

73
rej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"DETECCION DE Escherichia coli PRODUCTORAS DE
TOXINAS TERMOESTABLE. PRIMERA PARTE"

T E S I S

que para obtener el Título de

B I O L O G O

Presenta:

AUGUSTO JOSE GONZALEZ CANTO

MEXICO, D.F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y METODOS	29
RESULTADOS	34
DISCUSION Y CONCLUSIONES	40
FIGURAS	43
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas constituyen el problema más importante de salud pública en el mundo (1). Dentro de este marco, las diarreas representan la primera causa de muerte en la población infantil de los países en vías de desarrollo. Uno de los factores involucrados en tal situación es el socioeconómico, que determina condiciones ambientales especiales (2). Aunque es imposible citar datos precisos de morbilidad y mortalidad mundiales por diarrea, se calcula que las diarreas de origen infeccioso son la tercera causa de morbilidad y mortalidad en el mundo y la primera causa de mortalidad infantil en países en vías de desarrollo. Se registran más de 1,000 millones de casos de diarrea por año en menores de 5 años y aproximadamente 5 millones de muertes, de las cuales el 80% ocurre en menores de 5 años. Este estimado se desprende de un estudio realizado en 1980, en el cual se señala que el grupo poblacional más afectado es el de niños menores de un año, donde ocurre un promedio de 22 muertes por cada 1,000 habitantes, mientras que en niños menores de 5 años se registra un promedio de 13.6 muertes por 1,000 habitantes (3).

Los estudios de morbilidad indican que el promedio de casos de diarreas es de 2.2 episodios por persona por año en poblaciones con muestras de más de 1,000 niños, y se eleva a tres episodios por año en poblaciones con menos de 600 niños en estudio, donde se encuentra una frecuencia de cinco episodios de diarrea por año en el grupo de lactantes de 5 a 11 meses de edad. Aunque esto pudiera sugerir la existencia de mejores medidas sanitarias en las poblaciones de acuerdo a su tamaño, en realidad este estudio no logró demostrar diferencias entre las poblacio

nes de áreas rurales, urbanas o suburbanas (3). En México se calcula que la mortalidad de la población infantil por esta causa se eleva a más de 50,000 muertes por año (4).

En 1885 el profesor Escherich de Viena, Austria, aisló de algunos niños que presentaban un cuadro de "diarrea del verano" un organismo al cual llamó Bacterium coli; sin embargo, dos años más tarde el mismo Escherich demostró que esta bacteria constituía parte de la flora normal del intestino. En 1907, Massini demostró que las cepas aisladas de pacientes con diarrea provocaban el mismo cuadro cuando se inoculaban intraintestinalmente en conejos, lo que no sucedía siempre si se inoculaban cepas aisladas de personas sanas. El papel etiológico de Escherichia coli (E. coli) se estableció claramente a fines de la década de los cuarentas, después de que en 1944 Kauffmann hiciera una clasificación serológica basada en los antígenos de lipopolisacáridos O, flagelares H y los polisacáridos K, y por medio de sueros de referencia y estudios epidemiológicos adecuados se asoció este organismo con la diarrea (5). Durante la década de los cincuentas se estableció que las cepas que habitan el intestino como comensales son distintas de aquellas responsables de brotes de diarrea en los hospitales (6). Finalmente, en la década de los sesentas se establecieron modelos animales en los que se reprodujeron los cuadros clínicos de diarrea con las cepas de E. coli aisladas de pacientes (7,8,9).

Actualmente se acepta que E. coli puede causar diarrea por tres diferentes mecanismos: adherencia o alteración o destrucción del borde en cepillo de las células del epitelio intestinal, invasión a la mucosa intestinal, y producción de toxinas. Sin embargo, de acuerdo con sus distintas propiedades de virulencia, sus diferentes interacciones con la mucosa intestinal, los distintos síndromes clínicos, las diferentes epidemiologías y sus distintos serotipos O:H, las E. coli se agrupan en cuatro categorías principales: E. coli enterohemorrágica (EHEC), E.

coli enteroinvasiva (EIEC), E. coli enteropatógena (EPEC) y E. coli enterotoxigénica (ETEC). Además, ha surgido una nueva categoría E. coli enteroadherente (EAEC).

Aunque estas distintas categorías tienen propiedades diferentes, poseen también semejanzas en cuanto a su patología, como son:

- a) Las propiedades críticas de virulencia están codificadas en plásmidos.
- b) Tienen interacciones características con la mucosa intestinal.
- c) Producen entero o citotoxinas.
- d) Cada categoría pertenece a ciertos serogrupos O:H (10,11,12,13).

Las principales propiedades de estas distintas cepas se resumen en el Cuadro I.

E. coli Enteroinvasora (EIEC)

Epidemiología

El conocimiento de la epidemiología de cepas EIEC es muy limitado por la carencia de estudios diseñados para la búsqueda de este tipo de bacterias. La primera descripción de diarrea asociada con el aislamiento de cepas EIEC fue hecha en 1947 en soldados de los Estados Unidos de Norteamérica en servicio en la zona del Mediterráneo. Posteriormente, se encontraron cepas EIEC en brotes de diarrea en varios hospitales de la Gran Bretaña, fuentes de agua en Hungría y relacionadas con ingestión de queso francés contaminado en los EUA (14). Recientemente el grupo de Trabulsi en Brasil (15), ha informado la presencia de EIEC en niños de una comunidad rural con una frecuencia aproximada del 2% durante los primeros cinco años

coli enteroinvasiva (EIEC), E. coli enteropatógena (EPEC) y E. coli enterotoxigénica (ETEC). Además, ha surgido una nueva categoría E. coli enteroadherente (EAEC).

Aunque estas distintas categorías tienen propiedades diferentes, poseen también semejanzas en cuanto a su patología, como son:

- a) Las propiedades críticas de virulencia están codificadas en plásmidos.
- b) Tienen interacciones características con la mucosa intestinal.
- c) Producen entero o citotoxinas.
- d) Cada categoría pertenece a ciertos serogrupos O:H (10,11,12,13).

Las principales propiedades de estas distintas cepas se resumen en el Cuadro I.

E. coli Enteroinvasora (EIEC)

Epidemiología

El conocimiento de la epidemiología de cepas EIEC es muy limitado por la carencia de estudios diseñados para la búsqueda de este tipo de bacterias. La primera descripción de diarrea asociada con el aislamiento de cepas EIEC fue hecha en 1947 en soldados de los Estados Unidos de Norteamérica en servicio en la zona del Mediterráneo. Posteriormente, se encontraron cepas EIEC en brotes de diarrea en varios hospitales de la Gran Bretaña, fuentes de agua en Hungría y relacionadas con ingestión de queso francés contaminado en los EUA (14). Recientemente el grupo de Trabulsi en Brasil (15), ha informado la presencia de EIEC en niños de una comunidad rural con una frecuencia aproximada del 2% durante los primeros cinco años

Cuadro 1

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE Escherichia coli

	Patogenia	Factor de adherencia	Grupos de edad afectados	Distribución geográfica	Serotipos asociados
Enteroinvasora (EIEC)	Invasión y multiplicación en las células epiteliales, dependiente de plásmido de 140 MDa		Todas las edades	Mundial	028ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167, 029
Enterohemorrágica (EHEC)	Producción de citotoxinas tipo Shiga 1 y 2, codificadas por plásmido de 60 MDa		Todas las edades	Mundial	0157:H7, 026:H11
Enteropatógena (EPEC)	Adherencia a células Hep-2	EAF	Todas las edades	Mundial	
Clase I	Localizada	+			055, 086, 0111, 0119, 0125, 0127, 0128 ab, 0142
Clase II	Negativa o difusa	-			018, 044, 0112, 0114
Enteroadherente (EAEC)	Adherencia a células Hep-2		Probablemente todas las edades	Mundial	No definidos todavía
Enterotoxigénica (ETEC)	Enterotoxinas LT* ST**	CFA	Niños menores de 5 años de edad, viajeros o turistas	Países en desarrollo	06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159, 0167

*LT = Termolábil

**ST = Termoestable

de vida.

Las cepas de EIEC aisladas en estos estudios tienen características bioquímicas y serológicas muy semejantes a cepas de Shigella (14,15). Esta similitud explica en parte la sintomatología de estos cuadros. La enfermedad afecta tanto a niños como a adultos, lo que contrasta con la distribución de cepas EPEC y ETEC por grupos de edad, en países en desarrollo, donde se presentan fundamentalmente en lactantes.

En 1971 DuPont y col, describieron ciertas cepas de E. coli capaces de invadir la mucosa intestinal y de causar diarrea disenteriforme en voluntarios; los estudios sigmoidoscópicos realizados en estos individuos revelaron la presencia de úlceras hemorrágicas en colon, de donde fue posible aislar el microorganismo (16). En conejos y cuyos inoculados experimentalmente con cepas EIEC se ha demostrado que la ulceración del intestino se debe a invasión y reproducción de estas cepas dentro del citoplasma celular.

La capacidad invasiva de esta bacteria depende de la presencia de un plásmido de aproximadamente 140 MDa, que codifica varias proteínas de la membrana externa caracterizadas como los factores involucrados en la invasividad. La EIEC tiene predilección para colonizar la mucosa del colon. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por fiebre, disentería densa con heces escasas, sangre y moco, toxemia, malestar general e intensos dolores abdominales (17). Ante un paciente con disentería clínica la ausencia de trofozoitos de Entamoeba histolytica en las heces fecales y la falta de aislamiento de cepas de Shigella deben hacer pensar en EIEC como posible etiología.

Diagnóstico de Laboratorio

La identificación de cepas EIEC es difícil por varias razones: la mayoría de estos microorganismos tienen características bioquímicas poco frecuentes en E. coli; su crecimiento en medios habituales es lento y no fermentan la lactosa o lo hacen muy tardíamente; son anaeróbicos facultativos y no son móviles, por lo que frecuentemente se confunden con cepas de Shigella, además de que serológicamente cruzan con antígenos somáticos de este último género. La falta de identificación de cepas EIEC en casos individuales puede tener poca importancia, dado que la sintomatología del cuadro clínico y el tratamiento de ambas enfermedades es igual; sin embargo, para estudios epidemiológicos la identificación precisa de estas cepas es de gran importancia para conocer su frecuencia real en relación con la diarrea.

Las pruebas de laboratorio empleadas para detectar EIEC son caras y sólo se han utilizado en estudios de investigación. La más empleada consiste en inocular el ojo de un cuyo con un cultivo bacteriano y observar si en las siguientes 72 horas el animal desarrolla queratoconjuntivitis ulcerativa. Para evitar el uso innecesario de animales se han desarrollado pruebas de invasividad que utilizan células en cultivo (16) y recientemente se han usado sondas moleculares que detectan genes relacionados con la capacidad invasiva (18), quizá el avance más útil en este campo sea la prueba de ELISA para detección de las proteínas externas relacionadas con la capacidad invasora, publicada recientemente por un grupo húngaro (19).

E. coli Enterohemorrágica (EHEC)

En 1982, en un estudio epidemiológico de un brote de colitis hemorrágica, llamó la atención de algunos investi

gadores el que como organismo causante se encontrará E. coli del serotipo 0157:H7. Este serotipo no había sido descrito previamente como causa de diarrea en humanos; el síndrome clínico se caracteriza por diarrea copiosa con melena en pacientes afebriles y ausencia de leucocitos fecales. Estas características la distinguen de la disentería clásica causada por Shigella o por EIEC, en la cual la diarrea cursa con fiebres y deposiciones escasas con sangre y moco conteniendo numerosos leucocitos fecales (20).

E. coli 0157:H7

Surgió como un enteropatógeno importante en países como Canadá y Estados Unidos de Norteamérica, con brotes de colitis hemorrágica y diarrea, además del síndrome urémico hemolítico; los brotes se presentaron en centros maternos infantiles, escuelas y en la comunidad en general. EHEC elabora citotoxinas potentes codificadas por un fago, las cuales tienen actividad en células vero y HeLa; una de estas toxinas llamadas Shiga-like o verotoxina 1 es aparentemente idéntica a la neurotoxina/citotoxina/enterotoxina producida por la bacteria Shigella dysenteriae tipo 1 y es neutralizada por anticuerpos dirigidos contra la toxina de shigella (21); otras cepas elaboran además otra citotoxina llamada Shiga-like tipo 2 ó verotoxina 2, la que no es neutralizada por anticuerpos dirigidos contra la toxina de Shigella (22). EHEC posee un plásmido de 60 MDa que desempeña un papel importante en su virulencia; este plásmido codifica la producción de una nueva variedad de fimbrias que aparentemente median la unión de EHEC a células Henle 407, células epiteliales derivadas del intestino. Este plásmido es diferente de los genes que codifican para los factores de adherencia de EPEC (23). Aunque EHEC destruye las microvellosidades del epitelio

intestinal, estas lesiones se pueden distinguir de las causadas por bacterias enteropatógenas cuando se usa el modelo de cerdos gnotobióticos.

Las lesiones por EPEC afectan todo el intestino, mientras que las EHEC sólo involucran el ciego y el colon, además de que EPEC causa lesiones ligeras con algunas infiltraciones de leucocitos, lo cual no se observa en las lesiones por EHEC. Los estudios epidemiológicos de las infecciones por EHEC se han dificultado, ya que se carecen de métodos para permitir la identificación de un número grande de casos. Aparentemente 026:H11 puede también clasificarse dentro del grupo de las EHEC, ya que producen verotoxina, contiene el plásmido de 60 MDa que tiene homología con el plásmido de la cepa 0157:H7 y se ha asociado en ocasiones con diarrea hemorrágica (24).

Diagnóstico de Laboratorio

La presencia de E. coli 0157 y 026 en pacientes con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico puede detectarse por aglutinación con antisueros específicos contra los antígenos somáticos correspondientes. Sin embargo, en el caso de cepas 0157 es necesario saber si también poseen antígeno flagelar 7, pues solamente las bacterias de este serotipo producen citotoxina. En el caso de cepas 0157 las asociadas con enfermedad no son móviles (H-1). La incapacidad para utilizar sorbitol por cepas 0157:H7, característica poco frecuente en E. coli de la flora normal, ha permitido la detección rápida de este tipo de cepas en algunos estudios utilizando medio MacConkey con sorbitol en vez de lactosa (25). El método más directo de detectar si una cepa es capaz de causar colitis hemorrágica es investigando si produce VT por medio de la acción citotóxica sobre células Vero o HeLa en cultivo.

En ambos casos la presencia de la citotoxina debe confirmarse mediante neutralización de este efecto con una antitoxina específica (26). La sonda hecha con el plásmido de la cepa 0157 tiene homología con el de la cepa 026, por lo que es probable que se pueda usar en estudios epidemiológicos (27).

E. coli Enteropatógena (EPEC)

Como se había mencionado, en la etiología de los casos de "diarrea de verano" vistos en niños a principios de siglo, se establece claramente a fines de los años cuarentas, en que se informan casos aislados y epidemias de diarrea asociados con la presencia de cepas de E. coli con características serológicas diferentes a las de la flora normal. Independientemente, en México y en Inglatera se estudiaron niños con diarreas graves en quienes se aislaron cepas de E. coli que posteriormente se catalogaron como pertenecientes a los serogrupos 055 y 0111, según el esquema de Kauffman (5). A pesar de desconocerse originalmente la etiología de estos cuadros se pudo apreciar que las epidemias se podían controlar mediante una buena esterilización de biberones, la pasteurización de la leche que recibían estos niños en las salas hospitalarias y el control estricto de medidas higiénicas del personal que los manejaba. El estudio de casos similares en otras partes del mundo y el uso de tipificación serológica de las cepas de E. coli aisladas de estos casos demostró que existían ciertos serogrupos asociados con mayor frecuencia a procesos diarreicos (5). A estos serogrupos se les llamó enteropatógenos (EPEC). En los siguientes 30 años se continuaron observando epidemias de diarrea en cuneros de países industrializados, asociadas con cepas EPEC.

En la década de los setentas se dudó de las cepas

clásicamente reconocidas como enteropatógenas, dado que carecen de la capacidad de producir toxinas y factores de virulencia; sin embargo, en 1977, Levine demostró que cepas con estas características y almacenadas en el laboratorio durante siete años son capaces de producir diarrea en voluntarios adultos sanos, por lo que se concluyó que las cepas clásicas EPEC son patógenas aunque se desconocía el mecanismo por el cual causan diarrea.

En los países en vías de desarrollo las cepas EPEC continúan siendo una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de lactantes con diarrea. En un estudio reciente realizado en forma longitudinal en un poblado del Estado de Morelos en México (28), se encontró que aproximadamente el 20% de los casos de diarrea durante los primeros 18 meses de vida estuvieron asociados con cepas EPEC. La falta de higiene en estas comunidades hace que los niños estén en riesgo de colonizarse a temprana edad por este tipo de gérmenes. Aunque existen reportes de epidemias de diarrea en cuneros de países en desarrollo, la mayor parte de los aislamientos de cepas EPEC en estas zonas se hace de casos esporádicos de diarrea.

A pesar del efecto protector que pudiera tener la leche materna en niños de países en desarrollo, la colonización intestinal temprana por cepas EPEC continúa siendo muy importante. La relación entre el agente y el hospedero debe desempeñar un papel importante en este proceso de colonización y producción de cuadros diarreicos a temprana edad. Los estudios con voluntarios humanos y turistas adultos que viajan a países con deficientes condiciones sanitarias han demostrado que EPEC es capaz de producir diarrea en individuos de diversas edades. La falta de sintomatología en adultos de países en vías de desarrollo, a quienes se les aíslan cepas EPEC, probablemente se deba

a la presencia de inmunidad local a nivel intestinal producida por contacto temprano con este tipo de bacterias. En países industrializados, por el contrario, EPEC puede ser causa de brotes de diarrea en edad adulta asociados con la contaminación de alimentos o fuentes de agua por estos microorganismos (29).

Aunque los estudios con voluntarios humanos han confirmado que las cepas EPEC son capaces de producir diarrea, el mecanismo por el cual producen secreción a nivel intestinal permanece aún sin esclarecerse en su totalidad. Se sabe que EPEC destruye las microvellosidades sin invasión (29), la bacteria muchas veces se encuentra firmemente adherida a la célula y cubierta parcialmente por su membrana.

En 1979 Cravioto y col, describieron que el 80% de EPEC aisladas de epidemias de cuneros tenían la capacidad casi exclusiva de adherirse in vitro a células en cultivo tipo Hep-2 (30). Esta capacidad adhesiva de cepas EPEC a receptores de células epiteliales se confirmó en biopsias intestinales de niños con diarreas graves y prolongadas que presentaban microcolonias bacterianas adheridas focalmente al epitelio intestinal. Ulshen y Rollo (31), y posteriormente Rothbaum y col (32), sugirieron que los cambios inflamatorios en estos epitelios eran debidos al proceso de adherencia bacteriana.

Recientemente el grupo de Levine en Baltimore ha demostrado que existe una relación directa entre adhesividad de EPEC a células Hep-2 y la presencia de diarrea en voluntarios humanos inoculados oralmente con estas cepas (33). El control genético de esta capacidad adhesiva reside en genes presentes en un plásmido de aproximadamente 60 MDa. La pérdida del plásmido que confiere capacidad para adherirse a células Hep-2 en la cepa EPEC del seroti

po 0127:H6 se ha asociado con la pérdida de capacidad para producir diarrea en voluntarios humanos. Los genes en este plásmido codifican la producción de una adhesina no fimbriada que se encuentra en la parte exterior de la membrana celular de esta bacteria por medio de la cual probablemente se adhiere a receptores específicos de la célula intestinal (33). A esta proteína se le llama factor de adherencia a enterocitos (EAF).

De los estudios epidemiológicos iniciales se desprende que EAF desempeña un papel importante en la patogenia de EPEC. Sin embargo, se han aislado cepas que definitivamente causan diarrea pero no poseen EAF, por lo que las EPEC se refieren como cepas clase I o clase II de acuerdo a si poseen o no EAF (34).

Por otra parte, se ha informado también que algunas cepas de EPEC elaboran cantidades pequeñas de citotoxinas similares o idénticas a la de Shigella dysenteriae tipo 1 y algunos serotipos clásicamente considerados EPEC aparentemente deben clasificarse dentro del grupo de las enterohemorrágicas (35).

Clínicamente la enfermedad se caracteriza por fiebre, malestar general, vómito y diarrea con cantidades importantes de moco pero sin sangre, la enfermedad es más grave que otras infecciones y la diarrea persiste por más de 14 días.

E. coli Enteroadherente (EAEC)

La otra cepa bacteriana de E. coli de interés es la que no tiene factores enteroadherentes ni pertenece a los serotipos clásicos de EPEC; esta cepa fue descrita por Mathewson e identificada únicamente por su propiedad de adherencia a células Hep-2, después de su descripción en

un estudio epidemiológico como bacterias que causan un cuadro poco grave de diarrea, definida por no contener sangre ni leucocitos. Los datos sugieren que estas cepas son identificables por un patrón peculiar de adherencia a células Hep-2 que es claramente distinguible de la adherencia localizada y la adherencia difusa. Esta bacteria no elabora toxina ni termolábil ni termoestable, aparentemente tampoco toxinas Shiga-like, no invade las células epiteliales y no posee plásmidos llamados EAF (36).

Los factores enteroadherentes de EAEC son uno de los criterios utilizados para determinar su patogenicidad, esta capacidad de adherencia a células Hep-2 puede estar relacionada a la presencia de ciertos plásmidos, pero los datos a la fecha son bastante heterogéneos por lo cual no se ha podido establecer este grupo con claridad.

Diagnóstico de Laboratorio

La presencia de cepas EAEC en heces de niños con diarrea se puede detectar con pruebas de aglutinación en placa, en colonias de E. coli que crecen en medios poco selectivos MacConkey o eosina azul de metileno (EMB), usando dos sueros polivalentes comerciales. Una prueba positiva en placa debe confirmarse por aglutinación en tubo con los antisueros monovalentes correspondientes. La falta de aglutinación no significa que la cepa aislada sea incapaz de producir diarrea, sino únicamente que no pertenece a un serotipo de los considerados como enteropatógenos.

E. coli ENTEROTOXIGENICA (ETEC)

Las infecciones por cepas ETEC constituyen probablemente la causa más frecuente de morbimortalidad por diarrea en niños menores de 5 años de edad de países en desa

rollo, son la principal causa de deshidratación y se correlacionan con desnutrición (37).

En México las cepas ETEC se han asociado con aproximadamente el 40% de procesos diarreicos en niños menores de dos años de edad, tanto a nivel hospitalario como de comunidades (40). Aunque siempre se había pensado que el agua y los alimentos contaminados eran las fuentes y rutas de transmisión de estas cepas, los cultivos de agua potable y alimentos en estudios realizados en México, Bangladesh o Filipinas no lograron identificar ETEC, por lo que a la fecha este renglón permanece obscuro (41).

En países industrializados las cepas ETEC se aislan fundamentalmente como agente etiológico de tipo epidémico en cuneros y salas de hospitales pediátricos. A la fecha se han descrito tres brotes importantes de este tipo, uno en Estados Unidos y dos en la Gran Bretaña. En la población general de estos países las ETEC no constituyen una causa importante de diarrea, como lo demuestran estudios de prevalencia en Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Suecia y la Gran Bretaña (16).

El brote epidémico más grande descrito a la fecha asociado a ETEC fue el causado por una cepa 06:H16 en más de 2,000 individuos que visitaron un parque nacional de los Estados Unidos de Norteamérica en 1975. En este caso la única fuente de agua potable se contaminó con el drenaje del parque, infectando así a cientos de individuos de todas edades (42).

La mejoría de las condiciones ambientales y de la nutrición infantil han logrado eliminar casi por completo las diarreas por ETEC en los países desarrollados, de tal manera que cuando los habitantes de estos países viajan a otros en vías de desarrollo, presentan cuadros llamados

"diarrea del turista" (38). La enfermedad es de corta duración (aproximadamente 5 días), se presenta en forma aguda afectando a más de la mitad de los individuos que viajan de áreas salubres a áreas insalubres del mundo, el cuadro se inicia aproximadamente a los 10 días de arribo. Clínicamente se caracteriza por diarrea líquida, profusa, náuseas, cólicos, fiebre ligera, irritación anal, sensación de urgencia y vómito; los síntomas varían dependiendo de la distribución de cepas de toxinas LT ó ST, edad de las personas y si la región es endémica o no. La diarrea líquida profusa semeja a la causada por Vibrio cholerae. En zonas donde el cólera es endémico no es posible hacer una distinción por sintomatología entre el cuadro causado por cepas ETEC y aquel causado por los vibrios (39).

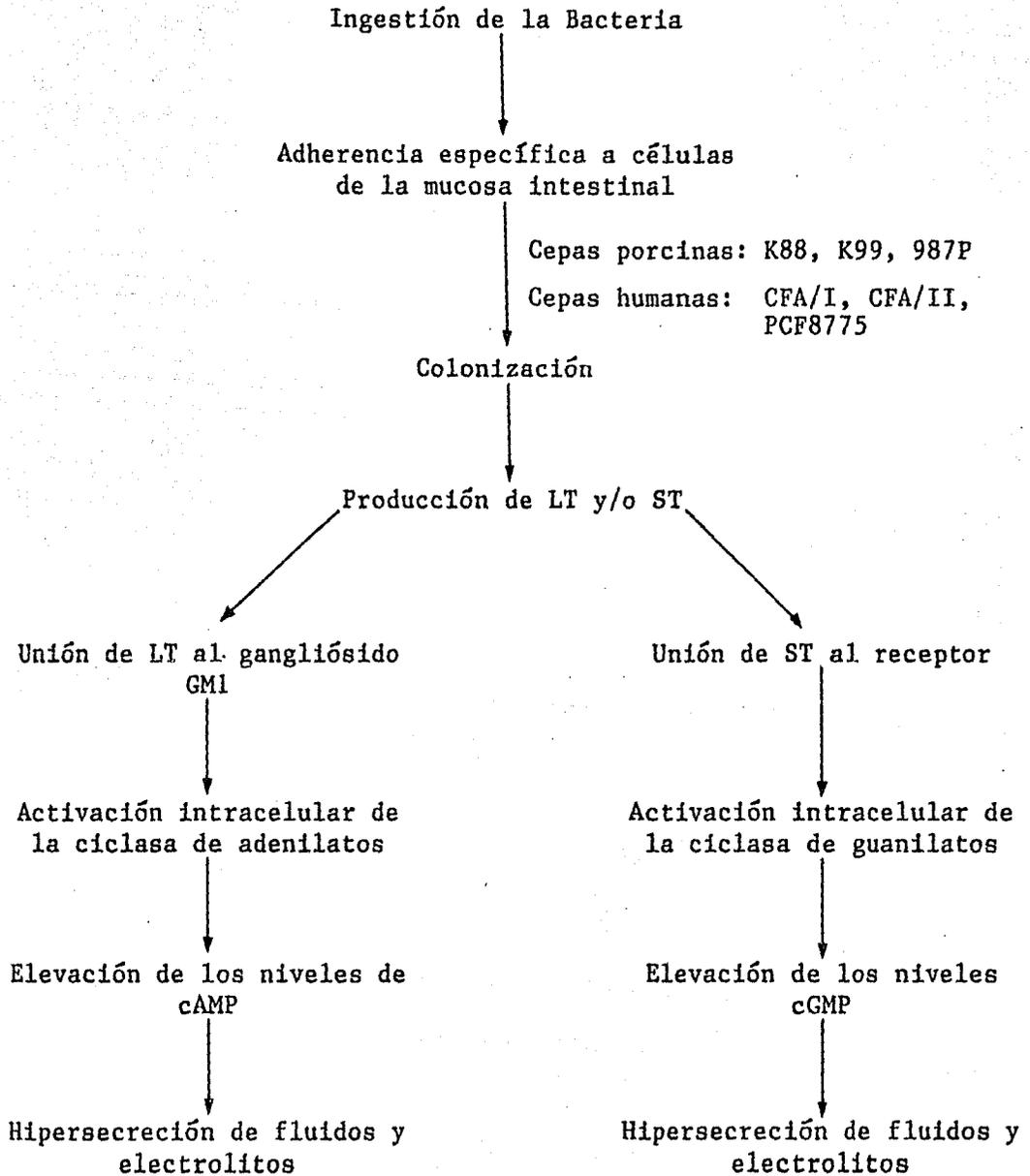
En 1970 Rowe y col aislaron una cepa ETEC del serogrupo 0148 como agente etiológico de diarrea aislada en el 50% de soldados británicos enfermos en Arabia Saudita. Esta misma cepa se aisló posteriormente en otros grupos de soldados con diarrea en servicio en Vietnam, Filipinas y Corea del Sur (14). En 1975 Merson y col, estudiando un grupo de médicos y sus familiares que asistieron a un congreso en la Ciudad de México encontraron que el 45% de los casos de diarrea estuvieron asociados con el aislamiento de cepas ETEC; los cultivos realizados antes de su arribo a México no mostraron la presencia de este tipo de bacterias (43).

ETEC posee al menos dos factores de virulencia:

- 1) La presencia de pilis o fimbrias, que le permiten adherirse a las células de la mucosa intestinal y,
- 2) La producción de dos clases de enterotoxinas, una estable al calor (ST) y otra lábil (LT). (Cuadro No. 2).

Cuadro 2

LA PATOGENIA DE ETEC



Las cepas que tienen los plásmidos que codifican para los pilis y los que codifican para las toxinas colonizan el intestino delgado y causan diarrea grave con alta mortalidad (44).

Los pilis, a los que se conoce también como adhesinas, están codificados por genes que se encuentran en plásmidos (45), estos factores de colonización o pilis sobresalen de la superficie de la bacteria, se unen a receptores específicos en la superficie de las células epiteliales y están compuestos de proteínas, pueden ser visualizados por microscopía electrónica, y como habíamos mencionado, existen diferentes tipos química y antigénicamente definidos, que son los K88, K99 y 987P, que se unen a los receptores específicos de las células epiteliales del intestino del cerdo y de los bovinos.

En el humano se han descrito por lo menos dos factores de colonización llamados de esa manera y se abrevian como CFA-I y CFA-II; (46,47,48), estos pilis determinan la especificidad de especie, de tal manera que las cepas de humanos no pueden causar diarrea en cerdos, y las cepas de animales no pueden causar diarrea en humanos. Estos pilis pueden también ser responsables de la enfermedad observada en el cerdo a diferentes edades, el K99 y 987P, están asociados habitualmente, aunque esto no es absoluto, a la diarrea de lechones de menos de dos semanas de edad (49).

Aparentemente estos pilis dan cierta hidrofobicidad a la bacteria, por lo tanto se pueden establecer interacciones hidrofóbicas para permitir la unión entre la bacteria y la superficie intestinal, venciendo la carga negativa neta que existe en la superficie de las bacterias antes de la adherencia y la colonización. La importancia

de estos pilis en la patogenicidad se puede demostrar dado que:

1. La pérdida de la información genética que codifica para estos pilis específicos causa pérdida de la virulencia, y
2. Los anticuerpos dirigidos contra estos pilis bloquean su función y protegen al animal en contra de desafíos con cepas homólogas (50).

Se ha sugerido que una vacuna trivalente contra estos pilis pueden proteger a los lechones contra la diarrea, aunque la inmunización con LT y con formas inmunogénicas de ST en combinación con los antígenos de los pilis debería ser la forma más efectiva de protección. El antígeno O de estos bacilos muchas veces contribuye a la patogenia, incrementando la resistencia a la fagocitosis y a la destrucción por complemento y por anticuerpos específicos, o bien por anticuerpos naturales (reactividad cruzada) (51).

Aun cuando existen más de 10,000 serotipos en la clasificación O:K:H, aproximadamente 12 son responsables de la mayoría de los cuadros diarreicos en el cerdo y se ha descrito también alguna dominancia en las cepas humanas; de tal manera que basados en la clasificación del antígeno O las cepas 06, 08, 078 y 0115 contendrían el 86% de las cepas aisladas en casos de humanos con diarrea. Además, existen ciertas combinaciones de antígenos O:H que pueden casi asegurar la presencia de plásmidos que codifican para las toxinas y que por lo tanto corresponderán a cepas toxigénicas, por ejemplo 078:H11, 078:H12, 06, H16 son siempre toxigénicas, mientras que otros serogrupos con otros antígenos H no son toxigénicas. Es posible también en base a estas clasificaciones decir por ejemplo

que la cepa 06:H16 usualmente producen LT y ST, mientras que el serotipo 0128:H casi siempre produce ST (52). Otros serogrupos en los cuales se ha observado la producción de enterotoxinas son los 044, 014, y 0128 muchos de los cuales se han aislado en países en vías de desarrollo y pertenecen clásicamente al grupo de EPEC (53). Se ha demostrado también que el serotipo 078 posee el factor de colonización I mientras que el 06 y 08 están asociados frecuentemente al factor de colonización II. Las cepas con K99 y 987P producen la enterotoxina termoestable mientras que las cepas con K88 muchas veces están asociadas a la producción de LT. Estas observaciones probablemente pueden ser explicadas por incompatibilidad de plásmidos (54).

Otro factor de virulencia de ETEC está dado por dos clases de enterotoxinas, una termoestable (ST) y otra termolábil (LT). La LT es termolábil, es decir se inactiva cuando se somete durante 15 minutos a 65°C, es una proteína de peso molecular aproximado de 86,500d; es semejante a la toxina de cólera en estructura, función y mecanismo de acción. LT está compuesta por dos subunidades, una subunidad A, a la cual se unen cinco subunidades B. La unidad monomérica B de LT difiere solamente por un número escaso de aminoácidos de la toxina del cólera. La toxina del cólera se une a su receptor GMI mientras que la LT se une tanto al gangliósido GMI como a otro receptor formado por una glicoproteína. Después de unirse a su receptor por alguna de las subunidades B, la subunidad A es cortada en A₁ y A₂, penetra las células y activa en forma irreversible a la ciclase de adenilatos a través del difosfato de adenosina (ADP) presente en los ribosomas, lo cual conduce a una acumulación de AMP cíclico; la acumulación intracelular de este nucleótido cíclico causa la secreción al interior del intestino de fluidos ricos en electrolitos lo cual se traduce clínicamente en diarrea (55).

Este aumento en la secreción se debe a incremento en el flujo de cloro y posiblemente de carbonato a nivel de la cripta intestinal, así como a reducción de la absorción de sodio a nivel de las microvellosidades del borde en ce pillo de la célula epitelial.

La otra toxina (ST) es termoestable, o sea que resis te el calentamiento a 100°C durante 30 minutos; realmente se trata de una familia de polipéptidos pequeños con pesos moleculares que van de 1980 a 5000d. No son inmunogénicas y al menos se han identificado dos clases: una la clase A, que es soluble en metanol y activa en el intesti no de ratones lactantes, y la otra la clase B, que es insoluble en metanol e inactiva en el intestino de ratones lactantes, pero tiene actividad en asas ligadas de intestino de lechones. Ambas son capaces de producir secreción en asas ligadas de intestino de conejo. La STa se ha encontrado fundamentalmente en cepas aisladas de humanos, mientras que la STb la producen casi exclusivamente cepas ETEC aisladas de lechones y becerros. El papel que desempeña la STb en la diarrea en humanos se desconoce (56).

El efecto de estimulación temprana de la respuesta secretora causado por cepas productoras de LT y ST está dado por la activación casi inmediata del monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) por la ST. Aunque al parecer es ta enterotoxina no tiene un receptor específico en la mem brana de la célula epitelial, sino que penetra al citoplasma sin cambios para activar el sistema de esta enzima, se supone la existencia de una proteína que funciona como re ceptor para esta toxina; esta molécula estaría fuertemente unida a una forma particulada de la ciclase de guanilatos, ambas unidas a componentes del citoesqueleto de las células del epitelio intestinal (57). Por este motivo, la

ST sólo es capaz de estimular el sistema de la ciclasa de guanilatos en células del intestino delgado. Esta característica reduce importantemente el número de ensayos para su detección en el laboratorio, a diferencia de la LT, que estimula cualquier célula que tenga intacto su sistema de la ciclasa adenilatos.

Diagnóstico de Laboratorio

Existen varios modelos para analizar cuáles cepas de E. coli producen toxinas.

Prueba de la Asa Ligada

Se utilizan el íleon del conejo o el yeyuno del cerdo, en los que se inyectan suspensiones bacterianas o preparaciones de diferentes grados de pureza, lo cual permite también ensayar la neutralización por anticuerpos específicos. En general, las pruebas se hacen por duplicado, en secuencia y al azar en diferentes animales. Sin embargo, los falsos positivos y los falsos negativos son comunes, por lo que se requieren múltiples controles que se deben de realizar al mismo tiempo.

La acumulación del líquido en estas asas intestinales como respuesta a la presencia de LT alcanza su máximo en aproximadamente 18 horas y la relación de volumen a longitud en centímetros es aproximadamente de 2-2.5 (58).

Conejo Infante

En el ensayo en conejos infantes la muestra se introduce en el estómago por un tubo de plástico o bien se inyecta directamente en el estómago a través de una incisión. Después que el animal se sacrifica se obtiene todo el intestino y los valores se expresan como la relación

entre el peso del intestino y el peso del cuerpo.

Los conejos infantiles exhiben un incremento de líquido intestinal en respuesta a la LT que alcanza el máximo a las cinco horas; la acumulación de líquido determina una relación peso intestino - peso del cuerpo diferente a la de los controles. Los animales tienen que ser menores de 14 días de edad dado que aparentemente después de esta edad el pH del estómago causa inactivación de LT (59).

Perfusión en Rata

La perfusión del intestino de la rata es un ensayo sensitivo para ambas toxinas de E. coli, reproducible y exhibe una respuesta dosis dependiente; un solo segmento del yeyuno se perfunde con una solución de electrolitos balanceada 150 mM con esta misma solución conteniendo enterotoxina o con la solución de electrolitos conteniendo enterotoxina incubada previamente con antitoxina. Después de un tiempo para permitir el equilibrio, se colectan fracciones a diferentes intervalos para medir el transporte neto de agua (60).

Modelo Canino

El modelo canino permite estudiar la LT y distinguir la de la respuesta secretoria a ST; dado que el perro es un animal resistente a la toxina el ensayo permite estudiar la respuesta inmune local, pero este modelo realmente ha sido poco utilizado (61).

Ensayo de Permeabilidad en Piel

La prueba de permeabilidad de la piel en conejos se diseñó para la cuantificación de toxina colérica pero puede utilizarse para la cuantificación de LT y su neutrali-

zación por anticuerpos específicos; en este caso las muestras deben estar en 0.1 ml, se pueden hacer de 40 a 50 inyecciones por animal, después de 18 horas los animales reciben una inyección intravenosa de colorante de azul de Evans al 2% en PBS, se miden las áreas coloreadas o induradas dos horas más tarde. Esta es la prueba más sensible y también la más utilizada para detectar cepas de ETEC (62).

Ensayo en Cultivo de Células

Células Suprarrenales Y-1. Existen varios ensayos de cultivos de células para la cuantificación de enterotoxinas; uno de ellos se hace con células de un tumor suprarrenal de ratón (Y-1), que responden a picogramos de toxina de cólera y a toxina de E. coli (LT) con un cambio morfológico en el cual la célula se redondea y se incrementa la producción de Delta 4-3-cetoesteroides, este aumento puede ser medido cualitativamente por el cambio morfológico y cuantitativamente por fluorometría de los esteroides.

El inconveniente de esta prueba es que después de 8 a 10 pases las células dejan de producir esteroides, después de 15 ó 20 pases ya no responden morfológicamente al estímulo de la toxina (63).

Células CHO. Las células de ovario de hamster chino (células CHO) responden también a la presencia de toxina del cólera o de LT con cambios morfológicos y con incrementos intracelulares de cAMP. La sensibilidad de estas células es parecida a la de las células Y-1 y tienen la ventaja de que la respuesta de las células CHO a la toxina es el desprendimiento de las mismas de la monocapa en la cual crecen, por lo que se facilita el contarlas (64).

Células Vero. Las células Vero, células de riñón de mono verde africano, también responden con cambios morfológicos a la LT. La dosis respuesta de las células Vero es parecida a las células Y-1 y células CHO, y tienen la ventaja de que pueden ser cultivadas rápidamente y en grandes cantidades (65).

Células Henle. Las células Henle son células intestinales de embriones de humanos que se cultivan en monocapas, cuando están en presencia de LT se incrementa la actividad de la ciclasa de adenilatos por lo cual la prueba necesita la determinación de AMP-cíclico o de la actividad de la ciclasa de adenilatos. Esta prueba puede ser usada para el estudio de los receptores a las enterotoxinas (66).

Ensayos Enzimáticos

Lisado de Eritrocitos de Pichón. El ensayo de lisado de eritrocitos de pichones puede usarse para estudiar la presencia de LT en sobrenadantes de cultivos bacterianos. El fragmento A de la LT reacciona directamente con una proteína asociada o unida a la GTP asociada a ciclasa de adenilatos, la activación de la ciclasa de adenilatos ocurre con la transferencia de la difosfato de ribosa y adenosida (ADPR) a la proteína unida a la GTP. El ensayo se hace en tres pasos, primero la activación de la ciclasa de adenilatos por LT, segundo el tiempo necesario para la acumulación de AMP cíclico antes de que la reacción se pare con ácido diluido, tercero la determinación de AMP cíclico, ya sea en ensayo de una de las proteínas o por un inmunoensayo. Este ensayo (llamado PEI) se estimula con 20 ó 40 μ l de sobrenadante de cultivo. Las diluciones del medio de cultivo se hacen habitualmente con SDS, lo que incrementa la estimulación de la ciclasa de adenilatos.

latos por la subunidad A (67).

Ensayo en el Miocardio del Corazón del Gato. Este ensayo puede servir como el anterior, para probar la toxina en diferentes grados de pureza y los títulos de antitoxina en los sueros; aparentemente, el mecanismo de estimulación de la ciclase de adenilatos es igual a la de otros sistemas y la ribosilación de una proteína unida a GTP es tá involucrada en la regulación de la ciclase de adenilatos (68).

Actividad de la Hidrolasa y la ADP Ribosiltransferasa. Esta actividad enzimática intrínseca a la subunidad A de LT puede medirse por la liberación del carbono 14 de la nicotinamida de NAD en la presencia o la ausencia del metil ester de la arginina, la cual actúa como un receptor; la liberación de nicotinamida depende de la presencia de ditiotreitol y arginina. La utilidad de este ensayo es muy limitada, dado lo caro del NAD radioactivo (69).

· Ensayos Inmunológicos

RIA y ELISA. El radioinmunoensayo en fase sólida y el ELISA, son ensayos que se han elaborado gracias a la reactividad cruzada entre toxina del cólera y LT. En el inmunoensayo en fase sólida los antígenos se incuban en pozos de placas para microensayos, a los cuales previamente se les han acoplado los anticuerpos, y se sigue con una reacción con antitoxina del cólera marcada con ^{125}I . El ELISA involucra el unir la antitoxina del cólera proveniente de conejos o pozos de microplacas, añadir las muestras de LT y posteriormente antitoxina proveniente de cobayos conjugada a fosfatasa alcalina e incubarla con el substrato adecuado. La sensibilidad de ambas pruebas es comparable a la de ensayo en células suprarrenales Y-1, el

ensayo puede modificarse cuando se pega a la placa el receptor Gml, lo cual ahorra tiempo para el ensayo material y reactivos (70).

Hemolisis Pasiva. Los eritrocitos de borregos sensibilizados con LT parcialmente purificada e incubados en la presencia de anti-LT o antotoxina del cólera se han utilizado para producir este ensayo de hemolisis pasiva (71).

Aglutinación de Estafilococo. En la técnica de aglutinación de estafilococo la antitoxina se absorbe a la proteína A del estafilococo y estos gérmenes se aglutinan cuando se mezclan con el antígeno; el ensayo se lleva a cabo en tubos capilares aunque se necesita tener la antitoxina del cólera no se requiere equipo especializado, por lo que la prueba puede ser útil en países en vías de desarrollo (72).

La Prueba de Biken. Esta prueba combina los principios de las pruebas de Elek y de Oucherlony, las bacterias se aplican al agar y se incuban 48 horas. Pueden colocarse filtros con polimixina B cercanos al área de crecimiento para permitir la lisis de las células y la extracción de mayor cantidad de toxina; después de cinco horas de incubación a 37°C se coloca un antisuero en pozo recortado en medio del agar y aproximadamente en 24 horas se forman líneas de precipitado (73).

Aglutinación con Partículas de Latex. Es un método rápido, simple y económico en el cual las partículas de latex sensibilizadas con un suero anti-LT se mezclan con una emulsión de un extracto de colonias a las cuales se les ha colocado polimixina B y después de 3 minutos de incubación la mezcla se observa para ver aglutinación utili

zando una fuente de iluminación oblicua. Para este ensayo es necesario tener antisueros con anticuerpos específicos de alta calidad, las partículas de látex deben ser también de buena calidad y se debe usar la polimixina B para permitir la liberación intracelular de LT, y titular adecuadamente el suero (74).

Detección por Sondas Moleculares

El uso de técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de sondas moleculares para la detección de factores de patogenicidad en enterobacterias. Estas sondas están hechas de secuencias específicas de ácido de soxirribonucléico (ADN) marcado con fósforo radioactivo, que por un proceso de hibridación reconocen secuencias de ADN complementarias en las cepas problema. El reconocimiento de secuencia ADN complementarias en bacterias aisladas de individuos enfermos significa que estos microorganismos tienen información genética para elaborar factores de patogenicidad iguales a los producidos inicialmente por las cepas de donde fue aislado el ADN de la sonda molecular. Este tipo de ensayos permite el análisis rápido y relativamente barato de gran número de cepas, si se tiene la facilidad para purificación de ADN y para el manejo de material radioactivo. A la fecha las sondas se han empleado fundamentalmente en estudios epidemiológicos donde es necesario examinar un número importante de bacterias lo más rápido y al menor costo posible. Existen informes sobre sondas moleculares para detección de LT, STa, STb. El desarrollo de técnicas para obtener ADN sintético a partir de secuencias conocidas y el uso de marcadores no radioactivos permitirá en un futuro cercano el uso más generalizado de estas técnicas, dado que el marcaje con radioactividad del ADN crea la necesidad de contar con personal técnico y equipo especializado, por lo cual

se limita actualmente el uso de esta técnica (75).

Aunque el objetivo final del proyecto es el desarrollar un método inmunológico que permita la identificación de E. coli productora de toxina estable (ST_a), para la presente tesis se fijaron los siguientes objetivos:

O b j e t i v o s :

- 1.- Montar la técnica del ratón lactante para la identificación de cepas de E. coli productoras de toxina estable ST_a.
- 2.- Producción y purificación de toxina estable ST_a.

MATERIAL Y METODOS

Diseño

- 1.- Obtención de una cepa de E. coli productora de toxina estable (ST).
- 2.- Identificación del género y subgénero a través de pruebas bioquímicas.
- 3.- Corroboración de que la cepa es productora de ST por medio de la prueba del ratón lactante.
- 4.- Cultivo de la bacteria en volúmenes grandes.
- 5.- Purificación de ST.
- 6.- Certificación de la pureza obtenida.

Cepa Bacteriana

Para la purificación de toxina estable se utilizó la cepa de referencia H-10407, dicha cepa en forma liofilizada fue obtenida por intermedio del Dr. Carlos Eslava del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, UNAM. Esta cepa en especial tiene los plásmidos necesarios para la síntesis de LT y ST, así como de CFA/I. Para corroborar el género y subgénero de esta bacteria se hicieron pruebas bioquímicas, para lo cual inicialmente la cepa fue resuspendida en solución salina isotónica y cultivada en medio de agar-soya-tripticosa. Las colonias obtenidas fueron homogéneas por lo que se tomó una muestra para realizar las pruebas mencionadas. Los medios que se utilizaron para tal efecto fueron:

EMB = Agar de eosina y azul de metileno

VB = Agar verde brillante

ST = Agar soya tripticasa

LIA = Agar de hierro y lisina

CU = Caldo Urea

CM = Caldo de molonato de Ewing modificado

SIM = Medio SIM

MIO = Medio MIO

CS = Agar de citrato de Simmons

VP = Medio MR-VP rojo de metilo y Voges-Proskaver

KLIGER = Medio de Kliger

El cultivo se desarrolló a 37°C durante 24 hs.

Prueba del Ratón Lactante

- Se utilizaron ratones CD-1 de 3-4 días de nacidos, que presentaban leche en el estómago en forma evidente.
- Se utilizaron cinco ratones por muestra.

- Las muestras a probar se diluyeron 1:2 con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos 0.01M (PBS) pH 7.4.
- A 1 ml de la solución se agregaron 10 μ l de azul de Evans al 1% en PBS.
- A cada ratón se le inyectó intragástricamente 100 μ l de la preparación, utilizando una jeringa desechable de 1 ml, aprovechando que a esta edad el estómago lleno de leche es visible a través de la pared abdominal.
- Los animales se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 4 hrs.
- Los animales fueron sacrificados colocándolos en un ambiente de cloroformo.
- El intestino se separó quirúrgicamente del cuerpo.
- Se pesaron por separado los intestinos y los cadáveres.
- Con los valores obtenidos se hizo una relación del peso del intestino entre el peso del cadáver.
- Los valores arriba de 0.085 son arbitrariamente considerados como positivos (76).

Para purificación de la toxina, se siguió el método descrito por Giannella (77), modificado por nosotros, brevemente consiste en:

A partir de los cultivos crecidos en agar soya triptica se inoculan matraces con 100 ml de precultivo, utilizando el siguiente medio:

Cloruro de sodio	2.52 gr
Acetato de sodio	10.00 gr

Fosfato de potasio dibásico $3H_2O$	11.42 gr
Asparagina	5.0 gr
Sulfato de sodio	0.14 gr
Sulfato de magnesio	0.05 gr
Cloruro de manganeso ($4H_2O$)	0.005 gr
Sulfato ferroso ($6H_2O$)	0.005 gr
pH = 8.5	

Todos los reactivos fueron de la marca Baker

Este medio fue esterilizado a 12 libras de presión durante 10 minutos. Con el precultivo se inocularon matraces estériles de 4 litros de capacidad, los cuales tenían 2 litros de medio cada uno.

Dicho cultivo se creció durante 36 horas a $38^{\circ}C$ con agitación de 100 rpm y posteriormente se centrifugaron a $28,000 \times g$, durante 30 minutos a $4^{\circ}C$. El sobrenadante se filtró en matraces estériles utilizando primero membranas (Millipore) con poros de 0.45 y posteriormente de 0.22 micras.

Después de corroborar la presencia de toxina en este filtrado por medio de la prueba del ratón lactante, cada litro de medio se incubó en un matraz que contenía 100 grs. de esferas de poliestireno (Bio Beds de la Marca Bio Rad) a $4^{\circ}C$ con agitación ocasional.

Posteriormente se filtró en un Büchner utilizando un filtro de papel Whatman No. 4.

Finalmente las esferas fueron lavadas con las siguientes soluciones:

- a) 2 x 100 ml de agua destilada
- b) 2 x 50 ml de ácido acético 1% y metanol 20%
- c) 1 x 50 ml de ácido acético 1% y metanol 99%

- d) 2 x 50 ml de ácido acético 1% y metanol 80%
- e) 2 x 50 ml de ácido acético 1% y metanol 99%
- f) 2 x 100 ml de agua destilada.

La fracción C se reunió con las dos primeras fracciones del paso D y se liofilizaron en un aparato Labconco Modelo 50648K.

Extracción con Acetona

El polvo obtenido de la muestra liofilizada fue disuelto en 10 ml de ácido acético al 25% y posteriormente se añadieron 10 ml de acetona (el volumen de acetona se incrementó hasta lograr la solubilización completa del material). La muestra fue posteriormente centrifugada a 35,000 x g, a 4°C durante 20 minutos, para eliminar el material insoluble, y el sobrenadante fue liofilizado nuevamente.

Cromatografía de Filtración

La muestra liofilizada se disolvió en 3 ml de solución amortiguadora de carbonato de amonio 12 mM con 0.6 ml de 2-propanol y se colocó en una columna (46 x 1.4 cm) de Sephadex G-25 equilibrada y eluida con 10 mM de carbonato de amonio con 15% de 2-propanol (Sephadex G-25 superfino, Pharmacia). Se colectaron fracciones de 5 ml las cuales fueron leídas a 275 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss, Modelo PMQ II. Estas fracciones fueron sometidas al ensayo del ratón lactante y las fracciones con toxina se liofilizaron.

Cromatografía de Intercambio Iónico

El producto obtenido en el paso anterior se disolvió en 5 ml de solución amortiguadora de Bis-Tris HCl (Sigma) 10 mM, pH = 6.5 y se fraccionó en una columna (24 x 1.4

cm) de DEAE-Sephacel (Pharmacia). Esta columna se eluyó con 600 ml 10 mM Bis-Tris/HCl realizando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M. Se colectaron fracciones de 4 ml, las cuales fueron nuevamente leídas en el espectrofotómetro y sometidas a la prueba del ratón lactante. Las fracciones con toxina fueron liofilizadas y luego resuspendidas en 10 mM de carbonato de amonio pH 8.6, y se pasaron por una columna (35 x 2.5 cm) de Sephadex G-25 grupo pH = 8.6 con 10 mM de carbonato de amonio con 15% de 2-propanol. Se colectaron fracciones de 5 ml, se leyeron a 275 nm y se sometieron a la prueba de ratón lactante, las fracciones con toxina se liofilizaron y se conservaron a 4°C para posteriormente resuspenderlas en PBS y hacer una prueba de pureza utilizando la técnica de cromatografía en capa fina descrita por Camag y col. Se utilizó celulosa Munktell's No. 400, el eluyente empleado fue butanol/ácido acético/agua 200:30:75 v/v. Las placas fueron incubadas en cubas de cristal dejando el tiempo necesario para que el eluyente alcance el 90% de la longitud de la placa. Posteriormente las placas se colocaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cuba seca de vidrio que contenía iodo metálico.

RESULTADOS

La cepa liofilizada de E. coli H-10407, al ser resuspendida bajo condiciones de esterilidad en solución salina y cultivada en agar soya tripticasa, mostró un desarrollo abundante con colonias homogéneas, por lo que se tomaron algunas de ellas, las que fueron crecidas en medios especiales. Los resultados obtenidos por triplicado en tales medios se muestra en el Cuadro No. 3.

En vista de los datos obtenidos se decidió utilizar

Cuadro 3

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS DE

E. coli H-10407

Muestra	L I A		K L I G E R				Simmons Citrato	S I M			M I O							
	Descarbo- xilación	H ₂ S	Glucosa	Lactosa	H ₂ S	Gas		Movi- lidad	H ₂ S	Indol	Movi- lidad	Indol	Ornitina	RM	VP	Manitol	Malonato	Urea
1	+	-	+	+	-	±	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
2	+	-	+	+	-	±	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
3	+	-	+	+	-	±	-	±	-	-	±	-	+	-	-	-	-	-

solamente las dos primeras muestras, que se corresponden con los cuadros descritos por Kauffmann (5). Después de crecer nuevamente estas bacterias, se crecieron en un matraz de precultivo y otra vez se tomaron tres muestras para realizar las pruebas bioquímicas; asimismo, al realizar el cultivo final de 30 litros, los cuales estaban contenidos en matraces de 4 litros con 2 litros de medio cada uno, se tomaron muestras, se realizaron pruebas bioquímicas y frotis que se tiñeron con el método de Gram, para corroborar la cepa crecida.

Los resultados siempre fueron satisfactorios, la tinción de Gram invariablemente mostró crecimiento de bacilos de tamaño uniforme y negativos, las pruebas bioquímicas también fueron satisfactorias.

En el cuadro 4 se proporcionan los valores obtenidos al muestrear los matraces de uno de los cultivos en volúmenes grandes, a cada matraz corresponde un valor. Los testigos se realizaron con medios de cultivo en el cual no se inoculó E. coli. En este estudio se descartaban los ratones mal inyectados, es decir el colorante azul de Evans funcionó muy bien para visualizar si la inyección de la muestra a estudiar se mezclaba con la leche contenida en el estómago de los animales. Se tuvo también cuidado de eliminar aquellos ratones que murieron durante el desarrollo de la prueba.

En el cultivo bacteriano nunca se tuvieron problemas de contaminación; sin embargo, se eliminaron algunos matraces (4) donde el crecimiento fue nulo o escaso.

En el cuadro 5 se presentan los datos obtenidos de la producción de toxina de las cepas 7115 y H-10407 en diferentes medios de cultivo.

Cuadro 4

RESULTADO DE LA PRUEBA DEL RATON LACTANTE

POR MATRAZ CON 2 LITROS DE MEDIO

Lote	Peso real	Relación intestino/ cadáver	Observa ciones
1	Intestino 1.0085 Cadáver 10.5302	0.095	
2	Intestino 0.8503 Cadáver 9.4382	0.090	1*
3	Intestino 1.3577 Cadáver 10.8013	0.125	
4	Intestino 1.0163 Cadáver 10.4333	0.097	
5	Intestino 1.1300 Cadáver 10.4900	0.107	
6	Intestino 0.5165 Cadáver 3.7412	0.138	2*
7	Intestino 0.8503 Cadáver 9.4382	0.090	1*
8	Intestino 1.2200 Cadáver 11.2301	0.108	
9	Intestino 1.1786 Cadáver 11.4386	0.103	
10	Intestino 1.0392 Cadáver 11.1862	0.092	
Tes- tigo	Intestino 1.0938 Cadáver 14.7190	0.074	
Tes- tigo	Intestino 0.5742 Cadáver 10.8340	0.053	

* Número de animales en los cuales al abrir, se demostró que la inyección se administró fuera del estómago, por lo que estos valores no se tomaron como reales

Cuadro 5

CULTIVOS BACTERIANOS EN DIFERENTES MEDIOS
PARA LA EVALUACION DE LA PRODUCCION DE TOXINA

Medios de cultivo	C E P A S		
	7115	H-10407	Testigo
CYE	0.064	0.095	0.063
CAYE	0.071	0.105	0.060
PEPTONA	0.064	0.097	0.062
STAPLES	No probado	0.089	0.069

Los resultados obtenidos de una de las cromatografías en Sephadex G-25 se muestran en la Figura 1. Como se puede observar, la mayor concentración de toxina no corresponde a las fracciones que proporcionaron valores más altos en las lecturas a 275 nm; sin embargo fue repetitivo, por lo que siempre se utilizaron tales fracciones. El hecho de encontrar la toxina en la primera fracción de la cromatografía indica que la adsorción a las esferas de poliestireno es de péptidos muy pequeños. En la Figura 2 se observan los resultados de la cromatografía de intercambio iónico, en donde se encuentra mayor heterogeneidad que en la cromatografía de filtración (Figura 1), y la toxina interacciona fuertemente con la DEAE Sephacel, de tal manera que solamente es posible desprenderla con una molaridad de NaCl de 0.6 M.

Finalmente, los resultados obtenidos en la segunda cromatografía en Sephadex G-25 muestran que la fracción obtenida en la cromatografía de intercambio iónico es bastante homogénea, obteniéndose una fracción principal con pocos contaminantes observados a 275 nm. Este resultado correlaciona muy bien con la prueba del ratón lactante, donde la principal actividad tóxica se localiza exactamente en el componente principal de la muestra (Figura 3).

La homogeneidad encontrada en la cromatografía en G-25 correlaciona perfectamente con los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina la cual muestra que la fracción obtenida al final del método de purificación contiene una sola especie molecular comparativamente a otras muestras que se sometieron a la misma técnica, en las que se observan dos o tres componentes (Figura 4).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Escherichia coli, reconocida como uno de los principales organismos que componen la flora normal del intestino contiene dentro de sus miembros individuos que a su vez constituyen parte de los patógenos involucrados en un gran número de cuadros diarreicos y patologías en otros órganos y sistemas (5,6,10,11,12,13,14,15,40).

A pesar de la importancia que tiene E. coli como agente patógeno para el humano, se desconocen aún muchísimos datos importantes en cuanto a sus mecanismos de patogenicidad (17,29,33,34,36), se conoce poco también de la respuesta inmune local del huésped hacia este parásito (21, 28,29-50), y algo importante también es que no se conocen todos los medios de transmisión del mismo (16,41,42). A lo anterior se suma el hecho de que a la fecha las técnicas que permiten detectar estas bacterias son tan sofisticadas y caras (58,59,60,62,64,67,69,75), que la mayoría de ellas solamente pueden realizarse en laboratorios especializados, dando por consecuencia el que no se pueda saber con certeza la etiología de la mayoría de los casos de diarrea que se presentan en un hospital.

A pesar de todos estos renglones oscuros en la relación humano-E. coli, la importancia de E. coli como patógeno y asimismo de ST como factor de virulencia se pueden inferir fácilmente, dado que los datos epidemiológicos que existen son contundentes. De ahí se deriva la importancia de contar con una prueba de laboratorio para el diagnóstico de esta cepa, la cual sea sencilla, específica y barata, existen distintas pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ETEC (58,59,60,62,64,67,69,75). El que haya tantas pruebas es un indicio de que ninguna de

ellas satisface los requisitos mencionados; las más utilizadas actualmente presentan todos los problemas inherentes a las pruebas biológicas, en cuyos resultados influyen grandemente factores tales como temperatura ambiente, tiempo de desarrollo de la prueba, edad de los animales y otros factores que no se han explorado como son el pH de las muestras a probar, concentración de sales, etc.

Desafortunadamente, la concentración de toxina que elaboran estas bacterias es baja y por lo mismo se dificulta su purificación a homogeneidad, lo cual es un requisito importante y necesario para poder tener anticuerpos contra la toxina y desarrollar una prueba inmunológica con las características mencionadas.

En el presente trabajo se seleccionó el medio de cultivo más simple, que permitiese la síntesis de toxina, aunque la cepa inicialmente se creció en varios para ver cual permitía la síntesis mayor de acuerdo a la prueba del ratón lactante, finalmente se decidió por el más simple para facilitar el objetivo, aunque no fue el que en la prueba realizada en el laboratorio diera mejores rendimientos (Cuadro 5). Posteriormente, los cultivos realizados dieron buenos resultados en cuanto a producción de toxina, como se observa en el Cuadro 4.

En el primer paso de la purificación, aunque no se pudo cuantificar la toxina obtenida por carencia de ratones, las esferas de poliestireno funcionaron bien, de tal manera que la toxina se puede eluir con la solución de metanol y esto permite reducir 30 veces los volúmenes de trabajo.

Las características de las cromatografías realizadas difieren de las informadas previamente (77); es interesante notar que al realizar la cromatografía en Sephadex

G-25, la toxina se eluye en los primeros tubos, por lo cual se concluye que los péptidos fijados por las esferas de Bio beds son realmente pequeños. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 1, existen otros muchos componentes que se eluyen después de la toxina. Junto con la toxina se encuentran otros péptidos contaminantes (dado que no presentan toxicidad), los cuales se observan fácilmente en la Figura 2, donde se encuentra también que la adsorción de los diferentes péptidos se realiza con diferente intensidad, aunque por las características encontradas en la prueba de toxicidad no se puede descartar la posibilidad de que las moléculas de ST se ligen de manera heterogénea a la DEAE; finalmente, la mayor cantidad de toxina se desprende con el gradiente salino de 0.6 M y después sí se encuentra homogeneidad en la fracción obtenida, como se demuestra en las Figuras 3 y 4.

Se concluye entonces que de acuerdo a la metodología usada es factible purificar STa y actualmente se está en posibilidad de acoplarla a un acarreador para tenerla en forma inmunogénica, obtener anticuerpos contra ella y montar una prueba inmunológica que permita detectarla.

G-25, la toxina se eluye en los primeros tubos, por lo cual se concluye que los péptidos fijados por las esferas de Bio beds son realmente pequeños. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 1, existen otros muchos componentes que se eluyen después de la toxina. Junto con la toxina se encuentran otros péptidos contaminantes (dado que no presentan toxicidad), los cuales se observan fácilmente en la Figura 2, donde se encuentra también que la adsorción de los diferentes péptidos se realiza con diferente intensidad, aunque por las características encontradas en la prueba de toxicidad no se puede descartar la posibilidad de que las moléculas de ST se ligen de manera heterogénea a la DEAE; finalmente, la mayor cantidad de toxina se desprende con el gradiente salino de 0.6 M y después sí se encuentra homogeneidad en la fracción obtenida, como se demuestra en las Figuras 3 y 4.

Se concluye entonces que de acuerdo a la metodología usada es factible purificar STa y actualmente se está en posibilidad de acoplarla a un acarreador para tenerla en forma inmunogénica, obtener anticuerpos contra ella y montar una prueba inmunológica que permita detectarla.

Figura 1

PERFIL DE LA ELUCION DE SEPHADEX G-25

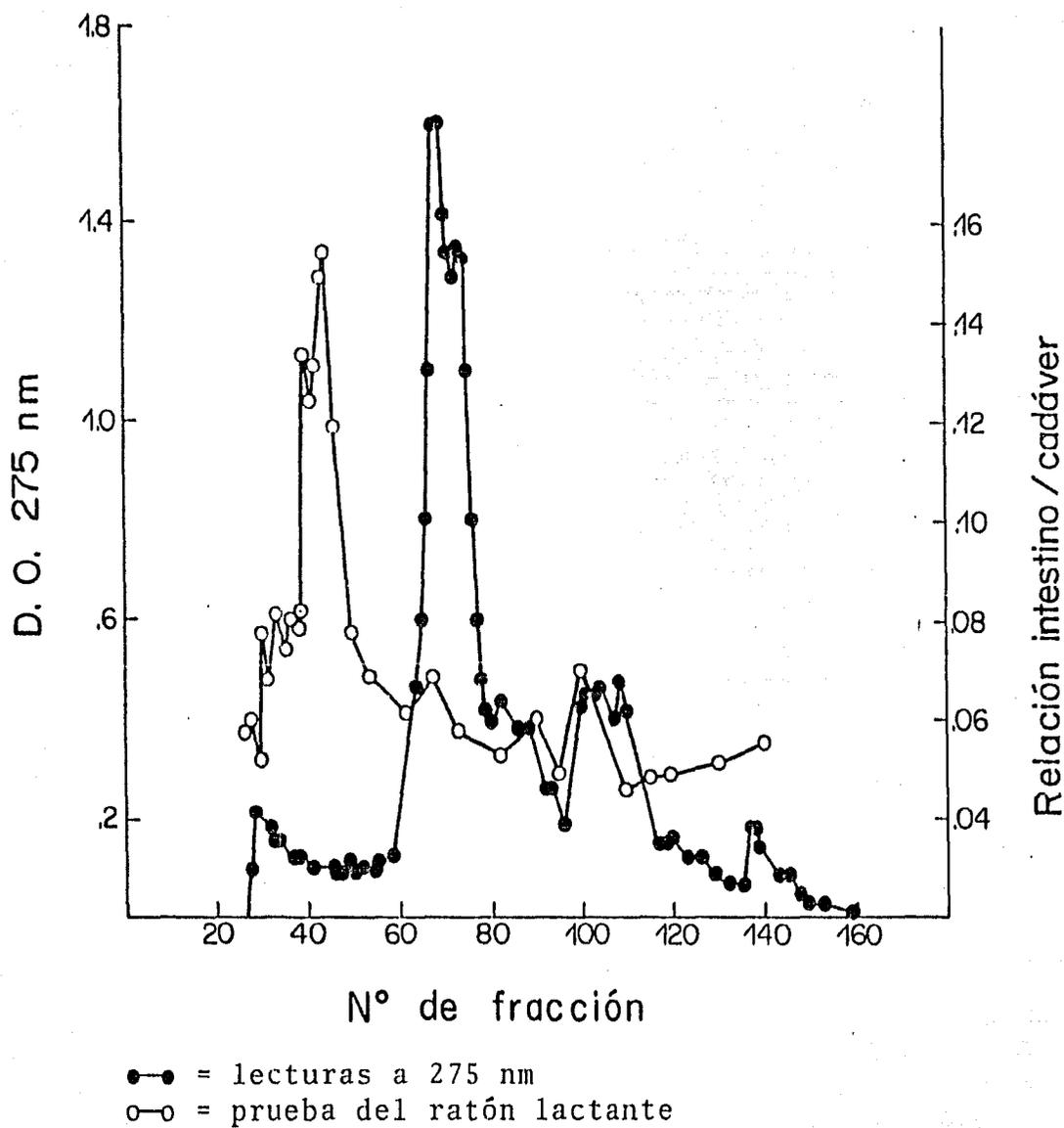
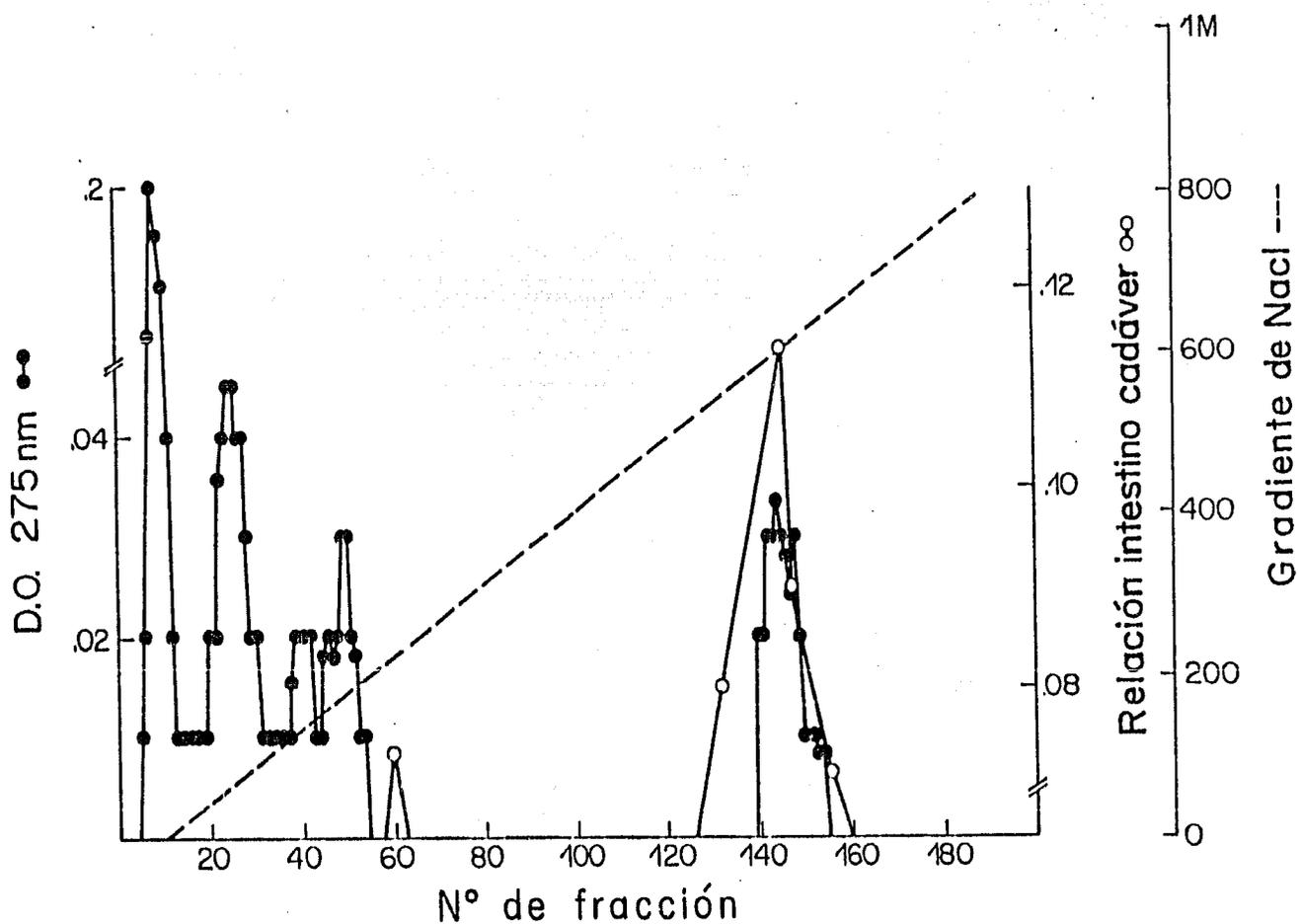


Figura 2

PERFIL DE LA ELUCION DE DEAE SEPHACEL

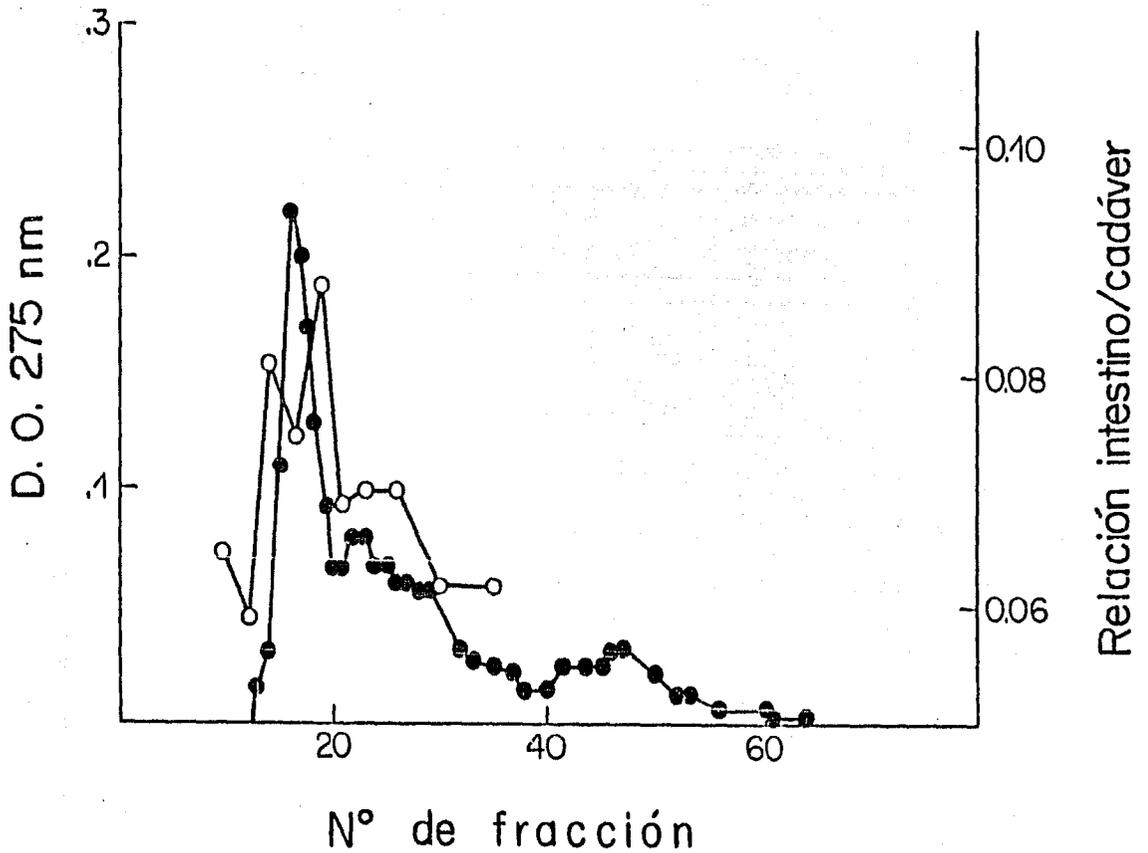


●● = lectura a 275 nm
○○ = prueba del ratón lactante

Figura 3

PERFIL DE LA ELUCION DE LA CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX

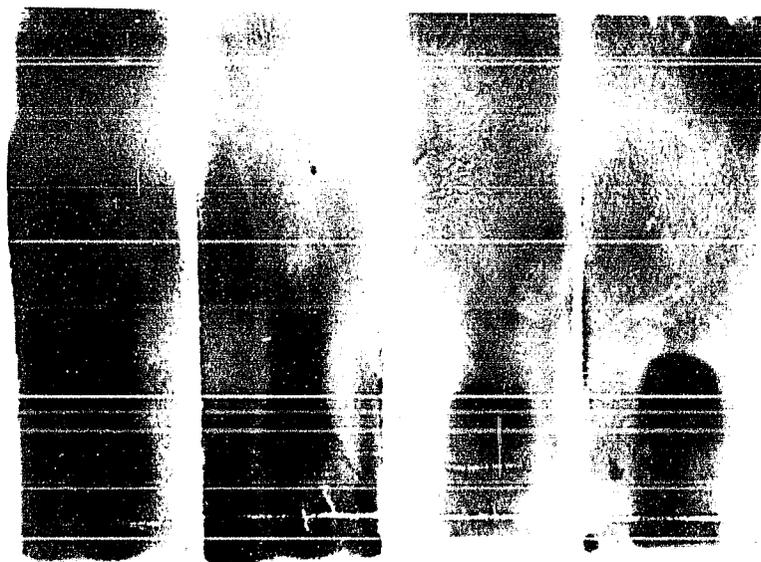
G-25 GRUESO



●-● = lectura a 275 nm
○-○ = prueba del ratón lactante

Figura 4

CROMATOGRAFIA EN PLACA DE CELULOSA



- a) Muestra del eluyente de la columna de Sephadex G-25 fino
- b) Muestra del eluyente de la columna de DEAE Sephacel
- c) Muestra del eluyente de la columna Sephadex G-25 grueso

BIBLIOGRAFIA

1. Rowe, B.: The role of Escherichia coli in gastroenteritis. Clin. Gastroenterol. 8: 625-644, 1979.
2. Bryant, J.: Health and the developing world. New York, Cornell University Press, 1969.
3. John, D., Snyder & Michael, Merson, H.: The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease. A review of active surveillance data. Bull. W.H.O. 60(4): 605-613, 1982.
4. Instituto Mexicano del Seguro Social. Epidemiológico Semanal de los Estados y del Valle de México. 4: 52, 1981.
5. Kauffmann, F.: The serology of the coli group. J. Immunol. 57: 71-100, 1947.
6. Ewing, W.H.: Sources of E. coli cultures that belonged to OA6 groups associated with infantile diarrheae disease. J. Infect. Dis. 110: 114-120, 1962.
7. Gyles, E.L. and Barnum, D.A.: Escherichia coli in ligated segments of pig intestine. J. Path. Bact. 94: 189-194, 1967.
8. Taylor, I. and Betterlheim, K.A.: The action of chloroform - killed enteropathogenic Escherichia coli on ligated rabbit - gut segments. J. Gen. Microbiol. 42: 309-313, 1966.
9. Smith, H.W. and Halls, S.: Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs

- and rabbits. *J. Path. Bact.* 93: 499-529, 1967.
10. Smith, H.R., Scotland, S.M., Rowe, B.: Plasmids that code for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strain of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 40: 1236-1239, 1983.
 11. Mullany, P., Field, A.M., McConnel, M.M., Scotland, S.M., Smith, H.R., Rowe, B.: Expression of plasmids coding for colonization factor antigen II (CFA/II) and enterotoxin production in Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3591-3601, 1983.
 12. Smyth, C.J.: Serologically distinct fimbriae on enterotoxigenic Escherichia coli of serotype 06:116 or H. *FEMS Lett.* 21: 51-57, 1984.
 13. Curwith, M.J., Wiseman, D.A., Chow, P.: Clinical and laboratory assessment of the pathogenicity of serotyped enteropathogenic Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 135: 736-743, 1977.
 14. Rowe, B.: The role of Escherichia coli in gastroenteritis. *Clin. Gastroenterol.* 1(8): 625-644, 1979.
 15. Silva, R.M., Toledo, M.R.F., Trabulsi, L.R.: Biochemical and cultural characteristics of invasive Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 11: 441-444, 1988.
 16. DuPont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., Sheahan, D.G., LaBree, E.H., Kalas, J.P.: Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285: 1-9, 1971.
 17. Hale, T.L., Sansonetti, P.J., Schad, P.A., Austin,

- S., Formal, S.B.: Characterization of virulence plasmids and plasmid associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40: 340-350, 1983.
18. Boileau, C.R., R'Hantville, H.M., Sansonetti, P.J.: DNA hybridization technique to detect shigella species and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 959-961, 1984.
19. Pál, T., Pácsa, A.S., Emödy, I., Voros, S., Sélley, E.: Modified enzyme linked immunosorbent assay for detecting enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent *Shigella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 21:415-418, 1985.
20. Harris, J.R., Wachsmuth, I.K., Davis, B.R., Cohen, M.L.: High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect. Immun.* 37: 1295-1298, 1982.
21. Noda, M., Nakabayashi, N., Yutsudo, T., Hirayama, T., Takeda, Y.: Physico-chemical and biological properties of the purified Shiga-like toxin from *Escherichia coli* 0157:H7. *Toxicon.* 23: 600, 1985.
22. Scotland, S.M., Smith, H.R., Rowe, B.: Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* 0157. *Lancet* 2: 885-886, 1985.
23. Karch, H., Heeseman, J., Laufs, R., O'Briend, A.D., Tacket, C.O., Levine, M.M.: A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* (in press).

24. Wade, W.G., Thor, B.T., Evans, N.: Cytotoxic enteropathogenic Escherichia coli. Lancet 2: 1235-1236, 1979.
25. Centers for disease control. Hemolytic-Uremic syndrome associated with Escherichia coli 0157:H7 enteric infections - United States, 1984. MMWR 34: 20-21, 1985.
26. Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S., Lior, H.: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing Escherichia coli. J. Infect. Dis. 151: 775-782, 1985.
27. Levine, M.M.: Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Of. Infect. Dis. 155: 377-389, 1987.
28. Cravioto, A., Ortega, R., Rodríguez, P., Reyes, R.E., López, D., Fernández, G.: Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el período neonatal. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. 42: 287-296, 1985.
29. Toledo, M.R.F., Alvariza, M.C.B., Murahovschi, J., Ramos, S.R.T.S., Trabulsi, L.R.: Enteropathogenic Escherichia coli serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect. Immun. 39: 586-589, 1983.
30. Cravioto, A., Cross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B.: An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belongind to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Current Microbiology 3: 95-99, 1979.

31. Ulshen, M.H., and Rollo, J.L.: Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man - another mechanisms. N. Engl. J. Med. 302: 99-101, 1980.
32. Rothbaum, R., McAdams, A.J., Giannella, R., and Partin, J.C.: A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology 83: 441-454, 1982.
33. Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L., O'Briend, A.D.: The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis. 152: 550-559, 1985.
34. Nataro, J.P., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Bravo, N., Levine, M.M.: Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. J. Infect. Dis. 152: 560-565, 1985.
35. Cleary, T.G., Mathewson, J.J., Faris, E., Pickering, L.K.: Shigalike cytotoxin production by enteropathogenic Escherichia coli serogroups. Infect. Immun. 47: 335-337, 1985.
36. Mathewson, J.J., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Morgan, D.R., Thornton, S.A., Wood, L.V., Ericsson, C.D.: A newly recognized cause of travelers' diarrhea: heteroadherent Escherichia coli. J. Infect. Dis. 151: 471-475, 1985.
37. Black, R.E., Brown, K.H., Becker, S., Abdul Alim, A.R.M., Huq, I.: Longitudinal studies of infectious

- diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. *Am. J. Epidemiol.* 115: 315-324, 1982.
38. Sack, D.A., Kaminsky, D.C., Sack, R.B., Itotia, J.N., Arthur, R.R., Kapikian, A.Z., Ørskov, F., Ørskov, I.: Prophylactic doxycyclin- for travelers' diarrhea. Results of a double-blind study of Peace Corps Volunteers' in Kenya. *N. Engl. J. Med.* 298: 758-763, 1978.
39. Black, R.E., Merson, M.H., Rahman Asmm, Yunus, M., Alim Arma, Huq, I., Yolken, R.H., Curlin, G.T.: A two year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 142: 660-664, 1980.
40. Donta, S.T., Wallace, R.B., Whipp, S.C., Olarte, J.: Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in Mexican children. *J. Infect. Dis.* 135: 482-485, 1977.
41. Gross, R.J.: Escherichia coli diarrhoea. *J. Infect.* 7: 177-192, 1983.
42. Rosenberg, J.L., Lopan, J.P., Wachsmutih, I.K., Wells, J.G., Gangarosa, E.J., Guerrant, R.L., Sack, D.A.: Epidemic diarrhea at crater lake from enterotoxigenic Escherichia coli. *Am. Intern. Med.* 86: 714-718, 1977.
43. Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., Wells, J.G., Feeley, J.C., Sack, R.B., Creech, W.B., Kapikian, A.Z., Gangarosa, E.J.: Trabelers' diarrhea in México. A prospective study of physician and family

members attending a congress. N. Eng. J. Med. 294:
1299-1305, 1976.

44. Smith, H.W. and Linggood, M.A.: Observation on the pathogenic properties of the K-88, Hly and λ plasmids of Escherichia coli with particular reference to porcine diarrhoea. J. Med. Microbiol. 4: 467-485, 1971b.
45. Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J.Jr., Chase, D.G., Gorbach, S.L.: Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 12: 656-667, 1975.
46. Evans, D.B., Evans, D.J.Jr., Tjoa, W.S., DuPont, H.L.: Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. 19: 727-736, 1978.
47. Levine, M.M., Ristaino, P., Sack, R.B., Kaper, J.B., Ørskov, F., Ørskov, I.: Colonization factor antigens I and II and type I somatic pili in enterotoxigenic Escherichia coli: relation to enterotoxin type. Infect. Immun. 39: 889-897, 1983.
48. Evans, D.G., Evans, D.J.Jr.: New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. Infect. Immun. 21: 638-647, 1978.
49. Moon, H.W., Kohler, E.M., Schenider, R.A. and Whipp, S.C.: Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88- negative

- enterotoxigenic Escherichia coli from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27: 222-230, 1980.
50. Evans, D.G., Graham, D.Y., Evans, D.J.Jr., Opekun, A.: Administration of purified colonization factor antigens (CFA/1) of enterotoxigenic Escherichia coli to volunteers. Response to challenge with virulent enterotoxigenic Escherichia coli. *Gastroenterology* 87: 934-940, 1984.
51. Robertson, D.C., McDonel, J.L. and Dorner, F.: E. coli heat - labile enterotoxin. *Pharmac. Ther.* Vol. 28: 303-339, 1985.
52. Reis, M.H.L., Decastro, A.F.P., Toledo, M.R.F. and Trabulski, L.R.: Production of Heat-stable enterotoxin by the 0128 serogroup of E. coli. *Infect. Immun* 24: 289-290, 1979.
53. Scotland, S.M., Day, N.P., Cravioto, A., Thomas, L.V. and Rowe, B.: Production of heat stable enterotoxins by strains of Escherichia coli belonging to serogroups 044, 0114, and 0128. *Infect. Immun.* 31: 500-503, 1981.
54. McConnell, M.M., Smith, H.R., Willshaw, G.A., Scotland, S.M. and Rowe, B.: Plasmids coding for heat-labile enterotoxin production isolated from Escherichia coli 078: comparison of properties. *J. Bact.* 143: 158-167, 1980.
55. Holmgren, J., Söderlind, O. and Wadström, T.: Cross-reactivity between heat-labile enterotoxins Vibrio cholerae and Escherichia coli in neutralization test in rabbit ileum and skin. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 81: 757-762, 1973.

- enterotoxigenic Escherichia coli from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27: 222-230, 1980.
50. Evans, D.G., Graham, D.Y., Evans, D.J.Jr., Opekun, A.: Administration of purified colonization factor antigens (CFA/1) of enterotoxigenic Escherichia coli to volunteers. Response to challenge with virulent enterotoxigenic Escherichia coli. *Gastroenterology* 87: 934-940, 1984.
51. Robertson, D.C., McDonel, J.L. and Dorner, F.: E. coli heat - labile enterotoxin. *Pharmac. Ther.* Vol. 28: 303-339, 1985.
52. Reis, M.H.L., Decastro, A.F.P., Toledo, M.R.F. and Trabulski, L.R.: Production of Heat-stable enterotoxin by the 0128 serogroup of E. coli. *Infect. Immun* 24: 289-290, 1979.
53. Scotland, S.M., Day, N.P., Cravioto, A., Thomas, L.V. and Rowe, B.: Production of heat stable enterotoxins by strains of Escherichia coli belonging to serogroups 044, 0114, and 0128. *Infect. Immun.* 31: 500-503, 1981.
54. McConnell, M.M., Smith, H.R., Willshaw, G.A., Scotland, S.M. and Rowe, B.: Plasmids coding for heat-labile enterotoxin production isolated from Escherichia coli 078: comparison of properties. *J. Bact.* 143: 158-167, 1980.
55. Holmgren, J., Söderlind, O. and Wadström, T.: Cross-reactivity between heat-labile enterotoxins Vibrio cholerae and Escherichia coli in neutralization test in rabbit ileum and skin. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 81: 757-762, 1973.

56. Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A. and Newsome, P.M.: Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 526-531, 1978.
57. Waldma, S.A., Kuno, T., Kamisaki, Y., Chang, L.Y., Gariepy, J., O'Hanley, P., Schoolnik, G., and Murad, F.: Intestinal receptor for heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* in tightly compled to a moveI form of particulate guanylate cyclase. *Infect. Immun.* 51: 320-326, 1986.
58. Smith, H.W. and Halls, S.: Observations by the ligeted intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bact.* 93: 499-529, 1967a.
59. Burgess, M.N., Cowley, C.M., Melling, J., Mullan, N.A. and Newsome, P.M.: Assay of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in infant rabbits. *J. Med. Microbiol.* 12: 291-302, 1979.
60. Klipstein, F.A., Life, C. and Engert, R.F.: Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by in vivo perfussion in the rat jejunum. *Infect. Immun.* 14: 1004-1010, 1976.
61. Guerrant, R.L., Ganculy, U., Casper, A.G., Moore, E.J., Pierce, N.E. and Carpenter, D.C.: Effect of *Escherichia coli* on fluid transport across canine small bowel. Mechanism and time course with enterotoxin and whole bacterial cells. *J. Clin. Invest.* 52: 1707-1714, 1973.
62. Evans, D.G., Evans, D.J. and Gorbach, S.L.:

- Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay infect. Immun. 8: 731-735, 1973.
63. Donta, S.T. and Smith, D.M.: Stimulation of steroidogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. Infect. Immun. 9: 500-505, 1974.
64. Guerrant, R.L., Brunton, L.L., Schnaitman, T.C., Rubhun, L.L. and Ghman, A.G.: 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.
65. Speirs, J.I., Stavric, S. and Konowalchuk, J.: Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. Infect. Immun. 16: 617-622, 1977.
66. Kantor-H.S., Tao, P. and Wisdom, C.: Action of *Escherichia coli* enterotoxin: Adenylate cyclase behavior of intestinal epithelial cells in culture. Infect. Immun. 9: 1003-1010, 1974b.
67. Gilligan, P.H. and Robertson, D.C.: Nutritional requirements for synthesis of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 23: 99-107, 1979.
68. Dorner, F. and Mayer, P.: *Escherichia coli* enterotoxin: stimulation of adenylate cyclase in broken-cell preparations. Infect. Immun. 11: 429-435, 1975.
69. Moss, J.M. and Richardson, S.: II. Activation of adenylate cyclase by heat labile *Escherichia coli*

- enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyl-transferase activity similar to that of cholera toxin. *J. Clin. Invest.* 62: 271-285, 1978.
70. Greenberg, H.B., Sack, D.A., Rodríguez, W., Sack, R.B., Wyatt, R.G., Kakica, A.R., Horswood, R.L., Chanock, R.M. and Kapikian, A.Z.: Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 17: 541-545, 1977.
71. Evans, D.J.Jr., Ruiz-Palacios, G., Evans, D.G., DuPont, H.L., Pickering, I.K. and Olar, H.J.: Humoral immune response to the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in naturally acquired diarrhea and antitoxin determination by passive immune hemolysis. *Infect. Immun.* 16: 781-788, 1977b.
72. Brill, B.M., Waislauskas, B.L. and Richardson, S.H.: Adaptation of the staphylococcal conagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 49-55, 1979.
73. Honda, T., Taga, S., Takeda, Y. and Miwai, T.: Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 13: 1-5, 1981.
74. Finkelstein, R.A., Yang, Z., Moseley, S.L. and Moon, H.W.: Rapid Latex particle agglutination test for *Escherichia coli* strains of porcine origin producing heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1417-1418, 1983.

75. Moseley, S.L., Huq, L., Alim, A.R.M.A., So., M., Samadpour-Motalebi, M. and Falkow, S.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J. Infect. Dis.* 142: 892-898, 1980.
76. Dean, A.G., Ching, Y., Williams, R.G. and Harden, L.B.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Inf. Dis.* 125: 407-411, 1972.
77. Staples, S.J., Asher, S.E. and Giannella, R.A.: Purification and characterization of heat stable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* 255: 4716-4721, 1980.