

11661

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

DETECCION DE LA TOXINA LT DE
Escherichia coli EN QUESO FRESCO.

T E S I S

Q U E P R E S E N T A :
Q.F.B. MA. GUADALUPE AMAYALEON

PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R A E N C I E N C I A S
(AREA MICROBIOLOGIA)

ASESOR:
M. en C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

COASESOR:
DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

CUAUTITLAN IZCALLI EDO DE MEXICO

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274238



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE PÓSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES - Cuautitlán
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "DETECCION DE LA TOXINA LT DE Escherichia coli EN QUESO FRESCO".

que presenta el (la) alumno (a) MARIA GUADALUPE AMAYA LEON

con Núm. de cuenta 7300815-2 N° Exp. 100931029
para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán, Izcalli a 18 de noviembre de 1999

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

Claradnes Alvarez

VOCAL: DRA. LIDIA MOTA DE LA GARZA

Lidia Mota de la Garza

SECRETARIO M.C. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

Guillermo Valdivia And

1er. SUPL. M.C. VIRGINIA LARA SAGAHON

Virginia Lara Sagahon

2do. SUPL. DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS

Carlos Eslava Campos

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de **Bacteriología e Inmunología** de la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán

AGRADECIMIENTOS:

De manera muy especial a la **M. en C. Clara Inés Alvarez Manrique**, por la dirección de este trabajo y su sincera amistad.

Al **Dr. Juan Antonio Montaráz Crespo** por su apoyo y valiosa asesoría.

A la **Q.F.B. Ma. Eugenia Rosales** por su colaboración y comentarios en los aspectos técnicos de Inmunología.

A la **M. en C. Virginia Lara Sagahon** por sus interesantes aportaciones.

A **Nacho**, por su gran disposición para el trabajo en el laboratorio de Bacteriología.

A todos los profesores y compañeros del posgrado.

Al Honorable jurado:

- *M. en C. Clara Inés Alvarez Manrique*
- *Dra. Lidia Mota de la Garza*
- *M. en C. Guillermo Valdivia Anda*
- *M. en C. Virginia Lara Sagahon*
- *Dr. Carlos Eslava Campos*

Por sus acertadas correcciones y sugerencias.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Dedicado a:

Al creador del universo.

Al recuerdo de mi maravilloso padre.

A mi madre y hermanas.

A mis adorables hijos: "Alex y Agus"

A mi esposo con todo mi amor.

A Mis cuñados y sobrinos

Al Sr. Agustín, Sra. Martha y Lupita

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	CFAs. de cepas de ETEC de humanos.	11
Tabla 2	Serogrupos específicos de <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).	15
Tabla 3	Pruebas para la detección de la toxina LT.	17
Tabla 4	Oligonucleótidos de <i>E. coli</i> Enterotoxigénico (ETEC).	19
Tabla 5	Mecanismos de defensa en infecciones a nivel gastrointestinal.	20
Tabla 6	Características de las enterotoxinas de <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Escherichia coli</i> .	32
Tabla 7	Tabla de frecuencia de la toxina LT, por prueba del dot-ELISA con inactivación de endoperoxidasas en quesos frescos de diferentes fuentes.	62
Tabla 8	Coliformes fecales encontrados en los quesos analizados positivos a la toxina LT de <i>E. coli</i> .	64
Tabla 9	Actividad biológica de la toxina LT a partir de sobrenadantes De los quesos (+) a LT por dot-ELISA.	65

INDICE DE FIGURAS.

FIG. A	Fimbria CFA/II de ETEC.	10
FIG. B	Genética de las fimbrias de <i>E. coli</i> Enterotoxigénica ETEC.	13
FIG. C	Diagrama del balance de Líquido en el tracto gastrointestinal en un ducto normal.	21
FIG. D	Modo de penetración de las toxinas LT de <i>E. coli</i> y <i>V. cholerae</i> .	24
FIG. E	Reacción de ADP – ribosilación.	26
FIG. F	Mecanismo de acción de las toxinas termolábiles de <i>E. coli</i> y <i>Vibrio cholerae</i> .	28
FIG. G	Representación esquemática del modo de acción de la toxina LT.	29
FIG. H	Patrón electroforético de la toxina LT semipurificada obtenida.	57
FIG. I	Reconocimiento de la antitoxina LT por la LT obtenida y por la toxina de <i>V. cholerae</i> C852.	59
FIG. J	Prueba de actividad biológica de la toxina LT de <i>E. coli</i> .	66

INDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1	Curva patrón de proteínas.	56
Gráfica 2	Curva patrón de pesos moleculares.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	=	Nanómetros
ug	=	Microgramos
mg	=	Miligramos
cm	=	Centímetros
mA	=	Miliamper
Kd	=	Kilodalton
Kg	=	Kilogramo
PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa.
GTP	=	Guanosin trifosfato
ATP	=	Adenosin trifosfato
IET	=	Inmunoelctrotransferencia
g	=	Gramos
ul	=	Microlitros
TBS	=	Solución amortiguadora de trietanol amina
DO	=	Densidad óptica
SSF	=	Solución salina fisiológica
rpm	=	Revoluciones por minuto
PBS	=	Buffer de fosfatos
BHI	=	Infusión cerebro corazón
NAD ⁺	=	Nicotin adenin dinucleótido
ELISA	=	Ensayo inmunoenzimático
hr	=	Horas
mm	=	Milímetros
D	=	Daltons
AMP _c	=	Adenosin monofosfato ciclico
SDS	=	Duodecil sulfato de sodio
PM	=	Peso molecular
Log	=	Logaritmo
Rf	=	Coficiente de movilidad relativa
ASB	=	Albúmina sérica bovina
ml	=	Mililitros
ufc	=	Unidades formadoras de colonias
Caye	=	Casaminoácidos extracto de levadura.
LT	=	Termolábil

LISTA DE ABREVIATURAS

ST	=	Termorresistente
EAF	=	<i>E. coli</i> factor adherencia.
CFAs	=	Fimbrias de colonización
CS	=	Antígeno de colonización de superficie.
U.S.A.	=	Estados Unidos Americanos.
SIM	=	Sulfhídrico, Indol, Movilidad.
M	=	Molar
PH	=	Potencial de iones hidrógeno.
r.p.m.	=	Revoluciones por minuto.
g.	=	Unidades de gravedad.
NC	=	Nitrocelulosa
LIA	=	Agar de hierro lisina
TSI	=	Agar de hierro triple azúcar.
MR-VP	=	Rojo de metilo y Voges Proskauer.
MIO	=	Movilidad, Indol, Ornitina.
SIM	=	Sulfhídrico, Indol y Motilidad
OF	=	Oxidación y Fermentación

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fué detectar la toxina LT de *E. coli* directamente en quesos frescos por la técnica del dot-ELISA. Para lograr esto se obtuvo la toxina LT a partir de una cepa de *E. coli* H10407 donada por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica INDRE con capacidad toxigénica probada en cultivo de células Vero y en pruebas de hibridación como "Colony Blot" y PCR. La bacteria se cultivó en medio de casaminoácidos extracto de levadura CAYE, la extracción y pureza de la toxina se verificó por medio de un corrimiento electroforético, comparándola con la toxina de *Vibrio cholerae*. Se produjo una antitoxina LT en conejo. La técnica inmunoenzimática empleada (dot-ELISA) fué estandarizada en quesos frescos producidos a nivel de laboratorio e incubados con una dosis conocida de *E. coli* LT (+), y mantenidos a temperatura ambiente, refrigeración y 37°C. Se realizó un muestreo de 96 quesos frescos de tianguis, mercados y tiendas de autoservicio, éstos fueron macerados y los sobrenadantes se probaron con el dot-ELISA. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 5/36 de tianguis, 4/30 de mercado y 5/30 de supermercados dieron un resultado positivo para LT, correspondiendo a un 14.5% del total de muestras, coincidiendo los resultados con la prueba intradérmica (+) en conejo. La positividad de LT en los quesos coincidió con la presencia de coliformes fecales en ellos, aislándose las bacterias *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. hafniae*, *Klebsiella spp.* *Citrobacter spp.* que posiblemente están produciendo LT relacionada antigénicamente con *E. coli*.

Por los resultados obtenidos se puede decir que existe un riesgo potencial de contraer diarrea al consumir quesos frescos que no hayan sido manipulados higiénicamente desde su producción hasta su consumo, particularmente tratándose de niños, personas mal nutridas o ancianos.

ABSTRACT

The objective of this work was to detect the toxin LT of *E. coli* in fresh cheese by dot-ELISA technic. In order to get this work, the toxin LT was got from a *E. coli* strain donate by Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica H10407 and was tested on Vero cell culture in hibridism test like "colony blot" and PCR. The bacteria was cultivated in Caye medium. The extraction and purity of the toxin was verificated by electrophoresis, compared with the toxin of *Vibrio cholerae*. Antitoxin LT was produced in a rabbit. The immune enzyme technic (dot-ELISA) was standardized in cheese produced in a laboratory and were inoculated with a known dose of *E. coli* LT (+), and kept in 25°C, 4°C y 37°C.

96 samples of fresh cheeses from street matket, market and supermarket were taken. These were macerated and the supernatans were LT tested by dot-ELISA standarized. The results: positive to LT were 5/30 from street markets, 4/30 from markets and 5/30 from supermarkets. The positive results to LT correspond to 14.5% of the all samples and coincide with presence of fecal coliforms found and *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. hafniae*, *Kelbsiella spp*, *Citrobacter spp* isolated that maybe are producing LT in relation non hygienic with *E. coli*.

According to the results obtained, there is a potencial risk to get diarrohea a when a person eats fresh cheese which they have not handled hygienicly from its production to consumer basically in children, old people or people with deficient nutrition.

INDICE

I	Indice de tablas	I
II	Indice de figuras	II
III	Indice de gráficas	III
IV	Lista de abreviaturas	IV
VI	Resumen	VI
VII	Abstract	VII
I	Introducción.	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Descripción de <i>E. coli</i>	2
1.3	Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	3
1.4	Factores de virulencia o patogenicidad de ETEC productora de LT.	8
1.4.1	Factores de colonización.	8
1.4.1.1	Fimbrias	8
1.4.1.2	Otros factores.	9
1.5	Producción de toxinas	12
1.5.1.	Relación entre la producción de la toxina termolábil y el serotipo en <i>E. coli</i> .	14
1.5.1.2	Detección de la toxina LT "in vivo"	17
1.5.2	Patofisiología de la infección por <i>E. coli</i> enterotoxigénica.	19
1.5.3	Mecanismo de acción de la toxina LT de <i>E. coli</i> (ETEC).	23
1.5.3.1	Penetración de la toxina a la célula.	23
1.5.3.2	Modo de acción de la toxina.	25
1.5.3.3	Efecto de la toxina termolábil sobre la secreción intestinal.	27
1.6	Comparación de la toxina LT y CT y de otras enterobacterias.	31
1.7	Importancia de la toxina LT de <i>E. coli</i> en los alimentos.	34
	Justificación	38
2.	Objetivos	39
2.1	Objetivo general	39
2.2	Objetivos particulares.	39
2.2.1	Producir la toxina LT.	
2.2.2	Purificar y caracterizar la toxina obtenida.	39
2.2.3	Obtener y titular la antitoxina LT producida.	39
2.2.4	Valorar la eficiencia en la detección de la toxina LT mediante las pruebas de Ouchterlony y dot-ELISA.	39

2.2.5	Investigar la presencia de la toxina LT en quesos comerciales.	39
3.	Metodología.	
	Diagrama de trabajo 1	40
	Diagrama de trabajo 2	41
3.1	Material biológico.	42
3.1.1	Cepas bacterianas.	42
3.1.2	Animales.	42
3.1.3	Reactivos.	42
3.1.4	Conjugado.	42
3.1.5	Toxina para <i>Vibrio cholerae</i> .	42
3.2	Medios de cultivo.	42
3.3	Producción de la toxina (LT) de <i>E. coli</i> .	43
3.3.1	Replicación de la cepa toxigénica.	43
3.3.2	Inducción de la liberación de la toxina LT con polymixina B.	44
3.3.3	Precipitación de la toxina con sulfato de amonio.	44
3.3.4	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	44
3.4	Producción de suero hiperinmune.	44
3.5	Titulación de la toxina semipurificada.	45
3.6	Corrimiento electroforético de la toxina semipurificada obtenida.	45
3.6.1	Procedimiento para el corrimiento de las muestras.	45
3.6.2	Tinción de geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio con azul de Coomassie.	46
3.6.3	Deshidratación de los geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio.	46
3.6.4	Curva patrón de movilidad relativa de proteínas	47
3.6.4.1	Cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas.	47
3.7	Transferencia de la toxina LT semipurificada de <i>E. coli</i> y la LT de <i>Vibrio cholerae</i> . en papel de nitrocelulosa.	47
3.7.1	Tinción de negro de amido de las proteínas transferidas.	48
3.8	Titulación del antisuero obtenido a partir de LT semipurificada de <i>E coli</i> por la prueba del dot-ELISA.	49
3.9	Detección de la toxina LT de <i>E. coli</i> en quesos producidos experimentalmente.	49
3.9.1	Obtención del queso experimental.	49
3.9.2	Determinación de coliformes en agar MacConkey.	50
3.9.3	Implementación de la técnica del dot-ELISA e inmuno-difusión en agarosa para detectar toxina LT cruda en cepas de <i>E. coli</i> incubadas a diferentes temperaturas.	50

3.9.3.1	Detección de la toxina LT por dot-ELISA en quesos inoculados con <i>E. coli</i> con y sin inactivación de la peroxidasa endógena.	50
3.9.3.2	Cuantificación de <i>E. coli</i> en quesos inoculados	51
3.9.3.3	Detección de la toxina LT en los quesos por inmunodifusión en agarosa.	51
3.10	Trabajo de campo.	51
3.10.1	Determinación de LT en quesos de tianguis, mercado y supermercado.	52
3.10.2	Aislamiento de bacterias a partir de quesos positivos a LT.	52
3.10.3	Cuantificación de coliformes totales y fecales en quesos de tianguis, mercado y supermercado.	53
3.10.4	Prueba de actividad de la toxina LT "in vivo" a partir de sobrenadantes de quesos positivos a LT.	53
4.	Resultados	54
4.1	Producción de la toxina LT de <i>E. coli</i> .	54
4.2	Corrimiento electroforético de la toxina obtenida.	54
4.3	Producción de la antitoxina.	54
4.3.1	Reacción de la antitoxina obtenida con la toxina LT semipurificada por inmunoelectrotransferencia.	54
4.4	Titulación de la toxina semipurificada.	58
4.5	Titulación de la antitoxina obtenida a partir de la toxina LT semipurificada de <i>E. coli</i> por la prueba del dot-ELISA.	58
4.6	Determinación de la toxina LT de <i>E. coli</i> en quesos producidos experimentalmente.	58
4.6.1	Producción de queso fresco a nivel de laboratorio.	58
4.6.2	Determinación de coliformes en agar MacConkey.	
4.6.3	Implementación de la técnica de dot-ELISA para detectar toxina LT en cepas de <i>E. coli</i> incubadas a diferentes temperaturas.	58
4.6.4	Detección de toxina LT por dot-ELISA y cuantificación de <i>E. coli</i> en quesos inoculados.	60
4.6.5	Determinación de toxina LT por dot-ELISA en quesos con inactivación de peroxidasas endógenas.	60
4.6.6	Prueba de inmunodifusión en gel de agarosa.	60
4.7	Trabajo de campo.	60
4.7.1	Determinación de LT en quesos de tianguis, mercado y supermercado utilizando el antisuero obtenido a partir de LT semipurificada de <i>E. coli</i> .	60

4.8	Aislamiento de cepas de quesos frescos obtenidos de tianguis, mercado y supermercado.	61
4.9	Cuantificación de coliformes totales y fecales en quesos de tianguis, mercado y supermercado.	63
4.10	Prueba de actividad de la toxina LT "in vivo" a partir de sobrenadantes de quesos positivos a LT.	63
5.	Discusión	67
6.	Conclusión	74
7.	Apéndice	75
8.	Bibliografía	80

Los que saben mucho se admiran de pocas cosas,
y los que no saben nada se admiran de todo.

Séneca

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.

La participación de *E.coli* como agente causal de diarreas, se detectó desde el siglo pasado, ya que este microorganismo se ha encontrado tanto en heces de personas sanas como en individuos con diarrea. Es de enorme interés establecer el papel que esta bacteria representa en el desarrollo de diarreas. En 1945 se demostró su participación en la diarrea infantil. (Pérez, 1983)

Desde 1945, se incrementó la evidencia de que *Escherichia coli* puede ser la causa de diarrea en gran cantidad de personas adultas, así como en niños de diversas edades. Se ha encontrado que dentro de las diferentes toxinas que libera este microorganismo, la toxina termolábil (LT), puede ser la causa de esta diarrea. Dicha toxina posee una gran similitud con la toxina LT causante del cólera. (Dupont, 1980)

En Calcuta demostraron la similitud entre la toxina, y la fisiopatología de la diarrea debida a *E. coli* y *V. cholerae*. (Sack y Gorbach, 1971)

Al analizar y estudiar una epidemia de diarrea en soldados británicos se demostró que *E. coli* enterotoxigénica puede ser una causa importante de enfermedad diarreica en el adulto. (Rowe, 1977)

Resultados de investigaciones sobre diarrea, condujeron al descubrimiento de la producción de dos enterotoxinas producidas por *E. coli*, una toxina termolábil (LT) y la otra termoestable (ST), reguladas por un plásmido. La activación de la toxina LT de *E. coli* en la membrana celular de células destruidas dependían de otros factores como NAD,⁺ factores protéicos celulares y de ATP. (Gill, 1976)

En un brote de gastroenteritis, producido por *E. coli* caracterizado por diarreas y dolor abdominal, ocurrido en el hospital metropolitano de San Antonio Texas, de un personal de 300 individuos, en 282 de éstos se detectó la bacteria *E. coli* en heces o en recto, de 54 enfermos se obtuvieron cultivos puros de *E. coli*, y de 45 personas se probó la producción de toxinas ST y LT y todas produjeron toxina LT. Finalmente se observó que el brote se originó

bacteria *E. coli* en heces o en recto, de 54 enfermos se obtuvieron cultivos puros de *E. coli*, y de 45 personas se probó la producción de toxinas ST y LT y todas produjeron toxina LT. Finalmente se observó que el brote se originó por el consumo de agua contaminada y como segunda causa por ingestión de alimentos en un restaurant de comida mexicana en Wisconsin. (Lynsey y col., 1983)

En 1997 González R. y col., en Caracas, Venezuela, realizaron un estudio epidemiológico acerca de diarreas producidas por *E. coli* y encontraron que se presentaba una adherencia significativa a células HEp-2 de *E. coli* aisladas de diarreas, el estudio de 513 niños con diarrea, detectó prevalencia de *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroadherente, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica y se estableció la correlación con serotipos O:H, las *E. coli* aisladas presentaron adherencia agregativa en HEp-2. También se menciona en este estudio que la adherencia agregativa ha sido asociada con diarrea aguda en Chile, y con diarrea persistente en niños de la India, México y Brazil.

En los estudios anteriormente mencionados, podemos observar la importancia que tienen los diferentes grupos de *E. coli* productoras de diarrea, cabe señalar la participación de *Escherichia coli* Enterotoxigénica ETEC específicamente ya que la toxina citada como termolábil aparentemente no prevalece en los alimentos procesados a elevadas temperaturas (100°C). Sin embargo puede presentarse en alimentos frescos o con deficiencias en el almacenamiento.

1.2 Descripción de *E. coli*.

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae y a la tribu Escherichia cuyo habitat es el tracto digestivo del hombre y animales. (Betleheim K. A., 1994) Fué descubierta por Escherich en 1886, durante sus investigaciones sobre la composición de la flora bacteriana intestinal normal del recién nacido. En Inglaterra, en los años 1945-1951 se aislaron cepas de *E. coli* a partir de heces diarreicas en niños y algunas de estas fueron patógenas.

Esta bacteria permanece generalmente en intestino sin causar daño, solo cuando el hospedero se encuentra inmunodeprimido, o las barreras intestinales son violadas, puede causar infección. Su alta capacidad de adaptación la hace producir un amplio espectro de enfermedades en humanos. Infecciones

infección por cepas patógenas de *E. coli* se presentan tres síndromes clínicos: a) infección en tracto urinario, b) sepsis / meningitis y c) enterico / enfermedad diarreica.

E. coli puede aislarse fácilmente en medios selectivos a temperaturas de 37° C en condiciones aeróbicas. La bacteria se desarrolla sin dificultad en agar Mac Conkey o en agar eosina azul de metileno, lo que permite la diferenciación por sus características morfológicas coloniales. (Balows, 1991)

Las enterobacterias son generalmente identificadas por reacciones bioquímicas. Estas pruebas pueden elaborarse en tubos de cultivo o usando equipos comerciales.

1.3 Clasificación de *Escherichia coli*.

Existen los grupos denominados:

- Escherichia coli* Enteropatógena. (EPEC)
- Escherichia coli* Enterohemorrágica. (EHEC)
- Escherichia coli* Enteroagregativa. (EAaggEC)
- Escherichia coli* Uropatógena. (UPEC)
- Escherichia coli* Neonatal Meningitis. (NMEC)
- Escherichia coli* Enterotoxigénica. (ETEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC):

Estudios por Bray en Scotland en los años 40's establecieron que tipos de *E. coli* serológicamente distinguibles, podrían ser la causa de gastroenteritis infantil. El esquema de serotipificación de Kauffman, permitió reconocer los serotipos más frecuentemente asociados con diarrea infantil, los cuales se han denominado serotipos EPEC. En el reino unido, en los años 60's, fueron reportados numerosos casos de gastroenteritis con deshidratación. En la actualidad se reportan los siguientes: 026:H11, 026:NM, 055:NM, 055:H6, 055:H7, 086:NM, 086:H34, 086:H2, 0111:NM, 0111:H2, 0111:H12, 0111:H21, 0114:H2, 0119:H6, 0125ac:H21, 0128ab:H2, 0142:H6 y 0158:H23, como causantes de diarrea.(Zinsser, 1994)

Resultados similares fueron observados en otros países europeos y en Norte América. Por lo tanto desde entonces EPEC ha sido aceptada como causa mayor de diarrea infantil en países en desarrollo.

EPEC se caracteriza por adherirse a la mucosa intestinal, atacando y destruyendo las microvellosidades de la membrana de células en borde de

cepillo. Lo anterior se ha observado en biopsias de pacientes o animales infectados, situación que ha sido reproducida, en cultivos celulares. (Jerse A.E., 1990)

Cravioto y col. (1979), observaron su adherencia a células Hep-2, la cual más tarde se describió como localizada (LA) es decir se observaban agregados de bacterias en la superficie de las células Hep-2. (Scaletzky, 1984)

Los cambios marcados del citoesqueleto incluyen la acumulación de actina polimerizada. Se han visto bacterias adherentes por debajo de las células en una estructura parecida a un pedestal, esas estructuras pueden extenderse por arriba de 10 micrómetros fuera de las células epiteliales como parecidas a pseudópodos. (Moon, 1983) Estas lesiones son diferentes a las de las cepas de *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) y a las ocasionadas por *Vibrio cholerae*, en los cuáles los organismos se adhieren y no causan destrucción de microvellosidades o polimerización de la actina. (Moon, 1983)

Cepas pertenecientes a los serogrupos O26, O111 y O128 han surgido recientemente y se han denominado *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). (Giammanco, 1996)

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC):

Los humanos y la mayoría de los animales de sangre caliente, portan *E. coli* en el tracto intestinal. Está presente en la mayoría de alimentos no cocinados, en objetos inanimados y en el ambiente. Muchas de esas cepas albergan genes para uno o más atributos de virulencia, asociados con la EHEC. Estos atributos incluyen la capacidad de producir toxina semejante a shiga, factor de adherencia, enterohemolisina, o antígenos somáticos que caracterizan a muchas EHEC y pertenecen a serogrupos como O111 ó O157. Un factor que es de gran significancia, es la dosis infectiva la cual es increíblemente pequeña, en comparación con otros patógenos transmitidos por alimentos. Se habla de menos que dos bacterias / 25 g. (Allerberger, 1996) El problema de identificar EHEC en alimentos no es tan simple, es como buscar una aguja en un pajar. (Watanabe, 1996)

En 1983 Riley y col., investigaron dos brotes de una enfermedad gastrointestinal caracterizada por severos dolores abdominales, diarrea acuosa y sanguinolenta en ocasiones con fiebre.

A esta enfermedad se le designó colitis hemorrágica (CH), y fue asociada con la ingestión de hamburguesas en restaurantes de comida china. Sin embargo en cultivos de heces de estos pacientes rara vez se aislaba *E. coli* serotipo O157:H7. En el mismo año, fue reportado por Karmali y col., (1983), la asociación de casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico producido

por *E. coli* localizada en heces. Estos dos ejemplos están relacionados con la presencia de serotipos raros y la producción de citotoxinas específicas.

Estos investigadores realizaron pruebas con la citotoxina y demostraron un efecto citopático en células Vero completamente distinto al que causan las toxinas de ETEC en células CHO y Y-1.

Más tarde encontraron que el efecto citopático en células Hela y Vero por sobrenadantes de *E. coli* 0157:H7, aisladas de casos de diarrea eran neutralizados por una antitoxina de *Shigella dysenteriae* 1, de aquí que esta toxina se denominara Shiga-like. (Konowalchuck y col, 1977; O'Brien y col. 1980, Karmali y col. 1983, Johnson y col. 1983 y Riley y col 1983)

Desde 1955 se cree que el Síndrome urémico hemolítico (HUS) fue debido a un agente viral. (Karmali, 1985)

Cepas de *Shigella dysenteriae* 1 producen proteínas STx y están asociadas a esta enfermedad como se mencionó anteriormente.

Kibell y Barnard (1968), en estudios que realizaron al sur de África sugirieron que cepas de *E. coli* mutante por bacteriófagos, pueden ser responsable de este síndrome. En los 80's fue reconocida la codificación STx en *E. coli* por un bacteriófago y que alrededor de 100 serotipos pueden expresar STx. (O'Brien, 1984; Smith, 1983)

Con relación al parecido entre verotoxinas y toxina shiga, existe una alternativa de nomenclatura, *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), citada formalmente SLTEC. Estas toxinas son idénticas a la genética y a los niveles de proteína STx producida por *S. dysenteriae* 1. Por lo tanto la comunidad científica determina que se pueden usar dos nombres STEC y VTEC ya que son términos equivalentes y ambos se refieren a las cepas de *E. coli* que pueden producir una o más toxinas de la familia de las STx.

El término *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) fue originalmente acuñado a cepas causantes de HC y HUS, que expresan STx, causando lesiones A/E en células epiteliales y se caracteriza por presentar un plásmido de 60 Mda. (Levine, 1984 y 1987)

Escherichia coli enteroagregativa. (EAggEC):

Por años, se ha cultivado *Escherichia coli* en células epiteliales, para estudiar varios tipos de adherencia y se ha asociado a casos de diarrea persistente y aguda.

Microcolonias adherentes a células HEP-2 de ciertos serotipos de *E. coli* con adherencia localizada (LAEC) se han asociado a diarreas agudas no sanguinolentas en niños. *E. coli* adherente difusa (DAEC), también ha sido asociada con diarreas en algunos estudios. El tercer tipo de adherencia se conoce como adherencia agregativa, mostrada por *E. coli* enteroagregativa.

(EAggEC), consiste en que la bacteria se alinea en paralelo a cualquier tejido, y está asociada principalmente con diarreas persistente en niños en la primera infancia, de acuerdo a estudios realizados en Brazil, Chile, México e India. (Germani, 1996)

Inicialmente se descubrió la adherencia de algunas cepas de *E. coli* a células HEP-2 por Cravioto y col (1979).

La adherencia se presenta cuando las bacterias formaban microcolonias alrededor de las células HEP-2, más tarde recibió el nombre específico de enteroagregativa.

Otro tipo de adhesión a células HEP-2 se descubrió como difusa porque mostraba poca agregación y poca adherencia a las células y solo algunas veces se relacionaba su aislamiento con casos de diarrea. (Cravioto 1979, Scaletsky 1984, Mathewson 1986, Nataro 1987, Vial 1988, Germani 1996).

Las cepas EAEC son comúnmente definidas como cepas de *E. coli* que no producen enterotoxinas LT o ST y que se adhieren a células HEP-2 en un modelo AA. Es probable que esta definición abarque ambos patógenos y no patógenos que comparten un factor o factores que confieren un fenotipo común. La patogenicidad heterogénea de EAEC en humanos ha sido confirmada en estudios con voluntarios y en investigaciones de brotes. (Eslava, 1993, Mathewson, 1986., Nataro, 1995., Smith, 1994.,)

Escherichia coli uropatogénica (UPEC):

E. coli es la causa mas común de infecciones en tracto urinario, (UTI). Las infecciones pueden presentarse desde asintomática con bacteriuria, cistitis y pielonefritis. Las mujeres se ven mas frecuente afectadas que los hombres.

Frecuentemente los mismos serotipos son encontrados tanto en las heces de pacientes como en orina, aparentemente UPEC posee factores de virulencia con capacidad de causar infección. Un número muy limitado de grupos son asociados con UTI. Estos incluyen al 01, 02, 04, 06, 018 y 075, también incluyen un número pequeño de antígenos K, K1, K2, K3, K5, K12 Y K13. Un factor importante de virulencia es un pili (fimbria) conocida como p-pili, porque se enlazan específicamente con el P-antígeno. El enlace de *E. coli* en células uroepiteliales es de gran significancia, para las personas con fenotipo P o P2. Otras adhesinas pueden también estar involucradas. La producción de alfa-hemolisinas está comúnmente asociada con UPEC. (Swenson, 1996)

Escherichia coli meningitis neonatal (NMEC):

La meningitis neonatal es reportada 1 en 2500 casos. De acuerdo a la variedad de estudios el 80% de estos casos de meningitis neonatal son por *E.coli*. Este antígeno es química e inmunológicamente idéntico al polisacárido ácido del grupo B de *Neisseria meningitis*. Este antígeno K1 se encuentra en la estructura de la superficie de las bacterias, evitando la respuesta específica a anticuerpos y la activación de la vía alterna del complemento. Los mismos serotipos que son aislados de casos de meningitis son también frecuentemente encontrados en las heces maternas, indicando éstas como fuente de contaminación durante el nacimiento.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC):

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), ha sido conocida como una bacteria capaz de producir dos tipos de enterotoxinas: ST y LT. (Levine, 1987)

Las cepas de ETEC fueron reconocidas primero como causa de enfermedad diarreaica en cerdos, donde la enfermedad fue letal en animales recién nacidos. (Alexander, 1994) Estudios de la ETEC en cerdos primero dilucidaron los mecanismos de la enfermedad, incluyendo la existencia de dos enterotoxinas codificadas por plásmidos. La primera descripción de ETEC en humanos reportó que ciertas cepas de *E. coli* aisladas de heces de niños con diarrea, produjeron una secreción de fluidos en la prueba de asas ligadas en intestino de conejo. (Taylor, 1961)

Posteriormente DuPont y col. mostraron que cepas de ETEC fueron capaces de causar diarrea en adultos voluntarios. (DuPont, 1995)

En un programa para la identificación de *Escherichia coli* causante de diarreas en niños en Tailandia, se aisló de las heces. Se obtuvieron muestras de 16 hospitales en diferentes distritos de Tailandia durante 1985 y 1986, las cepas aisladas fueron identificadas por serogrupos o como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* factor adhesina (EAF), o *E. coli* Shiga -Like (SLT) y se obtuvo lo siguiente: el 10% de las cepas aisladas fueron EPEC, el 6% de ETEC, y el 4% EAF, menos del 1% de cepas EIEC, y de *E. coli* SLT no se aisló ninguna. De las cepas *E. coli* ETEC se aislaron 5% (4 de 85) de niños menores de 6 meses, el 10% (12 de 118) de niños de 6 a 23 meses, y el 1% (1 de 75) de niños mayores de 23 meses. (Sunthaduanich, 1990)

En un estudio realizado al este de Africa, en Djibouti, se aislaron 140 bacterias patógenas de 209 muestras diarreicas y nuevamente se encontró *E. coli* (EAEC) en el 10.6%, *E. coli* ETEC en el 10%. *E. coli* EPEC en el 12%. *Salmonella* en el 3% y *Campylobacter* en un 5%. (Mikhail, 1990)

La presencia de *E. coli* sigue siendo importante en procesos diarreicos en países como Bangladesh. En estos estudios, las cepas obtenidas de 451 niños de 5 años de edad con diarrea aguda fueron probadas por técnicas de hibridación de DNA, de , no se aisló *E. coli* enteroinvasiva, ni enterohemorrágica. La *E. coli* ETEC fué la más importante productora de la diarrea en niños. El análisis sugirió una asociación de toxina ST y LT en la producción de estas diarreas. Y *E. coli* EPEC fué significativamente asociada a diarreas en grupos de niños de 1 año de edad, la *E. coli* ETEC y EPEC produjeron infecciones principalmente durante los meses calurosos.

Estos datos sugirieron que *E. coli* ETEC y EPEC fueron las causas más importantes de producción de diarreas aguda en estos niños. (Albert, 1995)

Las cepas de *E. coli* que producen enterotoxinas ST y LT son conocidas como *E. coli* enterotoxigénica o ETEC. La mayoría de las ETEC aisladas de humanos producen colonización por fimbrias específicas de humanos. La ETEC es probablemente la causa más común de diarrea en animales jóvenes, además de ser la principal causa de diarrea en niños en países en desarrollo y de la diarrea del viajero. (Willshaw, 1995)

1.4 Factores de virulencia o patogenicidad de la ETEC productora de LT.

Escherichia coli enterotoxigénica, como ya se mencionó anteriormente es un agente causal de diarrea en humanos y animales, requiere no sólo de su capacidad íntegra para producir toxina termolábil, sino además necesita propiedades accesorias de virulencia para poder manifestar ésta; para que la infección por estos microorganismos progrese es necesario que venza al peristaltismo íntestinal, colonizando el íntestino delgado, en el cuál se multiplica y elabora "in situ" la toxina. (Dupont, 1980)

1.4.1 Factores de colonización.

1.4.1.1 Fimbrias.

La colonización del íntestino tiene lugar mediante un fenómeno de adherencia a la mucosa en el que intervienen por lo menos en algunos casos,

ciertas estructuras o apéndices filamentosos que se proyectan de la superficie de la bacteria denominadas "fimbrias o pilis". Estas estructuras son de naturaleza proteica, antigénica y termolábiles que no tienen relación alguna con los flagelos. (Thorne, 1979)

El pili K88 fué descubierto en cepas de *E. coli* patógenas para el cerdo y se trata del antígeno superficial, el cual es de naturaleza proteica diferente de los antígenos "K" que son polisacáridos. (Kauffman, 1951)

1.4.1.2 Otros factores.

Los mecanismos por los que las cepas ETEC se adhieren para colonizar la mucosa intestinal han sido sujetos de intensas investigaciones. Para causar diarrea las cepas de ETEC, primero se adhieren a pequeños enterocitos de intestino, en un evento mediado por fimbrias de superficie, también llamadas pili. En la microscopía electrónica de transmisión las cepas ETEC típicamente revelan muchas fimbrias peritricas, arregladas alrededor del cuerpo bacteriano. (Levine, 1984) Ver Fig A

Un gran número de antígenos fimbriales han sido caracterizados, en algunas cepas ETEC, sin embargo algunos han sido identificados y solamente se presume de su existencia, provocando un obstáculo para el desarrollo efectivo de vacunas.

Las fimbrias de ETEC son específicas de especie. Por ejemplo, cepas de ETEC que expresan K99 son patógenas para vacas, borregos y cerdos. K88 se expresa en cepas capaces de causar enfermedad solamente en cerdos. (Cassels, 1995)

Las cepas de ETEC para humanos poseen su propia ordenación de fimbrias de colonización CFAs. (DeGraaf, 1994) La terminología de la CFAs es confusa e inconsistente, por lo se ha propuesto un esquema uniforme que se podría numerar con CFA , consecuentemente de acuerdo al año de la descripción inicial (Gaastra, 1996), el número debería ser precedido por las iniciales CS para antígenos de superficie de *E. coli*. (Ver tabla 1.)

FIG. A
Fimbria CFA/II de ETEC



(Nataro, 1998)

TABLA 1

CFAs de cepas ETEC de humanos.

Designación original	Designación CS	Diámetro (nm)
Bastón rígido		
CFA/ I	CFA/ I	7
CS1	CS1	7
CS2	CS2	7
CS4	CS4	6
PCFO159	CS12	7
PCFO166	CS14	7
CS17	CS17	7
PCF020	CS18	7
CS19	CS19	7
Forma de paquete		
CFA/ III	C88	7
Longus	CS21	7
Fibrilar		
CS3	CS3	2-3
CS5	CS5	5
PCFO148	CS13	
No fibrilar		
CS6	CS6	
2230	CS10	
8786	CS15	

(Nataro, 1998)

Las CFAs pueden estar basadas en sus características morfológicas. Existen tres variedades morfológicas : bastón rígida, formando paquetes de bastones flexibles, y estructuras de alambre flexible.

El prototipo de CFA/I de fimbrias de figura de bastón rígida, está compuesto de una proteína simple ensamblada en una configuración helicoidal apretada. (Jann, 1991) Los pilis CFA/ III están en forma de paquete con homología de la familia de fimbrias tipo 4. (Taniguchi, 1994 y 1995)

Los CFA / II y CFA/ IV están compuestos de factores múltiples de distintas estructuras fimbriales, CFA/II expresa una estructura CS3 flexible. (Levine, 1984) (Sjoberg, 1988). Los CFA/ IV, pueden expresar CS6 en conjunción con CS4 o C55. (Cassels, 1995 ; Knutton, 1989) Un gran número de otras adhesinas menos comunes, también se han encontrado en cepas ETEC (DeGraaf, 1994), sin embargo estudios epidemiológicos sugieren que CFA/I, CFA/II, o CFA/IV son expresados por el aproximadamente el 75% de las cepas ETEC de origen humano. (Wolf, 1997)

Una nueva descripción de fimbrias ETEC, designada Longus, se ha encontrado en una gran proporción en humanos (Girón 1994 y 1995)

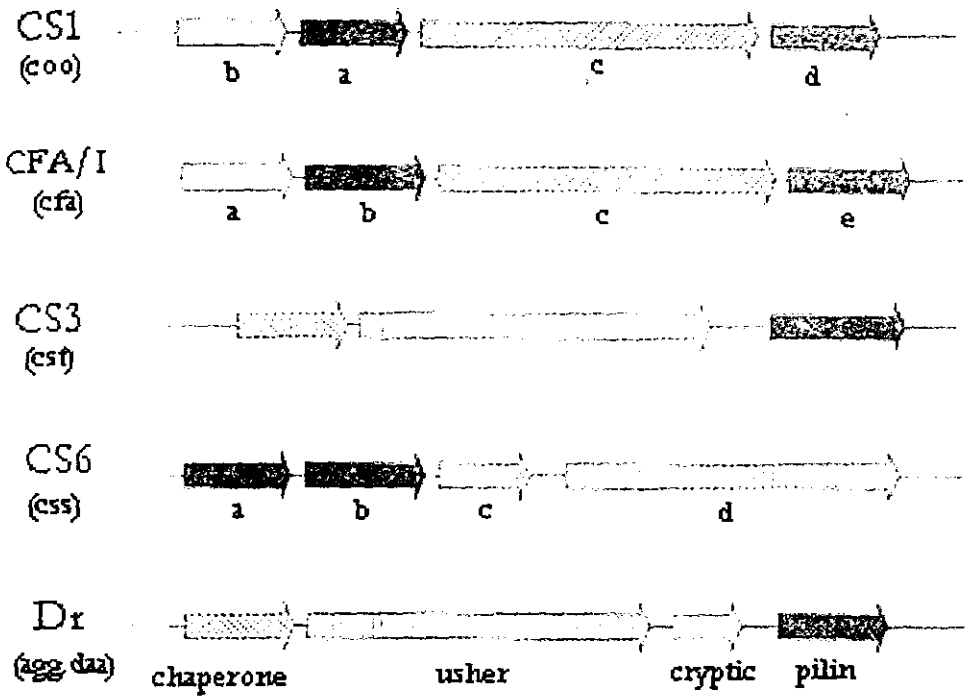
La genética de las CFAs ha sido estudiada extensivamente y esos estudios han servido para esclarecer modelos para expresión de proteínas secretadas de fimbrias , traslocación y el ensamble de organelos de bacterias. (Fig B)

Los genes CFA son generalmente codificados por plásmidos que típicamente también codifican para enterotoxinas ST y/o LT. (DeGraaf, 1994) Típicamente los genes agrupados que codifican para la síntesis de las fimbrias, consisten en una serie de genes que codifican para subunidades de fimbrias primarias y proteínas accesorias que son requeridas para procesar secreción y ensamble de la estructura misma de las fimbrias. (DeGraaf 1994, Jann, 1991, Jones 1996, Kusters, 1994)

1.5 Producción de toxinas.

Las enterotoxinas de bacterias son proteínas que tienen un efecto tóxico en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Las dos manifestaciones clínicas predominantes de enterotoxicidad son la diarrea y el vómito. Las enterotoxinas citotóxicas típicamente matan a células eucarióticas, por inhibición de la síntesis de proteínas, mientras que las enterotoxinas desordenan vías metabólicas específicas, elevando los niveles de nucleótidos cíclicos.

FIG. B
Genética de las frimbrias de *E. coli* Enterotoxigénica ETEC.



(Nataro, 1998)

Se ha estudiado la genética de las enterotoxinas citotónicas ya que son conocidos los genes de éstas. También se ha incluido aquí otra familia de enterotoxinas citotóxicas, las toxinas shiga-like, porque éstas han sido implicadas como agentes importantes en la enfermedad diarreica.

1.5.1 Relación entre la producción de Toxina termolábil y el serotipo en *E. coli*

Los serotipos de *E. coli* ocupan el lugar central en la historia de esos patógenos. (Lior, 1996) Anterior a la identificación de los factores de virulencia específicos para cepas de *E. coli* diarrenogénica, el análisis de los serotipos tuvo un significado predominante ya que así fueron diferenciadas las cepas patógenas.

En 1933, Adam mostró la tipificación serológica de cepas llamadas "dispepsia coli", las cuales se involucran en brotes de diarrea en niños. En 1944, Kauffman propuso un esquema para la clasificación serológica de *E. coli* la cuál es usada hasta la fecha con algunas modificaciones.

De acuerdo al esquema modificado de Kauffman, el serotipo de *E. coli* esta basado en la presencia de sus antígenos de superficie, el O somático, H flagelar y K capsular. (Lior, 1996)

Se han reconocido un total de 170 antígenos diferentes que definen a un serogrupo. La presencia de antígenos K fue determinada originalmente por su significado en pruebas de aglutinación de bacterias en cepas de *E. coli* que no fueron aglutinables por antisuero O. Los expertos sugieren la restructuración del antígeno K incluyendo polisacáridos ácidos. (Lior, 1996) Una combinación específica de antígenos O y H define el serotipo en un aislamiento. Los serogrupos específicos de *E. coli* pueden estar asociados para producir ciertos síndromes clínicos, como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2
Serogrupos específicos de *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)

Categoría	Serogrupo	Antígeno H asociado
ETEC	06	H16
	08	H9
	011	H27
	015	H11
	020	NM
	025	H42,NM
	027	H7
	078	H11, H12
	0128	H7
	0148	H28
	0149	H10
	0159	H20
	0173	NM

Cuando se describió por primera vez a *E. coli* enterotoxigénica como agente etiológico de diarrea en humanos, se vió que las cepas pertenecían a una larga variedad de serotipos, pero con pocas excepciones, no pertenecían a las cepas clásicas enteropatógenas.

Cuando se llegó al conocimiento de que plásmidos transferibles controlaban la producción de enterotoxina, se pensó que virtualmente cualquier cepa de *E. coli* podría ser enterotoxigénica por la adquisición del plásmido apropiado. Aunque esta transferencia puede llevarse a cabo, Orskov y col. en 1976, encontraron un grupo definido de serotipos cuando examinaron un gran número de cepas.

Aparentemente la presencia de ciertos antígenos O, H y algunas veces K, indica una alta posibilidad de que una cepa sea enterotoxigénica. Se ha observado que *E. coli* 078H11 y 078H12 son enterotoxigénicas, mientras que las cepas 078 sin estos antígenos H específicos, rara vez lo son. De la misma manera *E. coli* 06H16 es casi siempre enterotoxigénica, mientras que cepas 06 con otros antígenos H, usualmente no lo son. Algunas de estas cepas de *E. coli* enterotoxigénicas, también tiene un antígeno K específico: por ejem: casi todas las cepas 06H16 poseen el antígeno K15, y muchas de estas cepas

enterotoxigénicas tienen también patrones comunes de fermentación. (Kaijser, 1978)

Hay también una asociación entre el serotipo y el tipo de enterotoxina, el serotipo 06H16 casi siempre produce ambas enterotoxinas, mientras que el serotipo 0128H (variable) produce LT. Esta asociación entre los antígenos de pared mediados por el cromosoma celular y la producción de enterotoxinas y fimbrias mediadas por plásmidos no ha sido aclarada todavía. Aparentemente está relacionada con la capacidad de la cepa para aceptar e incorporar en forma estable estos plásmidos. Además se observa que serotipos como 06H16 y 078H11 son menos propensos a perder plásmidos que otros serotipos.

La pérdida de la capacidad para producir toxinas permitió a Evans y Col. (1977), clasificar las cepas de *E. coli* en cuatro grupos de acuerdo con la estabilidad o inestabilidad en la producción de la toxina. Encontró que aparentemente hay una relación entre el serotipo y la estabilidad en la producción de enterotoxinas, particularmente en la toxina termolábil. Estos autores especulan la posibilidad de que los serotipos anteriores sirven como reservorios de los plásmidos ENT⁺ en la naturaleza, transmitiendo éstos a otros serotipos de *E. coli*.

1.5.1.2 Detección de la toxina LT "in vitro".

Pruebas para la detección de la toxina LT.

TABLA 3

Pruebas	Resultados
Modelos animales:	
Asas ligadas de conejo (íleon)	+
Pba. intradérmica en conejo.	+
Pba. intragástrica en ratón recién nacido.	-
Pba. perfusión in vivo (yeyuno) en rata.	+
Cultivos celulares	
Y-1 (Tumor adrenal en ratón)	+
CHO (Ovario, Hamster chino)	+
VERO (Riñón mono verde africano)	+
Serodiagnóstico:	
Inmunohemólisis pasiva	+
Inhibición de la inmunohemólisis	+
RIA (Radioinmunoensayo)	+
ELISA (Inmunoadsorbancia enzimática)	+

(Olarte J., 1981)

En la tabla 3, se muestran las pruebas más comúnmente utilizadas para la evaluación de la presencia de la toxina LT.

En las cepas ETEC se han diagnosticado la presencia de enterotoxinas LT y ST. La toxina ST fué inicialmente detectada en asa ligada de conejo. (Evans, 1973) El costo y la carencia de estandarización, provocó que se remplazara por la prueba en ratón lactante (Gianella, 1976).

Varios inmunoensayos han sido desarrollados para la detección de ST incluyendo radioinmunoensayo, (Gianella, 1981) y la prueba de ELISA Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (Cryan, 1990). Los resultados de estas pruebas se correlacionan bien con la prueba de ratón lactante que no requiere de expertos.

El bioensayo tradicional para la detección de LT involucra el uso de cultivo celular, utilizando líneas celulares como: Y1 adrenales o células de ovario de hamster chino. En la prueba de Y1, los sobrenadantes del cultivo de ETEC, causan redondeamiento celular. (Donta, 1974) En la prueba con células CHO, la LT causa elongación de las células. (Guerrant, 1974)

Las pruebas inmunológicas son fáciles de implantar en los laboratorios clínicos e incluyen la prueba tradicional de Be.ken , (Honda, 1981) y como los métodos recientes como ELISA, (Yolken, 1977) aglutinación en partículas de latex, (Ito ,1983) y dos pruebas comercialmente disponibles, la prueba de aglutinación pasiva reversa en partículas de latex (Scotland, 1989), y la prueba de coaglutinación estafilocócica, (Chapman ,1989). Ambas pruebas están disponibles en el mercado y son de fácil realización. (Speir, 1991)

Alrededor de 1982 se desarrollaron técnicas que diagnosticaron a las cepas ETEC.

Se ha encontrado que pruebas de DNA parecen ser muy útiles en la detección de los genes que codifican para la síntesis de LT y ST encontradas en heces y muestras ambientales. Desde hace tiempo, se han tenido muchos avances en la detección de ETEC, pero las técnicas genéticas continúan siendo más atractivas, aunque son de gran importancia, no existe prueba perfecta para la detección de ETEC. La detección de factores de colonización no es práctica por su gran número y heterogeneidad.

En la actualidad se utiliza la técnica de ELISA por ser altamente confiable. La prueba de hibridización por colony blot, requiere del uso de polinucleótidos. La prueba del polinucleótido para ST ha tenido problemas de baja sensibilidad y especificidad, presumiblemente por el tamaño pequeño del gene. (Schultsz, 1994)

En la tabla 4 se expone la lista de nucleótidos, oligonucleótidos de especies de *E. coli* diarrenogénica usados para la prueba de PCR .

TABLA 4

Oligonucleótidos de *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)

Categoría	Toxina	Oligonucleótido PCR
ETEC	LT	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC
Categoría	Toxina	Prueba del oligonucleótido
ETEC	LT	GCTGTGAATTGTGTTGTAATCC GCTGTGAACTTTGTTGTAATCC

(Nataro, 1998)

1.5.2 Patofisiología de la infección por *E. coli* enterotoxigénica.

Las infecciones gastrointestinales se acompañan de una amplia variedad de complejos sintomáticos y agentes infecciosos. El término gastroenteritis se aplica a síndromes de diarrea y vómito que a menudo involucran una pequeña inflamación o cambios patológicos en tubo digestivo. La diarrea infecciosa es la más común de las enfermedades debilitantes.

En las últimas décadas ha sido enorme el avance en el conocimiento de los agentes bacterianos y virales, entre ellos se incluyen *E. coli* que produce enterotoxinas causantes de diarrea secretora. (Mandel, 1979)

No obstante, para que este microorganismo sea capaz de producir enfermedad, es necesario superar los mecanismos de defensa propios del hospedero los cuales se resumen en la tabla 5.

TABLA 5

Mecanismos de defensa en infecciones a nivel gastrointestinal

Acidez gástrica y otras barreras físicas
Movilidad intestinal
Microflora entérica
Inmunidad específica (Humoral).
Inmunidad mediada por células.
Fagocitosis
Receptores intestinales

(Mandel G. L. 1979)

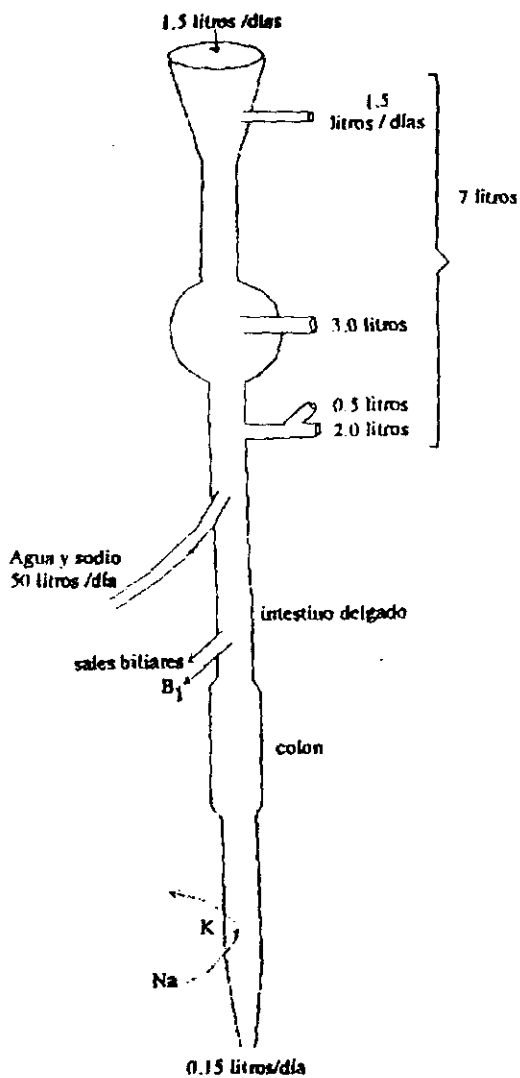
El efecto secretor de la toxina termolábil de *E. coli* se explica si previamente se conoce cuál es el balance de líquidos en el tracto gastrointestinal de un adulto normal, como se muestra en la figura C.

Una ingesta diaria oral de 1.5 litros, la saliva, la secreción gastrointestinal, biliar y pancreática contribuyen a un total aproximado de 8.5 litros que entran al tracto intestinal superior cada día. La secreción diaria de líquido en heces es menor de 150 ml, lo que indica una absorción neta de más de 8 litros diarios por el tracto intestinal, cerca del 90 % de esta absorción ocurre en el intestino delgado, donde existe un flujo bidireccional masivo que probablemente exceda los 50 litros. Una perturbación ligera en el flujo bidireccional puede provocar que la capacidad de absorción colónica sea superada, la cuál rara vez es mayor de 2 a 3 litros. (Mandel, 1979)

Las enfermedades entéricas pueden ser producidas por la interacción microorganismo-hospedero que alteran la fisiología normal de la porción intestinal en uno o más de los siguientes mecanismos:

a) Cambios en el delicado balance del flujo bidireccional de agua y electrolitos en la parte superior del intestino delgado por procesos intraluminales, tales como los provocados por la acción de una o más enterotoxinas. b) Destrucción inflamatoria de la mucosa ileal o colónica por procesos invasivos intraluminales acompañados de respuesta inflamatoria.

Fig. C
Diagrama del balance de líquido en el tracto gastrointestinal en un ducto normal



c) Cambios intraepiteliales mediados por la penetración a través de la mucosa intacta al sistema retículo endotelial.

La primera de las interacciones es la que opera en la infección por *E. coli* enterotoxigénica (LT). La secreción de líquidos causada por la toxina LT está restringida al intestino delgado, presentándose los valores más altos de secreción en el duodeno y menores en el íleon, al parecer esta acción va relacionada inversamente con la capacidad de absorción de fluidos isotónicos de las mismas regiones del intestino delgado, lo cual se ha tratado de explicar en base a que la enterotoxina tiene poco efecto sobre el movimiento de los electrolitos del lumen a la sangre, ya que la secreción ocurre sólo cuando la toxina induce al movimiento de electrolitos de la sangre al lumen, superando la capacidad de absorción del intestino.

La composición de los electrolitos del fluido secretado también varía en cada porción del intestino delgado. La concentración de potasio y bicarbonato es mayor en el íleon que en el duodeno, lo contrario ocurre con el sodio y el cloro.

La enterotoxina no causa una secreción fluida en el estómago, ni en el colon, inclusive la capacidad de absorción de éste no varía significativamente de la observada bajo condiciones normales. (Carpenter, 1980)

El principal efecto fisiológico de la enterotoxina LT es la secreción de un fluido isotónico por el intestino delgado, por lo que es importante conocer, con la mayor exactitud, la naturaleza de estos fluidos perdidos.

La fisiopatología de la infección por *E. coli* productora de toxina LT, no causa daño estructural a las células afectadas. esto fué demostrado por Gangarosa y col., (1960) en el cólera, y más tarde confirmado para la diarrea provocada por la acción de la toxina LT. (Polotskil, 1977) Existe una nota histórica de Conheim citado por Carpenter en la que aseguraba a mediados del siglo pasado, que ningún daño estructural era necesario para que se estableciera u observara el cuadro clínico del cólera. Esto no fué aceptado porque algunos investigadores sostenían que el daño estructural era una característica esencial en la patogénesis de la enfermedad. En la actualidad, se ha difundido mucho con gran aceptación por parte de los médicos, el uso de la restitución oral de agua y electrolitos para todos los individuos que padecen gastroenteritis aguda, particularmente en el caso de infección causada por la toxina LT de *E. coli* o por toxina CT de *Vibrio cholerae*. El método ha confirmado su efectividad, ya que la restitución de sodio y agua puede ser acoplada a algunos azúcares y otros solutos orgánicos. (Olarte, 1981)

La toxina LT de *E. coli* es muy similar a la toxina colérica aunque la unión al gangliósido GM1 es menos intensa que en dicha toxina.

La toxina unida a las células de la mucosa del intestino también estimula a la adenilato-ciclasa en una cinética muy similar a la de la toxina colérica, causando una secreción lenta de fluido isotónico la cual persiste por muchas horas después de que la toxina se ha unido a las células de la mucosa. La unión al gangliósido es igual aunque menos intensa que la actividad de la adenilato-ciclasa y la cantidad de fluido perdido es de 10 a 100 veces menor de lo que ocurre en respuestas equivalentes de la toxina colérica, ya que la afectación causada por la LT, sólo puede ser confundida con cuadros benignos de cólera. (Carpenter, 1980)

1.5.3 Mecanismo de acción de la toxina LT de *E. coli*. (ETEC)

1.5.3.1 Penetración de la toxina a la célula.

Las LTs de *E. coli* son toxinas oligoméricas que son relativamente parecidos en estructura y función a la enterotoxina del cólera (CT) expresada por *Vibrio cholerae*. (Sixma, 1993)

LT y CT comparten muchas características incluyendo la estructura de holotoxina con una secuencia proteínica en un 80%.

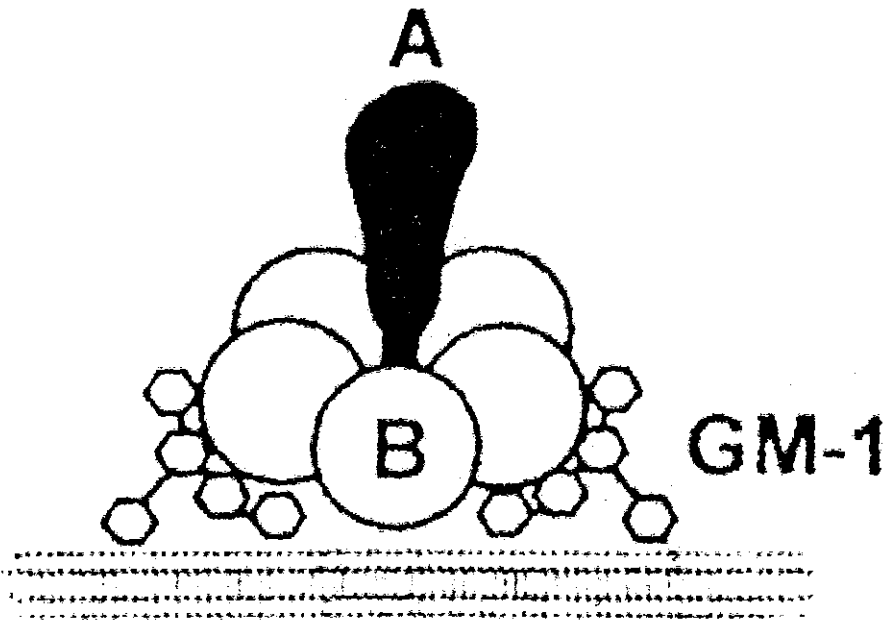
La actividad enzimática del receptor primario es idéntica, tanto en animales como en pruebas en cultivo celular. Se han observado algunas diferencias en el proceso de secreción ocasionado por las toxinas y en la respuesta de células linfocitarias. (Helper)

Existen dos grandes serogrupos de LT : LT-I y LT-II que no cruzan inmunológicamente. LT-I, es expresada por cepas de *E. coli* que son patógenas para humanos y animales. LT-II es encontrada principalmente en animales, y raramente encontrada en humanos, sin causar enfermedad. Estas toxinas se han designado con numeros romanos, y el término LT como se describe anteriormente se refiere a LT-I.

LT-I : es una toxina oligomérica de PM de 86 KDa. Compuesta de una subunidad llamada A, de 28 Kda y 5 estructuras idénticas de 11.5 Kda, denominada subunidad B. (Fig D) (Streatfield, 1992)

La subunidad B está arreglada en un anillo y está enlazada fuertemente al gangliósido GM1 y debilmente al GD1 y algunas glucoproteínas intestinales. (Tenerberg, 1994) La subunidad A es responsable de la actividad enzimática. Sin embargo A1 y A2 se encuentran unidas por enlaces disulfuro.

FIG. D
Modo de penetración de las toxinas LT de *E. coli* y *V. cholerae*.



(Nataro, 1998)

Se han descrito dos variantes relativamente parecidas que cruzan parcialmente. Esas variantes son mencionadas como LTp (LTP-I) y LTh (LTh-I) las cuales se descubrieron en cerdos y humanos respectivamente. Los genes que codifican para LT (elt o etx), residen en plásmidos que también pueden contener genes que codifican para ST y/o factores como antígenos de colonización (CFAs).

Después de enlazarse a las membranas de las células, la toxina es endocitada y traslocada a las células en un proceso que involucra el transporte vesicular a través del aparato de Golgi. (Lencer, 1995)

LT-II: El serogrupo de LT-II de la familia de estas toxinas, muestra una semejanza entre un 55 a 57% a LT-I y CT en la subunidad A, pero inicialmente no homóloga para LT-I o CT en la subunidad B. (Fukuta, 1988 y Guth, 1997)

Las dos variantes antigénicas LT-IIa y LT-IIb comparten una similitud de 71 y 66% en las subunidades A y B respectivamente. LT-II incrementa intracelularmente los niveles de AMPc por mecanismos similares para LT-I, pero LT-II utiliza GDI como receptor tal como GM1. (Fukuta, 1988)

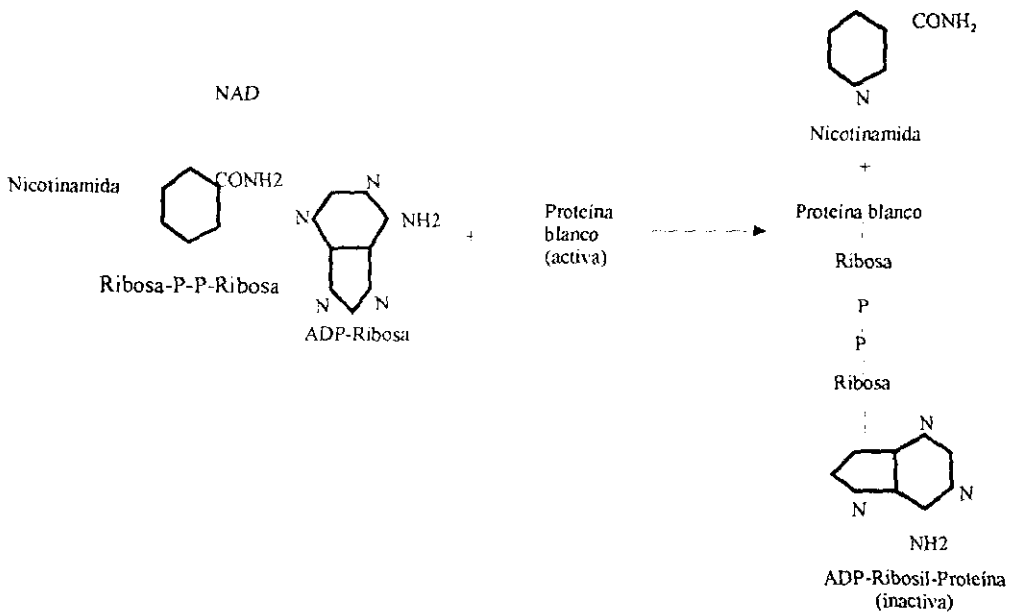
1.5.3.2 Modo de acción de la toxina.

Una vez unida la toxina LT al receptor natural, da lugar a una serie de cambios, provocando la aparición de una fase lag, previa a la acción enzimática.

Las células blanco para LT poseen adenilato ciclasa localizada en la membrana basolateral de las células epiteliales intestinales. El péptido A₁ tiene una actividad de ADP-Ribosil transferasa y actúa transfiriendo un ADP-ribosil a la mitad de la molécula de NAD en la subunidad alfa del GTP enlazado a la proteína Gs que estimula la actividad de adenilato ciclasa. (Ver Fig. E) La ribosilación de la subunidad Gs α da como resultado la activación permanente de la adenilato ciclasa, causando un incremento permanente de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares del AMPc.

La proteína cinasa dependiente del AMPc es por lo tanto activada, causando una fosforilación supranormal de los canales de cloro localizados en las células epiteliales apicales de las membranas. El CFTR es el canal de cloro mas grande el cuál es activado por LT y CT. (Sears, 1996) El resultado neto es la estimulación de la secreción de Cl⁻ de las células crípticas secretorias y

FIGURA E
Reacción de ADP-ribosilación



la inhibición de la absorción de NaCl por las vellocidades celulares. El aumento del ión en el lumen aumenta el contenido de agua pasivamente, através de la vía paracelular, resultando en diarrea osmótica.

Las figuras F y G muestra, en forma resumida, la serie de eventos que suceden en esta activación.

1.5.3.3 Efecto de la toxina termolábil sobre la secreción intestinal.

El líquido y los electrolitos perdidos durante un episodio de diarrea causada por *E. coli* enterotoxigénica (LT), son el reflejo de los efectos de la toxina termolábil sobre el transporte de varios electrolitos. Inicialmente el sodio y el cloro en el intestino delgado se ven alterados tanto "in vivo" como "in vitro" en la difusión extracelular a través de las uniones membranales, no obstante, hay también mecanismos de "transporte activo" los cuales participan y son de especial importancia en el fenómeno responsable de la diarrea secretora. (Carpenter, 1980)

Field y colaboradores (1979), demostraron que la relación entre la acción de la toxina termolábil de *E. coli* y el adenosin-monofosfato-cíclico (AMPc), sobre la secreción intestinal, producían efectos similares empleando epitelio intestinal.

Como se mencionó anteriormente el canal iónico que está defectuoso por fibrosis quística provocado por el efecto toxigénico, provoca la estimulación de la secreción de cloro de las células de las criptas secretoras y la inhibición en la absorción de NaCl por las microvellocidades de la punta de las células.

El incremento del ión en el lumen acumula agua pasivamente através de la vía intestinal teniendo como consecuencia la diarrea.

No obstante la estimulación en la secreción de cloro como resultado de un incremento en los niveles del AMPc es la explicación clásica para el mecanismo por el cual LT y CT causan diarrea; existe evidencia de que este incremento es mayoritario para la toxina CT, ya que la respuesta secretora de esta toxina es considerablemente más compleja. (Sears, 1996)

Un mecanismo alternativo por el que esas toxinas podrían actuar, involucran prostaglandinas de la serie E (PGE1 y PGE2) y factores activadores de plaquetas.

Fig. F
 Mecanismo de acción de las toxinas termolábiles
 de *E. coli* y *Vibrio cholerae*

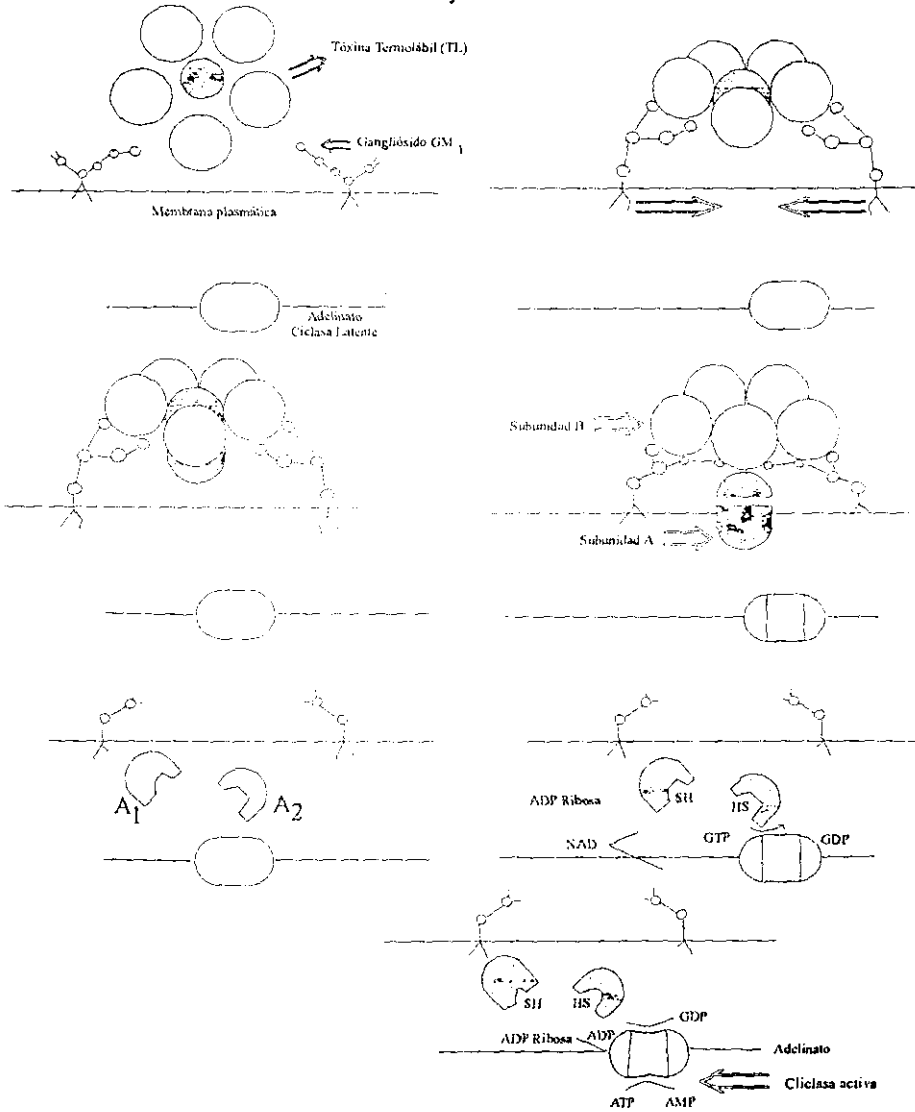
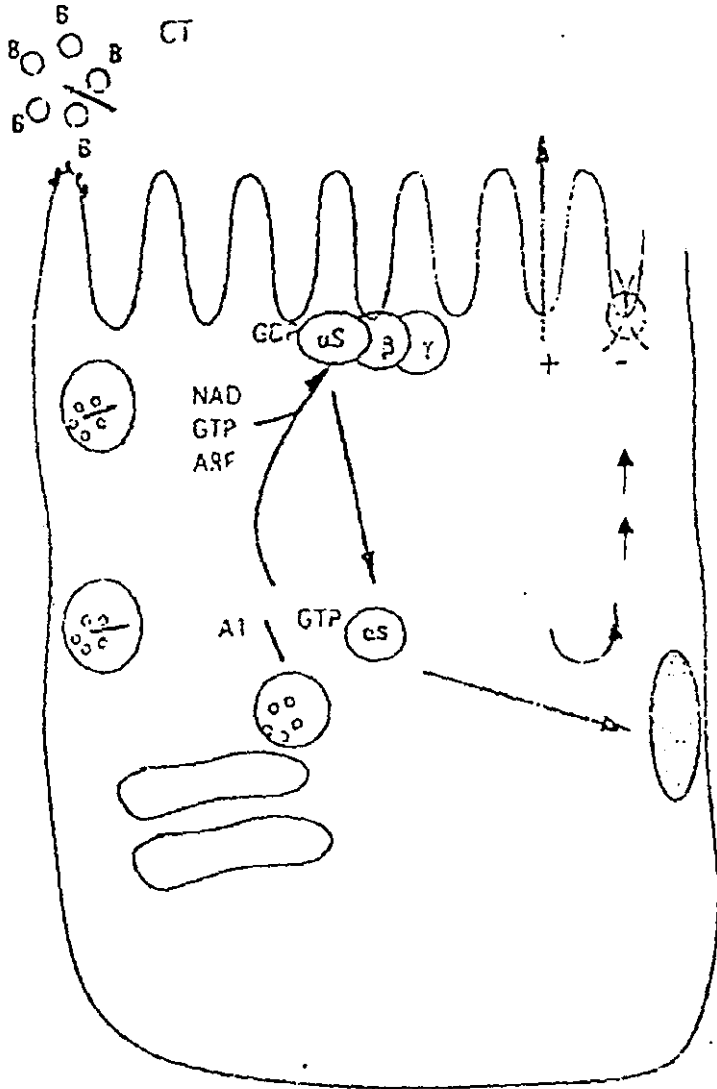


FIGURA G

Representación esquemática del modo de acción de la toxina LT



Popoff (1996)

La síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico, así como prostaglandinas y leucotrienos, pueden estimular el transporte de electrólitos y la motilidad intestinal.

Un mecanismo alternativo, involucra el sistema nervioso entérico (ENS), que regula la motilidad intestinal y secreción de iones. El intestino delgado después de ser tratado con CT puede liberar serotonina y polipéptidos vasoactivos los cuales pueden estimular la secreción de células epiteliales vía ENS.

Un tercer mecanismo potencial podría involucrar una suave respuesta intestinal inflamatoria debido a CT y LT. Se ha reportado que CT estimula la producción de la citocina proinflamatoria Interleucina-6 (IL-6), de tal modo activando el sistema entérico y generando potencialmente metabolitos del ácido araquidónico que estimulan la secreción. (McGree, 1993) Estos mecanismos alternativos secretorios son apoyados por una variedad de pruebas "in vitro" e "in vivo" y estos actúan en conjunto del modo clásico involucrando al AMPc, causando diarrea por estas toxinas.

La similitud de LT y CT es considerada lo suficientemente grande como para comprobar que los mecanismos de acción de las toxinas son similares, y la validación de estos lo han demostrado, a excepción de la influencia de LT para liberar serotonina. (Turvill, 1995)

Ha sido demostrado que CT y LT causan una disminución de la absorción de fluido y electrólitos de la lamina intestinal. (Field, 1972)

Muller y col, han reportado que la CT y la LT inducen inhibición del AMPc-dependiente de la H^+ / péptido cotransportados en la línea celular CaCo-2 del intestino humano. (Muller, 1996)

Es interesante que el H^+ /peptido cotransportador, no produce sitios para la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA). Los autores proponen que el efecto está mediado através de PKC. Esta hipótesis debería sugerir otro nuevo mecanismo para CT y LT. Por lo tanto, las propiedades enterotoxigénicas, funcionan adyuvante. Mutantes productoras de LT retienen esta característica de adyuvancia eliminando la actividad de ADP-ribosiltransferasa que ha sido producida por la toxina. (Douce 1995, Nashar 1996) Ratones inmunizados oralmente o intranasalmente con ovoalbúmina o fragmento C de la toxina tetánica juntas con el mutante LTs indujeron títulos altos de anticuerpos.

Esta propiedad podría aprovecharse para la preparación de vacunas contra una gran variedad de patógenos.

En resumen, los efectos de la toxina LT de *E. coli* parecen alterar el proceso de transporte de iones por lo menos en dos sitios diferentes donde participa el AMPc. En las células epiteliales de las vellosidades el AMPc inhibe la absorción acoplada al sodio y cloro, y en las células cripticas estimula la secreción activa de iones. No se han excluido otros efectos que pudieran presentarse. (Carpenter, 1980)

1.6 Comparación entre las toxinas LT de *E. coli*, y *V. cholerae* y las producidas por otras enterobacterias.

La enterotoxina LT-I es muy parecida a la CT (toxina del cólera). La secuencia de aminoácidos es idéntica en la subunidad A de 240 aminoácidos de 27 KDa. y en la B que forma un pentámero de 103 aminoácidos de cada unidad con 11.5 KDa. LT-I y CT comparten muchas características incluyendo la estructura de holotoxina, primer receptor idéntico, actividad enzimática y pruebas de actividad en animales. (Spangler, 1992) LT-I solo muestra similitud en estos aspectos y está en discusión que el modo de acción podría ser diferente a la CT. Por lo tanto es clara la diferencia de la enfermedad producida por la LT-I de y la CT. En algunas infecciones debidas a LT-I la unión del gangliósido GM1 es menos intensa que con CT. Esas diferencias podrían influir favorablemente en la secreción de la toxina y facilitar la colonización del intestino. (Ver tabla 6)

La Enterotoxina LT-II de *E. coli*, comparte muchas características con LT-I pero han sido aisladas de animales y raramente de humanos. (Seriwatana, 1988) La subunidad A de LT-II es 55 a 77% idéntica con la subunidad A de LT-I y CT, pero la subunidad LT-II no muestra homología con la subunidad B de LT-I o CT. (Pickett, 1988) Dos miembros distintos de LT-II han sido descritos, LT-IIa y LT-IIb con un parecido en un 71-66% en la secuencia de las subunidades A y B respectivamente. (Pickett, 1989)

Estudios genéticos y de hibridación de DNA, sugieren que los genes para CT no son codificados por plásmidos como en el caso de la toxina LT de *E. coli*. (Smith, 1968)

Los genes que codifican para CT han sido clonados de un número diferente de cepas de *V. cholerae*. La secuencia de genes de CT también indican que la subunidad A y B, son inicialmente sintetizadas con 18 y 21 señales de aminoácido terminal respectivamente.

TABLA 6
Características de las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* y de *Escherichia coli*.

PROPIEDADES	Toxina de <i>Vibrio cholerae</i>	Toxina LT de <i>E. coli</i>
PM	84,000	73,000-95,000
Subunidades	A Y B	A Y B
Resist. al calor(100°C,15 min)	se inactiva	se inactiva
Resist. a los ácidos.	se inactiva	se inactiva
Naturaleza química.	Proteica	Proteica
Receptores en mucosa.	Gangliósido GM ₁	Gangliósido GM ₁
Acción bioquímica	Activa adenilato -ciclasa	Activa adenilato-ciclasa
Acción fisiológica	Prolongada hipersecreción después de la fase log.	Prolongada hipersecreción después de la fase log.
Propiedades inmunológicas	Relacionada estrechamente a LT.	Relacionada estrechamente a CT y a otras LT.
Anticuerpos neutralizantes	Produce	Produce
Métodos de ensayo	Modelos animales	Modelos animales
	Cultivos celulares	Cultivos celulares
	Métodos inmunológicos	Métodos inmunológicos
Control genético	Cromosómico	Plásmidos
Factores de colonización	Ninguna proteína estructural conocida, los flagelos pueden ser importantes.	CFA/I y CFA/II mediada por plásmidos y otros por ser identificados.
Serotipos	Ogawa, Inaba.	Los más comunes 06K15H16 08K449, 078H11, 078H12.

(Finkelstein, 1976)

CT y LT son reguladas genéticamente por diferentes regiones (Melkalanos, 1983), las mutaciones que afectan la regulación de toxina colérica no afectan a la síntesis de la LT (Neill, 1983) y la regulación del gene clonado de la toxina colérica *toxR*, no tiene efecto en la síntesis de LT. (Miller, 1984) La acción de la asparagina y la serina son importantes para estimular la producción de toxina CT. Se ha confirmado que la adición de fosfato, magnesio y hierro es importante, porque estimulan la utilización de asparagina y serina.

Diversas especies producen toxinas que son bioquímicamente o genéticamente parecidas a LT o ST de *E. coli*. En muchos casos los genes que codifican para esas toxinas no están bien caracterizados.

Yersinia enterocolitica produce una toxina termoestable parecida a STI causante de diarrea por activación de guanilato ciclasa. (Rao M.C., 1981)

Se ha reportado que *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Shigella flexneri* producen Sts que son activas en ratón lactante. (Klipstein, 1976)

Klebsiella y *Enterobacter* han sido reportadas por producir toxinas parecidas a la toxina LT de *E. coli*. Fue reportado que el antisuero de la toxina LT de *Enterobacter*, neutraliza parcialmente la actividad de las toxinas LT de *Enterobacter*, *Escherichia coli* y *Klebsiella* pero no la CT. El antisuero para CT neutraliza la actividad de toxinas LT de *E. coli* y *Klebsiella*. (Klipstein 1977; Holmes, 1995)

Aeromonas hydrophila produce una enterotoxina que ha sido separada bioquímicamente y genéticamente de la citotoxina y hemolisina. Las enterotoxinas de *Aeromonas* son distintas de la CT, la LT y la ST de *E. coli*, porque su efecto en cultivo celular es menos pronunciado que el de LT o CT. La acumulación de líquido en asa íleal es tan rápida como en ST, y de una larga duración como en CT. La similitud inmunológica de la enterotoxina de *Aeromonas* con la CT es controversial y no se ha observado relación con LT. (Turnbull, 1984)

Algunas especies de *Salmonella*, tienen actividad enterotoxigénica. (Koupal, 1975). Dos factores de permeabilidad en piel aislados de *S. typhimurium*, difieren en tiempo de estabilidad poniendo en tela de juicio la reacción de inducción e induración en piel de conejo. El factor de permeabilidad LT de *E. coli* causa una demora en la reacción de induración, es una enterotoxina que causa acumulación e incremento de AMPc en asas ligadas de conejo, y en pruebas de cultivo de células CHO de ovario de

hamster chino. Esas actividades fueron neutralizadas por la antitoxina del cólera. (Sandefur, 1977) La enterotoxina de *Salmonella* ha sido purificada y está relacionada inmunológicamente y bioquímicamente con la CT. (Finkelstein, 1983)

Pseudomona aeruginosa produce una enterotoxina LT, (Kubota, 1971) la cual parece tener la misma actividad de factor de permeabilidad vascular, porque 28 cepas dieron respuesta positiva en piel y en asas ligadas. (Shriniwas, 1979) También puede producir toxinas ST además de LT, 5 de 21 casos de cepas aisladas fueron detectados ser STIb por pruebas de hibridación de DNA. (Timmis, 1984)

Una enterotoxina de *Campylobacter jejuni* parece ser más cercana inmunológicamente a LT de *E. coli* que a la CT. (Klipstein, 1977)

Algunas cepas de *E. coli* producen además de la toxina LT que está relacionada con la CT, una segunda enterotoxina que es similar en actividad biológica a LT, pero no es neutralizada por antitoxina LT o CT. Los genes para esta toxina parecida a LT, no han sido identificados pero parecen no estar asociados a plásmidos. (Green, 1983)

1.7 Importancia de la toxina LT de *E. coli* en los alimentos.

Se ha encontrado *E. coli* enteropatógena durante la fabricación de ciertos tipos de quesos madurados, como en el caso del camembert en donde durante la fabricación de éste se encontraron 10^4 células/ g. , después de 5 horas de incubación. Más tarde al agregar el inóculo de *Penicillium camamberti* y tratando previamente la leche con penicilina, se presentaba un aumento en la población de *E. coli* en el queso de aproximadamente de 10^7 /g., a las 10 semanas. Algunas cepas de *E. coli* fueron clasificadas como enteropatógenas. Esto demuestra que a pesar de ciertos tratamientos a los quesos, *E. coli* puede prevalecer en ellos y ser un agente potencial productor de enfermedad diarreica.

Se menciona en un estudio que el 12 de Noviembre y el 8 de Diciembre de 1971, por lo menos 227 personas en 8 estados de E.U. enfermaron de gastroenteritis aguda a las 24 horas después del consumo de queso importado francés Camembert o Brie. (Park, 1973)

Los brotes de origen alimentario causados por *E. coli* se han asociado al consumo de leche, helado, kefir, quesos y otros derivados lácteos. (Bonita, 1980)

Sack y col. (1977), encontraron que el 13% de cepas aisladas de alimentos de origen animal, incluyendo tres tipos diferentes de quesos blandos producían toxina termolábil o termoestable.

Mehlman y col. (1976) encontraron que los productos lácteos y alimentos frescos son importantes vehículos de transmisión de patógenos como *E. coli* enterotoxigénica, ya que fué detectada en quesos blandos fermentados.

Bonita y Cols. en 1980 aislaron *E. coli* enterotoxigénica en quesos disponibles en el comercio, encontrando los clásicos serotipos productores de LT.

En otro estudio realizado por Bernadette y cols. (1987), establecieron la incidencia de ETEC en alimentos crudos y cocinados de origen vegetal y animal, consumidos usualmente en la ciudad de Sao Paulo Brazil, donde cepas de *E. coli* enterotoxigénica se encontraron en un 35% de los alimentos, predominando solamente cepas de ETEC productoras de toxina LT.

Varios brotes de gastroenteritis en diferentes partes del mundo, como Brazil, Argentina, India, México etc., fueron asociados con el consumo de alimentos y agua contaminada con ETEC. (Danielson, 1979) y (Lumish, 1980)

En una revisión por Sosa L.P. y cols. (1988) se mencionó que las infecciones gastrointestinales representan un grave problema para las autoridades sanitarias, fundamentalmente en países subdesarrollados como ya se había mencionado anteriormente ya que son responsables de una alta morbilidad y mortalidad en infantes. Se subraya además que viajeros, personas inmunocomprometidas y pacientes hospitalizados se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad y en algunos casos puede ocasionarles hasta la muerte.

Los patógenos implicados son frecuentemente *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *Rotavirus*, los cuales son comúnmente encontrados en el agua y alimentos que se han manejado en condiciones pobres de higiene. (Wadstrom, 1975)

Existe en nuestro país información sobre los agentes etiológicos que son con mayor frecuencia se presentan en los alimentos. Sin embargo se sabe poco sobre la epidemiología de las infecciones intestinales del hombre causadas por colibacilos enterotoxigénicos, aunque parece tener distribución universal. Son

patógenos en adultos pero con mayor frecuencia en niños, las infecciones pueden ser esporádicas o epidémicas y explican muchas de las llamadas diarreas del viajero.

ETEC no está considerada como un peligro por el consumo de alimentos contaminados en países que tienen estándares de alta sanidad.

La contaminación del agua con heces de humanos puede contaminar los alimentos, al igual que los manipuladores.

Existe en nuestro país una información sobre los agentes etiológicos, colibacilos enterotoxigénicos, que con mayor frecuencia se presentan, aunque parezcan tener distribución universal.

En el período de 1969-1972 se registraron 122 brotes en Japón. En la década pasada se presentaron cuatro grandes brotes de gastroenteritis por ETEC en los Estados Unidos. Más tarde en 1975, experimentaron diarrea 30 pasajeros de dos cruceros que viajaban a Miami donde se señaló que la causa podría ser el consumo de cocktail de jaiba. En 1980, 415 personas experimentaron diarrea por el consumo de alimentos en un restaurant de comida mexicana donde se atribuyó la contaminación a un manipulador enfermo.

En 1981, 282 individuos de un personal de 3,000 en un hospital de Texas, presentó gastroenteritis por ETEC por el consumo de comida en la cafetería de ese lugar.

También se han brotes por ETEC en Islandia durante febrero de 1994. (Hipertext, 1998)

Se ha reportado que es necesaria la presencia en alimentos de cuando menos 10^8 ufc/g es la dosis que se requiere para provocar la enfermedad, lo que sugiere contaminación fecal o deficiencias en la refrigeración del alimento implicado.

Se han realizado estudios con voluntarios a los que se les han suministrado 100 millones de bacterias de *E. coli* enterotoxigénica, las que colonizan al intestino y producen toxinas, con estas dosis se puede inducir diarrea en 24 horas. En niños pueden requerirse pocos organismos para que la infección se establezca. (Fernandez, 1981)

El queso puede constituir un medio propicio para el ingreso y desarrollo de microorganismos patógenos. Los resultados obtenidos en los Laboratorios Nacionales de Referencia de la Secretaría de Salud apoyan lo anterior, pues se

ha observado que los quesos analizados rutinariamente suelen presentar cifras elevadas de bacterias coliformes totales y fecales. (Sosa, 1988)

La mala alimentación y el no tomar leche materna hace mas susceptible a los individuos a la acción de bacterias productoras de enfermedades diarreicas. En los recién nacidos que no son amamantados y por consiguiente no reciben los anticuerpos presentes en el calostro se han encontrado que son más susceptibles al no ingerir los anticuerpos contra algún antígeno de adherencia, toxinas o antígenos somáticos de *E. coli* patógena que van en el calostro. (Cruz y col., 1981)

JUSTIFICACIÓN:

Se estableció que *E.coli* enterotoxigénica produce diarreas en humanos colonizando la región anterior del intestino delgado, se estima que la dosis de *E. coli* toxigénica que debe ser consumida para causar enfermedad está entre 10^8 y 10^9 ufc. Las cepas enterotoxigénicas han sido encontradas en una gran variedad de alimentos incluyendo derivados lácteos, por lo tanto con este estudio se pretende poner en evidencia la posibilidad de que las cepas enterotoxigénicas produzcan toxina LT durante su desarrollo en estos productos.

Con la disponibilidad de técnicas de Biología molecular, los alimentos podrían ser analizados directamente para evidenciar la presencia de *E. coli* enterotoxigénica en un tiempo alrededor de tres días.

Aunque como se sabe de la gran sensibilidad de las pruebas genéticas, la infraestructura que se requiere y el costo de reactivos como los primers, no siempre están al alcance de los laboratorios en donde se realizan pruebas rutinarias de análisis microbiológico de alimentos, por lo que es importante contar con otros métodos que permitan realizar la detección de la toxina LT de *E. coli*.

Los métodos alternativos que involucran el aislamiento de *E. coli* en placas con medios enriquecidos, y la subsecuente confirmación de las cepas toxigénicas por métodos convencionales para detectar la producción de la toxina LT, lleva por lo menos siete días. Por lo que el presente trabajo tiene el objetivo de detectar la toxina directamente en el alimento comparando las técnicas inmunológicas del dot-ELISA y de Oucherlony.

Aunque el presente trabajo esta dirigido especialmente al estudio de ETEC productora de toxina LT, en quesos frescos, también se podrían evidenciar en este grupo de alimentos otros patógenos intestinales productores de toxina semejante a la termolábil.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la toxina LT de *E. coli* directamente en quesos frescos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1 Producir la toxina LT.

2.2.2 Purificar y caracterizar la toxina obtenida.

2.2.3 Obtener y titular la antitoxina LT producida.

2.2.4 Valorar la eficiencia en la detección de la toxina LT, mediante las Pruebas de Ouchterlony y dot-ELISA.

2.2.5 Investigar la presencia de la toxina LT en quesos comerciales.

METODOLOGÍA

Diagrama de trabajo 1

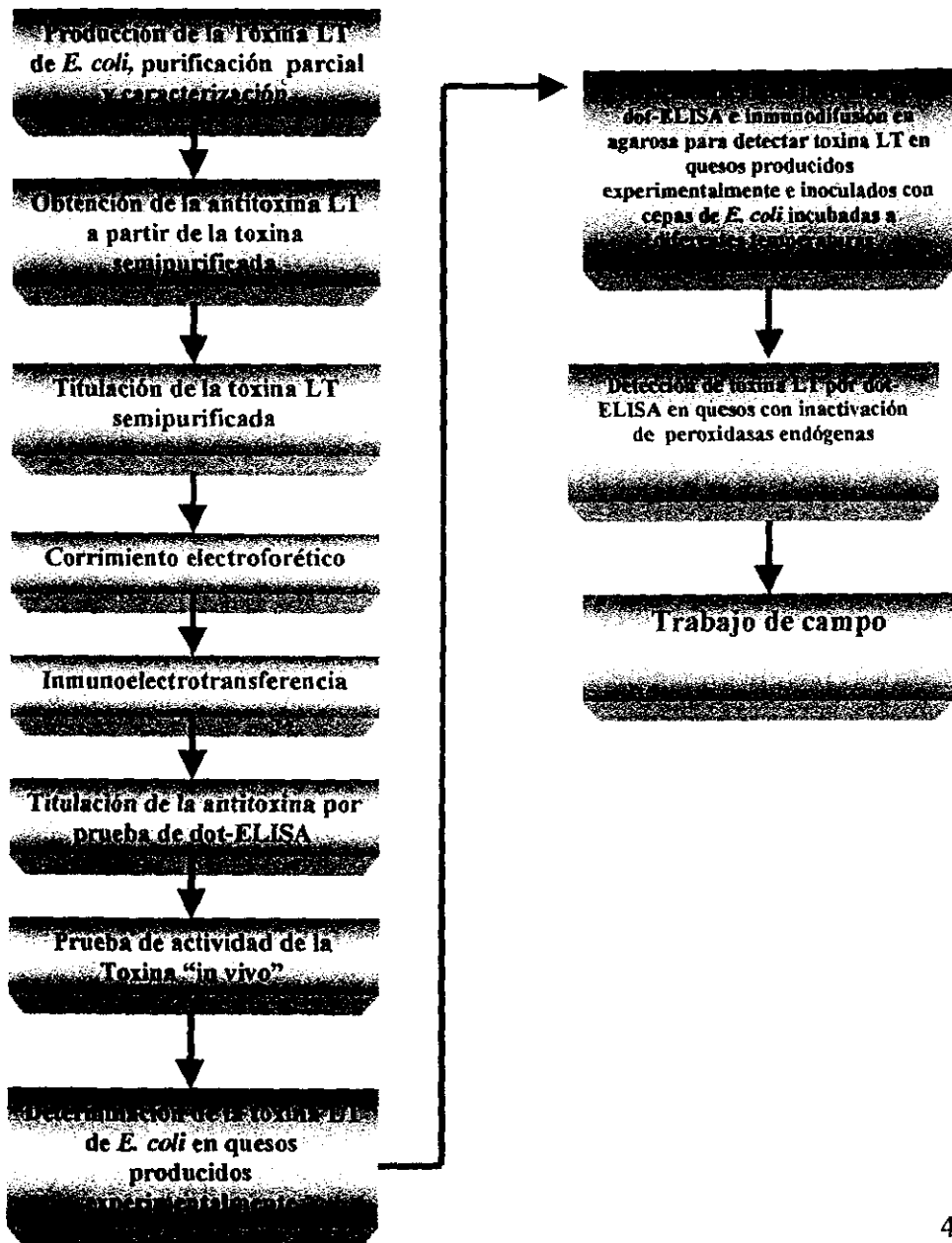
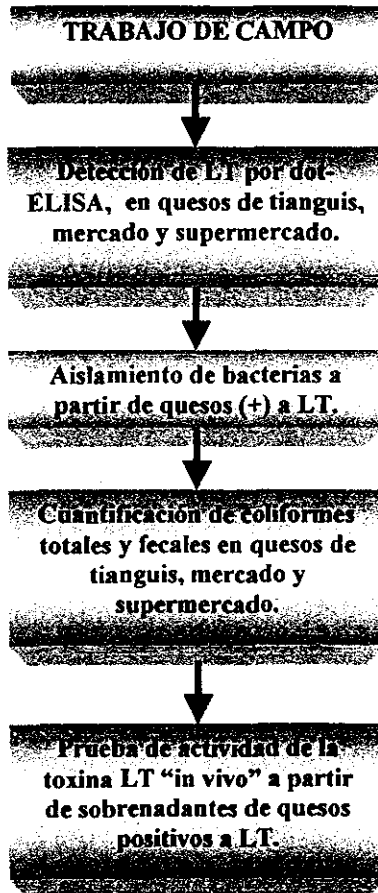


Diagrama de trabajo 2



3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Cepas Bacterianas:

Se utilizó una cepa de *E. coli* enterotoxigénica (H10407 ATCC) probada en cultivo de células Vero y en pruebas de hibridación : “colony blot” y PCR para producción de toxina termolábil (LT), y otra no toxigénica (8739ATCC), ambas donadas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica de la Secretaria de Salud.

3.1.2 Animales:

Para la obtención de antitoxina y para las pruebas de actividad de la toxina “in vivo”, se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 3Kg. de peso.

3.1.3 Reactivos

3.1.4 Conjugado:

Anti-IgG de conejo unido a peroxidasa, para la titulación de la antitoxina por dot-ELISA de laboratorios Sigma Chemical Company.

3.1.5 Toxina purificada de *Vibrio cholerae*.

3.2 Medios de cultivo:

Medio de Caye para promover la producción de la toxina LT de *Escherichia coli*. (Ver apéndice).

Para el aislamiento de coliformes se utilizó:

- | | |
|----------------------------------|-----------|
| - Caldo infusión cerebro corazón | No. 112-1 |
| - Agar infusión cerebro corazón | No. 147-1 |
| - Agar Mac Conkey | No. 109-1 |

Para tipificación bioquímica:

- Agar de hierro triple azúcar No. 114-1
- Agar citrato de simmons No. 216-1
- Agar hierro lisina No. 131-1

- Medios semisólidos:

- OF, Oxidación , Fermentación No. 261-1
- SIM No. 101-1

Para conteo de coliformes toales y fecales:

- Caldo lauril sulfato triptosa No. 238-1
- Caldo lactosado No. 117-1
- Caldo bilis verde brillante No. 115-1

Los medios de cultivo fueron de marca Bioxon.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo, de marcas: Merck, Sigma, y Baker.

3.3 Producción de la toxina (LT) de *E. coli*.

3.3.1 Replicación de la cepa toxigénica.

Para la producción de la toxina se utilizó la cepa de *E. coli* H10407 productora de toxina LT. Según metodología de Doyle J. Evans (1974), se sembró en 80 ml. de medio de Caye e incubó durante 18 horas a 37° C con agitación de 135-140 r p m. Posteriormente se inoculó con 5 ml. del cultivo de 18 horas en 12 matraces con 50 ml. de medio Caye preparado con 0.15 % de extracto de levadura. Se incubó nuevamente por 6 horas bajo las condiciones anteriores. Se centrifugó a 12,000g durante 20 minutos . Las células se lavaron tres veces con 320, 160 y 80 ml. de regulador tris 0.02 M, pH 8 respectivamente.

3.3.2 Inducción de la liberación de la toxina LT con polymixina B.

Las células obtenidas después de los lavados descritos anteriormente, se resuspendieron en 40 ml. de regulador tris pH 6.6 constituido por 2 mg. de sulfato de polymixina B, 0.9 % de NaCl disuelto en 15 ml. de regulador tris-clorhídrico. Posteriormente se incubaron a 37° C con agitación a 100 rpm. durante una hora. Después de la incubación, las células se removieron del regulador para liberar la toxina por centrifugación a 12000 g durante 20 minutos siguiendo la técnica descrita por Doyle J. Evans (1974).

3.3.3 Precipitación de la toxina con sulfato de amonio.

La toxina suspendida en el regulador se colocó en un baño de hielo y se le agregó lentamente y con agitación una solución de sulfato de amonio al 80 % de saturación. El precipitado se colectó por centrifugación a 16,000 g durante 15 minutos, la pastilla fué suspendida en 4.5 ml. de 0.02 M de tris-clorhídrico pH 8 conteniendo 2 ml. de EDTA. Se dializó durante 24 horas con dos cambios de agua destilada, para eliminar el sulfato de amonio y se concentró la toxina mediante una deshidratación, cubriendo la bolsa de diálisis con un agente higroscópico, azúcar glass. (Clements, 1979)

3.3.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

A la muestra dializada y concentrada se le determinó la concentración de proteínas utilizando el método Bradford (1976).

3.4 Producción de suero hiperinmune.

La antitoxina contra LT parcialmente purificada, fué obtenida en conejos adultos Nueva Zelanda, mediante 5 inoculaciones subcutáneas, una por semana de 1 ml. cada una, en una concentración de 4.7 mg/ml de la toxina obtenida. Las tres inoculaciones iniciales fueron realizadas con adyuvante completo de Freund, y las dos últimas se realizaron con adyuvante incompleto de Freund. (Doyle J. Evans, 1974)

3.5 Titulación de la toxina semipurificada.

En esta prueba se detectó la toxina LT por la prueba del dot-ELISA haciendo diluciones de ésta de 1/5, 1/25, 1/625, 1/1250, 1/ 2500, 1/5000, 1/10000, con la finalidad de verificar la concentración mínima de toxina que es detectada por la prueba. Se colocaron 5 μ l de la antitoxina en círculos pequeños de papel de nitrocelulosa de poro 0.22 mm., se dejaron secar a temperatura ambiente, se bloquearon los espacios libres del papel con leche descremada al 5% / TBS (ver apéndice) durante 1 hora. Posteriormente se lavaron 3 veces con TBS / Tween 20 al 0.05 % (ver apéndice), después de los lavados se colocó 0.2 μ l de la toxina cruda diluida, y se dejaron en agitación a 100 rpm durante una hora; después se lavaron los discos con TBS / Tween; una vez realizado ésto se colocó el conjugado (anticuerpo anticonejo peroxidasa) 1:5000 y se sometió a agitación durante 1 hora, se lavaron nuevamente y por último se expusieron a 150 μ l. de solución reveladora. (ver apéndice)

3.6 Corrimiento electroforético de la toxina semipurificada obtenida.

Se utilizaron geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12.5 %, uno de concentración al 3.7 % y una solución amortiguadora de corrimiento de Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M SDS 0.1 % a pH 8.3. (ver apéndice) Después de preparada esta mezcla, se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis. Se dejó polimerizar y se agregó el gel de concentración y se colocó el peine de 15 dientes retirándolo al polimerizar el gel.

Esto proporcionó los carriles para colocar las muestras de los sobrenadantes a probar. (Laemmli, 1970)

3.6.1 Procedimiento para el corrimiento de las muestras.

Con base en los resultados obtenidos en la determinación de la toxina LT de *E. coli* y de la del *Vibrio cholerae*, se tomaron 20 microlitros (μ l) de las muestras problema para que tuvieran una concentración aproximada de 20 μ g.

de proteína, se les adicionó un volumen igual de solución digestora (ver apéndice), se mezclaron y sometieron a ebullición en baño María durante 3 minutos; una vez que se preparó la muestra, con una jeringa Hamilton se colocaron 20 μ l para cada muestra en los carriles del gel de concentración; a la par se corrieron muestras con marcadores de peso molecular conocido, como albúmina sérica bovina de PM 66,000 d., Albúmina de huevo de PM 45,000 d., y Tripsinógeno de PM. 24,000 d., con la finalidad de tener puntos de referencia y así poder realizar el cálculo de los pesos moleculares de la toxina (LT) presente en la muestra.

El corrimiento electroforetico se realizó a 20 mA hasta que las muestras penetraron en el gel de separación y posteriormente a 25 mA hasta el momento en que el colorante de referencia llegó al punto final del gel de separación.

3.6.2 Tinción de geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio con azul de Coomassie.

Después de finalizada la electroforesis, se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, se separó el gel concentrador del gel separador, y se sumergió en una solución para teñir (ver apéndice) durante un lapso de 12 horas. Transcurrido el tiempo se sacó con mucho cuidado y se sumergió en solución decolorante I (ver apéndice), con agitación durante 1 hora. Después se transfirió a una solución decolorante II (ver apéndice) hasta que el colorante del gel se eliminó y se manifestaron las bandas de proteínas. (Barcenás, 1993)

3.6.3 Deshidratación de los geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio.

Los geles ya decolorados se sumergieron en una solución conservadora (metanol 50 %, glicerol 10 % y agua 40 %) y se mantuvieron en refrigeración durante 12 horas. Posteriormente se deshidrataron, utilizando el secador (Hofer-Scientific-Instruments-Drygeljr modelo SE540), colocandolos en la parrilla a T = 37°C, sobre papel filtro Whatman No. 1 y sobre ellos una placa de plástico flexible para sellar el sistema y poder conectar el vacío quedando deshidratados en una hora para su análisis posterior. (Barcenás, 1993)

3.6.4 Curva patrón de movilidad relativa de proteínas.

Se realizó una curva patrón graficando en el eje de las ordenadas el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas de referencia y en el eje de las abscisas, la movilidad relativa de las proteínas en el gel de poliacrilamida. En la gráfica ajustada por el tratamiento matemático de mínimos cuadrados y por una regresión lineal, se obtuvo el valor del peso molecular de la toxina problema. (Bradford, 1976)

3.6.4.1 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas.

Este coeficiente fué calculado de la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por las proteínas (bandas).}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra.}}$$

Esta movilidad se obtiene por el desplazamiento que tienen las proteínas de peso molecular conocido con respecto a la distancia total que recorre la muestra.

3.7 Transferencia de la toxina LT de *E. coli* semipurificada y LT de *Vibrio cholerae* en papel de nitrocelulosa.

Se colocó cuidadosamente el gel de poliacrilamida con las proteínas que se van a transferir sobre un papel filtro de nitrocelulosa humedecido anteriormente con el amortiguador de transferencia, (ver apéndice) y se procedió a colocar los elementos para la técnica de la siguiente manera:

cátodo positivo
acrílico
fibra
papel filtro
fibra
acrílico
ánodo en el fondo

Estos elementos se colocaron en el cassette del aparato de electrotransferencia (Genie Blotter modelo 4017, Idea Scientific Company).

Cuando se colocó el papel sobre el gel, se verificó que no existieran burbujas entre ambas superficies, ya que esto puede originar que la transferencia sea inadecuada. Posteriormente se colocó el cassette en la cámara de transferencia, y se conectaron los electrodos de tal manera que el cátodo quedara del lado del gel y se conectó el sistema a la fuente de poder (Battery Charger Schaver Mod. 4612, IDEA Scientific Company). La transferencia se realizó durante hora y media a 12 volts, cuando esta terminó se cortaron tiras de 0.5 mm. del papel con las proteínas transferidas, o sea las muestras de toxina LT de *E. coli* y la toxina de *Vibrio cholerae*. Se procedió a detectarlas mediante la tinción de negro de amido. (Barcenás, 1993)

3.7.1 Tinción de negro de amido de las proteínas transferidas.

La tira de papel de nitrocelulosa se colocó en un recipiente conteniendo una solución de negro de amido al 0.1 % (ver apéndice) por un lapso de 5 min, pasado este tiempo, se lavó con agua destilada por 1 min, y posteriormente con la solución decolorante (ver apéndice), las veces necesarias hasta que se observaron la aparición de bandas. Finalmente se enjuagó con agua destilada para remover los residuos de la solución desteñidora dejando secar al aire.

El papel de NC con las proteínas transferidas se colocó en un recipiente con la solución de bloqueo durante 1 hora en agitación. Se hicieron siete lavados con regulador TBS-Tween 20 al 0.05% y posteriormente se cortaron las tiras de 5 mm de ancho y se colocaron dentro de tubos de ensaye. Después se agregó 1 ml. de la antitoxina LT diluida 1:5 y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente a las tiras se les hicieron 7 lavados con regulador TBS-Tween 20 al 0.05%. Inmediatamente se le agregó 1 ml. del conjugado, (anticuerpo-anti-conejo con peroxidasa), se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se les realizaron una serie de lavados, después se colocó 1 ml de solución de revelado, se incubó 15 minutos, se lavaron las tiras con TBS y por último se dejaron secar a temperatura ambiente. Las bandas se tiñieron de color violeta. (Barcenás, 1993)

3.8 Titulación del antisuero obtenido a partir de LT semipurificada de *E. coli*, por la prueba del dot-ELISA.

Se colocaron 5 μ l de la toxina semipurificada en pequeños círculos de papel de nitrocelulosa de poro 0.22 mm., se dejaron secar a temperatura ambiente, se bloquearon los espacios libres del papel con leche descremada al 5 % / TBS (ver apéndice) durante 1 hora. Posteriormente se lavaron 3 veces con TBS / Tween 20 al 0.05 % (ver apéndice), después de los lavados se colocó 0.2 μ l de suero diluido (1: 10, 1: 20, 1: 40, 1: 80, 1: 160, 1: 320, 1: 640, 1: 1280, 1: 2560, 1: 5120) y se dejaron en agitación a 100 rpm durante una hora; después se lavaron los discos con TBS / Tween, una vez realizado esto se colocó el conjugado (anticuerpo anticonejo con peroxidasa) 1: 5000 y se sometió a agitación durante 1 hora, se lavaron nuevamente y por último se expusieron a 150 μ l. de la solución reveladora. (ver apéndice) El título se determinó como la máxima dilución en donde el color de la solución reveladora fué detectado claramente. (Zhang Hong, 1984)

3.9 Detección de la toxina LT de *E. coli* en quesos producidos experimentalmente.

3.9.1 Obtención del queso experimental.

Se utilizó leche bronca de vaca, la cuál fué sometida a pasteurización lenta a 65° C durante 30 minutos, y se le realizó conteo de coliformes. Para la elaboración de la cuajada, se adicionó a la leche Ca Cl₂ en una proporción de 0.1 a 0.3 por cada 10 litros de leche, posteriormente se agregó el cuajo a una temperatura de 35° C en una proporción de 3.5 ml. por cada 10 litros de leche. El cuajo se diluyó en agua estéril antes de agregarlo a la leche, para que se

dispersara mejor y la coagulación fuera uniforme; se dejó reposar durante un tiempo de 20-30 minutos hasta la formación de la cuajada.

Se verificó esta coagulación separando una de las puntas de la cuajada y se procedió a cortarla en cuadros aproximadamente de 1-2 cms. para facilitar el desuerado y se agitó lentamente hasta que tomó consistencia. La cuajada se dejó reposar hasta quedar totalmente desuerada.

Se desalojó el suero, y al mismo tiempo se fué presionando la cuajada, de tal modo que se formaron bloques compactos, estos se empalmaron uno con otro hasta desplazar por completo el suero.

Se continuó con el corte de estos bloques adicionandoles sal en una proporción del 3 al 4% del peso de la cuajada mezclandola perfectamente.

Finalmente se colocó la cuajada en moldes conteniendo una manta limpia y estirada para evitar que la superficie del queso quedara defectuosa; los moldes quedaron llenos y uniformes, se dejaron reposar prensados con una prensa de 1 kg. de peso durante 12 horas.

3.9.2 Determinación de coliformes en agar MacConkey.

Se sembró una muestra del queso terminado en agar MacConkey para aislar e identificar bacterias fermentadoras de lactosa.

3.9.3 Implementación de la técnica del dot-ELISA e inmunodifusión en agarosa para detectar toxina LT en cepas de *E. coli* incubadas a diferentes temperaturas.

Se inocularon dos trozos de quesos de aproximadamente 3 g. con *E. coli* LT (+) y otro con LT (-), el inóculo fué ajustado a una D. O. de 0.1 a una longitud de onda de 595 nm., se dividieron en tres fragmentos y se incubaron a 37°C, medio ambiente y 4°C respectivamente, durante 18 horas. Posteriormente, se valoró la producción de la toxina, en cada queso mediante la técnica del DOT- ELISA y por inmunodifusión en agarosa, utilizando como control positivo la toxina concentrada, y negativo solución salina al 0.85%, además de la cuantificación de ufc / ml. por el método de Miles y Misra descrito por (Fernández 1981).

3.9.3.1 Detección de la toxina LT por dot-Elisa en quesos inoculados con *E. coli* con y sin inactivación de la peroxidasa endógena.

Después de la inoculación de los quesos a las diferentes temperaturas, ya mencionadas, se tomaron muestras cada 30 min., se homogeneizó aproximadamente 1 g. de cada queso con solución salina al 0.85 %, se

centrifugaron a 3000 rpm en tubos Eppendorf y se determinó en el sobrenadante la toxina LT de *E. coli* por la técnica del dot-ELISA citada anteriormente para la titulación de la toxina, con previa inactivación de peroxidasas endógenas. Se tomaron 5 ul, colocándolos en discos de papel de nitrocelulosa, se dejaron secar y se pusieron en contacto con H₂O₂ al 30% durante 5 minutos para inactivar a dichas enzimas, posteriormente se lavaron con TBS, se bloquearon con leche descremada al 5% TBS, mas tarde se les agregó 0.2 µl de antisuero diluído, se agitaron durante 1 hora, se lavaron con TBS / Tween, y se les agregó el conjugado a una concentración de 1: 5000 y se dejaron reaccionar durante 1 hora, a 37°C, se lavaron y sometieron a la solución reveladora. (Allan, 1985) Ver apéndice

3.9.3.2 Cuantificación de *E. coli* en quesos inoculados.

También se realizaron diluciones decuples de cada muestra tomadas cada 30 minutos, se sembraron en agar MacConkey por el método de Miles y Misra incubandolas a 37°C por 24 hr., para la cuantificación de *E. coli*.

3.9.3.3 Detección de la toxina LT en los quesos por inmunodifusión en agarosa.

Se colocó en un matraz 0.5 g. de agarosa y se agregó 50 ml de solución salina fisiológica pH 7.2, se calentó a fuego lento hasta que el agar se disolvió y no se observan grumos.

Se agregó 1 ml de merthiolate blanco a una concentración final de 1: 10000. Se colocaron 5 ml de agarosa caliente en portaobjetos secos y desengrasados en una superficie plana con una pipeta ancha a cada laminilla y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Posteriormente el agar de los portaobjetos se perforó con un dado o molde perforador y el agar residual se retiró con un aplicador. Los orificios del agar se llenaron con diferentes diluciones de la toxina y un pozo con toxina concentrada, y los pozos contiguos con antisuero. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda incubándose a temperatura ambiente por 24 hrs.

3.10 Trabajo de campo.

Una vez que se estableció el modelo experimental para la detección de la toxina LT de *Escherichia coli* en queso fresco se realizó un muestreo de quesos comerciales para comprobar la presencia de toxina en estos productos obtenidos de diferentes lugares como: el tianguis : mercado establecido al

aire libre en donde se reunen comerciantes en diferentes sitios y días ,
mercado: sitio establecido en lugar fijo para vender mercancías , y
supermercado: establecimiento comercial donde la clientela se sirve así
misma los diversos productos.

3.10.1 Determinación de LT en quesos de tianguis, mercado y supermercado.

Para esta prueba se hizo un muestreo de 96 piezas de queso fresco, de las cuales se obtuvieron 36 de 4 tianguis ubicados en el municipio de Cuautitlán Izcalli, de las colonias: Las palomas, Centro urbano, Atlanta, y Ensueños, donde de diferentes puestos se adquirieron 9 piezas de cada tianguis. Los quesos de mercado que se obtuvieron fueron 30 , 8 del mercado del Carmen, ubicado en la colonia de Infonavit Norte, 8 del mercado de Infonavit centro, 7 del mercado de San Antonio y los últimos 7 del mercado de Romero Rubio, y finalmente el resto, se obtuvieron de tiendas de autoservicio: las muestras fueron de quesos que se encontraban en oferta, y de diferentes marcas. Los quesos fueron del tipo canasta, frescal, panela y doble crema.

De los quesos, se tomó 1 g. de cada uno y se homogeneizó con 10 ml. solución salina al 0.85 % estéril. Se colocaron las muestras en tubos Eppendorf y se centrifugaron, tomando 5 μ l del sobrenadante, se colocó en discos de papel de nitrocelulosa, se dejaron secar a temperatura ambiente y se bloquearon con leche descremada al 5 % en TBS. (ver apéndice) Se hicieron lavados y se les colocó 25 μ l de antisero LT 1:4000, se dejaron reaccionar p durante 1 hora a 37° C y se lavaron con una solución de TBS / Tween, se les colocó posteriormente 0.5 ul de suero anticonejo con peroxidada 1: 5000, se les dejó reaccionar durante 1 hr. a 37° C en agitación, se lavaron los discos con TBS y después se les agregó 40 μ l de solución reveladora durante 1 minuto aproximadamente y finalmente se enjuagaron con agua destilada. Para esta prueba se utilizaron como controles positivos, a la toxina LT obtenida y como control negativo sobrenadante de cultivo de *E. coli* no toxigénica.

3.10.2 Aislamiento de bacterias a partir de quesos positivos a LT.

Para esta prueba se utilizó 1 g. de los quesos positivos a LT, se homogeneizaron con solución salina isotónica se centrifugaron a 3000 rpm para separar las bacterias del sobrenadante, se sembró con una asada, a partir de la pastilla obtenida en medio de agar MacConkey, y se incubaron por 18

hrs. a 37° C, las colonias obtenidas se purificaron utilizando el mismo medio. Finalmente se conservaron en agar nutritivo. A las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas para identificarlas siguiendo las indicaciones del manual Cowan, se sembró en LIA, agar citratos, TSI, hidrólisis de la urea, MR-VP, MIO, malonato, SIM, OF, indol, motilidad, producción de H₂S y reducción de nitratos para establecer el género y especie.

3.10.3 Cuantificación de coliformes totales y fecales en quesos de tianguis, mercado y supermercado.

Para cuantificar coliformes totales, se tomó 1g de queso de cada una de las 96 muestras, se maceraron y homogeneizaron, se realizaron tres diluciones decuples de cada una y se sembraron por triplicado, en caldo Lauril Sulfato Triptosa con tubos de Durham para valorar la producción de gas, se incubaron a 37°C de 18-48 horas, las muestras que presentaron resultados positivos se sembraron en tubos con caldo lactosado, los cuales contenían también campanas para detectar la producción de gas, incubándose a 45°C de 24-48 hrs. Verificando así la presencia de gas para evidenciar a los coliformes fecales, la lectura se hizo en tablas de número más probable.(NMP)

Esta técnica nos permitió valorar la producción de gas, que es una característica importante no solo de *Escherichia coli* sino también de bacterias pertenecientes al grupo coliformes.

3.10.4 Prueba de actividad de la toxina LT "in vivo" a partir de sobrenadantes de quesos positivos a LT.

Para esta prueba se obtuvieron los sobrenadantes de los quesos positivos a LT por la prueba del dot-ELISA, después de su homogeneización y centrifugación se esterilizó el sobrenadante por filtración, y se inocularon en piel de conejo, rasurándolo previamente; las inoculaciones de 0.1 ml. se hicieron vía intradérmica, en esta prueba se utilizaron como control positivo a la toxina LT concentrada, sobrenadantes de quesos negativos a LT por dot-ELISA y solución salina fisiológica.

La lectura de esta prueba se realizó observando los cambios que se tuvieron en la piel del animal desde el cambio en su tonalidad, inflamación e induración etc. midiendo el diámetro de la lesión durante 24 a 72 horas.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Producción de la toxina LT de *E. coli*.

La concentración de proteínas del extracto fué de 4.7 mg / ml., con una D.O. de 0.268 obtenida por la interpolación de resultados en la curva patrón mostrada en la gráfica 1 ajustada por el tratamiento matemático de mínimos cuadrados.

4.2 Corrimiento electroforético de la toxina obtenida.

La gráfica 2 representa la curva patrón realizada con los valores obtenidos del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas de peso molecular conocido.

Los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida del extracto obtenido a partir de la cepa de *E. coli* toxigénica y de las proteínas de PM conocido, se muestran en la figura H, lo que indica que se obtuvieron 2 bandas, la primera corresponde a un PM = 24,000 daltons la que correspondería a la subunidad A y una zona de bandas correspondientes a un PM = 11,000 daltons, las cuales forman el pentámero de la subunidad B de PM = 56,000 daltons, las que posteriormente fueron detectadas por su especificidad en una inmunotransferencia.

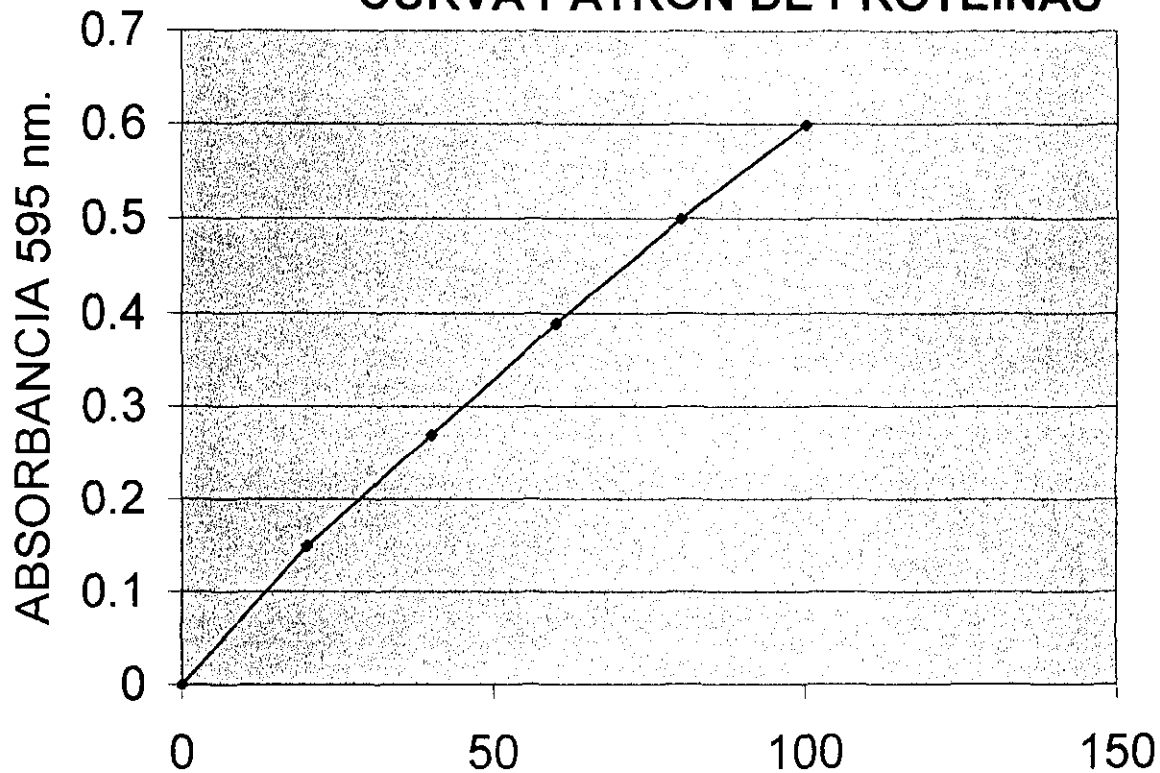
4.3 Producción de la antitoxina.

Después de cumplir con el esquema de inmunización, empleando la toxina LT semipurificada de *E. coli*, se obtuvo aproximadamente 30 ml. de suero de conejo por sangría total.

4.3.1 Reacción de la antitoxina obtenida con la toxina LT semipurificada por Inmunolectrotransferencia.

Después de la transferencia al papel de nitrocelulosa se evidenció la especificidad que presenta el patrón antigénico de la toxina LT de *E. coli* y

GRAFICA 1
CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS



Bradford(1976)

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (ug/ml)

$r = 0.997$

$b=0.02$

$m=0.005$

GRAFICA 2 CURVA PATRÓN DE PESOS MOLECULARES

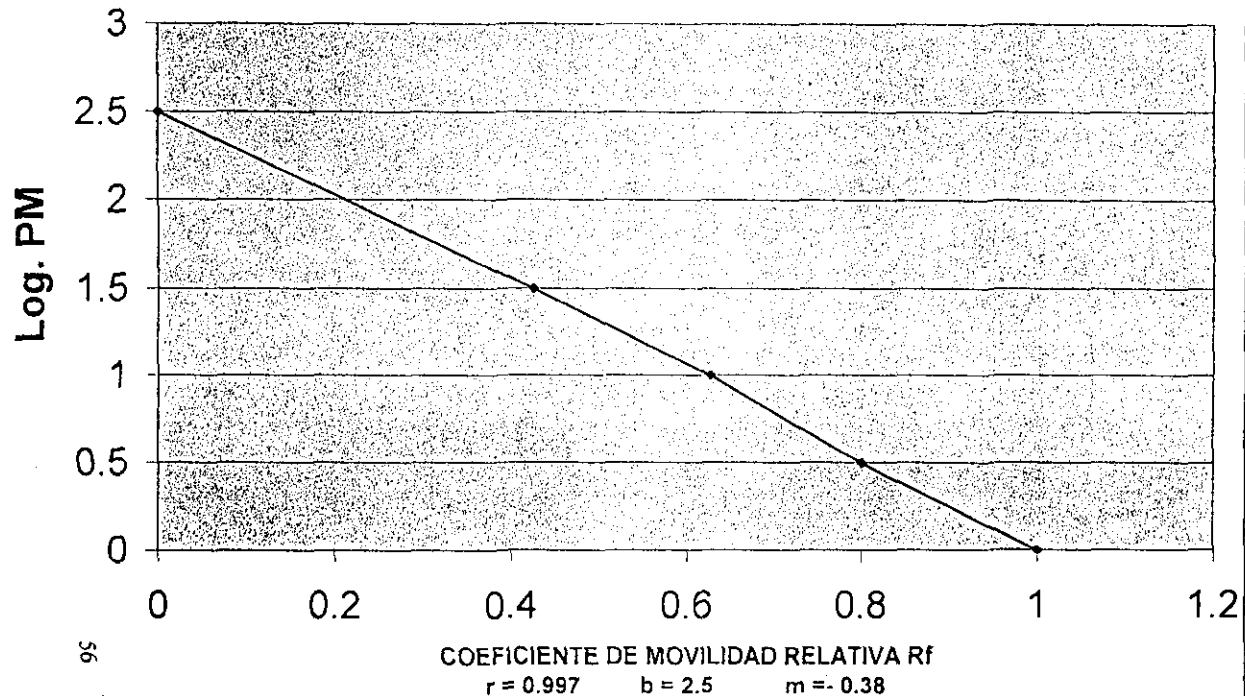
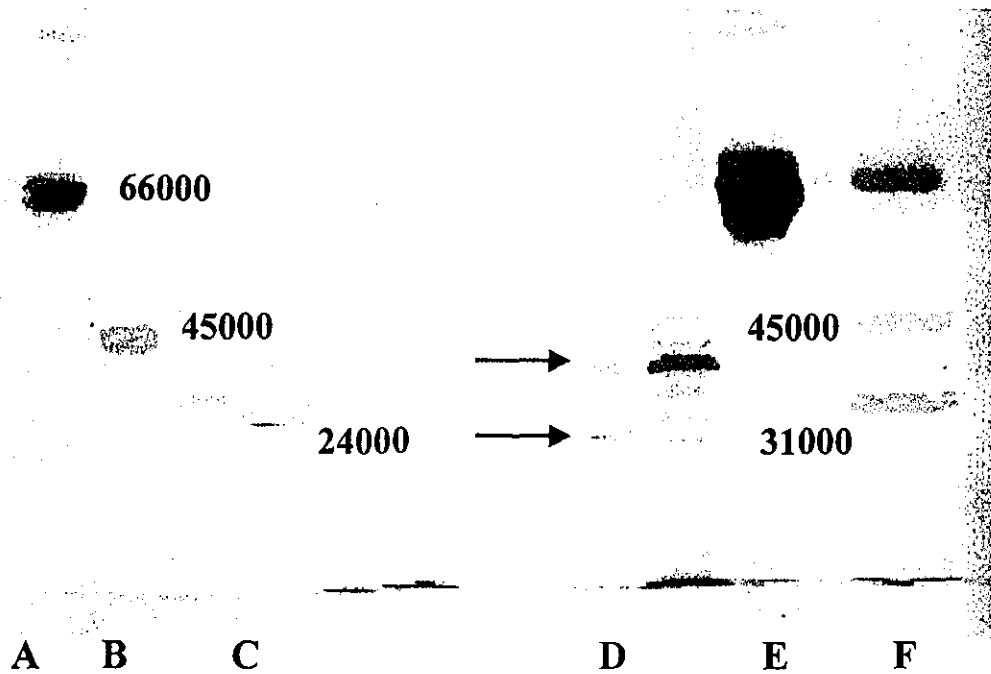


FIG. H
Patrón electroforético de la toxina LT semipurificada.



- A: Patrón de albúmina bovina
- B: Patrón de albúmina de huevo
- C: Tripsinógeno
- D: Toxina LT
- E: Muestra irrelevante
- F: "Pool" de proteínas

el de la toxina de *Vibrio cholerae* los que fueron reconocidos por el antisuero producido. (Ver figura 1)

4.4 Titulación de la toxina semipurificada.

En esta determinación se detectó la toxina LT hasta la dilución 1: 5000. La prueba del dot-ELISA fue capaz de detectar 9.4×10^{-4} mg / ml. de la toxina semipurificada.

4.5 Titulación de la antitoxina obtenida a partir de la toxina LT semipurificada de *E. coli*, por Pba. de dot- ELISA.

El título obtenido mediante la prueba del dot-ELISA fué de 1: 2560 , para ser utilizado en las pruebas posteriores.

4.6 Determinación de la toxina LT de *E. coli* en quesos producidos experimentalmente.

4.6.1 Producción de queso fresco a nivel de laboratorio.

El rendimiento del queso obtenido fue de 500g, / 4.5 litros de leche.

4.6.2 Determinación de coliformes fecales en agar MacConkey.

En el queso obtenido experimentalmente no se aislaron coliformes en concentraciones importantes, se obtuvieron entre 1 –2 ufc/ g.

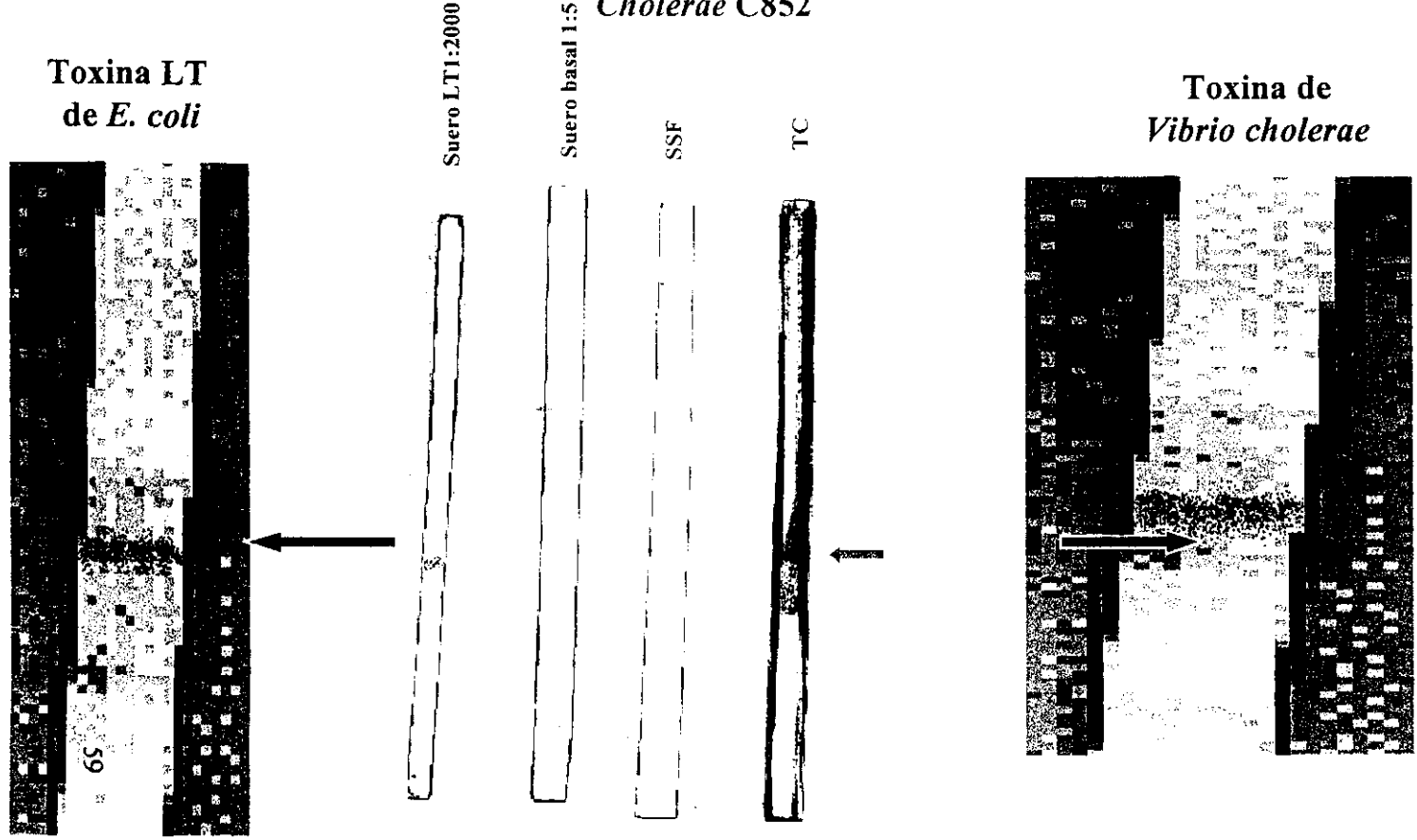
4.6.3 Implementación de la técnica de dot-ELISA para detectar toxina LT en quesos inoculados con *E. coli* incubadas a diferentes temperaturas.

La determinación de la toxina LT de *E. coli* fué positiva por la prueba del dot-ELISA en todas las temperaturas de incubación a las que fué expuesta la muestra de queso inoculado, y negativa en los quesos inoculados con una cepa no enterotoxigénica.

FIG I

Reconocimiento de la antitoxina LT por la LT semipurificada obtenida y por la toxina de *V.*

Cholerae C852



4.6.4 Detección de toxina LT por dot-ELISA y cuantificación de *E. coli* en quesos inoculados.

En esta prueba se observó que el conteo de bacterias inoculadas en el queso fresco producido experimentalmente, en el que se tomó muestra a intervalos de 30 minutos para cuantificar bacterias se detectaron en promedio valores de 1×10^6 ufc/ ml, en una hora y dieron positiva la prueba de detección de toxina LT por dot-ELISA.

4.6.5 Determinación de toxina LT por dot-ELISA en quesos con inactivación de peroxidasas endógenas.

La determinación de la toxina fue negativa hasta la dilución 1: 5120, por la prueba del dot-ELISA y fue la prueba que se siguió empleando con los diferentes quesos analizados. La inactivación de las endoperoxidasas impidió tener resultados falsos positivos por la presencia de peroxidasas endógenas que pudieran encontrarse en los quesos.

4.6.6 Prueba de Inmunodifusión en gel de agarosa.

En la prueba de inmunodifusión en agarosa, la toxina obtenida fue detectada solamente cuando se utilizó sin diluir, es decir la cantidad mínima para detectar la toxina fue de 4.7 mg / ml.

4.7 Trabajo de campo.

4.7.1 Determinación de LT en quesos de tianguis, mercado y supermercado utilizando el antisuero obtenido a partir de LT semipurificada de *E. coli*.

De los quesos muestreados en tianguis, se obtuvieron un total de 30% de muestras positivas a LT de un total de 36.

A nivel de mercado, se obtuvieron un total de 6/30 muestras positivas a la toxina LT el que corresponde a un 20% y en los quesos procedentes de supermercado, se obtuvieron 30 % de positividad de 30 quesos.. Estas determinaciones se realizaron posteriormente inactivando peroxidasas

obteniendo como resultados, en quesos de tianguis 13.2 %, mercado 13.3 % y en los de supermercado 16.6 %. (Ver tabla 7)

4.8 Aislamiento de cepas de quesos frescos obtenidos de tianguis, mercado y supermercado.

Se aislaron e identificaron bioquímicamente cepas lactosa positivas y algunas lactosa negativas en los quesos que presentaron positiva la prueba de detección de la toxina LT.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas aplicadas según Mac Faddin (1990), a las cepas aisladas de los quesos analizados que dieron la prueba del dot-ELISA positiva a la toxina LT de *E. coli*, corresponden a los siguientes géneros y especies:

Quesos de tianguis:

T11-29	<i>Enterobacter agglomerans</i>
T26-54	<i>Enterobacter hafniae</i>
T11-59	<i>Enterobacter agglomerans</i>
T25-55	<i>Klebsiella spp.</i>
T26-55	<i>Escherichia coli</i>

Quesos de mercado:

M16	<i>Citrobacter spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i>
-----	-----------------------------------------------------

Quesos de supermercado:

A38-39	<i>Citrobacter spp.</i>
A59-17	<i>Enterobacter agglomerans</i>
A51-29	<i>Klebsiella spp.</i>
A51-28	<i>Klebsiella spp.</i>
A31-45	<i>Enterobacter agglomerans</i>
A39-33	<i>Klebsiella spp.</i>

TABLA 7

Tabla de frecuencia de la toxina LT por prueba del dot-ELISA con inactivación de peroxidasas endógenas en quesos frescos de diferentes fuentes.

QUESOS FRESCOS	dot-ELISA		TOTAL	%
	+	-		
TIANGUIS	5	31	36	13.2
MERCADO	4	26	30	13.3
SUPERMERCADO	5	25	30	16.6
	14	82	96	
%	14.5	85.5		
		$X^2 = 1.02$	$p > 0.1$	

4.9 Cuantificación de coliformes totales y fecales en quesos de tianguis, mercado y supermercado.

En esta prueba se obtuvieron las concentraciones de coliformes totales que se muestran en la tabla.(Ver tabla 8)

4.10 Prueba de actividad de la toxina LT “in vivo” a partir de sobrenadantes de quesos positivos a LT.

La prueba de actividad biológica de la toxina LT detectada en los quesos muestreados, presentó positividad en las pruebas intradérmicas en el conejo. (Ver tabla 9 y Fig. J)

TABLA 8

Coliformes fecales encontrados en los quesos analizados positivos a la toxina LT de *E. coli*.

Quesos (+) a LT	No. de coliformes fecales
Tianguis	
T11	1×10^3 ufc/g.
T18	1×10^4 ufc/g.
T26	1×10^3 ufc/g.
T30	1×10^3 ufc/g.
T36	1×10^3 ufc/g.
Mercado	
M9	2×10^3 ufc/g.
M16	90 ufc/g.
M24	2×10^3 ufc/g.
M25	1×10^3 ufc/g.
Supermercado	
A53	1×10^3 ufc/g.
A56	1×10^3 ufc/g.
A57	90 ufc/g.
A31	1×10^3 ufc/g.
A38	2×10^4 ufc/g.

TABLA 9

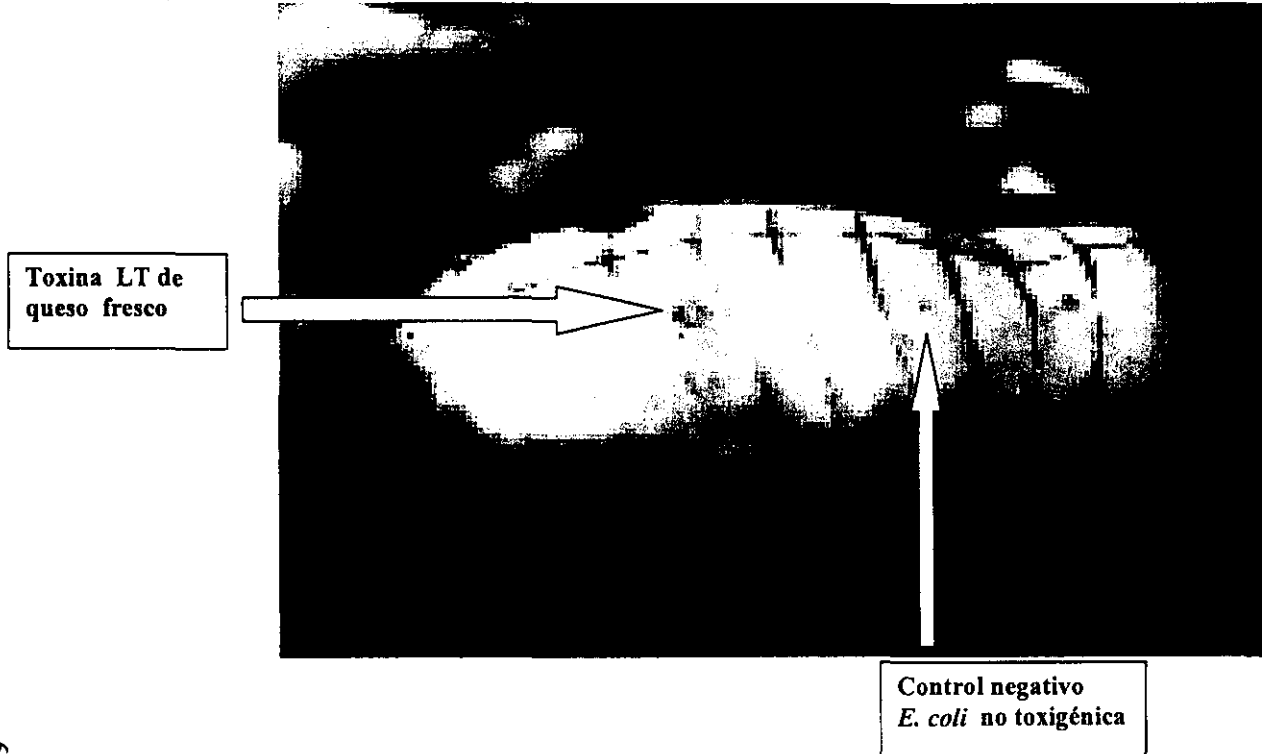
Actividad biológica de la toxina LT cruda a partir de sobrenadantes de los quesos (+) a LT por dot-ELISA.

Conejos	1		2		3	
Quesos	Tianguis		Mercado		Supermercado	
	dot Elisa	Pba. Act. Biol.	dot Elisa	Pba. Act. Biol.	dot Elisa	Pba. Act. Biol.
T12	+	+	M25	+	A31	+
T18	+	+	M24	+	A 51	+
T26	+	+	M23	+	A53	+
T36	+	+	M16	+	A 56	+
T1C	-	-	M 9	+	A 57	+
C(+)	+	+	T2C(-)	-	T4C(-)	-
			C(+)	-	C(+)	-

C= Control (+) Toxina LT
 C= Control (-) Sobrenadantes de quesos (-) a LT.

FIG. J

Prueba de actividad biológica de la toxina LT obtenida de sobrenadantes de queso fresco.



DISCUSIÓN

Se logró obtener la toxina LT de *E. coli*, siguiendo las especificaciones dadas por Evans y col., haciendo crecer a la bacteria en medio de Caye, e induciendo la liberación de la enterotoxina con polimyxina B, obteniendo un extracto que fué purificado según Clements y Finkelstein (1979), precipitándola con sulfato de amonio y dializándola durante 48 horas.

Finkelstein (1985), reporta que la toxina LT tiene un gran parecido en estructura a la toxina de *Vibrio cholerae*, ésta presenta un PM de 85,000 d. confirmandose por electroforésis en presencia de SDS en donde se observó que la toxina está formada por 2 tipos de proteínas, una de PM de 25,500 la cuál se ha designado A, y la otra de 56,000 la que se designó B. En condiciones de disociación se ha revelado que la proteína de 56,000 d, es un agregado de 5 pequeñas proteínas de PM de 11,500. Con respecto a la parte de 25,000 daltons, bajo tratamiento drástico, se puede convertir en dos proteínas de PM de 23,000 y 5,000 daltons, designadas A₁ y A₂ respectivamente. (Clements, 1979) En este trabajo se encuentra que hay proteínas en el extracto semipurificado de un cultivo de *E. coli* con esos pesos moleculares.

El título de anticuerpos obtenido mediante la técnica del dot-ELISA, después de cuatro semanas de realizada la inmunización, fué una clara manifestación de la capacidad antigénica de la toxina LT semipurificada de *E. coli*. Como citan Vázquez, y González (1996), esta técnica ha sido muy utilizada para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, así como para la detección de la toxina producida por ETEC.

El reconocimiento por inmunoelectrotransferencia de la toxina LT de *E. coli* parcialmente purificada y la toxina del *Vibrio cholerae* por la anti LT obtenida en este trabajo, nos indica que a pesar de que el antisuero producido se obtuvo empleando una toxina LT semipurificada, fué sin embargo capaz de reconocer la toxina LT de *Vibrio cholerae*, indicando que puede ser utilizado en el diagnóstico de la toxina en una muestra sospechosa de queso fresco.

Al estandarizar la prueba de detección de la toxina en los quesos inoculados con *E. coli*, por el método del dot-ELISA, e incubándolos a

diferentes temperaturas, permitió establecer que existe un riesgo que implica la presencia de esta bacteria enterotoxigénica en el queso aún mantenido en condiciones de refrigeración, la cual suele ser entre 4 y 7° C en la mayoría de los centros de expendio y más aún si es a temperatura ambiente como ocurre en los mercados tipo tianguis (mercados ambulantes).

En otros estudios sobre la detección de la toxina LT, se ha utilizado la prueba de inmunodifusión en agarosa, como cita Clements J. (1978), quién realizó un ensayo mediante esta técnica para manifestar la relación existente entre la toxina LT de *E. coli* y la toxina (CT) de *Vibrio cholerae*, evidenciando las relaciones entre la región B de la toxina del *Vibrio cholerae* y la toxina LT de *E. coli*. Sin embargo en este trabajo para la inmunodifusión realizada, el reconocimiento antigénico solo se logró cuando se utilizó el extracto en donde se encontraba la toxina con una concentración de 4.7 mg / ml, resultando negativa en los diferentes quesos inoculados, lo que indicaría la baja sensibilidad de esta prueba.

La prueba del dot-ELISA fué lo suficientemente sensible para detectar la dosis de toxina liberada por *E. coli* inoculada en los quesos.

Ya que la peroxidasa existe en forma natural tanto en tejidos de animales o en sus productos biológicos como la leche y por lo tanto en quesos, fue necesario adicionar peróxido de hidrógeno a las muestras para inactivar las endoperoxidasas propias de los quesos y evitar resultados falsos positivos en este estudio. (Jay. 1990, Allan, 1985) Como se observa en la tabla 12 el número inicial de quesos positivos a LT por la técnica del dot-ELISA en los quesos obtenidos de tianguis fue de 11, los de mercado 6 y los de supermercado 9, después del tratamiento con peróxido se obtuvieron: 5, 4 y 5 respectivamente, lo cuál indica, que es indispensable realizar el tratamiento de las muestras con peroxidasa para eliminar resultados falsos positivos, ya que la prueba del dot-ELISA utiliza antisuero con peroxidasa.

Si en los estudios realizados por Bonita A. Glatz y col. (1979), obtuvieron la producción de enterotoxina por el desarrollo de *E. coli* en leche, era muy probable detectarla también en derivados lácteos como los quesos, los cuales en ocasiones son elaborados con leche cruda y aunado a esto están las malas condiciones de almacenamiento, expendio y la manipulación poco higiénica de los mismos, especialmente en los quesos expendidos en mercados ambulantes donde carecen de una conservación adecuada; en este caso los quesos se mantienen durante el tiempo de su comercialización a temperatura ambiente y expuestos al aire, polvo, y contaminación ambiental. En los

quesos de mercado y tiendas de autoservicio, el porcentaje fue menor 13.3% y 16.6% respectivamente, aunque debe considerarse alto para este tipo de establecimientos. Posiblemente se debe a que parte del tiempo los mantienen a temperaturas de refrigeración, pero para comercializarlo la temperatura de expendio es inadecuada, podría haber también el problema de que aunque los quesos fuesen preparados con leche pasteurizada estos podrían sufrir en parte contaminación por medio ambiente contaminado o por el manipulador poco higiénico.

Es necesario tomar en cuenta que los quesos frescos que se expenden en tianguis, son alimentos que permanecen a temperatura ambiente, y durante la primavera y verano esa temperatura oscila entre 20 a 35 grados según la población en donde se expendan. La situación puede agravarse si los quesos fueron elaborados con leche sin pasteurizar, lo cual los hace susceptibles a la presencia de bacterias coliformes que podrían ser toxigénicas, lo que implica un riesgo potencial para la salud.

En los resultados obtenidos de quesos de mercado observamos que el porcentaje es ligeramente menor que para tianguis, esto hace ver que la disminución de quesos contaminados por la toxina se puede deber a que las condiciones en las que se expende en un mercado son diferentes que en el caso anterior, ya que generalmente los mercados no se encuentran al aire libre, están cubiertos con techo y paredes, y en la mayoría de los casos se tienen frigoríficos en donde se almacenan los quesos, aunque a pesar de esto sabemos que la baja temperatura no asegura de ninguna manera la eliminación de bacterias toxigénicas, ya que pueden continuar multiplicándose a un ritmo lento ya que son psicrótrofas. Como se menciona en este trabajo acerca de la detección de toxina LT de *E. coli*, en quesos inoculados e incubados a diferentes temperaturas, se demostró la presencia de toxina incluso en los productos en refrigeración, indicando que el microorganismo se logró reproducir y liberar toxina a nivel detectable por la prueba del dot-ELISA.

También es importante señalar que pese a las condiciones higiénicas en que se expenden los quesos en el interior de un mercado, no se debe perder de vista que los manipuladores en muchas ocasiones son las principales fuentes de contaminación, así como se presentó en el año de 1980 en Estados Unidos brotes de gastroenteritis por el consumo de alimentos contaminados por manipuladores infectados con ETEC. (Hipertext, 1998)

En las muestras de queso obtenidas de supermercado, se obtuvo un porcentaje de casos positivos igual que en las muestras de tianguis y mercado. Este resultado parece paradójico ya que los quesos que se expenden en el supermercado son almacenados en condiciones de refrigeración supuestamente más estrictas, además de que muchas veces son empaquetados con películas plásticas lo cuál ejerce una mayor protección para este tipo de alimentos. Como ya se mencionó antes, en la mayoría de casos los alimentos al ser producidos tienen excelentes controles de calidad sanitaria, pero cuando salen a la venta, el manejo inadecuado por los manipuladores es una verdadera fuente de contaminación que genera una gran carga bacteriana a los productos alimentarios. En el caso de un supermercado, el número de personal que tiene contacto con los quesos es mucho mayor que en un tianguis y que en el mercado, además que en estas tiendas de autoservicio dentro de sus prácticas de mercadotecnia la filosofía es minimizar pérdidas de cualquier producto, y entonces los quesos viejos y sobrantes, los mezclan para hacer nuevas presentaciones de estos y poderlos expender a menores precios, y estas operaciones podrían ser la causa de la difusión de bacterias contaminantes entre ellos.

El primer reporte en E.U. de un brote de diarrea por *E. coli* ocurrió en 1971, y fué originado por el consumo de quesos importados de tipo francés Camembert y Brie. Y así como puede estar este microorganismo podrían encontrarse otras variedades igualmente patógenas o incluso otros géneros como *Salmonella sp.* o patógenos entéricos y toxigénicos. (Marier, 1973)

Lo anteriormente mencionado se relaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que aunque no se trata del mismo tipo de queso, la materia prima es similar y podría estar contaminada desde su inicio, ya que esto no es garantía de obtener un producto en buenas condiciones de higiene, como se sabe, para la elaboración de quesos frescos en muchas ocasiones, no se garantiza la pasteurización de la leche, y aunado a sus propiedades nutritivas, lo hacen muy susceptible a contaminación, por lo que el consumo de éste, puede traer verdaderos problemas a niños, ancianos y personas inmunocomprometidas.

La prueba de intradermorreacción positiva con algunos quesos analizados, demuestra que la toxina estaba activa a pesar de la acidez del producto.

De las muestras que dieron resultados positivos a la toxina LT de *E. coli*, también se realizó el aislamiento de bacterias en medio MacConkey, y a partir de estas, se obtuvieron 13 cepas fermentadoras de lactosa en quesos de tianguis, en los quesos de mercado 10 cepas fermentadoras de lactosa y en los de autoservicio solamente 9 cepas, esto hace ver que muchas de estas cepas pueden corresponder al grupo de bacterias coliformes, lo que se comprobó al realizar el conteo de éstos. La caracterización de las cepas como lactosa positivas ó negativas, orienta para suponer la presencia de bacterias pertenecientes a este grupo, ya que en su mayoría son fermentadoras del carbohidrato, así como cita Nataro (1998), que el 90% de las cepas aisladas de *E. coli* productoras de diarrea, son fermentadoras de lactosa. Por lo tanto es importante ya que existe la posibilidad de que bacterias lactosa positiva del grupo coliforme, podrían ser productoras de toxina LT, aunque cabe señalar que existen Enterobacterias no fermentadoras del azúcar y producen toxinas como en el caso del género *Salmonella* y *Shigella*. (Sears, 1996) De los quesos analizados que presentaron la prueba positiva a la toxina LT de *E. coli*, se encontró desarrollo de coliformes; en un 54% , los que corresponden en promedio a cantidades de 1×10^3 - 1×10^4 ufc/ ml, 50% a 1×10^3 - 2×10^4 ufc/ ml y 27% 1×10^3 - 2×10^4 ufc/ g, respectivamente.

Por los resultados obtenidos podemos observar que en este estudio, probablemente no se está detectando unicamente toxina LT de *E. coli*, sino que también pueden haberse detectado toxinas producidas por otras bacterias coliformes, las cuales posiblemente tienen un parecido antigénico, a la toxina termolábil de *E. coli* esto es importante en cuanto a qué la técnica del dot-ELISA, detecta toxinas LT no solo de esta bacteria, sino también de otros coliformes capaces de producir toxina relacionada con la de *E. coli*, característica que pudo ser adquirida posiblemente a través de mecanismos de conjugación bacteriana.

Estas toxinas se consideran similares a las de varios patógenos entéricos tales como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* etc. Además que su efecto no solo está restringido al intestino in vivo, sino también a cultivos celulares in vitro. La actividad biológica de esas enterotoxinas es el resultado de la interacción de receptores de membrana con la adenilato ciclasa, dando como resultado la elevación de los niveles de AMPc, el cuál interviene en la regulación de fluidos intestinales.

Las toxinas LTy ST de bacterias como *V. cholerae*, *E. coli*, *Salmonella* sp. , *A. hydrophyla* y *Y. enterocolítica* y otras, tienen mucho en común en la estructura de receptores de membrana y modo de acción bioquímico. La actividad biológica de las toxinas ST de *E. coli* y *Y. enterocolítica* son iguales.

La enterotoxina de *C. perfringens* la producida por *Sh. dysenteriae*, y posiblemente las de algunas cepas de *E. coli* parecen diferir de otras enterotoxinas por su acción en la biosíntesis de proteínas y no por la activación de sistemas de nucleótido ciclasa.

La similitud estructural e inmunológica entre varias enterotoxinas LT sugieren un origen genico común con transferencia de genes entre las diferentes especies bacterianas responsables de desarrollar enterotoxigenicidad.

Otra situación que puede explicar la producción de la toxina LT por otras bacterias y no por *E. coli*, como citan (Albert 1992, Frankel 1994, Law 1994, Ridell 1994, Shauser 1993), que cepas de *E. coli* EHEC y EPEC y un biotipo de *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*, que también su virulencia, puede estar asociada a genes *eaeA* (EPEC A/E). En contraste a la scepas de *H. alvei*, que generalmente no son consideradas como patógenos. Los cepas *eaeA* positivas de *H. Alvei*, pueden ser diarreogénicas. Los genes pueden ser necesarios pero no suficientes para la adherencia íntima del patógeno para las células epiteliales, y para la formación de las lesiones características de A/E en la scélulas de bosde de cepillo. Aunque se sabe que no solo los genes *eaeA* están asociados a virulencia, ya que también se ha mostrado que *Hafnia alvei eaeA* negativo se ha encontrado involucrada en mecanismos diarreicos.

En otro estudio realizado por Patón (1996), en donde organismos productores de toxinas Shiga-like, fueron aislados de heces de niños con síndrome urémico, fueron analizados por PCR e hibridización por colony blot. Una de las cepas identificadas fue *E. coli* OR: 119 y la otra fue identificada como *Enterobacter cloacae*. Ambas cepas fueron citotóxicas para células Vero y por el análisis de DNA por Souther blott indicaron contener genes relacionados con el fenómeno, *slt-II*, esos genes fueron localizados con fragmentos de tamaños similares de restricción.

La secuencia de nucleótidos indicó que la toxina de *E. coli* es codificada por genes *slt-II* realacionados también con una variante de *E. coli* productora de toxina Shiga-like II.

Por lo tanto, estos experimentos exolican que existen cepas de Enterobacterias que comparten genes involucrados en la producción de toxinas y factores de virulencia, de tal suerte que esto puede ser responsable de producir reacciones cruzadas.

Es posible que muchas de las nuevas enterotoxinas deben su origen a recombinación genética con enteropatógenos como *V. cholerae*. (Annapurna E. Sanyal, 1997)

Por lo tanto, los genes que codifican para la producción LT son (elt o etx), los cuales residen en plásmidos. (Nataro, 1998)

Las funciones genéticas que se requieren para transferencia son aportadas por los genes contenidos en plásmidos transmisibles. Algunos de estos pueden movilizar a otros plásmidos o porciones del cromosoma para ser transferidos.

Procedimientos con plásmidos han permitido a investigadores elaborar mapas de cromosomas circulares de miembros de géneros bacterianos distantes, por ejemplo, plásmidos de resistencia a medicamentos, llamados factores R, pueden promover transferencia cromosómica desde bacterias diversas, por lo tanto es posible pensar que se lleva a cabo transferencia de material genético que confiera la capacidad de producir toxina LT a otras bacterias que no sean *E. coli*.

CONCLUSIÓN

6. CONCLUSIÓN

1.- El presente estudio se logró detectar mediante la prueba inmunológica dot-ELISA, la presencia de la toxina LT de *E. coli* directamente en quesos frescos inoculados, producidos a nivel de laboratorio y en los obtenidos en el comercio..

2.- Los hallazgos anteriores, posiblemente permitirán realizar el diagnóstico temprano de LT en algunos alimentos en donde se sospeche de una mala manipulación.

3.- Existe un riesgo potencial de adquirir la enfermedad diarreica por el consumo de quesos frescos obtenidos de diversas fuentes que no hayan sido adecuadamente conservados y manipulados.

4.- Se detectó no solamente la presencia del género *Escherichia*, sino también otras bacterias como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, las cuáles dan reacción cruzada a la prueba de detección de toxina termolábil de *E. coli*, por lo que se sugiere continuar con este tipo de estudios, y tomar en cuenta la presencia de estos géneros bacterianos, hasta encontrar la probable relación entre toxinas producidas por éstos.

Si se quiere evitar la interferencia de determinantes antigénicas de otras bacterias, se podría producir anticuerpos monoclonales para la detección de la toxina LT.

5.- Se logró producir y purificar parcialmente la toxina LT de *E. coli*, a partir de la cepa tipificada de referencia como se planteó inicialmente la cuál fue caracterizada por corrimiento electroforético, la que fue utilizada para la obtención de la antitoxina LT, la cuál fue titulada y esto permitió la valoración de la eficiencia de las pruebas del dot-ELISA y Oucherlony para detección de la toxina LT.

APÉNDICE

7. APENDICE

MEDIO DE CAYE

Agar Casaminoácidos	2.0	%
Extracto de levadura	0.6	%
NaCl	0.25	%
K ₂ HPO ₄	0.871	%
Glucosa	0.25	%
Soln. Trazas	0.1	% vol. / vol.
Soln. Trazas	5% Mg SO ₄ ,	0.5 % MnCl y 0.5 % FeCl ₃ .
PH = 8.5		

BUFFER DE FOSFATOS, pH 7.2

Solución A (NaH₂PO₄ 0.2 M): se disolvieron 27.6 g de NaH₂PO₄.H₂O en agua destilada, completando a un litro.

Solución B (Na₂HPO₄ 0.2 M): 53.65 g de Na₂HPO₄.7H₂O se disolvieron en agua destilada, llevando a volumen final de un litro.

Solución A	140 ml.
Solución B	360 ml
Agua destilada	500 ml.

GELES DISCONTINUOS DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

A) Solución de monómeros, acrilamida-bis acrilamida.

Acrilamida	30 g
Bis acrilamida	0.8 g.
Agua destilada	100 ml.

Se filtró en papel Whatman No. 1 y se guardó en frascos ambar a 4°C.

B) Regulador del gel de separación Tris-HCL 1.5 M. pH 8.8.

Trizma base 18.15 g.
Agua destilada 90 ml.

Se ajustó el pH con HCL 6 N, se aforó a 100 ml., se filtró en papel Whatman No. 1 y se guardó a 4°C.

C) Regulador del gel concentrador Tris-HCL 0.5 M pH 6.8.

Trizma base 3.0 g.
Agua destilada 40.0 ml

Se ajustó el pH con HCL 6N, se aforó a 100 ml, se filtró en papel Whatman No. 1 y se guardó a 4°C.

D) Lauril Sulfato de sodio. (SDS) al 10%.

SDS 10 g.
Agua destilada 100 ml.

E) Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio 0.1 g.
Agua destilada 1.0 ml.

Se prepara al momento de usarse.

F) Gel de separación:

Solución de monómeros 12 ml.
Tris 1.5 M, pH 8.8 7.5 ml.
SDS 10% 0.6 ml.
Agua destilada 10.05 ml.

Se hizo vacío durante 15 minutos.

Persulfato de amonio 10% 0.075 ml.
N'N'N'N' tetrametiletilendiamina (TEMED)..... 0.005 ml.

G) Gel de concentración.

Solución de monómeros	1.33 ml.
Tris 0.5 M, pH 6.8	2.50 ml.
SDS al 10%	0.20 ml.
Agua destilada	6.10 ml.
Se hizo vacío durante 10 minutos.	
Persulfato de amonio al 10%	0.05 ml.
TEMED	0.005 ml.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CORRIDA (TRIS 0.025 M, GLICINA 0.192 M, SDS AL 0.1%, pH 8.3.

Trizma base	3.0 g.
Glicina	14.4 g.
SDS al 10%.....	10.0 ml.
Agua destilada c.b.p.....	1000.0 ml.

No se debe ajustar el pH. El regulador del tanque inferior puede ser reusado 4 ó 5 veces, el del tanque superior debe ser descartado cada vez.

SOLUCIÓN DIGESTORA.

Tris 0.5 M, pH 6.8	4.375 ml.
SDS.....	0.1 g.
Glicerol.....	0.5 ml.
2-mercaptoetanol.....	0.25 ml.
Azúl de bromotimol.....	0.05 g.

SOLUCIÓN MADRE PARA TINCIÓN DE PROTEÍNAS.

Azúl de Coomasie R-250.....	2 g.
Agua destilada	200 ml.

COLORANTE DE TRABAJO PARA TINCIÓN DE PROTEÍNAS COOMASIE R-250 AL 0.125%.

Solución madre de azúl de Coomasie.....	62.5 ml.
Metanol absoluto.....	250.0 ml.

Acido acético glacial.....	50.0	ml.
Agua destilada.....	137.5	ml.

Se filtro en papel Whatman.

SOLUCIÓN DESTENIDORA I PARA EL GEL.

Metanol absoluto.....	500.0	ml.
Acido acético glacial.....	100.0	ml.
Agua destilada.....	400.0	ml.

SOLUCIÓN DESTENIDORA II PARA EL GEL.

Metanol absoluto	25	ml.
Acido acético glacial.....	35	ml.
Agua destilada	440	ml.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA (TRIS 0.025 M, GLICINA 0.192 M, pH 8.3 METANOL 20% v/v).

Trizma base	3.023	g.
Glicina	14.4	g.
Metanol.....	200.0	ml.
Agua destilada	800.0	ml.

SOLUCIÓN DE NEGRO DE AMIDO AL 0.1%

Negro de amido	0.1	g.
Metanol.....	45.0	ml.
Acido acético glacial.....	10.0	ml.
Agua destilada.....	45.0	ml.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TRIETANOLAMINA pH 7.2 (TRIS).

Cloruro de sodio.....	7.5	g.
Trietanolamina.....	2.8	ml.
Acido clorhídrico 1 N.....	17.0	ml.
Cloruro de magnesio.....	0.1	g.
Cloruro de calcio.....	0.02	g.

Agua destilada.....980.2 ml.

SOLUCIÓN REVELADORA.

Alfa-cloronaftol..... 0.03 g.
Metanol absoluto..... 10.0 ml.
TBS, pH 7.2 50.0 ml.
Peróxido de hidrógeno..... 0.05 ml.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Albert, M. J., Faruque, M. Ansaruzzaman, M. Islam, K. Haider, K. Alam, L. Kabir, and Robins-Browne. (1992) Sharing of virulence associated properties at the phenotypic and genes levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* **37** : 310 – 314.

Albert, M. J., S. M. Faruque, A. S. Faruque, P. K. Neogi, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, K. Alam, and M. S. Akbar. (1995) Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 973 – 977.

Alexander. T. J. L. (1994) Neonatal diarrhoea in pigs. P. 151 – 170. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford. United Kingdom.

Allerberger, F., Rossboth, D., Dierich, M.P. Aleksie S., Schmidt, H. & Dierich, M.P. Aleksie S., Schmidt, H. & Kercha, H. 1996. Prevalence and Clinical manifestations of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. *European Journal of Clinical microbiology and Infections Diseases* **15**: 545-550.

Allan G.M., M.S. Mc Nulty, D Tood J.B. Mc Ferrow. (1985). The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by immunoperoxidase labelling *Vet. Microbiol.* **10**: 481-486.

Annapurna E, Sanyal S. C. (1997) Enterotoxicity of *Aeromonas hydrophyla*. *Journal of Medical Microbiology* **10**: 317-323.

Barcenas Morales G. (1993). Comparación de la respuesta inmune humoral de cerdos inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la desarrollada en casos clínicos de rinitis atrófica porcina.

Ballows, A., W. J. Hauster, K. L. Herrmann, H. D. Insenberg, and H. J. Shadomy. (1991). Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington. D.C.

Bettelheim, K. A. (1994). Biochemical characteristics of *Escherichia coli*, p. 3-30. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International. Wallingford. United Kingdom.

Bernadette D.G. M. Franco, Beatriz E.C. Guth and Luis R. Trabulsi (1987). Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from foods in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Food Protection* **50** (10): 832-834.

Bonita A. Glatz and Steven A. Brudvig (1980). Enterotoxin Production in milk by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **43** (4): 298-299.

Bonita A. Glatz and Steven. A. Brudvig (1980). Survey of Comercially Available Cheese for Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **43**: (5) 395-398.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Burgess N.M. Bywater. R.J. Cowley. C.M. Mullan N.A. Newsome, P.M. (1978). Biological Evaluation of a Methanol-Soluble, heat-stable. *Escherichia coli* enterotoxigenic in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect Immun.* **21**: 526-531.

Carpenter, C.J.C. (1980). Clinical and Pathophysiologic fuatures of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in secretory diarrhea. *Field M. Fordtran S. J. Schultz G.S.* (eds) *Am. Physiol. Soic. Baltimore U.S.A.* 67-83.

Cassel, D., Pfeuffer, T. (1978). Mechanism of cholerae toxin action, covalent modification of the guanil nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. natl, Acad. Sci U.S.A.* **75**: 2669-2673.

Cassels, F. J., and M. K. Wolf. (1995) . Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J. Ind Microbiol.* **15**: 214 -226

Clements J.D. and Richard A. Finkelstein (1979). Isolationand Characterization of Homogeneous Heat-Labile Enterotoxins with High Specific Activity from *Escherichia coli* cultures. *Infection and Immunity* **24**: (3) 760-769.

Clements J.D. and Richard A. Finkelstein (1978). Immunological Cross-Reactivity Between a Heat-Labile Enterotoxin (s) of *Escherichia coli* and Subunits of *Vibrio cholerae* Enterotoxin. *Infect Immun.* 21: (3) 1036-1039.

Cravioto. A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3 : 95 – 99.

Cruz, J. R., Gill, L, Cano, F., caceves, P. & Pareja, G. (1981). Breast milk anti-*Escherichia coli* heat-labile toxin IgA antibodies Protect against toxin induced infantile diarrhea. *Acta Paediatrica Scandinavia* 77: 658-662.

Cryan, B. (1990) Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat – stable enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 28: 792 – 794.

Chapman, P. A., and C. M. Daly. (1989). Comparison of Y1 adrenal cell and coagglutination assay for detection of *Escherichia coli* heat – labile enterotoxin. *J. Clin. Pathol.* 42: 755 –758.

Danielson, M. L., R. Mollby, H. Brag, N. Hansson, P Johsson, E. Olsson, and T. Wadstrom. (1979). Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and out-breaks of food-borne in Sweden. *J. Hyg. (Camb)* 83: 33-40

De Graf, F. K., and W. Gaastra. (1994). Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*, 58 – 83. In P. Klemm (ed). *Fimbriae: adhesion, genetics, Biogenesis, and vaccines.* CRC Press. Inc., Boca Raton. Fla.

Donta, S. T., H. W. Moon, and S. C. Whipp. (1974). Detection of heat-labile *Escherichia coli* enetrotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* 183: 334 – 336.

Doyle J. Evans Jr., Dolores and Sherwood L. Gorbach (1974). Polymyxin B-Induced Release of Low- Molecular-Weight, Heat-Labile Enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 10: (5) 1010-1017.

Doyle J. Evans., Evans. D.G. Duppont. H. L., Orvkov F. and Orskov, I (1977). Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* Isolated from adults with diarrhea, sugestive evidence for and interrelationship with serotype *Infect Immun.* 17: 105-111.

Douce, G., C. Turcotte, I. Copley, M. Roberts, M. Pizza; M. Domenghini, R. Rappuoli, and G. Dougan. (1995). Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92:** 1644 – 1648.

Dupont H. L. (1980) Enteropathogenic organisms, New Etiologic Agents and Concepts of Disease *Medical Clinics of North America* **62:** 945-960.

DuPont , H.L. (1995). Pathogenesis of traveler's diarrhea. *Chemotherapy* 41 (Suppl. I): 33-39.

Elwell, L., Shipley, P.L. (1980) Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals *Am. rev. Microbiol.* **34:** 465-496.

Eslava, C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. (1993) Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstr. **B-105** : 44 In Abstracts of 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology. Washington. D.C.

Evans, D. J., Jr., D. G. Evans and S. L. Gorbach. (1973) . Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect Immun.* **8:** 725 - 730

Evans D. J. Evans, D.G. Dupont. H.L. Orskov and Orskov, Y. (1977). Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults, with diarrhea sigestive evidence for and interrelationship with serotipe. *Infect Immun.* **17:** 105-111.

Evans D.G. and D. J. Evans Jr. (1978). New Surface Associated Heat-Labile Colonization Factor Antigen (CFA/II) Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 y 08 *Infect Immun.* **21:** 638-647.

Fernández Escartín, E. (1981). *Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos.* Universidad de Guadalajara México.I: De. EDUG.

Field M. (1979). Mechanisms of action of cholera and *Escherichia coli* enterotoxins. *Am J. Clin Nutr.* **32:** 189-198.

Field, M., D. Fromm, Q. Al-Awqati, and W. B. Greenough. (1972). Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *J. Clin Invest.* **51**: 796 – 804.

Finkelstein A. (1985). The ubiquitous presence of channels with wide lumens and their gating by voltage. *Annals of New York Academy of Science* **45 b**: 25-32.

Finkelstein, R.A., Marchlewicz, B.A. Mac Donald, R.J. Boesman-Finkelstein, M. (1983). Isolation and Characterization of a Cholera-Related Enterotoxin from *Salmonella typhimurium* *FEMS Microbiol Lett.* **17**: 239-241.

Finkelstein R.A. (1976) Progress in the study of cholera and related enterotoxin in Mechanism in bacterial toxinology. De. for Alan W. Bernheimer *wiby Medical* 54-80.

Frankel, G., D. C. A. Candy, P. Everest, and G. Doungan. (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafniae alvei*. *Infect. Immun.* **62** : 1835 – 1842.

Fukuta, S., J. L. Magnani, E. M. Twiddy, R. K. Holmes, and V. Ginsburg. (1988). Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.* **56**: 1748 –1753.

Gaastra, W., and A. M. Svennerholm. (1996). Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* **4**: 444 – 452.

Germani, Y.B. Gaud, Duval, P & Le Bougunc, C. (1996) Prevalence of Enteropathogenic, enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli* among Isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *Journal of Infections Diseases* **174**: 1124-1126.

Giammanco Anna, Margherita Maggio, Giovanni Giammanco, Roberto Morelli, Fabio Minelli, Flemming Scheutz, and Alfredo Caprioli, (1996). Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* . **34**: (3) 689-694.

Gianella, R. A. (1976) Suckling mouse model for detection of heat – stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect. Immun.* **14** : 95 – 99.

Gianella, R. A., K. W. Drake and M. Luttrell. (1981). Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat – stable enterotoxin. *Infect. Immun.* **33**: 186 – 192.

Gill, D. M. (1976). The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry.* **15**: 1242-1248.

Gill, D. M. and Richardson. S. H. (1980). Adenosine diphosphate ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Comparison with cholera toxin. *J. Infect Dis.* **141**: 64-70.

Girón J. A., M. M. Levine, and J. B. Kaper. (1994). Lomgus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12** : 71 – 82.

Girón, J. A., F. Qadri, K. J. Jarvis, J. B. Kaper, and M. J. Albert. (1995). Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **63**: 4949 –4952.

González R, C. Díaz, M. Mariño. R. Cloralt. M. Pequeneze, and Y Pérez-Chael. (1997) Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, May **35**: 1103-1107.

Guth, B. E., E. M. Twiddy, L. R. Trabulsi, and R. K. Holmes. (1997). Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **54**: 529 – 536.

Green, B. A., Neill, R. J., Ruyechan, W.T., Holmes, R.K. (1983) Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. *Infect Immun* **41**: 383-390.

Guerrant, R. L., L. L. Bruton. T. C. Schnaitman, L. I. Rebhum, and A. G. Gilman. (1974). 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.

Gyles, C. L. (1976). Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 9: 564-570.

Holmes (R. K.), Jobling (M.G.) et Contell T.D. (1995) Cholera toxin and related enterotoxins of Gram-negative bacteria. In Bacterial Toxins and Virulence factors in Disease, J. Moss, et al., Editors. Marcel Dekker: New York 225 –255.

Honda, T., S. Taga, Y. Takeda, and T. Miwatani. (1981). Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* J. Clin. Microbiol. 13 : 1 – 5.

Hypertest last updated by mow/ dms J3b /xxz . (1998) Sep-16.
FDA/CFSAN Bad Bug Book- Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Explorador de Internet 2 – 4.

Isis A. Mikhail, Emile fox, Richard L. Haberberger J.R. M. H. Ahmed and E.A. Abbatte (1990). Epidemiology of Bacterial Pathogens Associated with Infections Diarrhea in Djibout. Journal of Clinical Microbiology. 28 (5): 956-961.

Ito, T., S. Kuwahara, and T. Yokota. (1983). Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat – labile enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 17: 7 - 12

Jann. K., and H. Hoschutsky. (1991) Nature and organization of adhesins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 151: 55 – 85.

Jay James. Modern Food Microbiology. (1990) 3^a. Ed. D. Van Nostrand Co., New York.

Jerse, A. E., W. C. Martin J. E. Galen, and J. B. Kaper. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions of tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 87: 7839-7843.

Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Benzanson. (1983) Cytotoxic *Escherichia coli* 0157 : 07 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* i : 76. (Letter)

Jones, C. H., K. Dodson, and S. J. Hultgren. (1996). Structure, function, and assembly of adhesive P pili, 175 – 219. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed). *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Kaijser, B, Suanborg-Eden, C y Wadstron T. (1978). High frequency of 15 antigen in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Lack of correlation to adherence to epithelial cell or sensitivity to bactericidal effects on normal serum. *Zentralbl Bacteriol* 242: 17-22.

Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, and B. T. Steele. (1983) *Escherichia coli* cytotoxin. Haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* ii : 1299-1300

Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, and H. Lior. (1985) The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151:775-782.

Kauffman F. (1951). The differentiation of *Escherichia coli* and *Klebsiella* types. American lectures Series No. 84 De. Charles C. Thomas Springfield. USA 32-34.

Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 57 : 1290 –1298.

Klipstein, F.A. Engert, R.F. (1976) Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun.* 13: 373-381.

Klipstein f.A. Engert, R.F. (1977) . Immunological Interrelationships between cholera toxin and the heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria. *Infect Immun.* 18: 110-117.

Konowalchuk, J., J. I. Speirs. And S. Stavric. (1997). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **18** : 775-779.

Koupall L. R. Diebel R.H. (1975) . Assay, characterization, and Localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect Immun.* **11**: 14-22.

Kubota, Y., Liu, P. U. (1971). An enterotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Infect Dis.* **123**: 97-98.

Kusters, J. G., and W. Gaastra. (1994). Fimbrial operons and evolution. P. In P. Klemm (ed.). *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines.* CRC Press. Inc., Boca Raton, Fla. 179-196

Laemmli, V.K., (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London.* **227**: 680-685.

Law, D. (1994) Adhesin and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 152 – 173.

Lencer, W. I., C. Constable, S. Moe, M. G. Jobling. H. M. Webb, S. Ruston, J. L. Madara, T. R. Hirst, and R. K. Holmes (1995). Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL., *J. Cell Biol.* **131**: 951-962.

Levine M.M. Rennels M. B. Day V. Y. Hughes T.P. (1980). Hemagglutination and Colonization Factors in Enterotoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. *J. Infect Dis.* **141**: 733-737.

Levine, M. M., and R. Edelman. (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6** : 31 -51

Levine, M. M., P. Ristaino, G. Marley, C. Smyth, S. Knutton, E. Boedeker, R. Black, C. Young, M. L. Clements, C. Cheney, and R. Patnaik. (1984). Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect. Immun.* **44**: 409 - 420

Levine, M. M., J. Xu, J. B. Keper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J.Nataro, H. Karch, and K. Wachsmuth. (1987). A DNA probe to identify

enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157 : H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect Dis.* **156**: 175 - 182

Lindsey V. Wood, William H. Wolf, Guillermo-Ruiz Palacios, Williams S. Foshee, Larry Y Corman, Ferné Mac Cleskey, James a Wright and Herbert L Dupont. (1983). An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin-producing strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **41**: No. 3 931-934.

Lior, H. (1996). Clasificación of *Escherichia coli*, p. 31 – 72. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Lumish, R. M., R. W. Ryder, D.C. Anderson, J.C. Wells, and N. Puhr (1980). Heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrhea aboard a Miami based cruise ship *Am J. Epidemiol.* **111**: 432-436.

Mac Faddin Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Medica Panamericana. Edición (1990)

McGree, D. W., C.O. Elson, and J. R. McGhee. (1993). Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* **61**: 4637 - 4644

Mandel, G. L. Douglas Jr. R.G. y Vennett. J. E. (1979). Principales and practice of infectious diseases first edition. John Wiley and Sons U.S.

Marier, R., J. G. Wells, R.C. Swanson. W. Callahan, and Y. J. Mehlman. (1973). An outbreak of Enteropathogenic *Escherichia coli* Foodborne disease traced to imported French Cheese. *Lancet* **11**: 376-378.

Mathewson, J. J., P. C Johnson. And H. L. DuPont. (1986). Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J. Infect. Dis.* **154** : 524-527.

Mehlman, I.J., M. Fishbein, S.L. Gorbach, A.C. Sanders,, E.L. Eide, and J.C. Olson, Jr (1976). Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **59**: 67-80.

Melkalanos J.J. Swartz, D. J., Pearson, G. D, N., Harford N., Groyne, F., de Wilde M. (1983). Cholera toxin genes. Nucleotide sequence, detection analysis and vaccine development. Nature . **306**: 551-557.

Miller, V. L., Mekalanos, J.J Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:3471-75

Mikhail A. Isis, Emile Fox, Richard L. Haberberger, Jr., M. H. Ahmed, and E. A. Abbate. (1990) Epidemiology of bacterial Pathogens Associated with Infectious diarrhea in Djibouti. Journal of Clinical microbiology. May. **28**(5): 956 - 961

Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Gianella. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun. **41**: 1340 - 1351

Muller, U., M. Brandsch, P. D. Prasad, Y. J. Fei, V. Ganapathy, and F. H. Leibach. (1996). Inhibition of the H- peptide cotransporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. **218**: 461 - 465.

Nashar, T. O., H. M. Webb, S. Eaglestone, N. A. Williams, and T. R. Hirst. (1996). Potent immunogenicity of the B subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 226 -230.

Neill, R. J., Ivins, B. E., Holmes, R. K. (1983). Synthesis and secretion of the plasmid-coded heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae*. Science **221**: 289-291.

Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, J. B.Kaper, M. M. Levine, and L. R. Trabulsi. (1985). Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **48**: 378 - 383

Nataro, J. P., K. O. Maher, P. Mackie, and B. Kaper. (1987). Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 2370–2377.

Nataro, J. P., D. Yikang S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine and C. O. Tacket (1995) Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* **171** : 465 - 468

Nataro P. James and James B. Kaper (1998), Diarrhegenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* **11** (11) : 142 – 201

O'Brien, A. D. Chen, M.E., Holmes R.K., Kaper, J.B., Levine, M.M. (1984). Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (shiga)-Like cytotoxin. *Lancet.* **1**: 77-78.

O' Brien, A. D., G. D. LaVeck, D. E. Griffin, and M. R. Thomson. (1980). Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infect. Immun.* **30** : 170–179.

Olarte J. Avances en el conocimiento de la etiopatogenia de las diarreas (1981). *Analectas de Medicina Mexicanas Primera Edición Academia Nal. de Medicina.*

Orskov, I., Orskov, F. (1976) Episomecarried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. Y. Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfr of chomosomal markers. *J. Bacteriol.* **91**: 69-75.

Park, H. S., E.H. Marth, and N.F. Olson. (1973). Fate of enteropathogenic strain of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camembert chesse. *J. Milk Food Technol.* **36**: 543-546.

Paton W. Adrienne and James C. Paton. (1996). Enterobacter cloacae Producing a shiga-Like toxin II-Related Cytotoxin Associated with a Case of Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology.* Feb. **34**:(2): 463 – 465.

Pérez P.I. Guillermo (1982). Toxina termolábil (TL) de *Escherichia coli*. *Infectología* **5**: 223-232.

Pickett, C. L., E. M. Twiddy, C. Coker, and R. K. Holmes. (1989). Cloning, sequencing and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 4945 – 4952.

Polotskil Y.Y., Snigirevskaya E.S. y Dragunskaya. F.M. (1977) Electron-microscopic study of interaction between enterotoxigenic forms of *Echerichia coli* and the intestinal epithelium bull. *Epp. Biol. med.* **77**: 702-705.

Popoff M. R. (1996). Entérottoxines bactériennes: structure, mode d' action et approche vaccinale. *Revue Méd. Vét.* **147**: (6): 425-438.

Rao , M.C. Orellana, S.A. (1981) Comparison of the biological actions of three purified heat-stable enterotoxins effect on ion transport and guanilate cyclase activity in rabbit ileum in vitro *Infect Immun.* **33**: 167-170.

Ridell, . J., A. Siitonen. L. Paulin . L. Matilla, II. Korkeata, and M. J. Albert. (1994). *Hafnia alvei* in stool epecimens of patients with diarrhea and healthy controls. *J. Clinical Microbiol.* **32**: 2335 – 2337.

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen (1983). Hemorrhagic colitis associated whith a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**: 681 – 685.

Rowe, B., S.M. Scotland, and R. J. Grass. (1977) Enterotoxigenic *Escherichia coli* causing infantile enteritis in Britain *Lancet i*, 90-91.

Schauser. D. B. And S. Falkow. (1993). The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* **61**: 4654 – 4661.

Sack, R.B., S.L. Gorbach, J.G. Banwell, B. Jacobs, B. D. chatterjee, and R.C. Mitra (1971). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis* **123**: 378-385

Sack, R.B., D.A. Sack, I.J. Mehlman, F. Orskov, and Y Orskov. (1977). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect Dis.* **135**: 313-317.

Sandefur, P.D., Peterson, J. W. (1977) Neutralization of Salmonella toxin induced elongation of chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect. Immun.* **15**: 988 - 92

Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *Infect. Immun.* **45**: 534 – 536.

Schultsz, C. (1994). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **1994**: 2393 – 2397.

Scotland, S. M., R. H. Flowman, and B. Rowe. (1989). Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat – labile toxin in culture supernatants. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 339 -340

Scotland, S.M. Smith, H.R., Cheasty T said B., Willshaw, G.A. Stokes, N. & Rowe, B. (1996). Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropatogenic serogroups isolated in the united kingdom *Journal of medical Microbiology* **44**: 438-443.

Sears, C. L. and B. Kaper. (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60** : 167 –215.

Seriwatana J. P. Echeverria. D. N. Taylor, L. Rasrinaul, J. E. Brown J.S. M. Peiris, and C.L. Clayton (1988) Type II heat-labile enterotoxin producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect Immun.* **56**: 1158-1161.

Shriniwas, U. M., Bhujwala, R.A.. (1979) Production of permeability factor and enterotoxin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ind. J. Med. Res.* **70**: 380-383.

Sixma, T. K., H. Kalk, B. A. Van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt, and W. G. Hol. (1993). Refined structure of *Escherichia coli* heat- labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J. Mol Biol.* **230**: 890 – 918.

Sjoberg, P. P., M. Lindahl, J. Porath, and T. Wadstrom. (1988). Purification and characterization of CS2, a sialic acid-specific haemagglutinin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **255**: 105 - 111

Smith, H. W., Green, P., Parsell, Z. (1983) . Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. *J. Gen Microbiol.*129: 3121-3127.

Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. (1994) Isolates of *Escherichia coli* 044: H 18 of diverse origin are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* **170**: 1610 – 1613.

Sosa., L.P. G. Eusebio y R. Gallardo (1988). Aislamiento de *Escherichia coli* Enterotoxigénica a partir de quesos. *rev. lat-Amer. Microbiol.* Vol. **30**, 97-103.

Spangler, B.D. (1992) Structure and function of cholerae toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev.* **56**: 622-647.

Speir, J., S. Stavric, and B. Buchanan. (1991). Assessment of two commercial agglutination kits for detecting *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Can. J. Microbiol.* **37**: 877 – 880.

Streatfield, S. J., Sandkvist, T. K. Sixma, M. Bagdasarian, W. G. J. Hol. And T. R. Hirst. (1992). Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 12140 –12144.

Sunthaduanich, Dumrong Chiewsilp, Jitvimol Seriwatana, Riichi Sakazaki and Peter Echeverria. (1990) Nationwide Surveillance Program to Identify Diarrhea-Causing *Escherichia coli* in Children in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. **28** : No. 3 469 – 472.

Swenson, D.L. Bukanov, N. O, Berg, D.E, & Welch, R.A. (1996) Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J. 96 Cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity.* **64**: . 3736-3743.

Takeda, Y., Murphy, J.R. (1978) Bacteriophage conversion of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **133**: 172-177.

Taniguchi, T., M. Arita, M. Sato, K. Yamamoto, T. Miwatani and T. Honda. (1994). Evidence that the N- terminal amino acid sequence of pilus colonization factor antigen III produced by human enterotoxigenic

Escherichia coli is similar to that of TepA pilin of *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis. 170 : 1049 – 1050.

Taniguchi, T., Y. Fujino, K. Yamamoto, T. Miwatani, and T. Honda. (1995). Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/ III is related to type IV pili. Infect Immun. 63: 724 –728.

Taylor, J., M. P. Wilkins, and J. M. Payne. (1961) Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic *Escherichia coli*. Br. J. Exp Pathol. 42: 43 –52

Teneberg, S., T. R. Hirst, J. Angstrom, and K. A. Karisson. (1994). Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. Glycoconjugate J. 11: 533-540.

Timmis K.N., Montenegro, M.A., Bulling, E., Chakraborty T., Sanyal, S.C. (1984). Genetics of toxin synthesis in gram negative enteric bacteria. In bacterial protein toxins, de. J.E. Alouf, J. H. Freer.F.J. Fehrenbach, J. Jeljaszwez. London Academic. 13-27.

Thorne G. M. Duneke C.F. y Gorbach, S. L. (1979). Hemagglutination and adhesiveness of toxigenic *Escherichia coli* Isolated from human. Infect Immun 23 : 690-699.

Turbull, P.C. B., Lee, J.V. Millotis, M.D., Van de Walle, S., Koornhoff, H.J. et al. (1984) Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. J. Clin Microbiol 19: 175-180.

Turvill, J. L., F. H. Mourad, D. Perrett, and M. J. G.Farthing. (1995). Tissue and luminal 5 –HT levels in cholera toxin and *E. coli* heat labile toxin induced secretion. Gastroenterology 108: A 333.

Vázquez, E.A. González, J. y Garabal, Susset Valderrama, J. Blanco and S. B. Baloda, Oct. (1996). Development and Evaluation of an ELISA to detect *Escherichia coli* K88 (F4) Fimbrial Antibody Levels the pathological society of Great Britain and Irland 453-464.

Vial, P. A., Robins Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. (1988). Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* **158** : 70 – 79.

Wadstrom T. (1975) The relationship of *E. coli* and malnutrition. In food and Immunology, Symposia of the swedish nutrition foundation XIII: 164.

Wantanabe H, Wada, A. Inagaki, Y, Itoh, K.I. & Tamura K, (1996) Outbreaks of enterohemorrágica *Escherichia coli* 0157:H7 Infection by two different genotype strains in Japon. *Lancet* **248**: 831-832.

Willshaw G.A. et al (1995) Isolation Enterotoxigenic *Escherichia coli* from British troops in Saudi Arabia. *Epidemiology and Infection* **115**: 455-463.

Wolf, M. K. (1997). Ocurrance, distribution, and association of O and H serogrups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10** : 569 – 584.

Yolken, R. H., H. B. Greenberg. M. H. Merson, R. B. Sack, and A. Z. Kapikian. (1977). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 439-444.

Zhang Hong and Huang Ce (1984). Application of Dot Immunobinding Assay (DIBA) and Reversed Pasive Hemagglutination Assay (RPHA) in Detection of *Shigella flexneri* from Fecal Samples. 104 – 110.

Zinsser, (1994) Microbiología Ed. Médica Panamericana S. A. 20ª. Edición, Marzo.