lecturas a los:								Temp.de Incubación.
			7'	15'	30'	45'	60'	70'	80'	90'	
1	1:5	1:5	0.20	0.25	0.31	0.33	0.36	0.42	0.41	0.42	37°C.
2	1:10	1:5	0.11	0.13	0.14	0.16	0.17	0.21	0.23	0.23	37°C.
3	1:5	1:5	0.20	0.21	0.25	0.28	0.30	0.37	0.37	0.37	ambiente
4	1:10	1:5	0.13	0.11	0.12	0.13	0.14	0.17	0.17	0.17	ambiente

Cuadro 4. Registro de las Lecturas efectuadas en el Nefelómetro de Rayo Laser con diluciones 1:5 y 1:10 del suero con diluciones 1:5 del antígeno, incubandolas a 37°C. y a temperatura ambiente.

DISCUSION.

Producción de Enterotoxina Termo-Lábil.

Mediante la producción de enterotoxina termo-lábil con un medio de cultivo conteniendo casaminoácidos y extracto de levadura e induciendo su liberación con un antibiótico (polimixina-B) se ha reportado que se obtiene un mayor rendimiento en la concentración de la toxina. La enterotoxina obtenida de esta manera es la forma más pequeña que conserva su actividad toxigénica e inmunogénica (20000 dalton) Se ha mencionado que esta toxina reside en el espacio periplasmático de la célula y sólo una pequeña cantidad (aproximadamente el 10%) es liberada espontáneamente al medio de cultivo (41 y 87).

En nuestro estudio en las diferentes ocasiones en que se produjo enterotoxina termo-lábil obtuvimos un material con concentraciones de proteína constantes, que demostró tener actividad en la prueba del asa ligada de intestino de conejo de 24 horas, ensayo que se ha considerado útil para demostrar la presencia de la enterotoxina termo-lábil y diferenciarla de la acción de la toxina termo-estable de la misma bacteria (53).

La enterotoxina demostró conservar su actividad aún cuando se conservó durante 3 meses en congelación a -30°C . Se ha visto que esta proteína pierde su actividad en forma importante cuando se almacena por tiempo más prolongado y a temperaturas menos frías (36).

Producción de Anticuerpos Anti-Enterotoxina Termo-Lábil.

La inmunización de conejos con el material conteniendo a la enterotoxina después de extracción con sulfato de amonio produjo buenos niveles de anticuerpos en el suero de los tres animales.

Se ha reportado que en la obtención de enterotoxina después de precipitación con sulfato de amonio hay una considerable disminución en el número de componentes en las preparaciones cuando a éstas se les efectúa electroforesis (44). Esto lo pudimos constatar al efectuar inmunoelectroforesis con el suero de ambos conejos, antes y después de extraer la fracción globulínica, al obtener sólo una banda.

El procedimiento de extracción de la fracción gamma globulina del

suero nos permitió obtener un material en el que la concentración de proteínas presentes casi totalmente correspondía a las globulinas - del suero del conejo (94.5%), con una gran recuperación de la fracción gamma globulina.

Ensayo en el Nefelómetro Laser del Sistema Anti-Toxina/Toxina Termolábil.

La nefelometría laser es un instrumento que se ha desarrollado en forma importante en los últimos años. La base de su funcionamiento - consiste en medir la cantidad de luz dispersada cuando se hace incidir el laser a través de una solución conteniendo partículas en suspensión (complejos antígeno-anticuerpo).

Las diluciones 1:5 y 1:10 del suero cuya concentración de proteína fue de 2.2 y 1.1 mg./ml. respectivamente, al probarse con una dilución de la enterotoxina de 1:5, con una concentración de proteína de 0.49 mg/ml. en el nefelómetro dieron lecturas con una magnitud ascendente en relación al tiempo, logrando su pico a los 70 minutos de incubación a temperatura ambiente, indicando claramente la presencia de una reacción antígeno-anticuerpo. Esto se pudo reproducir en otra ocasión sin observar variaciones en las lecturas, aún cuando se utilizó un antígeno de preparación más reciente (cuadro 4).

Al incrementar la temperatura de incubación a 37°C., sólo se observó un aumento en la magnitud de las lecturas alcanzando su pico máximo en el mismo lapso de tiempo, por lo que consideramos que esta modificación no ofrece ninguna ventaja.

Las lecturas con las pruebas de diluciones mayores, tanto del antígeno como del anticuerpo, no mostraron un comportamiento ascendente, a excepción de las efectuadas con la dilución 1:5 del suero con la 1:10 de la toxina, y la 1:20 del suero con la 1:5 de la toxina, en las que la variación es discretamente perceptible.

Lo anterior nos indica que es posible detectar a la enterotoxina termolábil de Escherichia coli en el nefelómetro de rayo laser cuando - se utiliza un anticuerpo anti-enterotoxina a una concentración de 1.1 a 2.2 mg/ml. de proteína, y un antígeno de enterotoxina con una concentración de 0.49 mg/ml. de proteína.

CONCLUSIONES.

Escherichia coli enterotoxigénica es una causa frecuente de diarrea en los países en desarrollo. Produce dos enterotoxinas, una termo-lábil de peso molecular elevado, y otra termo-estable de peso molecular bajo. Para que esta bacteria produzca enfermedad es necesario, además, la presencia de un antígeno, el factor de colonización. La presencia de éste y de las toxinas está controlada genéticamente por plasmidos.

La enterotoxina termo-lábil físico-químicamente es muy semejante a la toxina del Cólera, con quien además presenta inmunidad cruzada. Lo que se ha aprovechado para desarrollar métodos para detectarla. Estas enterotoxinas ejercen su acción por un mecanismo que hace que la adenil ciclasa se estimule e incremente la concentración del AMPc intracelular con la consecuente alteración en la absorción de NaCl y agua y en la secreción de NaCO_3H y agua por las células del epitelio del intestino delgado.

Para poder detectarla es necesario demostrar que produce enterotoxina ya que no tiene características morfológicas ni bioquímicas que la distinguan. Entre los medios empleados para esto, se incluyen pruebas "in-vivo", como el ensayo de asa de conejo, y pruebas "in-vitro", como los cultivos de células suprarrenales. Todas ellas presentan dificultades en su realización que no las hacen del todo accesibles para aplicar las prácticamente al laboratorio clínico.

Utilizando un medio de cultivo con casaminoácidos, y estimulando su liberación con polimixina-B, se obtiene un mayor rendimiento en la producción de esta enterotoxina. Al someter este material a precipitación con sulfato de amonio se disminuye el número de componentes. Este material puede administrarse a conejos por vía intramuscular para producir anticuerpos logrando una buena respuesta.

Utilizando los anticuerpos obtenidos de esta forma puede detectarse a la enterotoxina termo-lábil en el nefelómetro de rayo laser cuando se utiliza este anticuerpo con una concentración de proteína de 1.1 a 2.2 mg/ml. y un antígeno de enterotoxina a una concentración de 0.49 mg/ml. de proteína.

RESUMEN:

En el presente trabajo se presenta una revisión de la información más importante acerca de la enterotoxina termo-lábil de Escherichia coli y los métodos para su detección.

Además, se presenta la parte inicial de un trabajo orientado hacia el desarrollo de un método que pueda ser utilizado en el laboratorio clínico en forma práctica y confiable para su detección.

Esta parte es la producción de enterotoxina termo-lábil con un medio conteniendo casaminoácidos y extracto de levadura, la producción de anticuerpos anti-enterotoxina termo-lábil en conejos y el ensayo en el nefelómetro de rayo laser del sistema antienterotoxina termo-lábil/toxina termo-lábil de Escherichia coli.

BIBLIOGRAFIA:

1. Raskova H., Raska K. Escherichia coli enterotoxin; Comentary. Biochem.Pharm. 26:1103-1108; 1977.
2. Pickering LK. Gastroenteritis due to enteropathogenic, enterotoxigenic and invasive Escherichia coli: a review. Am.J.Med.Tech. 45:787-792;1979.
3. Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli: identification and characterization. J.Infect.Dis. 142:279-286; 1980.
4. Sack RB. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Annu.Rev.Microbiol. 29:333-352; 1975.
5. Smith HW., Halls S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves and rabbits. J.Path.Bact. 93:499-529; 1967.
6. DuPont HL., Formal SB., Hornick RB., Snyder MJ. Pathogenesis - of Escherichia coli diarrhea. N.Engl.J.Med. 285:1-9; 1971.
7. Evans DG., Olarte J., DuPont HL., Evans DJ., Galindo E. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico city. - J.Pediatrics 91:65-68; 1977.
8. Pickering LK., Evans DJ., Nuñez O. Prospective evaluation of - enteropathogens associated with diarrhea in children in Houston - and Mexico. J.Pediatrics 98:383-388; 1978.
9. Hornick RB. Acute bacterial diarrheas. Adv.Int.Med. 21:349-361; 1976.
10. Kétyi I. Enterotoxins of enteric bacteria -a review-. - Ann.Immunol.Hung. 19:9-24; 1979.
11. Wadström T., Mölby R., Söderlind O. Heat-labile enterotoxins of Escherichia coli. Toxicon 15:511-519; 1977.
12. Richards KL., Douglas SD. Pathophysiological effects of Vibrio cholerae and enterotoxigenic Escherichia coli and their exotoxins on eucariotic cells. Microbiol.Review 42:592-613; 1978.
13. Merson MH., Orskov F., Sack RB. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic Escherichia coli. - Infect.Immun. 23:325-329; 1979.

14. Konowalchuk J., Dickie S., Stavric S. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22:644-648; 1978.
15. Back E., Mølbj R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other gram negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen and loss of enterotoxigenicity. *J. Infect. Dis.* 142:318-327; 1980.
16. Gyles CL., Palchaudhuri S. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science* 198:198-199; 1977.
17. Evans DG., Silver RP., Evans DJ. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12:656-667; 1975.
18. Evans DG., Evans DJ., DuPont HL. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 19:727-736; 1978.
19. Levine MM., Rennels MB., Daya V. Hemagglutination and colonization factor in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. *J. Infect. Dis.* 141:733-737; 1980.
20. Evans DG., Evans DJ. Hemagglutination of human groups A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* 18:330-337; 1977.
21. Clements JD., Finkelstein RA. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* 24:760-769; 1979.
22. Clements JD., Yancey RJ. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 29:91-97; 1980.
23. Dallas WS. The molecular nature of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* 277:406-407; 1979.
24. Gill DM., Clements JD., Robertson DC. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 33:677-682; 1981.
25. Kunkell SL., Robertson DC. Purification and chemical character

- rization of the heat-labile enterotoxin, produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 25:586-596; 1979.
26. Gill DM., Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate-cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *J.Infect.Dis.* 141:64-70; 1980.
27. Moseley SL., Falkow S. Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* DNA. *J.Bacteriology* 144:444-446; 1980.
28. Gyles CL., Barnum DA. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J.Infect.Dis.* 120:419-426; 1969.
29. Clements JD., Finkelstein RA. Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect.Immun.* 21:1036-1039; 1978.
30. Honda T., Takeda Y., Miwatani T. Isolation of special antibodies which react only with homologous enterotoxins from *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 34:333-336; 1981.
31. Clements JD., Finkelstein RA. Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 22:709-713; 1978.
32. Holmgren J. Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infect.Immun.* 8:851-859; 1973.
33. Fishman P., Brady R. Biosynthesis and function of gangliosides. *Science* 194:906-915; 1976.
34. Evans DJ., Chen C., Evans DG. Stimulation of adenylcyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nature N.Biol.* 236:137-138; 1972.
35. Field M. Mechanisms of action of cholera and *Escherichia coli* enterotoxins. *Am.J.Clin.Nutr.* 32:189-196; 1979.
36. Mundell D., Anselmo C. Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect.Immun.* 14:383-388; 1976.
37. Gilligan PH., Robertson DC. Nutritional requirements for synthesis of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 23:99-107; 1979.

38. Kunkel SL., Robertson DC. Factors affecting release of heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 23:652-659; 1979.
39. Levner M., Wiener FP., Rubin BA. Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein - synthesis. *Infect.Immun.* 15:132-138; 1977.
40. Gensky P., O'Brien AD., Wohlieter JA. Cellular release of - heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* by bacteriophage induction. *Infect.Immun.* 19:1076-1082; 1978.
41. Evans DJ., Evans DG. Polymyxin-B induced release of low molecular weight heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. - *Infect. Immun.* 10:1010-1017; 1974.
42. Dorner F., Jacke H. *Escherichia coli* enterotoxin: purification partial characterization, and immunological observations. - *J.Infect.Dis.* 133:s142-s156; 1976.
43. Finkelstein RA., LaRue MK., Johnston DW. Isolation and properties of heat labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J.Infect.Dis.* 133:s120-s137; 1976.
44. Evans DJ., Evans DG., Richardson SH., Gorbach SL. Purification of the polymyxin released heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J.Infect.Dis.* 133:s97-102; 1976.
45. De SN., Chatterje DN. An experimental study of the mechanisms - of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J.Fath.Bact.* 66:559-562; 1953.
46. De SN., Bhattacharya K., Sarkar JK. A study of the pathogenicity of strains of bacterium *coli* from acute and chronic enteritis. *J.Path.Bact.* 71:201-209; 1956.
47. Taylor J., Maltby MP., Payne JM. Factors influencing the response of ligated rabbit-gut segments to injected *Escherichia coli* *J.Path.Bact.* 76:491-499; 1958.
48. Smith HW., Halls S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J.Path. Bact.* 93:531-543; 1967.
49. Burrows W., Mustakis GM. Cholera infection and toxin in the - rabbit ileal loops. *J.Infect.Dis.* 116:183-190; 1966.

50. Moon HW., Whipp SC. Response of the rabbit ileal loops to the cells free products from *Escherichia coli* enteropathogenic for swine. *J.Infect.Dis.* 121:182-187; 1970.
51. Etkin S., Gorbach S. Studies on enterotoxin from *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in man, *J.Lab.Clin.Med.* 78: - 81-87; 1971.
52. Moon HW., Whipp DV. Comparative effects of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* on rabbit and swine small intestine. *Lab.Invest.* 25:133-140; 1970.
53. Evans DG., Evans DJ. Differences in the response of rabbit - small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 7:873-880; 1973.
54. Guarrant RL., Ganguly U., Casper AGT., Moore EJ. Effect of *Escherichia coli* on fluid transport across canine small bowel. - *J.Clin.Invest.* 52:1707-1714; 1973.
55. Craig JP. A permeability factor (toxin) found cholera stools - and culture filtrate and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature (London)* 207:614-616; 1965.
56. Evans DJ., Evans DG., Gorbach SL. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect.Immun.* 8:725-730; 1973.
57. Evans DJ., Evans DG., Gorbach SL. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Infect.Immun.* 8:731-735; 1973.
58. Burgess MN., Cowley CM., Melling CJ., Mullan NA. Assay of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in infant rabbits. - *J.Med.Microbiol.* 12:291-302; 1979.
59. Donta ST., King M. Induction of steroidogenesis in tissue culture by cholera enterotoxin. *Nature N.Biol.* 243:246-247; 1973.
60. Donta ST. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* 183: - 334-335; 1974.
61. Kwan CN., Wishnow RM. *Escherichia coli* enterotoxin induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Infect.Immun.* - 10:146-151; 1974.

62. Sack DA., Sack RB. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. *Infect.Immun.* 11:334-336; 1975.
63. Echeverría F., Verheart L., Ulianco C., Santiago L. Detection of - heat-labile enterotoxin like activity in stools of patients with Cholera and *Escherichia coli* diarrhea. *Infect.Immun.* 19:343-344; 1978.
64. Merson MH., Yolken RH., Sack RB., Froelich JR. Detection of *Escherichia coli* enterotoxin in stools. *Infect. Immun.* 29:108-113; 1980.
65. Donta ST., Viener JP. Inhibition of the steroidogenic effects of - Cholera and heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin by G₁ ganglioside. *Infect. Immun.* 11:982-985; 1975.
66. Wishnow RM., Lifrak E., Chen C. Interaction of Cholera enterotoxin with cultured adrenal tumor cells. *Infect.Immun.* 12:768-771; 1975.
67. Guerrant RL., Brunton LL., Schaitman TC., Rebhun L. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 10:320-327; 1974.
68. Stavric S., Speirs JI., Konowalchuck J. Stimulation of cyclic AMP secretion in Vero cells by enterotoxin of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 21:514-517; 1978.
69. Dorner F., Mayer P. *Escherichia coli* enterotoxin: stimulation of - adenylate cyclase in broken cells preparations. *Infect. Immun.* 11:429-435; 1975.
70. Evans DJ., Evans DG. Inhibition of the immune hemolysis serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J.Clin. - Microbiol.* 5:100-105; 1977.
71. Evans DJ., Evans DG. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infect Immun.* 16:604-609; 1977.
72. Serafim MB., Pestana AF., Lemos MH., Trabulsi LR. Passive Immune - hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. *Infect.Immun.* 24:606-610; - 1979.
73. Pestana AF., Serafim MB., Gomes JA. Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. - *J.Clin.Microbiol.* 12:714-717; 1980.

74. Tsukamoto T., Kinoshita Y., Taga S., Takeda Y. Value of passive - immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* 12:768-771; 1980.
75. Serafim MB., Pestana AF., Leonardo MK. Single radial immune hemolysis test for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* 14:473-478; 1981.
76. Brill MB., Wasilaukas DL., Richardson SH. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* 9:49-55; 1979.
77. Greenberg HB., Sack DA., Rodriguez W. A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 17:541-545; 1977.
78. Ceska M., Grossmuller F., Effemberger F. Solid-phase radioimmunoassay method for detection of *Escherichia coli* enterotoxin. *Infect. - Immun.* 19:347-352; 1978.
79. Yolken RH., Greenberg HB., Merson MH., Sack RB. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J.Clin.Microbiol.* 6:439-444; 1977.
80. Back E., Svennerholm AM., Holmgren J., Mollby R. Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *J.Clin.Microbiol.* 10:791-795; 1979.
81. Otnaess AB., Halvorsen S. Identification of low levels of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* from childrens with diarrhea. - *Acta Path.Microbiol.Scand.B* 89:173-177; 1981.
82. Gustafsson B., Mollby R. G_{m1} ganglioside enzyme linked immunosorbent assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by human and porcine *Escherichia coli* strains. *J.Clin.Microbiol.* 15:298-301; 1982.
83. Honda T., Glass R., Akthar Q. A simple assay to detect *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin: results of a field study of the Biken test in Bangladesh. *Lancet* ii:609-610; 1981.
84. Honda T., Arita M., Takeda Y. Further evaluation of the Biken test for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. *J.Clin.Microbiol.* 16:60-62; 1982.

85. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193:265-276; 1951.
86. Hudson L., Hay FC. Inmunología práctica. Editorial Jims. 1979 - página 2.
87. Yamamoto T., Yokota T. Release of heat-labile enterotoxin subunits by Escherichia coli. J.Bacteriol. 150:1482-1484; 1982.
-