

**BUSQUEDA DE TOXINA LABIL (LT) EN CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DE CUADROS DIARREICOS
EN NIÑOS POR EL METODO INMUNOENZIMATICO ELISA.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

MA. GUADALUPE GALLARDO RESENDIZ



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

OBJETIVOS.....	1
INTRODUCCION.....	2
GENERALIDADES :	
A) Antecedentes.....	4
B) ELISA.....	10
PARTE EXPERIMENTAL:	
A) Material, equipo y reactivos.....	15
B) Métodos.....	19
RESULTADOS.....	38
DISCUSION Y ANALISIS DE LOS	
RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES.....	46
ANEXO.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	51

O B J E T I V O S :

Los objetivos que se desean alcanzar en el presente trabajo son los siguientes :

- Estandarizar el método inmunoenzimático ELISA-gan-gliósido GM₁, para la detección rápida de la toxina lábil LT de Escherichia coli en muestras diarreicas de niños menores de 5 años.

- Comparar los resultados obtenidos con los alcanzados con otros métodos, como asa ligada en conejo y el ensayo en células de hamster chino para, de este modo, establecer las ventajas del método realizado en el presente trabajo.

I N T R O D U C C I O N :

Las diarreas de origen bacteriano, sobre todo las debidas a Escherichia coli enterotoxigénica, son motivo principal de morbilidad y mortalidad en el mundo, siendo una de las dos causas principales de muerte en niños menores de 5 años de edad, aunque ocasionando también un alto índice de morbilidad en adultos. En países en vías de desarrollo se ha estimado que las diarreas son las responsables de un 50% de mortalidad infantil (5,6,22,28, 34).

En nuestro país esta enfermedad ocupa uno de los principales lugares como causa de mortalidad, especialmente en los niños menores de un año a quienes corresponden de el 53.4% del total de muertes por diarrea de la población general (35).

Hace diez años la identificación de los agentes etiológicos de casos de diarrea se hacía solamente en un 20-25%. En los últimos 5 años se ha mejorado por haberse elaborado nuevas técnicas que han permitido el aislamiento e identificación de estos agentes, que en algunos casos eran microorganismos desconocidos y en otros no se les consideraba como patógenos. En la actualidad los agentes etiológicos son identificados en un 50-80% (22).

Las bacterias más comunmente aisladas en casos de diarrea son: Shigella y Salmonella en adultos y ciertos serotipos de Escherichia coli en niños menores de 5 años. Los agentes bacterianos recientemente involucrados como causa importante de diarrea incluyen: Escherichia coli en

terotoxigénica, Yersinia enterocolitica, Bacillus cereus, Campylobacter fetus, Vibrio parahaemolyticus, y muchos --- otros microorganismos coliformes (4,22,27,28).

Entre los agentes antes citados, Escherichia coli - enterotoxigénica últimamente se menciona con mucha fre--- cuencia en casos de diarrea, pues se ha visto que posee - la capacidad de producir toxinas, una de ellas, la toxina lábil LT, es a la que se encuentra enfocado este trabajo, básicamente a probar un método de detección rápido, espe--- cífico y sensible de la misma.

GENERALIDADES:

A) Antecedentes:

Se ha establecido que las enterotoxinas, sustancias elaboradas por bacterias, que provocan la secreción de agua y electrolitos en el intestino, son causa de cuadros diarreicos. Entre las principales bacterias productoras de ellos se encuentran: Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus y Salmonella enteritidis (19,22,29,34,38).

Escherichia coli enterotoxigénica es la más comunmente aislada de diarreas tanto en humanos como en ganado porcino (lechones), caprino, ovino y bovino, en los que este síndrome es bien conocido. En humanos es más frecuente en niños, así como también se le considera como causa importante de la diarrea de los viajeros (4,5,6,9,22,27,28,29,34,35,38,44).

Las primeras comunicaciones de Escherichia coli asociada con diarrea, surgieron de una epidemia infantil -- ocurrida a mediados de 1940, en donde ciertos serotipos --- fueron epidemiológicamente incriminados como agentes etiológicos. A las cepas de Escherichia coli que pertenecían a estos serotipos se les llamó enteropatógenas, y el mecanismo por el cual causaban la diarrea era desconocido. Las enterotoxinas se mencionaron como factor de virulencia en 1956 por De y colaboradores y más tarde por Bettelheim y Taylor, pero su existencia no se demostró totalmente -- (22,34,35,38).

No fue sino hasta mediados de los sesenta, que Escherichia coli productora de enterotoxinas se aisló por primera vez de animales domésticos recién nacidos, que presentaban diarrea severa. Estas cepas resultaron ser de los mismos serotipos llamados enteropatógenos, y que se reconocieron como causantes de diarreas en estos animales. Poco después, en estudios hechos en Calcuta, se describieron algunas cepas de E. coli enterotoxigénica como agentes etiológicos de una enfermedad en humanos parecida al cólera. En las últimas décadas se ha enfatizado la importancia de las cepas de E. coli productoras de toxinas como causantes de diarrea en humanos y animales, por lo que en la actualidad se ha incrementado su estudio (22,24,34,35, 38).

E. coli enterotoxigénica elabora dos toxinas, una toxina lábil LT y otra toxina estable ST. La producción de ambas está genéticamente codificada por elementos extracromosomales transmisibles llamados plásmidos (4,6,9,12, 17,19,22,34,38).

La toxina lábil LT es una proteína con peso molecular que varía, según reportes, de 20,000 a 100,000 daltons, es inmunológicamente similar a la toxina del cólera, no es dializable y se neutraliza con su suero específico. El mecanismo por el cual produce diarrea es activando la adenil-ciclase de las células epiteliales del intestino delgado, con un consecuente incremento de la concentración intracelular de AMP-cíclico, dando como resultado la secreción de agua y electrolitos por el intestino delgado. El receptor de la toxina en la mucosa intestinal es el gangliósido GM₁ (galactosil-N-acetilgalactosaminil-N-acetil-neuraminil-galactosilglucosilceramida) (4,8,18,19,

21, 22, 27, 34, 35, 38).

La toxina estable ST es un péptido de bajo peso molecular (1,000 a 10,000 daltons), dializable, no inmunogénica, ácido estable y resistente a la acción de las proteasas. Induce la secreción de agua y electrolitos en el intestino delgado y en el intestino grueso por medio de la estimulación de la guanidil-ciclasa (GMP) (4, 22, 34, 35, 38).

Entre los métodos que existen para la detección de la toxina lábil LT, están los siguientes:

- Asa ligada en conejo.
- Factor de permeabilidad.
- Células adrenales V-1 de ratón.
- Células de ovario de hamster chino (Cels. CHO).
- Radioinmunoensayo de fase sólida.
- Fijación de complemento.
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Asa ligada en conejo :

El ensayo de asa ligada en conejo se usa para la --- detección de las toxinas de E. coli, tanto para toxina lábil como para toxina estable, pero entre las dificultades que existen para usar este método se encuentra el hecho de que da reacciones falsas, ya que el animal pudo haber tenido contacto con este agente o bien ser portador, por lo que se recomienda el uso de controles apropiados..... Otro inconveniente es el poco número de cepas que se pueden probar en un conejo y esto se traduce en costo elevado (18, 20, 24, 34, 41, 43).

Factor de permeabilidad:

Es un ensayo comparable en sensibilidad al asa ligada en conejo, pero entre los aspectos críticos de este ensayo se encuentra la edad de los conejos, ya que los de mayor edad reaccionan menos que los conejos jóvenes, ocasionando así fallas en las reacciones de permeabilidad -- (14,17,21,43).

Cultivo Celular:

Los ensayos de cultivo celular son métodos específicos y sensibles para la detección de la toxina lábil de E. coli, pero su realización es laboriosa y requiere de -- continuo suministro de tejido biológico viable (3,15,17,21,24,43).

Fijación de complemento :

Esta técnica recientemente descrita por Evans y colaboradores para la detección de la toxina lábil, requiere para su elaboración, reactivos que no están generalmente disponibles, como son un antígeno purificado, un anticuerpo dirigido contra él y cambio continuo de eritrocitos -- frescos de cordero y complemento (16,42,43).

Radioinmunoensayo de fase sólida :

El radioinmunoensayo es una técnica muy sensible y -- pueden llevarse a cabo gran número de muestras simultáneamente, pero su realización requiere de equipo y personal especializado, material radioactivo cuya vida media es corta, y su manejo representa un peligro para la salud. Por lo anterior se deduce que, además de ser una técnica costosa, ----

tiene varios inconvenientes para llevarla a cabo en un laboratorio de rutina [26,42,43].

Teniendo en cuenta la desventajas que se tienen con los métodos antes mencionados, surgió la necesidad de crear una nueva técnica que reuniera las ventajas de los métodos. Así fue como Avrameas (1969), Engvall y Perlmann (1971-1972) dieron origen al ensayo inmunoenzimático -- ELISA (del inglés Enzyme-linked immunosorbent assay) basándose en el hecho de que un antígeno o un anticuerpo -- pueden marcarse con una enzima formando un complejo, conservando éste, tanto la actividad inmunológica como la enzimática. Siendo esta técnica tan sensible como el radioinmunoensayo, presenta ventajas tales como: reactivos de bajo costo, estables, con una vida media larga, no presentan peligro para la salud, y los resultados pueden observarse a simple vista o leídos con un espectrofotómetro -- (27,31,39,41,42,43).

Estas ventajas hacen que ELISA sea una técnica de fácil realización en un laboratorio de rutina. Así mismo, cabe mencionar que este método, tiene un rango de aplicación muy extenso, pudiendo reemplazar a otras técnicas tales como: inmunofluorescencia, hemaglutinación, fijación de complemento y radioinmunoensayo. Es así como últimamente, ELISA ha tenido gran auge en Endocrinología, Inmunopatología, Hematología, Parasitología y Microbiología (39, 40).

El propósito fundamental de este trabajo es la detección de la toxina lábil LT de cultivos de E.coli por medio de un método rápido, específico y de fácil realización, para poderlo así introducir en un laboratorio de ru

tina. Por lo que se seleccionó la técnica de ELISA por las ventajas antes mencionadas.

B) E L I S A :

Fundamento: El método está basado en la adsorción de anticuerpos (o antígenos) solubles, a una superficie sólida insoluble, con el fin de capturar el antígeno (o anticuerpo) correspondiente presente en la solución problema y detectar este complejo antígeno-anticuerpo por medio de un anticuerpo (o antígeno) marcado con una enzima. Finalmente se revela el sistema con la adición del sustrato -- específico, produciéndose una coloración debida a la hidrólisis del sustrato, que es proporcional a la cantidad de antígeno (o anticuerpo) presente en la solución problema (29,30,31,32,33).

Para la realización de este método se tienen que tomar en cuenta ciertas consideraciones generales, que se mencionarán a continuación.

Sensibilización :

La sensibilización, es la unión del antígeno o anticuerpo a la fase sólida, encontrándose que éstos pueden unirse covalentemente a ciertos materiales tales como celulosa y en forma iónica al poliestireno o polivinilo; -- usando de este modo papel, esferas o placas de microhemaglutinación hechos de estos materiales como fase sólida - (29,30,33).

Las placas de microhemaglutinación de poliestireno se recomiendan debido a que se pueden trabajar gran número de muestras con pequeñas cantidades de reactivos y -- además son económicas (30,33).

La sensibilización se lleva a cabo por adsorción pasiva con soluciones alcalinas conteniendo 1-10 ug/ml de proteína, por tiempo y temperaturas variables según la naturaleza del antígeno o anticuerpo (30,33).

Conjugado :

Consiste en acoplar una enzima, previamente activada, a un antígeno o anticuerpo, lo que hace que este complejo denominado conjugado posea tanto actividad inmunológica como enzimática (30,31,32,33).

Las enzimas utilizadas como marcadores de antígenos o anticuerpos, deben reunir los requisitos siguientes:

- Actividad específica.
- Buena estabilidad.
- Que la actividad enzimática después de la conjugación no se pierda en un porcentaje considerable.
- Que sea de fácil obtención o de fácil preparación.

Entre las enzimas que reúnen los criterios anteriores se encuentran :

- Fosfatasa alcalina.
- Peroxidasa.
- Glucosa oxidasa.
- β -galactosidasa.

La unión de la enzima con la proteína involucra el uso de un agente acoplante, el cual va reaccionar con los grupos funcionales presentes en la enzima así como en la proteína a conjugar. Los reactivos utilizados como agen-

tes acoplantes son [32,33]:

- 4,4' difluoro-3,3' dinitrofenilsulfona.
- Cloruro de cianógeno.
- Toluen 2,4 diisocianato.
- Bis-diazobencidina.
- Carbodiimidas.
- N,N'-o-fenilendiamina.
- Periodato de sodio.
- Glutaraldehído.
- Parabenzoquinona.

Se han descrito dos tipos de procedimientos para elaborar el conjugado:

1.- Procedimiento de un paso: en este caso se hacen reaccionar juntos la proteína, la enzima y el agente acoplante, esta es una reacción difícil de controlar, debido a que el grado de reacción de los grupos funcionales en enzimas y proteínas son diferentes. Esto puede conducir a una polimerización selectiva de enzimas o proteínas, -- por lo que los conjugados preparados por este procedimiento son básicamente heterogéneos [32,33].

2.- Procedimiento de dos pasos: primero se activa la enzima con el agente acoplante y se agrega después el --- antígeno o anticuerpo. Teóricamente este procedimiento es más fácil de controlar que el de un paso, obteniéndose así conjugados más homogéneos [32,33].

Sustrato :

La elección del sustrato es esencial para el ensayo

inmunoenzimático, teniendo que reunir los siguientes requisitos:

- Ser estable.
- Soluble antes y después de la degradación.
- De fácil uso.
- Económico.

La mayoría de los autores usan sustratos cromogénicos, que son incoloros y después de la degradación enzimática se transforman en productos coloridos. La hidrólisis del sustrato continúa por un tiempo dado, hasta que se detiene, generalmente por la adición de un ácido o álcali fuerte (29,31,33).

El sustrato que se utiliza es el p-nitrofenilfosfato para conjugados de fosfatasa alcalina. La reacción de la enzima con este sustrato altamente soluble, se detiene -- con una solución alcalina concentrada (NaOH 3M) produciéndose un color amarillo en la reacción resultante (33).

Paso de lavado :

Como el ensayo inmunoenzimático consiste de una serie de incubaciones de diferentes reactivos, es necesario lavar las placas después de cada incubación, con el objeto de eliminar los reactivos que no reaccionaron para, -- posteriormente, poner la siguiente sustancia a reaccionar.

El sistema de lavado de las microplacas se lleva a -- cabo vaciando el contenido de los pozos y llenándolos con solución salina amortiguadora de fosfatos que contenga un agente tensoactivo como Tween 20. Con esta solución se --

mantienen 3 minutos, después de los cuales, se vierte el contenido y se vuelven a llenar los pozos con la misma solución amortiguadora (PBS-Tween). Esto se repite tres veces, al cabo de lo cual, se sacude la placa y para -- eliminar el resto de la solución de lavado se coloca sobre un papel absorbente. Después se adiciona el siguiente reactivo (30,33).

INSTRUCTIVO PARA LLENAR LA FORMA DE REGISTRO DE TESIS

1. **Consigne la información de manera clara, de acuerdo a las instrucciones que aquí se señalan. Escriba con tinta.**
2. **No invada las zonas sombreadas. Tales espacios están reservados a la codificación de la información que usted proporciona.**
3. **AÑO EN QUE SE PRESENTA LA TESIS:** Consigne solamente el año (omita el día y el mes); utilice para ello caracteres numéricos únicamente.
4. **AUTOR:** Escriba el nombre del autor en el siguiente orden: apellido paterno, apellido materno y nombre o nombres. Si la tesis ha sido elaborada por más de tres personas, consigne el nombre de las tres primeras en la hoja principal de registro de tesis y solicite una hoja anexo para registrar el nombre de las restantes.
5. **TITULO DE LA TESIS:** Escríbalo tal y como aparece en la portada de la tesis. En caso de haberlo, anexe el subtítulo en el renglón destinado a tal efecto.
6. **LUGAR DE EDICION:** Indique la ciudad donde fue presentada la tesis en examen -- profesional. No se considera lugar de edición la ciudad donde fue impresa la tesis.
7. **NUMERO DE PAGINAS:** Anote el último número que aparezca impreso en la paginación del ejemplar que presenta.
8. **ILUSTRACIONES:** Si su tesis cuenta con algún tipo de ilustraciones (mapas, esquemas, diagramas, fotografías, etc.) tache la palabra "SI". Tache en caso contrario la palabra "NO".
9. **IDIOMA:** Indique el idioma en el que fue redactada la tesis sólo en el caso de que sea éste una lengua distinta al castellano. Si su tesis está escrita en español, ignore el renglón correspondiente a idioma y déjelo en blanco.
10. **GRADO ACADEMICO:** Tache la letra que corresponda al grado académico que obtiene mediante la presentación de la tesis: L para licenciatura, M para maestría, D para doctorado y E para especialización.
11. **CARRERA:** Escriba el nombre completo de la carrera objeto de la tesis de acuerdo a su denominación oficial en los planes de estudio de la universidad en la que la cursó. No utilice abreviaturas.
12. **FACULTAD O ESCUELA:** Anote el nombre completo oficial de la facultad a la que corresponda la tesis. No utilice abreviaturas.
13. **UNIVERSIDAD:** Si su tesis fue presentada en alguna facultad o escuela de la - - - U. N. A. M., deje en blanco este renglón. En caso contrario, consigne el nombre completo y oficial de la universidad a la que pertenece la facultad en la que presentó la tesis.
14. **TEMAS DE QUE TRATA LA TESIS:** Anote los temas que más claramente definan el objeto de la investigación. Consígnelos de manera clara y concisa por orden de importancia.
15. **GRADO ACADEMICO DEL ASESOR DE LA TESIS:** Indíquelo --en caso de saberlo-- de la misma manera que se pide en el punto 10 de este instructivo.
16. **NOMBRE DEL ASESOR DE LA TESIS:** Escribalo en el siguiente orden: nombre(s), apellido paterno y apellido materno.
17. **RESUMEN:** Si la tesis que registra corresponde al nivel de doctorado, solicite -- hoja anexo para redactar un resumen no mayor de una cuartilla. Dicho resumen deberá presentarse --de preferencia-- en inglés.



Fecha	idioma	g. clave U.	Nº de matriz	f. cat.	iden.	Registro de Tesis
\$050M						Año en que se presenta la tesis: 1984
\$100M	Autor:	Gallardo	Reséndiz	Ma. Guadalupe		
\$100M	Autor:	Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)		
\$100M	Autor:	Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)		
\$2451	Título:	Búsqueda de toxina lábil (LT) en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de cuadros diarréicos en niños por el método inmunoenzimático ELISA.				
	Subtítulo:					
\$260M	Lugar de Edición:	México, D.F.				
\$300M	Número de páginas:		Ilustraciones:	NO	Idioma:	
	Grado:					
	<input checked="" type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E	Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo				
	Facultad o escuela:	Facultad de Química.				
	Universidad:	Universidad Femenina de México				
	Temas que trata la tesis:	Importancia de la identificación de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica productora de toxina lábil (LT) en cuadros diarréicos de niños.				
	Grado del asesor de tesis:					
	<input checked="" type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E	Nombre del asesor: Rosa Ma. Cerezo González				
\$650M						
\$600M						
\$901M						

P A R T E E X P E R I M E N T A L :

A) Material, equipo y reactivos. -

Material : Matraces Erlenmayer de 125, 250, 1000 y 2000 ml.
 Matraces volumétricos de 50, 100, 250, 1000 y 2000 ml.

Pipetas graduadas de 1, 5, 10 y 20 ml.

Pipetas Pasteur.

Probetas de 100, 500 y 1000 ml.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Vasos de precipitados de 50 y 250 ml.

Viales de plástico.

Viales de vidrio.

Equipo : Agitador automático.

Agitador magnético.

Balanza analítica.

Balanza granataria.

Baño metabólico.

Bolsas para diálisis.

Centrifuga refrigerada.

Incubadora.

Incubadora con atmósfera húmeda.

Espectrofotómetro.

Lavador manual de placas de microtitulación.

Micropipeta manual de 0 - 50 μ l.

Micropipeta manual de 50 - 250 μ l.

Micropipeta manual de 250 - 1000 μ l.

Puntas para micropipetas de 0 - 1000 μ l.

Selladores de plástico.

Material biológico : Suero de conejo anti-IT obtenido en el laboratorio.

Fosfatasa alcalina (Sigma).

Antigammaglobulinas de conejo obtenidas en cabra (Dako).

Albumina sérica bovina libre de -- gammaglobulinas (Sigma).

Gammaglobulinas de conejo normal -- (obtenidas en el laboratorio).

Gangliósido GM₁ (Supelco).

Reactivos: Glutaraldehído.

Sulfato de amonio.

p-Nitrofenilfosfato.

Soluciones : Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6.

Solución amortiguadora de dietanolamina - pH 9.8.

Solución amortiguadora de glicina-HCl pH- - 2.7.

Solución de hidróxido de sodio 3 M.

Solución salina 0.85% pH 6.8.

Solución salina 0.85% pH 7.4.

Solución TEAN 0.5 M.

Solución de Tris (hidroximetil aminometano) - HCl 0.01 M pH 8.0.

Solución 1 N de ácido clorhídrico.

Solución 1 N de hidróxido de sodio.

Solución salina amortiguada de fosfatos pH- - 7.4 0.05 M.

Solución salina amortiguada de fosfatos Tween pH 7.4.

Medios de cultivo y de conservación :

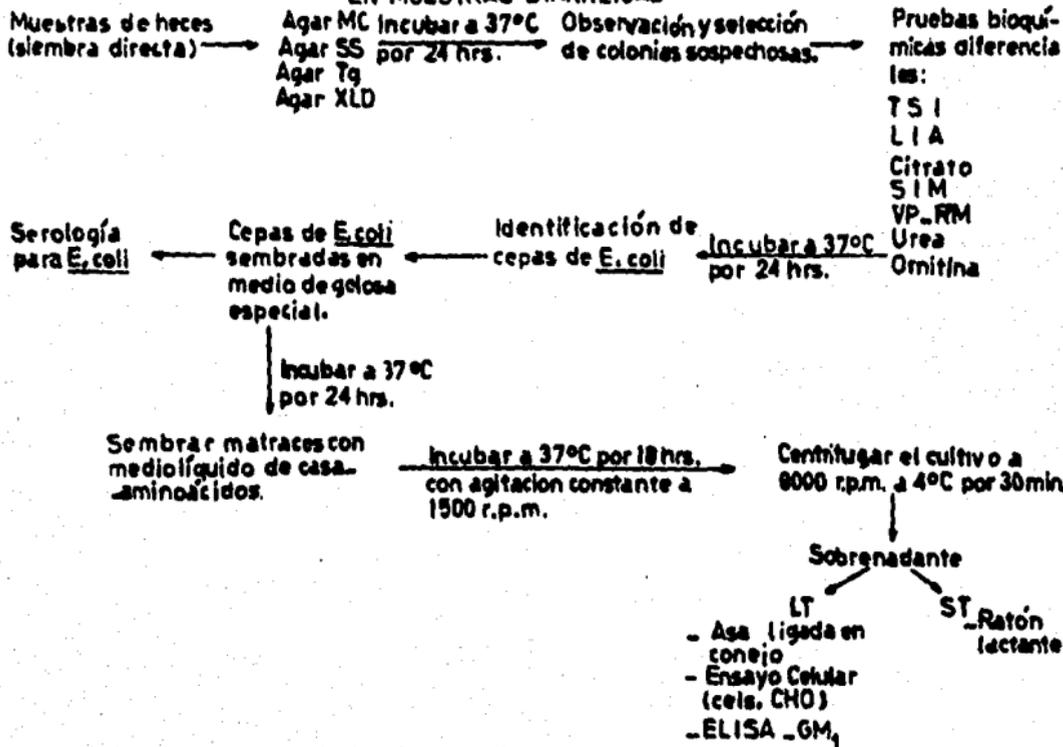
Caldo glicerol.

Gelosa especial.

Medio de casaminoácidos-agar.

Medio líquido de casaminoácidos.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA EN MUESTRAS DIARREICAS



8) Métodos.-

Se procesaron 94 muestras de heces diarreicas de las cuales se obtuvieron 300 cepas de E.coli, estas muestras pertenecían a niños menores de 5 años de edad, correspondientes en su mayoría a una zona marginada localizada en la parte sur de la Ciudad de México.

a) Colección y tratamiento de las muestras :

La colección de las heces se efectuó en bolsas de -- colostoma o en otro recipiente adecuado, procurando no -- excederse de un tiempo de 3 horas después de la evacua--- ción o de 4 horas de refrigeración para su tratamiento, - registrándose en las libretas correspondientes.

Inmediatamente que se recibió la muestra se hizo la observación directa de leucocitos y parásitos. Posteriormente las muestras se sembraron en los medios específicos para coprocultivo que son: agar MacConkey, agar Tergitol-7, agar Salmonella-Shigella y agar XIV (xilosa, lisina -- desoxicolato), se incubaron durante 24 horas a 37°C. --- Después se seleccionaron las colonias sospechosas y se -- procedió a su identificación con pruebas bioquímicas dife-- renciales, las que se utilizaron para este fin fueron: -- agar triple azúcar, agar Lisina descarboxilasa, agar ci-- trato de Simmons, medio HIO (movilidad, indol y ornitina),

caldo Vogues Proskauer-Rojo de metilo, caldo urea-sacaro-sa; se incubaron durante 24 horas a 37°C y aquellas cepas identificadas como E. coli se serotipificaron en base a -- sus antígenos somáticos y de envoltura; estas cepas de -- E. coli se resembraron en una gelosa especial (ver anexo) -- para conservarlas en refrigeración por un periodo de 6 me -- ses, y para una conservación de mayor tiempo se utilizó -- caldo glicerol donde las cepas conservan sus característi -- cas durante 1 - 2 años a -70°C.

b) Obtención de las exotoxinas de E. coli :

La obtención de exotoxinas de E. coli se hizo por el método descrito por Clements y Finkelstein(7), este se ba -- sa en que las cepas de E. coli desarrollen en matraces con -- teniendo un medio líquido de casaaminocidos, que es pro -- picio para la liberación de las toxinas. Una vez inocula -- dos los matraces con las cepas de E. coli conservadas en -- el medio de gelosa especial, se incubaron en un baño meta -- bólico a 37°C durante 18 horas con agitación constante a 1,500 rpm.

Al cabo de las 18 horas se pasó el contenido de los matraces a tubos y se centrifugó a 8,000 rpm por 30 min -- a 4°C. El sobrenadante así obtenido se guardó en viales de plástico limpios y etiquetados con número de cepa y fe -- cha. Se recomienda si es posible, procesarlos enseguida para la identificación de las toxinas lábil y estable en dicho sobrenadante, pero de no ser así, deben conservarse en refrigeración hasta el momento de identificar dichas -- toxinas.

c) Métodos empleados para la detección de la toxina

Lábil (LT) de E.coli:

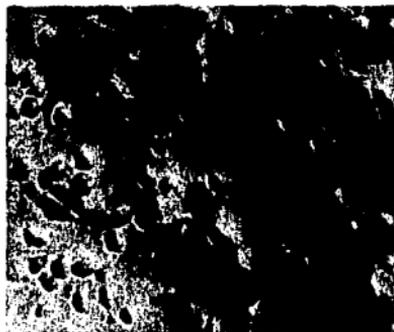
Los métodos empleados en este trabajo para la identificación de la toxina lábil de E.coli fueron: asa ligada en conejo, ensayo celular en células de ovario de hamster chino y ensayo inmunoenzimático ELISA-gangliósido GM₁. A continuación se describirá cada uno de ellos.

Ensayo de asa ligada en conejo:

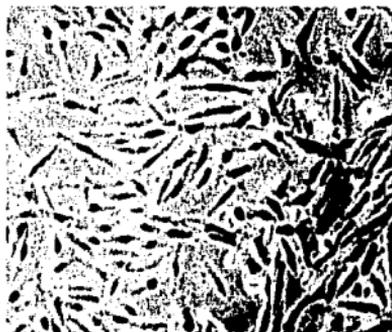
Este ensayo se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Evans-Pierce (12). Se emplearon conejos adultos jóvenes de raza Nueva Zelanda de 1Kg a 1.5 Kg de peso. - Los animales se mantuvieron en ayunas por 24 horas antes de su uso. Bajo anestesia local, el intestino delgado se ligó en segmentos (o asas) de aproximadamente 4 a 5 cm de largo. Cada segmento se inyectó intraluminalmente con 1 ml de sobrenadante obtenido de las cepas de E.coli. Se incluyó en cada conejo un control positivo y un control negativo, siendo el control positivo una cepa de referencia, E.coli H-10407 productora de toxinas y como control negativo solución salina amortiguada de fosfatos y medio líquido de casaaminocidos estéril; después de la inyección de las asas de intestino, se cerró el abdomen y los animales se sacrificaron a las 18 horas de la inoculación por inyección intravenosa de pentobarbital 0.063 g/ml. El abdomen se abrió y se extirpó el intestino delgado observándolo. Se consideraron positivas aquellas asas que mostraron un acúmulo de líquido (agua y electrolitos), y como negativas aquellas asas que no mostraron dicho acúmulo de líquido. Los resultados se consideraron válidos solamente cuando los controles positivo y negativo dieron las respuestas apropiadas. Fig. 1.



Fig. I Asa Ligada en conejo.



A.-



B.-

Fig. II Células de Ovario de Hamster Chino.

A.- Control Negativo

B.- Control Positivo

Ensayo Celular en células de ovario de hamster chino (células CHO):

Los sobrenadantes de las cepas de E. coli se probaron por este método siguiendo la técnica de Guerrant, Brunton y Schnaitman (22). Las células CHO desarrollaron de manera uniforme en frascos de cultivo celular en medio F-12 (HAM) con suero fetal bovino al 10%. Se tripsinizaron y se resuspendieron en 2 ml de medio mínimo esencial Eagle con suero fetal bovino al 1%. Se incubaron por 30 min. a 37°C. En cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 200 μ l de esta suspensión y se incubó la placa por 20 min. a 37°C (quedando -- aproximadamente 3,000 células por pozo), después de lo -- cual se agregaron 20 μ l de cada sobrenadante por probar, -- así como de los controles incluidos en el ensayo de asa -- ligada en conejo. Se incubó la placa durante 18 horas a 37°C con 5% de CO₂. Los resultados de esta prueba se leyeron al microscopio invertido y se interpretaron en base a un cambio morfológico en dichas células, las cuales en presencia de toxina lábil LT de E. coli sufren una elongación, debido a la alteración de AMP-cíclico celular. En -- caso negativo, las células sufren un arredondamiento. Los resultados se consideraron válidos solamente cuando los -- controles positivo y negativo dieron los cambios morfológicos correspondientes. Fig. II.

Ensayo inmunoenzimático ELISA-gangliósido GM₁:

La técnica de ELISA utilizada en este trabajo, se ba -- sa en la unión de la toxina lábil LT de E. coli a su recep -- tor específico el gangliósido GM₁.

La realización de esta técnica requiere la preparación de los siguientes reactivos .

1) Suero antitoxina lábil LT.-

Para la obtención del suero antitoxina lábil LT de E.coli, se realizó primero una purificación parcial de la toxina lábil LT de la cepa de E.coli H-10407 productora de toxinas.

El método de purificación y aislamiento de la toxina lábil se hizo conforme a lo descrito por Clements' y --- Finkelstein (7), la metodología fue la siguiente.

Se cultivó la cepa de E.coli H-10407 en medio de casaaminocidos agar.

Se inocularon los matraces conteniendo medio líquido de casaaminocidos, con un cultivo de 24 horas de la cepa de E.coli H-10407. Se incubó a 37°C durante 18 horas y posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm durante 60 min. a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en agua estéril y se dejó reposar 30 min. aproximadamente en baño de hielo.

Las bacterias se destruyeron por sonicación aproximadamente 10-15 min (30 seg de sonicación con 30 seg de reposo) a 1,500 decibeles.

El volumen obtenido se diluyó al doble con solución amortiguadora TEAN 0.5 M y se centrifugó a 16,000 rpm durante 20 min a 4°C; el precipitado resultante se resuspendió en solución amortiguadora TEAN 0.5 M, se dializó -

contra solución amortiguadora TEAN 0.5 M y se concentró el dializado con membrana de Amicon PM-10.

Después de la concentración se montó una columna de agarosa A-0.5M, se equilibró con solución amortiguadora - TEAN 0.5M a 4°C, hasta obtener una lectura de cero a --- 280 nm.

La toxina lábil se eluyó con una solución de D(+)-galactosa en TEAN. Se recogieron las fracciones de 5 ml en un colector de fracciones y los picos se recolectaron.

El material eluido por la galactosa se concentró por ultrafiltración con una membrana de Amicon PM-10, al concentrado obtenido conteniendo la toxina lábil se le determinaron proteínas, encontrándose una concentración de 9.6 mg/ml. Este concentrado fue el utilizado para la obtención del suero antitoxina lábil LT.

El esquema de inmunización fue el siguiente :

Se inoculó 1 ml de la toxina lábil cruda con una --- concentración aproximada de 1 mg de proteína por ml, se realizaron 5 inoculaciones, las tres primeras con intervalos de 1 semana por las siguientes vías de administración: subcutánea, intramuscular y subcutánea respectivamente, - con adyuvante completo de Freund. El cuarto y quinto re--- fuerzo fueron por vía intraperitoneal con intervalos de - 1 mes. Después de 1 mes del último refuerzo se sangró a blanco, antes de esto se hizo una sangría de prueba a la semana de la última inoculación, determinando el título - de anticuerpos por la técnica de Ouchterlony. El título de anticuerpos fue de 1:4, así que se decidió dar un últi--- mo refuerzo y esperar tres semanas más, haciendo sangrías cada semana. El título obtenido aún después de este tiempo

continuo siendo de 1:4.

2) Conjugado.-

El conjugado utilizado en la técnica de ELISA-gan---glisido GM_1 , se elaboró por la técnica de dos pasos del glutaraldehído. La enzima empleada fue la fosfatasa alcalina obtenida de intestino de bovino (Lab. Sigma), --- gammaglobulinas de conejo preparadas en cabra (Lab. Dako) y con el glutaraldehído como agente acoplante; todos adquiridos comercialmente.

i) Separación de las gammaglobulinas de conejo del suero de cabra:

La separación se efectuó por el método de precipitación con sulfato de amonio, que se realizó de la siguiente manera: como el suero de cabra era de fuente comercial, - fue necesario eliminarle el conservador, por lo que se -- dializó toda la noche en solución salina amortiguada de - fosfatos pH 7.4 sin azida de sodio, con varios cambios de la solución.

Se precipitaron las gammaglobulinas del suero de cabra con solución saturada de sulfato de amonio, se midió el volumen del suero y se agregó lentamente el mismo volumen de la solución saturada de sulfato de amonio con agitación suave a 4°C , obteniéndose una saturación final del 50%. Se realizó una segunda precipitación al 33% con solución de sulfato de amonio saturada, con el objeto de -- eliminar la albúmina, principal contaminante de las gamma globulinas, aunque no en forma total, de la siguiente manera : el precipitado resultante de la saturación al 50%

se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución salina al 0.85% pH 7.4, al doble del volumen inicial. Una vez resuspendido se agregó un volumen de solución de sulfato de amonio saturada igual al volumen inicial del suero. Esta segunda precipitación se hace lentamente por espacio de 30 min a una temperatura de 4°C.

El precipitado resultante se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un volumen igual al inicial del suero, con solución salina al 0.85% pH 7.4 y dializándose el tiempo necesario para eliminar todo el sulfato de amonio comprobándose mediante la siguiente reacción :



A las gammaglobulinas dializadas se les determinó la cantidad total de proteínas por el método de Biuret, encontrándose una concentración de 28 mg/ml, conservándose en refrigeración.

ii) Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina :

10 mg de fosfatasa alcalina comercial se reconstituyeron con 2 ml de solución salina isotónica pH 6.8 y se centrifugaron a 5,000 rpm por 20 min a 4°C, se tomaron 5 ul para la determinación de la actividad enzimática, los cuales se disolvieron en 1 ml de solución salina isotónica pH 6.8 obteniéndose una dilución 1/200 y a partir

de ésta se hacen diluciones seriadas hasta una dilución - 1/51,200.

A 100 ml de solución amortiguadora de Tris base -- 0.01 M pH 8.0, se le agregaron 5 mg de sustrato p-nitro-- fenilfosfato, tomándose alcuotas de 1 ml a las que se -- adición 200 μ l de cada una de las diluciones de la enzi-- ma (1/200.....1/51,200).

Se dejaron incubar por 10 min a temperatura ambiente para que la enzima hidrolizara al sustrato, se detuvo la reacción enzimática con NaOH 3M. El color obtenido en el producto final se leyó a una longitud de onda de 410 nm. Las lecturas obtenidas se encuentran graficadas en la -- fig. III.

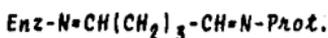
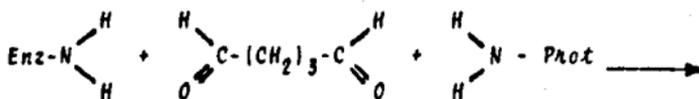
iii) Preparación del conjugado :

El conjugado se preparó usando la técnica de dos pa-- sos del glutaraldehído, mediante el procedimiento si---- guiente. Una vez valorada la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, ésta se dializó con solución salina toda la noche efectuando varios cambios. A 10 mg de la enzima dializada, se le adiciónó el agente acoplante que en este caso fue el glutaraldehído al 25% a una propor--- ción del 0.2% por ml de enzima empleada, ya que en nues-- tro caso fueron 2 ml de enzima (10 mg) el volumen de -- glutaraldehído que se debió adicionar fue de 16 μ l pero -- como se recomienda usar un pequeño exceso el volumen fi-- nal fue de 20 μ l por 2 ml de enzima (10 mg/2 ml), de esta manera la enzima fue activada por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente, agitándose suavemente por espacios de 15 min.

Al cabo de las 2 horas, la enzima activada por el glutaraldehído se puso a reaccionar con las gammaglobulinas de conejo. La relación que guardaron las proteínas de las gammaglobulinas con respecto a la enzima fue en una proporción de 1 mg de proteína por 3 mg de enzima. La cantidad de fosfatasa alcalina usada fue de 10 mg y la concentración de proteínas de la gammaglobulinas de conejo fue de 28 mg/ml, por lo que se hicieron las siguientes relaciones :

$$\begin{array}{rcl}
 3.0 \text{ mg de enzima} & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ mg de proteína} \\
 10 \text{ mg de enzima} & \underline{\hspace{2cm}} & X \\
 X = 3.3 \text{ mg de proteína} \\
 28 \text{ mg de proteína} & \underline{\hspace{2cm}} & 1000 \text{ ul} \\
 3.3 \text{ mg de proteína} & \underline{\hspace{2cm}} & X \\
 X = 117.8 \text{ ul de proteína para conjugar con } 10 \text{ mg de} \\
 & & \text{enzima.}
 \end{array}$$

Se agregaron los 117.8 ul de gammaglobulinas de conejo a la enzima activada con el glutaraldehído, dejándose reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave cada 15 min, posteriormente se dializó con solución amortiguadora Tris base 0.05 M pH 8.0 toda la noche con varios cambios y al dializado se le adicionó un volumen igual de solución amortiguadora Tris base 0.05 M pH 8.0 al 1% de albúmina sérica bovina libre de gammaglobulinas con el objeto de neutralizar los sitios activos que no hayan reaccionado.



Una de las ventajas de los conjugados obtenidos por la técnica descrita es su alto porcentaje de homogeneidad.

iiii) Potencia del conjugado:

La potencia del conjugado se prueba sensibilizando - una placa de microtitulación con gammaglobulinas normales de conejo, a una concentración de 100 ng/ml en solución - amortiguadora de carbonato-bicarbonato. Se adicionó un volumen de 200 μ l de la solución anterior por pozo, se selló la placa y se incubó 18 horas a 37°C en atmósfera húmeda.

Después de este tiempo, se lavó la placa tres veces - con PBS-Tween y se adicionó el conjugado en diluciones seriadas desde 1/200 a 1/20,000 en un volumen de 200 μ l por pozo, se selló la placa y se incubó 3 horas a 37°C.

Después de este tiempo, se lavó la placa tres veces con PBS-Tween y se adicionaron 200 μ l de p-nitrofenilfosfato por pozo para revelar el sistema, se incubó por --- 30 min a 37°C. Al finalizar este tiempo se detiene la --- reacción con 50 μ l de NaOH 3 M y se lee al espectrofotómetro al 410 nm. Las lecturas obtenidas se graficaron, considerando como la dilución óptima del conjugado aquella - que dio una lectura de 1.5 de absorbancia, por lo que se concluyó que la dilución 1/1000 era la más adecuada como se puede observar en la fig. IV.

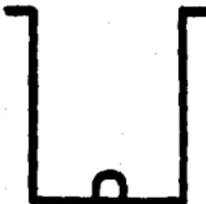
iiii) Determinación de las concentraciones óptimas para llevar a cabo el ensayo inmunoenzimático ELISA --- gangliósido GM₁:

Para llevar a cabo la técnica de ELISA-gangliósido -

GM, este trabajo se basó en lo reportado por la técnica de Svennerholm y Holmgreen (37), cuyo fundamento es el método sandwich del doble anticuerpo el cual consta de los siguientes pasos:

- Adsorción a la fase sólida de la inmunoglobulina conteniendo el anticuerpo específico o un receptor específico del antígeno buscado, incubándose y prosiguiendo un lavado para eliminar el exceso de material no adherido.
- Se adiciona la solución problema conteniendo el antígeno a la fase sólida sensibilizada, se incuba y se lava.
- Se adiciona el anticuerpo específico marcado con la enzima a la fase sólida, se incuba y se lava.
- Se adiciona el sustrato de la enzima. El cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno de la solución problema.

La representación esquemática de la técnica realizada en este trabajo es la siguiente:



- a.- Adsorción a la fase sólida del GM, en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato. Incubando 18 hrs. a 37°C en atmósfera húmeda.

L a v a r

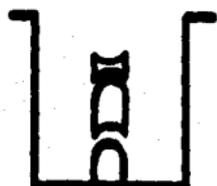
Bloqueo de los sitios activos con solución amortiguadora de glicina HCl pH 2.7. Incubando 1 hr a 37°C.

L a v a r



- b.- Se agregan los sobrenadantes en los que se buscan las toxinas, incubando 1 hr a 37°C.

L a v a r



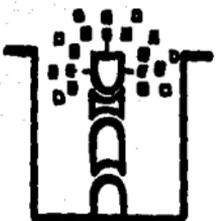
- c.- Se agrega el suero anti-LT producido en conejo, incubando 1 hr a 37°C.

L a v a r



- d.- Se agrega el conjugado gammaglobulinas de conejo marcadas con fosfatasa alcalina, incubando 1 hr a 37°C.

L a v a r



- e.- Se agrega el p-nitrofenilfosfato en una concentración de 1 mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina pH 9.6, incubando 30 min a 37°C. Leer al espectrofotómetro.

Cantidad de hidrólisis = Cantidad de antígeno presente.

El primer paso después de haber determinado la concentración óptima del conjugado, fue determinar la concentración óptima del suero anti-LT, basándonos en -- técnicas ya establecidas donde la cantidad óptima del gangliósido GM₁ utilizada es de 5 ug, se procedió a -- realizar la técnica siguiendo los pasos del ELISA-gangliósido GM₁ antes descrito probándose diferentes diluciones del suero anti-LT y con la dilución del conjugado 1/1000, dando los resultados mostrados en la - fig V, determinándose que la dilución 1:400 del suero anti-LT era la más adecuada.

El siguiente paso a seguir fue determinar la --- concentración óptima del agente sensibilizante, el -- gangliósido GM₁, sensibilizando la placa a diferentes cantidades de éste y manteniendo los demás parámetros constantes (dilución del suero anti-LT y dilución -- del conjugado) se procedió a realizar la técnica de ELISA-GM₁, dando los resultados mostrados en la fig - VI. Notándose la poca diferencia que existe al usar las tres diferentes concentraciones, se decidió utilizar la concentración de 1 ug/ml de gangliósido GM₁.

En cada uno de los parámetros determinados se -- utilizó como control positivo, sobrenadante de cultivo de la cepa de E. coli H-10407 productora de toxinas y como control negativo medio líquido de casaaminocidos. Se hicieron diluciones de éstos, observándose -- que en el caso del sobrenadante positivo sin diluir, - diluido 1:2 y diluido 1:4, era donde se detectaba la presencia de toxina lábil, por lo que se decidió utilizar estas mismas diluciones en las muestras a procesar. El bloqueo de los sitios activos se realizó con solución amortiguadora de glicina-HCl pH 2.4.

FIG. III.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFATASA ALCALINA.

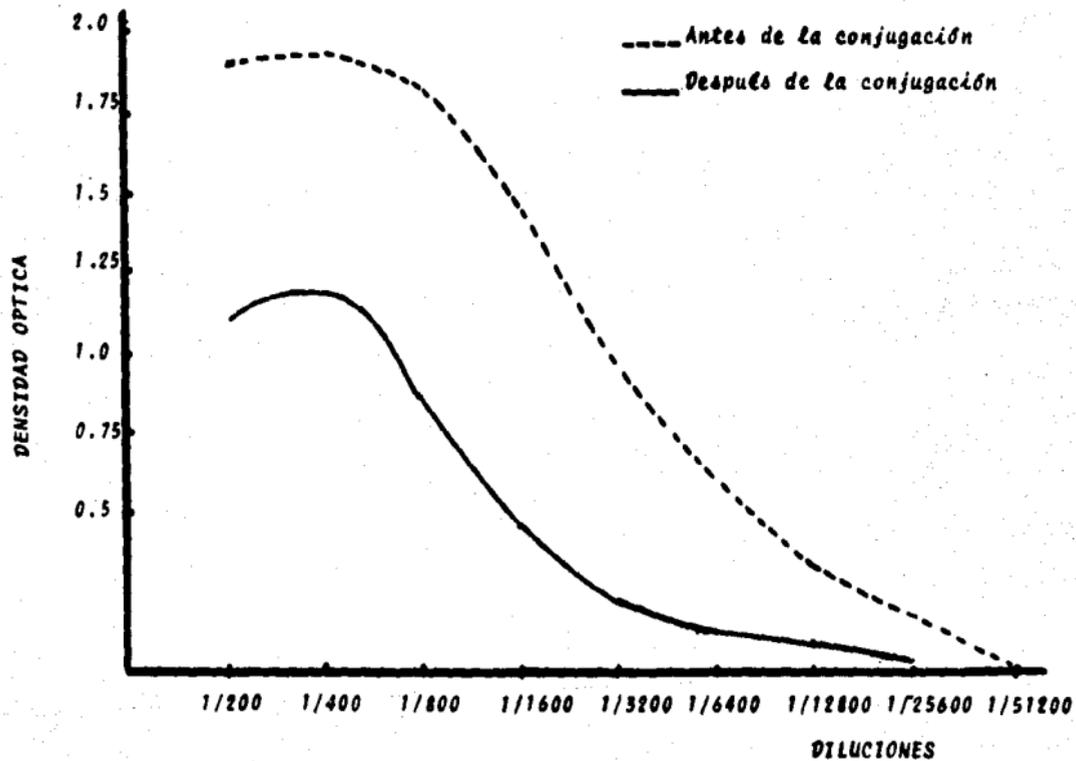


FIG. IV.- DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DEL CONJUGADO.

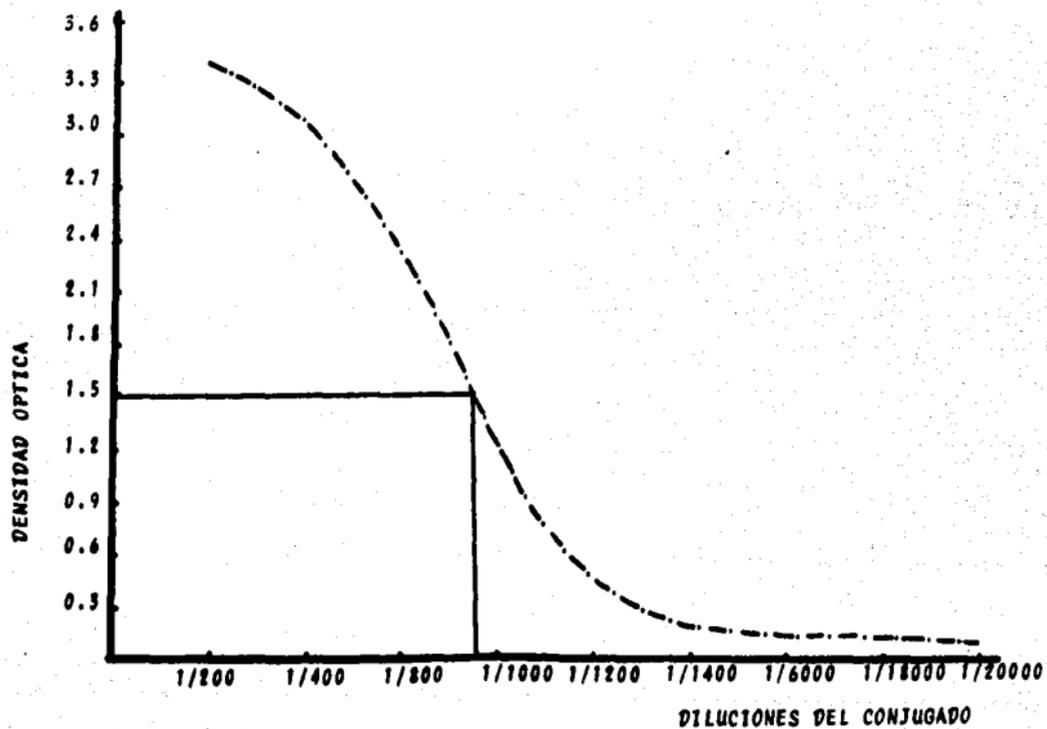


FIG. V.- DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DEL SUERO ANTI-LT.

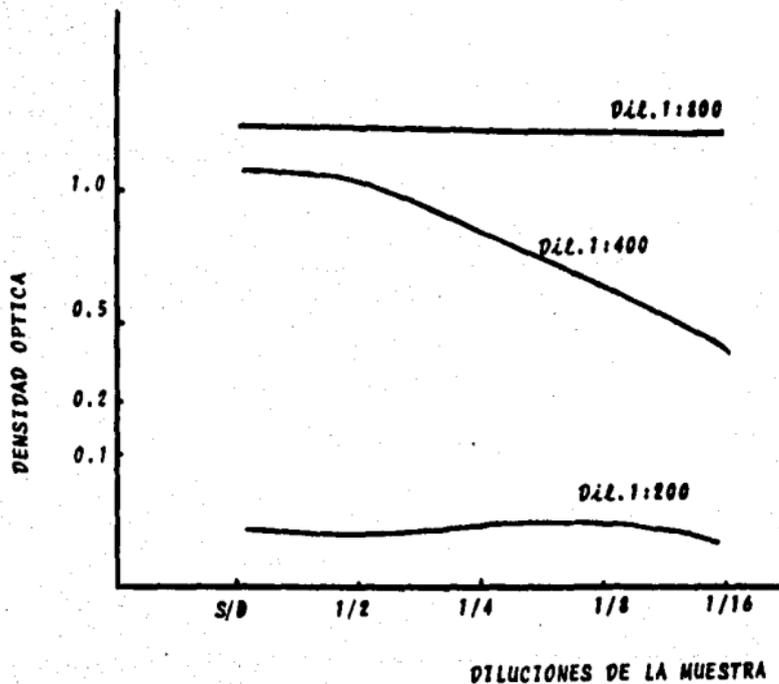
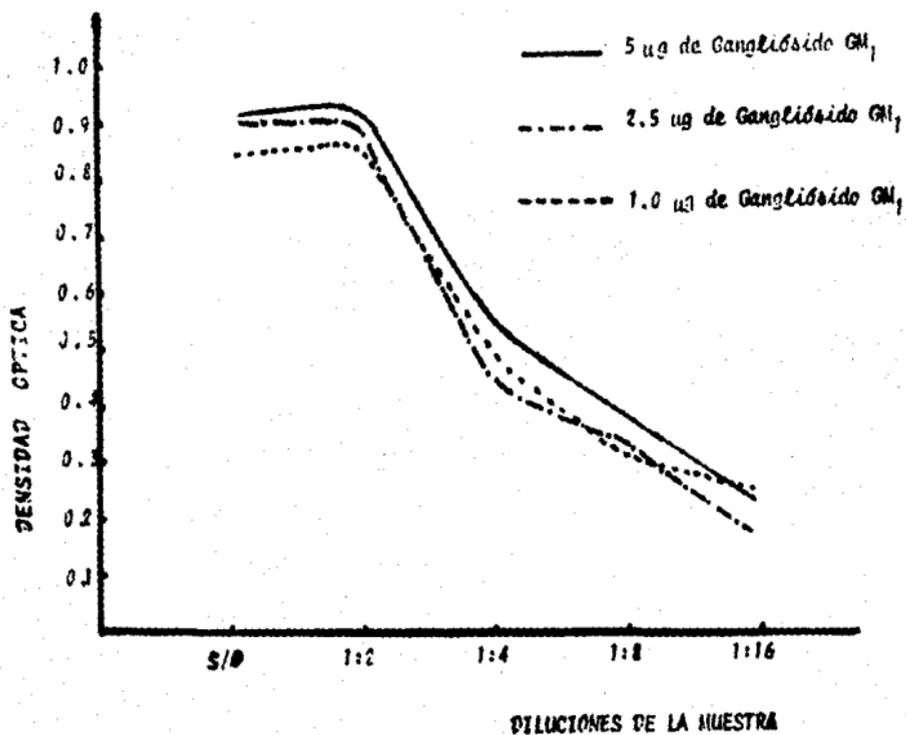


FIG. VI.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL GANGLIOSIDO-GH₁



RESULTADOS:

De un total de 94 muestras de heces diarreicas procesadas, se aislaron 300 cepas de E. coli, el 23.4% correspondió a E. coli enterotoxigénica, de las cuales el 2.12% fueron productoras de ambas toxinas lábil LT y estable --ST, el 6.38% correspondió a cepas productoras únicamente de toxina lábil y el 14.89% a productoras únicamente de toxina estable ST.

Las 300 cepas de E. coli se estudiaron por los tres métodos utilizados en este trabajo para la detección de la toxina lábil de E. coli: asa ligada en conejo, ensayo en células de ovario de hamster chino y ensayo inmunoenzimático ELISA-GM₁.

Los resultados encontrados por cada uno de los métodos fue el siguiente. De las 300 cepas de E. coli, 19 resultaron positivas por el método de asa ligada en conejo representando el 6.33%, 18 cepas fueron positivas por el método de ensayo celular que representa el 6% y 24 cepas fueron positivas por el método de ELISA-GM₁, que corresponden de al 8%. Fig VII.

Con los resultados obtenidos se procedió a calcular la especificidad y sensibilidad del método de ELISA-GM₁, en relación a los métodos de asa ligada en conejo y ensayo celular por el método Kramer.

A) ELISA-gangliósido GM₁ con respecto a asa ligada en conejo.

a.- Número de cepas positivas por ambos métodos.

- b.- Número de cepas negativas por ELISA-GM, y positivas - por asa ligada.
- c.- Número de cepas positivas por ELISA-GM, y negativas - por asa ligada.
- d.- Número de cepas negativas por ambos métodos.

E.L.I.S.A.- gangliósido

		(+)	(-)
A s a l i g a d a	(+)	7 (a)	11 (b)
	(-)	16 (c)	266 (d)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = 30.43\%$$

$$\text{Especificidad} = 96.02\%$$

- B) ELISA-gangliósido GM, con respecto a ensayo celular -
- a.- Número de cepas positivas por ambos métodos.
- b.- Número de cepas negativas por ELISA-GM, y positivas por ensayo celular.
- c.- Número de cepas positivas por ELISA-GM, y negativas por ensayo celular.
- d.- Número de cepas negativas por ambos métodos.

E.L.I.S.A.-gangliósido

		(+)	(-)
E n s a y o C e l u l a r	(+)	9 (a)	9 (b)
	(-)	14 (c)	268 (d)

$$\text{Sensibilidad} = 39.13\%$$

$$\text{Especificidad} = 96.75\%$$

Con los datos anteriores se procedió a obtener la -- sensibilidad y especificidad de los métodos de asa ligada en conejo y ensayo celular.

A) Asa ligada en conejo con respecto a ensayo celular.

- a. - Número de cepas positivas por ambos métodos.
- b. - Número de cepas negativas por asa ligada y positivas por ensayo celular.
- c. - Número de cepas positivas por asa ligada en conejo y negativas por ensayo celular.
- d. - Número de cepas negativas por ambos métodos.

E
n
s
a
y
o

C
e
l
u
l
a
r

	(+)	(-)
(+)	16 (a)	2 (b)
(-)	3 (c)	279 (d)

Sensibilidad = 84.21%

Especificidad = 99.28%

B) Ensayo celular con respecto a asa ligada.

- a. - Número de cepas positivas por ambos métodos.
- b. - Número de cepas negativas por ensayo celular y positivas por asa ligada.
- c. - Número de cepas positivas por ensayo celular y negativas por asa ligada.
- d. - Número de cepas negativas por ambos métodos.

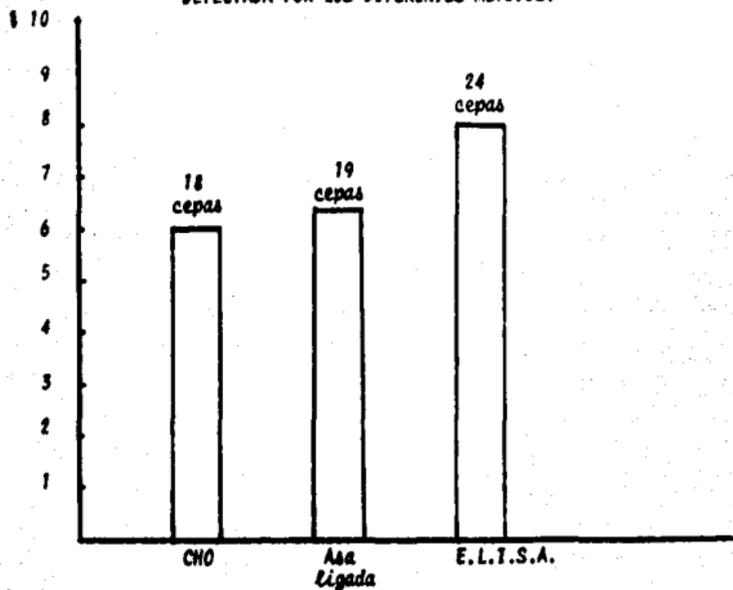
Ensayo Celular

		(+)	(-)
A d a	(+)	16 (a)	3 (b)
	(-)	2 (c)	279 (d)

Sensibilidad = 88 %

Especificidad = 98 %

FIG. VII.- GRAFICA DE PORCENTAJES DE LAS CEPAS DE E.coli PRODUCTORAS DE LT
DETECTADA POR LOS DIFERENTES METODOS.



DISCUSIÓN Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS :

El porcentaje de cepas productoras de toxinas reportado en este estudio 23.4%, es un poco bajo con respecto a lo que señalan otros autores: Wadstrom (1976) en Etiopla aisló un 38%, Evans (1977) en México aisló un 33%, -- Bäck (1980) en Etiopla reportó un 67%, estas diferencias se deben principalmente al número de cepas estudiadas, ya que en nuestro caso son pocas, en comparación con los números estudiados por los autores mencionados.

Otro dato importante que cabe hacer notar, es que el mayor número de cepas de E.coli enterotoxigénica correspondió a las productoras de toxina estable ST, hecho que coincide con un estudio reportado por Evans en 1977 en la ciudad de México (15) quien encontró un 58.7%. Es de hacerse notar la diferencia de lo reportado en otros países, como Etiopla en 1976 y 1980, en los que el mayor porcentaje de cepas de E.coli enterotoxigénica correspondió a las productoras de toxina lábil LT en un 38% y 93% respectivamente.

En los resultados obtenidos por cada uno de los métodos, se encuentran estrechamente relacionados los porcentajes de positividad para el método de asa ligada en conejo y en ensayo celular, a los que corresponde el 6.33% y 6% respectivamente, no ocurriendo lo mismo para el método de ELISA-GM, al que corresponde el 8%.

Con respecto a los resultados obtenidos con el método de ELISA-GM, y comparándolos con los del asa ligada en conejo, tenemos una sensibilidad del 30.43% y una especificidad del 96.02%. Igualmente, comparando los resultados obtenidos en el método de ELISA-GM, con respecto a el ensayo celular, encontramos una sensibilidad del 39.13% y una especificidad del 96.75%.

Ahora bien, con respecto a los resultados obtenidos en el ensayo celular y comparándolos con los del asa ligada en conejo tenemos una sensibilidad del 84.21% y una especificidad del 99.28%. Igualmente, comparando los resultados obtenidos en el asa ligada en conejo con respecto a los del ensayo celular, tenemos una sensibilidad del 88% y una especificidad del 98%.

Con los datos anteriores se puede señalar que el método de ELISA-GM, con respecto a los métodos de comparación, resultó ser menos específico variando en un 2-3%, y poco sensible.

La baja sensibilidad obtenida para el método de ELISA-GM, pudo haberse debido a la impureza del antígeno que se utilizó para la obtención del suero antitoxina lábil, ya que se utilizó la toxina cruda de la cepa de E. coli H-10407, ocasionando que los anticuerpos producidos tuvieran una baja sensibilidad hacia la toxina, hecho que se demostró en el bajo título obtenido en nuestro suero antitoxina lábil, que quizá no fue lo suficientemente eficaz para detectar pequeñas cantidades de toxina lábil en los sobrenadantes de cultivos de E. coli, con lo que nos pueden dar reacciones falsas negativas.

En cuanto a especificidad, las reacciones falsas positivas obtenidas, probablemente se debieron a que puedan existir en algunas cepas, componentes bacterianos o productos metabólicos que se unan inespecíficamente al gángliósido GM₁ y sean reconocidos por el suero antitoxina lábil. Ahora bien, no se puede descartar la posibilidad de que esas falsas positivas que supuestamente tenemos por el método de ELISA-GM₁, sean realmente positivas y que los otros métodos no las estén detectando debido a que la toxina se encuentre en forma inactiva.

Al realizar los métodos de asa ligada en conejo y ensayo celular, comparando los resultados, se obtuvo una alta sensibilidad y especificidad en ambos casos, lo que coincide por lo reportado por otros autores.

CONCLUSIONES:

- De 300 cepas de E. coli aisladas a partir de 94 muestras de heces diarreicas procesadas, el 23.4% correspondió a E. coli enterotoxigénica, de las cuales el 2.12% fueron cepas productoras de ambas toxinas labil LT y estable ST, el 6.38% correspondió a cepas productoras únicamente de toxina labil LT y el 14.89% a productoras únicamente de toxina estable ST.

- Es importante diferenciar entre una cepa de E. coli productora de toxina labil LT y una de toxina estable ST, puesto que el método desarrollado se enfoca a la identificación de la primera.

- Se desarrolló el método de ELISA-GM₁, descrito por algunos autores como rápido, específico, sensible y de fácil realización, para compararlo con los métodos de asagligada en conejo y ensayo celular. De acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo, el método ELISA-GM₁, resultó ser menos específico y poco sensible con respecto a los métodos comparados, contrastando con lo obtenido por diferentes autores que lo recomiendan ampliamente.

- La obtención de un suero antitoxina labil sin la purificación adecuada del antígeno tiene como desventajas:

- Pérdida en la sensibilidad ya que da lugar a falsas reacciones.
- Presentar reacciones inespecíficas por la presencia de otros productos.

- Con la técnica empleada para el desarrollo del método ELISA-GH, en este trabajo, los resultados obtenidos no fueron los esperados debido tal vez a lo mencionado en el párrafo anterior, por lo cual es de considerarse la modificación de algunos de los pasos de la técnica.

- Debido al alto índice de mortalidad en niños menores de 2 años ocasionado por las cepas de E. coli enterotoxigénica, dentro de las que se encuentran cepas productoras de toxina lábil, deriva la importancia de seguir investigando para encontrar un método que nos permita realizar la identificación con el máximo de confiabilidad, especificidad y rapidez.

A N E X O :

- Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6:

Carbonato de sodio.....	1.59 g
Bicarbonato de sodio.....	2.93 g
Azida de sodio.....	0.2 g
Agua destilada.....	500 ml.

- Solución amortiguadora de dietanolamina pH 9.8 :

Dietanolamina.....	97 ml
Azida de sodio.....	0.2 g
Cloruro de magnesio...6H ₂ O....	0.1 g
Agua destilada.....	800 ml
Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1 M, agitar a un litro y guardar a 4°C.	

- Solución TEAN 0.5 M (Trizma base, EDTA, azida de sodio y cloruro de sodio) :

Trizma base.....	6.05 g
EDTA.....	0.336 g
Azida de sodio.....	0.195 g
Cloruro de sodio.....	11.68 g
Agua destilada.....	1000 ml

- Solución de Tris (hidroximetil aminometano)-HCl 0.01 M pH 8.0 :

Tris-HCl.....	31.6 g
Cloruro de sodio.....	116.8 g
Agua destilada.....	2 lts.
Ajustar a pH 8.0.	

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Solución salina amortiguada de fosfatos pH 7.4 0.5M:
Fosfato de sodio monobásico..... 4.9693 g
Fosfato de sodio dibásico..... 1.9535 g
Azida de sodio..... 0.2 g
Agua destilada..... 1 lt.
- Solución de fosfatos salina amortiguada Tween pH 7.4:
Cloruro de sodio..... 16 g
Fosfato de sodio monobásico..... 5.8 g
Fosfato de sodio dibásico..... 0.4 g
Cloruro de potasio..... 0.4 g
Azida de sodio..... 0.4 g
Tween 20..... 1 ml
Agua destilada..... 2 lts.
- Solución amortiguadora de glicina-HCl pH 2.7.
Solución stock A: disolver 15.01 g de glicina en 1,000 ml de agua destilada, haciendo una solución 0.2 M.
Solución stock B: preparar HCl 0.2 M.
Mezclar 50 ml de la solución A con 23 ml de la solución B y llevar a un volumen final de 200 ml, para obtener el pH de 2.7.

Medios de cultivo y de conservación :

- Caldo glicerol:
Infusión cerebro corazón..... 3.7 g
Glicerol..... 15 g
Agua destilada..... 100 ml
- Gelosa especial:
Peptona..... 0.25 g

Base agar sangre.....	2 %
Extracto de carne.....	0.3 %
Agar.....	1.5 %
Agua destilada.....	100 ml.

- Medio liquido de Casaminocidos :

Casaminocidos.....	20 g
Extracto de levadura.....	1.5 g
Cloruro de sodio.....	2.5 g
Fosfato de sodio monobásico.....	8.7 g
Sulfato de magnesio.....	0.05g
Cloruro de manganeso.....	0.05g
Cloruro férrico.....	0.005g
Agua destilada.....	1 lt.

- Medio de Casaminocidos agar :

Casaminocidos.....	10 g
Extracto de levadura.....	1.5 g
Cloruro de manganeso.....	.005g
Sulfato de magnesio.....	.05 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Avrameas, S., T. Ternynck and J.L. Guesdon. 1978. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol. Vol. 8:7-23.*
- 2.- Bäck E., R. Möllby and B. Kaijser. 1980. Relative importance, seasonal variation, O- and K- antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*: a three- and - half year review in Sweden. *J. Infect. Vol. 2:303-315.*
- 3.- Bäck E., R. Möllby, B. Kaijser, G. Stintzing, T. - Wadström and D. Habte. 1980. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria of -- infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor, and loss of enterotoxigenicity. *J. Infect. Dis. Vol 142:318-327.*
- 4.- Bernheimer A.W., J. Wiley. 1976. Progress in the -- study of cholera and related enterotoxins. Academic. Press, New York, 1976, p.54-86.
- 5.- Carpenter C. 1978. "Clinical concepts of infections -- diseases": Eluff L.G. and Jhonson J.E. Pags. 285-295. Ed. Wilkins and Wilkind, Baltimore.
- 6.- Carpenter C.J. 1980. Mechanisms of Bacterial Diarrheas. *J. Am. Med. Vol. 68:313-316.*
- 7.- Clements J.D., and R.A. Finkelstein. 1979. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from Escherichia coli cultures. *Vol 24:760-769.*
- 8.- Dallas S.W. and Stanley Falkow. 1979. The molecular nature of heat labile enterotoxin (LT) of Escherichia coli. *Nat. Vol. 277:406-407.*

- 9.- Doner F., Jaksche and Stöckl. 1976. Escherichia coli enterotoxin: purification, partial characterization, and immunological observations. J. Infect. Dis. Vol. 133:142-156.
- 10.- Du Pont L.H., B. Formal, B. Hornick. 1971. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. N. Engl. J. Med. Vol. 285: 1-9.
- 11.- Erwin N: 1975. Enteropathogenicity of Escherichia coli. J. Am. Dis. Child. Vol. 129:865-870.
- 12.- Evans G.D., J. Evans Jr. and L. DuPont. 1977. Virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. Vol. 136:118-122.
- 13.- Evans G.D., J. Evans and F. Pierce. 1973. Differences in the response of babbit small intestinal to heat labile and heat stable enterotoxins of Escherichia coli. Infect. Immun. Vol. 7:873-880.
- 14.- Evans G.D., J. Evans Jr. and L. Gorbach. 1973. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli -- and serum antitoxin activity by de vascular permeability factor assay. Infect. Immun. Vol. 8:731-735.
- 15.- Evans G.D., Olarte, L. DuPont, J. Evans Jr., Galindo, L. Portnoy and H. Conklin. 1977. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in México City. J. Pediatr. Vol. 91:65-68.
- 16.- Evans J.D. Jr. and G. Dolores. 1977. Inhibition of -- immune hemolysis: serological assay for heat labile -- enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. Vol. 5:100-105.
- 17.- Evans J. D. Jr., G.Evans and L. Gorbach. 1975. Cholerae like enterotoxin produced by Escherichia coli. Symposium on Toxins. J. Jap. Med. Sci. Biol. Vol.28: 53-100.

- 18.- Evans J.D. Jr., C. Chen, T. Curlin, G. Evans. 1972. Stimulation of adenyl cyclase of Escherichia coli enterotoxin. Nat. New Biol. Vol. 236:137-139.
- 19.- Field M. 1979. Mechanisms of action of cholera -- and Escherichia coli enterotoxin. J. Am. Clin. -- Nut. Vol. 32:189-196.
- 20.- Finkelstein A., L. Vasil, R. Jones, A. Anderson - and Barnhard. 1976. Clinical cholera caused by --- enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. Vol. 3:382-384.
- 21.- Finkelstein A., M. LaRue, W. Jhonston, L. Vasil, J. Cho and R. Jones. 1976. Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from: enterotoxigenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. Vol. 133:120-136.
- 22.- Gianella R.A. 1981. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. Ann. Rev. Med. Vol. 32:341-357.
- 23.- Guerrant L.R., L. Brunton, T.C. Schnaitman, L.I. Rebhun and A.G. Gilman. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration and chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun. Vol. 10:320-327.
- 24.- Guerrant L.R., R.A. Moore, P.M. Kerchenfeld, M.A. Sande. 1975. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med. Vol. 293:567-573.
- 25.- Guesdon J.L. and S. Avrameas. 1977. Magnetic solid phase enzyme-immunoassay. Immunch. Vol. 14:443-447.

- 26.- Greenberg B.H., D.A. Sack, W. Rodriguez, R.B. Sack, R.G. Wyatt, A.R. Kalica. 1977. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. Vol. 77:731-735.
- 27.- Gurwith J.M. and T.W. Williams. 1977. Gastroenteritis in children: a two year review in Manitoba. J. Infect. Dis. Vol. 136:239-247.
- 28.- Hamilton J.R. 1980. Infections diarrhea: clinical - implications of recent-research. J. CMA. Vol. 122: 29-32.
- 29.- Hongren J. and A.M. Suennerholar. 1978. E.L.I.S.A. for the study of enterotoxic diarrheal diseases. Scand. J. Immunol. Vol. 8:111-118.
- 30.- Leinikki P. and S. Päsia. 1976. Solid phase antibody assay by means of enzyme conjugated to anti-immunoglobulin. J. Clin. Pathol. Vol. 29:1116-1120.
- 31.- Nerson H.H., R.H. Volken, R.B. Sack, J.L. Froelich, H.B. Greenberg, I. Hud and R.F. Black. 1980. Detection of Escherichia coli enterotoxin in stools. Infect. Immun. Vol. 29:108-113.
- 32.- Moss J., S. Garrison, P.H. Fishman and S.H. Richardson. 1979. Gangliosides sensitive unresponsive fibroblasts to Escherichia coli heat labile enterotoxin. J. Clin. Inv. Vol. 64:381-383.
- 33.- Rudoy C.R., J.D. Nelson. 1975. Enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli. Occurrence in acute diarrhea of infants and children. Rep. J. Am. Dis. Child. Vol. 129: 668-672.
- 34.- Sack R.B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Ann. Rev. Microbiol. Vol. 29:333-353.

- 35.- Sack R.B. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli: identification and characterization. *J. Infect. Dis.* Vol. 142:279-286.
- 36.- Sepúlveda Dr. Bernardo. 1979. Infecciones y parasitosis del aparato digestivo, grave problema de salud pública en México. IV Jornadas Médicas de Oriente, - Veracruz, Ver.
- 37.- Svennerholm A.N. and J. Holmgren. 1978. Identification of Escherichia coli heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM, E.L.I.S.A.) procedure. *Curr. Microbiol.* Vol. 1:19-23.
- 38.- Taylor G. Anthony. Toxins and genesis of specific lesions enterotoxin and exfolatin. 1975. *Microbial Toxins.* Vol. 1 Academic New York, pag.196-216.
- 39.- Voller A., D.E. Bidwell and A. Bartlett. 1976. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay in Diagnostic Medicine. *Bull. Wld. Hlth. Orga.* Vol. 53:55-65.
- 40.- Voller A., D.E. Bidwell and A. Bartlett. 1977. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.) Nuffield Institute of Comparative Medicine. The Zoological Society of London, Regent's Park, London NW1. Dynatech Laboratories.
- 41.- Voller A., D. Bidwell and A. Bartlett. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Manual de Inmunología - Clínica.* Rose and Friedman, Ed. American Society -- for Microbiology, Washington D.C. pages:359-371.
- 42.- Volken H.R. 1978. E.L.I.S.A. Enzyme-linked immunosorbent assay. National Institute of Allergy - and Infections Diseases.
- 43.- Volken H.R., H.B. Greenber, M.H. Nerson, R.B. Sack and A.Z. Kapikian. 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 6:439-444.

- 44.- Wadström T., A. Aust-Kettis, D. Habte, J. Holmgren, G. Mesumisse, R. Møllby and O. Soderlind. 1976. Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease. Arch. Dis. Child. Vol. 51: 865-870.