

11262  
2 ej 8

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina  
División de Estudios de Postgrado.

Instituto Nacional de la Nutrición  
Salvador Zubirán

Inmunogenicidad de los factores de colonización  
I y II de Escherichia coli enterotoxigénica  
en voluntarios.

Tesis de Postgrado  
que para obtener el título de  
Maestra en Ciencias Médicas con  
Enfasis en Infectología.  
Presenta la

Dra. Ma. de Lourdes García García.

**FALLA DE ORIGEN**

1987



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.

<b>Indice</b>	<b>Pag.</b>
<b>Introducción</b> - - - - -	<b>1</b>
<b>Objetivo</b> - - - - -	<b>12</b>
<b>Fundamentación</b> - - - - -	<b>12</b>
<b>Material y métodos</b> - - - - -	<b>14</b>
<b>Resultados</b> - - - - -	<b>19</b>
<b>Discusión</b> - - - - -	<b>21</b>
<b>Tablas</b> - - - - -	<b>27</b>
<b>Anexos</b> - - - - -	<b>35</b>
<b>Bibliografía</b> - - - - -	<b>42</b>

## INTRODUCCION

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) se asocia a diarrea aguda en hombres y animales domésticos. Es la causa más frecuente de diarrea de período corto de incubación en el viajero (41,82,117,45); en algunos países subdesarrollados es causa importante de diarrea infantil endémica (17,4,44,103); produce diarrea esporádica o epidémica en climas templados o tropicales (101,111,135) y se asocia a diarrea (colibacilosis) en corderos, lechones y terneras (71).

Se ha trabajado ampliamente en las diversas posibilidades de prevención de la diarrea por este germen; el tema de estudio ha sido doble: antibióticos profilácticos e inmunización, tanto activa, administrando diversos tipos de vacunas, como pasiva, a través de anticuerpos específicos. Los turistas y las crías de animales susceptibles, han constituido los dos grupos sobre los que se han enfocado las investigaciones en este sentido, dadas las dificultades existentes para estudiar a los demás susceptibles.

En los viajeros se han utilizado antibióticos profilácticos con algún éxito (58,108,130,19,21). Sin embargo, su utilización acarrea varias desventajas como son la necesidad de administración diaria del medicamento durante el viaje, el riesgo de que se desarrollen cepas resistentes al generalizar su empleo, la posibilidad de presentación de reacciones secundarias al medicamento y finalmente la alteración de la flora intestinal normal.

Otra forma de intentar prevenir la diarrea del turista ha sido mediante la elaboración de diversos tipos de vacunas.

Las investigaciones se han dirigido hacia utilizar como inmunógenos las toxinas o bien los pili que median la adherencia de la bacteria a la pared intestinal. Se les ha utilizado en forma purificada o a través de bacterias vivas a las que se les ha introducido la información genética que expresa estos antígenos ya sea por separado o combinados.

ETEC produce una toxina termolábil (LT), una toxina termoestable (ST) o ambas. La forma de acción de estas toxinas es a través de la activación de AMP (LT) y de GMP (ST), a través de adenilciclase la primera y guanilciclase la segunda. El efecto en la pared intestinal es producir hipersecreción de cloro y bicarbonato y consecuentemente transporte de agua hacia la luz intestinal ocasionando diarrea de tipo secretor (119,48,31,88,71,52,35,71).

LT es una proteína similar a la toxina del cólera en peso molecular (aproximadamente 80,000), especificidad

serológica y mecanismo de acción (47,46). Se relaciona inmunológicamente con las subunidades A y B de la enterotoxina del cólera (9).

ST de estructura polipeptídica, es más pequeña que LT mucho menor (peso molecular aproximado de 8,500), pobremente antigénica, resistente a proteasas y a calentamiento a 100 grados centígrados (55). Existen varios tipos de ST que difieren en reactividad en los diferentes ensayos (6). Se han descrito dos tipos de enterotoxinas termoestables (Sta, Stb) (133). Como se describe más adelante se ha podido producir ST sintética (124,15).

Ambas toxinas se controlan por plásmidos (120).

La patogenicidad de ETEC está mediada además de las toxinas por los antígenos de superficie (pili). Estas son estructuras filamentosas en la superficie de la bacteria que median la adherencia del germen a la pared intestinal a través de receptores específicos (54). Se han descrito varios tipos de estas estructuras específicas para especie (K88 y 987p en lechones, K99 en bovinos, ovinos y cerdos; factor de colonización, FC, en humanos). Estas estructuras son identificables mediante electromicrografía como estructuras finas filamentosas (7,53,126); que permiten la adherencia a la pared intestinal (29,134,57); son especie-específicos (106,20); se asocian a plásmidos (30,126,92); y se detectan mediante hemaglutinación sensible o resistente a manosa (7,26,32,56). En cepas provenientes de humanos se han descrito tres tipos de pili, FCI y FCII y E8775 (25,23,128), cada uno con un patrón de hemaglutinación específico (33). En vista de que se han encontrado cepas de ETEC en las que se detectan estructuras filamentosas por electromicrografía y en las que no se ha identificado FCI o FCII por anticuerpos específicos y cuyo patrón de hemaglutinación puede, o no, coincidir con el descrito para cada uno de estos pili, se ha sugerido que puedan existir otros pili diferentes en cepas provenientes de humanos (135,77,43,14,128).

Los tres tipos de antígenos descritos (toxinas termolábil y termoestable, y antígenos de superficie), han sido utilizados como inmunógenos por diferentes investigadores con resultados variables. A continuación se describen los estudios que se han llevado a cabo en esta área hasta la fecha; así como la utilización de cada tipo de vacuna en campo y en el caso de los antígenos de superficie, los estudios que se han llevado a cabo con inmunización pasiva. Finalmente se describen los estudios en que se han utilizado bacterias completas.

#### VACUNACION CON TOXINAS.

Desde 1973, Sack demostró que la inyección parenteral de LT producía una antitoxina neutralizante en animales (110).

En 1979 Levine y colaboradores (76), realizaron vacunaciones en humanos. Se administró inicialmente la cepa B7 A (LT+/ST+) por vía oral, produciendo diarrea en 7/11 voluntarios. Se les retó 9 semanas después con la misma cepa y se vio que había protección en los vacunados al compararlos con los controles (1/8 de los vacunados, contra 7/12 de los controles, presentaron diarrea). Al retar a los voluntarios con una cepa diferente E2528C-1 (LT+/ST-), se vio que no había protección. Por lo tanto, en humanos, la protección era eficaz únicamente para cepas homólogas y no heterólogas.

Klipstein y colaboradores han trabajado extensamente en la producción de vacunas a partir de toxinas termolábil y termoestable. En 1980 produjeron una vacuna a partir de LT liberada por polimixina y la inocularon a ratas gnotobióticas (70). La vía de administración fue parenteral para la primera dosis y oral el refuerzo. Se demostró protección al retar a las ratas con cepas productoras de LT (LT+/ST- y LT+/ST+) en forma oral y observar que el transporte acuoso, medido por bomba peristáltica, era significativamente menor en las ratas vacunadas que en el grupo control.

Posteriormente (1981) y contrastando con el experimento realizado por Levine en humanos, se demostró que la protección era efectiva contra cepas de diferente serotipo de las que se había obtenido la vacuna (heterólogas) (62). En esta ocasión se utilizó LT obtenida de dos maneras diferentes (holotoxina y liberada por polimixina). La vía de administración fue también combinada. El reto se hizo inoculando asas ligadas de rata con una cantidad conocida de bacterias y comparando la secreción hacia la luz intestinal de los animales vacunados con los controles.

La toxina termoestable (ST), dado su pequeño tamaño por sí sola no era inmunogénica. En 1981 Klipstein y cols, describieron la utilización de ST como hapteno (63). Se conjugó mediante la reacción de carbodiimida a inmunoglobulina G porcina (PIG) en su forma semipurificada. En este mismo trabajo se definió que la vacunación con cada toxina era específica. Así, la vacunación con ST y PIG protegía contra la misma toxina ST, contra cepas ST+/LT- y no contra cepas LT+/ST+ y LT+/ST-; por otro lado la vacunación con holotoxina LT protegía contra la misma LT, cepas LT+/ST+ y LT+/ST- y no contra LT-/ST+ o contra la administración de la toxina ST.

En 1982 se conjugaron LT y ST (61). LT se utilizó en forma de holotoxina y ST en su forma semipurificada. Se estudiaron las diferentes proporciones, encontrándose que la mejor era la de ST/LT 100/1 (96% de ST por molaridad y 36% de ST por peso). Se inmunizaron ratas con el conjugado de ambas

toxinas por vía intraperitoneal y oral encontrando que el conjugado era inmunogénico y comparable al 82% de antigenicidad de LT sola (medido con anticuerpos "in vitro"). Se comparó toxicidad medida en el ensayo de células adrenales Y1 para LT y por el de ratón lactante para ST, encontrándose que era menor al 0.15% de las toxinas solas. Al retar a los animales vacunados con LT, ST pura y ST semipura, así como con cepas heterólogas de LT+/ST+ LT+/ST- y LT-/ST+ se demostró protección en dichos animales.

En 1982, se hicieron varios estudios para definir la cinética de la respuesta secretora (60). Klipstein vacunó ratas con holotoxina LT midiendo mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) IgG en suero e IgA en mucosa intestinal. Encontró que la pura administración parenteral, inducía solamente respuesta sérica, si bien protegía frente al tratamiento de LT. La pura administración oral no inducía respuesta sérica ni secretora. El mejor programa era el que incluía vacunación inicial parenteral y refuerzos orales posteriores. La magnitud de la respuesta de IgA, el grado de protección otorgado y la duración de la respuesta, eran proporcionales al número de refuerzos orales y a la dosis total de los mismos. Por lo tanto, en el modelo de rata era necesario inmunización parenteral inicial y refuerzos orales posteriores.

Otro de los requisitos que se habían definido hasta entonces, era la necesidad de neutralizar la acidez gástrica. Esto se había logrado mediante la administración de cimetidina. En 1983 (69) se utilizaron microesferas sensibles a pH. Se administró holotoxina de LT en tabletas de celulosa microcristalina, almidón y estearato de Mg, así como con una cubierta fabricada de ftalato de hidroxipropil celulosa y monoglicéridos acetilados. Se administró inicialmente LT en forma parenteral y posteriormente se dieron las microesferas por vía oral. Esta cubierta se desintegraba en pH menores de 5, aproximadamente en 10 minutos. Se encontró que la respuesta de IgG sérica y de IgA intestinal, en esta forma de administración, era adecuada, así como la protección proporcionada frente al reto de cepas productoras de LT sola. En este experimento se demostró, también, que la administración de bicarbonato oral era ineficaz para proteger a la toxina de la inactivación por el pH ácido en el modelo de rata.

En 1981, se compararon las características inmunogénicas de tres diferentes preparados de LT (holotoxina, la liberada por polimixina, y subunidad B) (59). Se administraron a ratas tres diferentes programas de vacunación: uno sólo por vía oral, otro sólo por vía parenteral y el tercero por ambas. Se encontró que el primero (oral), no producía respuesta de anticuerpos ni era protector; el segundo (parenteral) estimulaba anticuerpos séricos pero la protección era variable. La subunidad B no protegía para cepas productoras de LT y la holotoxina no

protegia para cepas LT+/ST+. El mejor régimen era el mixto, en el que se demostró que los 3 inmunógenos producían respuesta sérica y otorgaban protección frente al reto de la toxina sola, cepas LT+ y LT+/ST+. El grado de protección otorgado por cada inmunógeno fue diferente. La vacuna más potente era la holotoxina, seguía la obtenida por liberación de polimixina y finalmente la producida a partir de la subunidad B de LT. Estos experimentos demostraron la inmunogenicidad y el grado de protección otorgado por este compuesto, el cual tenía la ventaja, frente a los utilizados previamente, de no ser tóxico ya que en ensayo de asa ligada de rata su toxicidad era de 0.2% comparado con holotoxina LT (64).

El problema que seguía existiendo con ST era la dificultad de su obtención en cantidades importantes. En 1983, se describió la preparación de ST sintética y su comparación con ST de origen biológico (65). La ST sintética tenía la misma estructura primaria de 18 aminoácidos que la ST biológica. Se compararon en los siguientes aspectos: toxicidad medida tanto en ensayo de ratón lactante como en asa ligada de rata, inmunogenicidad medida a través de efecto neutralizante e inducción de IgG sérica e IgA en mucosa intestinal y protección otorgada frente al reto con ST biológica, ST sintética y cepas productoras de ST. No se encontró diferencia entre ambos compuestos para las diferentes variables.

En 1983, se produjo una vacuna con ambas toxinas producidas a partir de ST sintética y la subunidad B de LT conjugadas por la reacción de carbodiimida (64). La proporción de cada toxina en la vacuna, se definió haciendo equivalente su poder antigénico a la administración de cada componente por separado. Se concluyó que la mejor relación era 1:1 (2.2 mg de la vacuna con 1000 unidades antigénicas de cada componente). Se demostró que la vacuna producía niveles de anticuerpos tanto para la subunidad B como para ST iguales a los producidos por la administración de cada componente por separado. Su efecto protector se comprobó al observar que protegía contra cepas productoras de LT+/ST-, LT-/ST+, y LT+/ST+. Las cepas con las que se retó eran tanto de origen porcino como humano, lo cual demostró protección heteróloga. Se midió también toxicidad de la vacuna, tanto en asa ligada de rata, como por ensayo de ratón lactante, encontrándose que la vacuna era 600 veces menos tóxica comparada a la administración de ST nativa.

El modelo animal utilizado hasta entonces había sido la rata. Se cambió entonces a conejo a fin de investigar si la efectividad de la vacuna combinada (subunidad B de LT y ST sintética), era la misma y para definir si persistía la necesidad de un régimen mixto para la administración de la vacuna (66). Se encontró que en conejos la administración intraperitoneal y oral o, solamente, por vía oral era semejante en cuanto a inducir respuesta de IgA en mucosa



intestinal; la vacuna oral no estimuló la formación de IgG sérica. Los dos esquemas fueron protectores contra la administración de ST y LT en asa ligada. En este modelo se corroboró también la ausencia de toxicidad de la vacuna, ya que su administración en forma de vacuna y su equivalente de ST no atenuada, no produjo efecto en asa ligada de conejo. Se utilizaron también microesferas para la administración oral de la vacuna combinada, corroborándose su efectividad.

Recientemente se ha experimentado con la producción de moléculas hiperantigénicas de ST mediante la modificación de su estructura estereoquímica. Al utilizarlas como vacunas en el modelo de rata han resultado ser inmunogénicas, protectoras y no tóxicas (67). Se ha buscado asimismo abatir los costos de producción de la vacuna mediante síntesis de porciones peptídicas de la subunidad B de LT. Se ha producido un conjugado de ST sintética y 26 aminoácidos de la subunidad B que estimuló la producción de IgA intestinal contra componentes de ST y de la subunidad B. Esta vacuna fue protectora contra una cepa productora de ST y LT en ratas. La inmunogenicidad del compuesto fue similar a la de ST con un 50% de la capacidad inmunogénica de la subunidad B nativa. Se demostró también que el conjugado no fue tóxico (51).

En 1986 se vacunaron voluntarios con la vacuna sintética formada por 18 aminoácidos de ST y 26 aminoácidos de subunidad B de LT (68). La administración fue por vía oral previa neutralización de la acidez gástrica con cimetidina. Se empleó una dosis de 60 mg. Se encontró respuesta local (IgA en aspirado yeyunal) y sistémica (IgG en suero) significativamente por arriba de los controles. Asimismo se demostró que los anticuerpos producidos eran neutralizantes tanto de ST como de LT en los modelos biológicos apropiados.

En cuanto a trabajos en el campo, la vacunación específica con vacunas producidas a partir de toxinas, se ha llevado a cabo en cerdos vacunados con LT y con procoleragenoide (agregado de toxina del cólera obtenido al calentar ésta).

Furer vacunó cerdas preñadas con procoleragenoide en forma parenteral (36). Demostró presencia de IgG en suero e IgA específica en calostro. Las crías estuvieron protegidas de colibacilosis al retarlas con una cepa productora de LT. En el grupo control, 70% presentaron diarrea y 5% murieron; en las del grupo cuya madre había sido inmunizada 11% presentaron diarrea y 0.77% murieron. Se demostró que, al revacunar a la cerda antes del siguiente parto, la nueva camada estaba igualmente protegida. Dorner demostró presencia de antitoxina específica en el calostro de cerdas inmunizadas con LT, así como reducción en la incidencia de diarrea y mortalidad en sus crías (18).

En cuanto a ST, Moon vacunó en forma parenteral cerdas embarazadas con ST conjugada a inmunoglobulina porcina

(87). Demostró presencia de anticuerpos en suero y calostro por radioinmunoensayo, sin embargo, estos anticuerpos no neutralizaban la toxina. Las crías de las cerdas vacunadas no estuvieron protegidas al tratarlas con una cepa productora de ST.

#### VACUNACION CON ANTIGENOS DE SUPERFICIE

La primera evidencia de la posibilidad de bloqueo con anticuerpos a la adherencia de antígenos de superficie data de 1972. Jones (57) encontró que los lechones a los que se trataba con una cepa poseedora de antígeno k88 tenían un 50% de mortalidad mientras que los que se trataban con una cepa k88- morían en un 3%. Este autor vacunó conejos con esta cepa, adsorbió los anticuerpos a una cepa k88-, obteniendo así un anticuerpo específico para k88. Mediante inmunofluorescencia encontró que la cepa k88+ se adhería a la mucosa intestinal; esta adherencia se bloqueaba al incubar la bacteria con el anticuerpo antik88. Wilson (134), en 1974 describió un modelo "in vitro" mediante el cual pudo probar que los anticuerpos antik88 eran específicos ya que bloqueaban únicamente el mismo tipo de pilus. Rutter en 1976 (107), vacunó cerdas antes de parir por vía parenteral con Agk88. A las crías se les permitió lactar y se les trató posteriormente, con una cepa k88+. Se observó que las crías de las cerdas vacunadas tenían una mortalidad de 3.2% contra una mortalidad del 67% de las crías controles. Se encontraron anticuerpos neutralizantes en calostro. Nagy (90), en 1978 hizo un experimento similar encontrando 56% de diarrea en el grupo vacunado contra 72% en el grupo control. A los 6 días post-reto ninguna cría de cerda vacunada tenía diarrea, mientras que el 28% del grupo control continuaba con diarrea; ninguna cría del grupo de estudio murió, mientras que del grupo control falleció el 30%. La protección se relacionó con la presencia de anticuerpos antik88 en el calostro (media de 1:4836 en el grupo vacunado contra una media de 1:10 en el grupo control). Asimismo el grupo vacunado presentó mayor ganancia de peso en forma significativa (6.7 gramos/hora contra 4.2 gramos/hora). En el grupo control se encontraron más bacterias viables de la misma cepa con que se había tratado. Por inmunofluorescencia se buscaron bacterias en la mucosa intestinal, búsqueda que fue negativa en el grupo de estudio y que hizo patente que en el grupo control las bacterias adherentes cubrían prácticamente toda la superficie del intestino.

En 1978, Morgan (89), vacunó cerdas con concentrados de pili diferentes (987P+ y k99). Encontró que había protección en los lechones, transmitida a través del calostro cuando se les retaba con la misma cepa o con un serotipo diferente pero con el mismo pilus, y no así cuando el reto era con una cepa poseedora de un pilus diferente. Demostró la presencia de aglutininas específicas en el calostro. La protección en los lechones se demostró por

menor mortalidad, igual o menor incidencia de diarrea así como diarrea de más corta duración y mayor ganancia de peso en los grupos de estudio comparados con los grupos controles.

Continuando con estudios llevados a cabo en animales, Acres y colaboradores (1), en 1979, llevaron a cabo estudios en vacas a las que vacunaron con un purificado de antígeno k99. Demostraron protección significativa en las terneras retadas con la cepa homóloga en cuanto que no hubo mortalidad en el grupo vacunado y la incidencia de diarrea fue menor. En este experimento se comparó la eficacia de vacunación con k99 purificado, con la administración de una mezcla de varias cepas k99+ y de un homogenizado de una cepa k99+ demostrándose mayor efecto protector al vacunar con el purificado. La protección se correlacionó con los títulos de anticuerpos antik99 en calostro, encontrándose que cuando el título era mayor de 1:1000 la mortalidad era del 6.3% y cuando era menor a esta titulación la mortalidad era del 80%.

En 1978 se llevaron a cabo estudios en voluntarios que demostraron la patogenicidad del factor de colonización en cepas de ETEC en infecciones en humanos (29,113). Se administró una cepa FC+ y su variante de laboratorio sin este antígeno (FC-) a 27 voluntarios en estudio doble ciego. Se encontró que a los que se les había administrado la cepa FC+ a una concentración de 100 millones de unidades formadoras de colonias/ml, 6/7 presentaron diarrea, contra 0/7 a los que se administró la cepa FC-. Asimismo la sintomatología abdominal fue mayor en el primer grupo (3/7). Solamente los voluntarios del primer grupo desarrollaron anticuerpos contra FC (4/7) LT (4/7), y antígeno somático (6/7) y en ellos la excreción de la bacteria por las heces fue más prolongada (7/7 al sexto día contra 1/6 al tercer día). Por lo tanto, la presencia de FC se relacionó con mayor sintomatología, excreción más prolongada de la bacteria y positividad de anticuerpos.

En 1978 Evans y cols. (25), determinaron la presencia de FCI en cepas aisladas de turistas. Se inmunizaron conejos por vía subcutánea e intramuscular con un concentrado de FCI obteniéndose un anticuerpo específico mediante el cual se detectó FCI en 25/29 (86%) cepas de ETEC aisladas de turistas con diarrea y de 2/11 (18%) cepas aisladas de turistas asintomáticos. El poseer o no FCI era independiente de los demás antígenos somáticos y flagelares. Inoculando conejos recién nacidos con bacterias FCI+ se demostró por inmunofluorescencia la adherencia de las bacterias al tercio anterior del intestino delgado, lo cual se correlacionó con la aglutinación de las mismas cepas con el anticuerpo específico para FCI y con la presencia de pili por microscopía electrónica.

Posteriormente, se demostró también en cepas aisladas de casos con diarrea, un FC diferente, FCII, el cual se identificó mediante un anticuerpo específico obtenido en

conejos y por hemaglutinación diferente a la descrita previamente para FCI. Mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que mediaba la adherencia a la mucosa intestinal del conejo recién nacido (23).

Como se ha mencionado hasta aquí, en varios experimentos, se demostró que la administración de FC purificado era inmunogénico por vía parenteral en conejos.

En 1981 De la Cabaña y cols. (8) administraron por vía oral un concentrado de FCI a conejos retándolos posteriormente con una cepa homóloga (FCI+) y una heteróloga (FCII+). Se demostró que el purificado era protector para la cepa homóloga comparado tanto con el grupo que no había recibido vacuna como con el que se inmunizó con la bacteria completa. La protección otorgada era proporcional a la dosis administrada del concentrado de FCI. La protección se manifestó por menor volumen intestinal al retar con la cepa homóloga y por menor concentración de unidades formadoras de colonias recuperadas en las heces de los animales en estudio. Asimismo, se vio que no había protección al retar con una cepa heteróloga (FCII+). En este estudio se menciona también que hubo respuesta serológica para FC en los animales vacunados, comparados con el grupo control.

Boedeker y colaboradores inocularon con diferentes dosis de FCII asas intestinales de conejos externalizadas quirúrgicamente. Encontraron que 1 y 2 mg en 3 dosis estimulaban la producción de IgA en la mucosa intestinal e IgG en suero (5).

En 1984 Evans y colaboradores (27) inmunizaron voluntarios con un preparado de FCI y FCII. Encontraron que la administración oral de 8 mg de cada factor en voluntarios sin anticuerpos sericos previos no era inmunogénica ni protectora. En cambio, lo fue la administración parenteral de 200 microgramos de FCI a 5 voluntarios como también la administración de 1 mg por vía oral en 8 de 11 voluntarios con niveles de anticuerpos previos. Al administrar un regimen mixto (parenteral y oral) a sujetos sin contacto previo con ETEC, se obtuvo respuesta secretora en 4/8 (0/8 en el grupo control). Al administrar a este grupo la cepa reto hubo diarrea en 4/8 sujetos contra 6/8 en el grupo control si bien 3 de los sujetos que no presentaron diarrea fueron los que tuvieron niveles altos de anticuerpos en saliva. Estos resultados sugieren en forma preliminar que la administración de FC en humanos pueda ser inmunogénica y protectora.

En lo que se refiere a estudios en campo, en varios países se han usado vacunas comerciales en animales, preparadas a partir de bacterias muertas, tratadas por calor, purificadas de LT de antígeno k88 y combinaciones de los mismos. Soderling y colaboradores (123) valoraron el efecto que tiene en el campo la vacunación con antígeno k88.

Encontraron que el efecto de vacunar a las cerdas es de corta duración ya que la protección en los lechones dura únicamente durante los 8 primeros días de vida, si bien es en este periodo cuando hay mayor morbi-mortalidad por colibacilosis. Encontraron también que la proporción de infecciones por cepas poseedoras de otros pili (k99), o por causas no identificadas, era mayor.

En cuanto a la utilización de vacunas mixtas Snodgrass y colaboradores (122), describieron una vacuna preparada a partir de k99 y rotavirus. Se demostró protección en las crías del grupo de estudio y presencia de anticuerpos específicos en calostro y leche.

En lo que se refiere a estudios con inmunización pasiva, M. Ahren y colaboradores (2), demostraron, al probar anticuerpos anti LT, antiFCI, antiFCII y antilipopolisacárido en asas de intestino de conejo retadas con cepas LT+, que existe efecto sinergista entre ellos.

En 1983 Sherman y colaboradores (115), propusieron la administración de anticuerpos monoclonales en lugar de vacunación de las madres, dada la renuencia de los ganaderos a apreciar las ventajas de la vacunación. Se encontró que en terneras a las que se administró anticuerpo monoclonal antik99 al retarlas con la cepa homóloga se disminuían los efectos más graves, deshidratación y muerte (29% contra 82%), aunque la incidencia de diarrea era la misma en el grupo de estudio y el control.

#### VACUNACION CON BACTERIAS COMPLETAS

La utilización de bacterias completas nos remonta a considerar las que se han empleado para prevenir el cólera. La vacuna disponible comercialmente utiliza bacterias muertas y se administra en forma parenteral. La protección que otorga es corta e incompleta. Se ha buscado desarrollar cepas no toxigénicas que sean inmunogénicas y que se administren por vía oral. La más prometedora es una mutante de la cepa El Tor Ogawa 3083 (Texas Star) que produce exclusivamente la subunidad B de la toxina del cólera. Su administración en voluntarios ha estimulado la producción de anticuerpos vibriocidas en el 85% y antitoxinas en el 25%. Al retar con una cepa toxigénica 1 de 7 voluntarios vacunados presentó diarrea contra 7 de 10 controles. La desventaja ha sido que su administración produce diarrea (8/42 voluntarios) y que no evita la excreción fecal de la cepa reto (74).

Mediante técnicas de recombinación de DNA se han producido otras cepas A-B- y A-B+ para explorar las preguntas que han surgido en esta área y que se refieren al mecanismo de producción de diarrea por cepas no productoras de toxina completa y al papel de la subunidad B como protectora (39).

Clements y colaboradores en 1984 (10) construyeron

una vacuna bivalente utilizando la cepa mutante ty21a de Salmonella typhi como receptor del plásmide con el gene que contiene la información para producir la subunidad B de LT de ETEC. La cepa obtenida, SE12, produjo subunidad B idéntica a la de ETEC. En ensayo en ratón demostró ser capaz de inducir formación de antitoxinas. Al mismo tiempo mantuvo su sensibilidad a la galactosa y su utilidad como vacuna antitifoídica.

Yamamoto y colaboradores en 1985 transfirieron un plásmide con la información sobre FCI y ST a una mutante de ty21a resistente a estreptomicina (136). La cepa obtenida produjo FCI y ST. A partir de estos experimentos se ha postulado la posibilidad de producir una cepa productora de factores de adherencia y porciones de toxinas que pueda ser utilizada como vacuna e induzca la formación tanto de antitoxinas como de anticuerpos contra los factores de colonización.

Levine y colaboradores (75) han llevado a cabo investigaciones en humanos con la cepa atenuada E 1392-75-2A, la cual es una mutante no enterotoxigénica, FC II + de una cepa previamente enterotoxigénica. Aunque aproximadamente el 20% de los sujetos a los que se les administró desarrollaron diarrea leve, estimuló la producción de anticuerpos anti FC II tanto locales como séricos y una sola dosis resultó protectora frente al reto por ETEC en voluntarios. En base a estos resultados preliminares estos autores están llevando a cabo experimentos para introducir en la cepa mencionada, mediante técnicas de recombinación de DNA, la información genética que codifica otros antígenos tales como la subunidad B.

En resumen, los estudios llevados a cabo orientados a la producción de vacunas obtenidas a partir de las enterotoxinas de Escherichia coli, han llevado a la obtención de una vacuna fabricada a partir de la subunidad B de LT conjugada a ST sintética, que en los modelos de rata y de conejo ha probado ser inmunogénica, protectora tanto para cepas homólogas, como heterólogas y no tóxica. Los estudios en voluntarios han mostrado que esta vacuna es inmunogénica y los anticuerpos producidos neutraliza la actividad biológica de la vacuna. La idea de que una vacuna de este tipo sea útil en el hombre, se basa en que diversos grupos han demostrado la presencia de antitoxinas en humanos. En poblaciones con diarrea por ETEC endémica se ha encontrado que la frecuencia de antitoxinas aumenta conforme a la edad y alcanza un nivel constante a partir de los 2 años de edad. (112). En grupos con diarrea del turista, se ha encontrado que los niveles de anticuerpos basales se relacionan en forma inversa con la presencia de diarrea por ETEC y que la elevación de los títulos se asocia al aislamiento de la bacteria (34). Por lo tanto, es de suponerse que estos anticuerpos sean protectores y que una vacuna que estimule la producción de antitoxinas en humanos tenga efecto protector.

Por otro lado, los experimentos llevados a cabo en animales utilizando vacunas producidas a partir de los antígenos k88, k99, 987P han demostrado que son inmunogénicas y no tóxicas. Se ha demostrado también que los anticuerpos específicos, transmitidos a través del calostro a las crías, son protectores.

En lo que se refiere a FCI y FCII los estudios realizados han demostrado su patogenicidad en humanos. Se ha demostrado que la vacuna producida a partir de un concentrado de FCI y FCII es inmunogénica administrada parenteralmente en conejos. Asimismo se ha demostrado que la sola administración oral de FCI en conejos es inmunogénica, no tóxica y otorga protección frente al reto de una cepa poseedora del mismo pilus. Estudios preliminares en humanos sugieren que la administración de los factores de colonización por vía oral es inmunogénica y protectora (27). Finalmente los avances tecnológicos han permitido incorporar secuencias de genes específicos en microorganismos vivos, colonizantes no patogénicos tales como E. coli o la mutante ty21a de Salmonella typhi que permitirían la llegada de los antígenos clave a la mucosa intestinal donde la respuesta parece ser más efectiva.

#### Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad inmunogénica en fase aguda de un concentrado de factores de colonización (FCI y FCII) administrado por vía oral a voluntarios así como la posible presentación de reacciones adversas al mismo y el grado de protección que pudiera otorgar frente a la presentación de diarrea por ETEC portadora de FCI o FCII.

#### FUNDAMENTACION

Si bien se acepta que las medidas de saneamiento ambiental tales como dotación de agua potable y disposición adecuada de excretas son suficientes para reducir la incidencia de infecciones intestinales, requieren de planeación, infraestructura y recursos con los que no se cuenta aún en forma completa en los países en desarrollo.

Por este motivo, se han buscado otro tipo de estrategias para el control de la diarrea infecciosa, causa de gran morbimortalidad en nuestros países. Una de estas estrategias consiste en aumentar la inmunidad del huésped a base de vacunación con bacterias inactivadas o con estructuras bacterianas relacionadas con procesos de patogenicidad (13).

En varios estudios (4,116,104,29,17) llevados a cabo en países en desarrollo, incluyendo el nuestro, se ha encontrado que un porcentaje importante de diarrea en niños

menores de 2 años son debidas a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). En nuestro medio se les ha encontrado con frecuencia de 16% (17), 21% (104), y 47% (28). En un solo estudio (95) llevado a cabo en niños de nivel socioeconómico medio esta frecuencia ha sido menor, del 7%.

En poblaciones donde la diarrea por ETEC es endémica, se ha encontrado que desde temprana edad existen niveles de anticuerpos contra FC. En 80 niños seguidos desde el nacimiento por Ruiz-Palacios y colaboradores, 40% tenían niveles de anticuerpos para FC al año de edad y 60% a los dos años (105).

Como se ha mencionado anteriormente existe evidencia experimental que apoya la correlación entre la respuesta inmune local y sistémica a estos factores y la resistencia adquirida contra diarrea producida por las bacterias que los producen en modelos animales y datos preliminares de que lo mismo ocurra en humanos por este motivo el producir una vacuna que estimulara la producción de anticuerpos protectores en niños menores de 2 años y que previniera la diarrea por ETEC constituiría una de las estrategias a las que nos referíamos anteriormente y que podría disminuir la morbilidad por diarrea infecciosa debida a ETEC en este grupo de edad.

La administración oral del antígeno parece ser la más adecuada ya que se ha demostrado que la inmunización oral estimula la producción de anticuerpos locales con mayor intensidad que la inmunización parenteral (50). Por este motivo, parece ser más útil esta vía, cuando el modo natural de infección es el oral como es el caso de la diarrea por ETEC. La utilización del factor de colonización como antígeno oral tendría las siguientes ventajas: se produce mediante un método relativamente sencillo, interacciona en forma difusa con la membrana intestinal y aparentemente no tiene toxicidad inherente.

Las investigaciones en humanos con productos bacterianos de *Escherichia coli* se encuentran en fase experimental por lo que consideramos que la administración del inmunógeno a voluntarios susceptibles sería la más adecuada. Ya que la población adulta en nuestro medio en su mayoría posee anticuerpos estimulados por la exposición endémica a ETEC, sería necesario administrárselo a voluntarios provenientes de una población no expuesta en forma endémica como son los turistas norteamericanos. De aquí que seleccionamos para nuestro estudio a un grupo de voluntarios mexicanos en los que no se demostraran anticuerpos antifactor de colonización y a un grupo de voluntarios norteamericanos que no tenían exposición endémica al germen con el fin de investigar si la administración de una mezcla de factores de colonización (FCI y FCII) era inmunogénica. Se buscó evaluar asimismo la aparición de



reacciones tóxicas atribuibles a la administración del concentrado y el grado de protección que pudiera conferir para la presentación de diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica portadora de los factores de colonización administrados.

En estudios en los que se ha investigado la prevalencia de FCI y FCII se ha observado que entre los dos abarcan un 25% a 47% de las ETEC aisladas. Específicamente en cepas de ETEC provenientes de turistas norteamericanos viajando en nuestro país corresponden a un 47% (103). Por lo tanto, un inmunógeno preparado a partir de estos antígenos podría prevenir un 25% a un 47% de la diarrea por ETEC en viajeros.

El estudio se dividió en las siguientes partes:

1) Práctica de pruebas de seguridad general en el concentrado de FCI y FCII según los lineamientos de la FDA (11), a fin de definir su pureza, toxicidad, pirogenicidad y esterilidad.

2) Administración del concentrado. Se dividió en dos fases:

I) Realización de un estudio piloto, en voluntarios mexicanos, buscando la dosis inmunogénica del concentrado y posibles reacciones adversas.

II) Realización de un estudio, a mayor escala, en turistas norteamericanos a fin de definir:

i) Inmunogenicidad sérica de la dosis escogida.

ii) Reacciones adversas al concentrado.

iii) Efecto del concentrado sobre la aparición de la diarrea por ETEC.

## MATERIAL Y METODOS

### PRUEBAS DE SEGURIDAD GENERAL.-

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas en el concentrado de FCI y FCII.

Prueba de toxicidad: Se inocularon con material proveniente del envase final del concentrado cuatro ratones sanos, de peso menor de 22 gramos y dos cobayos sanos, de peso menor de 400 gramos por vía intraperitoneal (0.5 ml, 100 microgramos/ml de cada uno de los FC en los ratones y 2.5 ml, a la misma concentración en los cobayos). Se observaron en forma cotidiana por 10 días y se pesaron inmediatamente antes de administrar la vacuna y el último día de observación.

Pruebas de esterilidad: Se cultivaron en medio de tioglicolato 5 ml del material antes de envasar y 1 ml del material proveniente del envase final (probándose el 10% de los envases) y se incubaron a 37 grados centígrados; se cultivó también 1 ml del material proveniente del envase final (probándose también el 10% de ellos), en medio de soya tripticasa incubándose a 37 grados centígrados. Se observaron durante 10 días examinándolos visualmente los días 3,4,5,7 y 8.

Pruebas de pirógenos: Se inocularon intravenosamente 3 conejos sanos, maduros, con 3ml/kg del concentrado (100 microgramos/ml de cada uno de los FC) utilizando una vena del pabellón auricular. Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales, a temperatura uniforme, sin estímulos y sin alimento durante la prueba, únicamente con agua. Se les tomó la temperatura por vía rectal, introduciendo el termómetro 7.5 cm, siendo su temperatura basal menor a 39.8 grados centígrados. El registro se hizo en los 40 minutos previos al inóculo. La administración del concentrado se realizó en 10 minutos. Para su administración, el concentrado se calentó a 37 grados centígrados. Se registró la temperatura 1, 2 y 3 hrs. después de la administración.

Se realizó asimismo prueba de amebocito de Limulus Polyphemus.

Prueba de identidad: Se llevó a cabo inmunodifusión, inmunolectroforesis e isoelectroenfoque, a partir del primer pico obtenido de la cromatografía en DEAE Sephacel (81).

#### SEROLOGIA

Se midió IgG anti FCI y FCII mediante el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA), como se describe en (78). En resumen, el ensayo corresponde al método indirecto y consiste en los pasos siguientes:

- 1) Sensibilización de la microplaca de titulación con 1mcg/ml del FC de ETEC correspondiente, obtenido como se describe en (81).
- 2) Incubación.
- 3) Lavado
- 4) Colocación del suero problema, a dilución seriada a partir del 1/200.
- 5) Lavado.
- 6) Colocación de antiinmunoglobulina G, marcada con fosfatasa alcalina.
- 7) Lavado.
- 8) Adición del sustrato p-nitrofenil-fosfato.
- 9) Detención de la reacción con NaOH.
- 10) Lectura a 410 nm.

Se consideraron positivas todas las mediciones iguales o mayores a una absorbancia de 0.20.

Se consideró que existía seroconversión si existía elevación de dos o más titulaciones.

#### COPROCULTIVOS

Las muestras de heces se sembraron en los medios de McConkey, Tergitol, SS, Campy Bap y TCBS, practicando búsqueda de leucocitos y examen coproparasistoscópico. Además de ETEC se investigaron campylobacter, salmonella, shigella, yersinia, aeromona, vibrios, E. histolytica y giardia (73), EPEC identificadas mediante serología y rotavirus mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) (139).

#### ENSAYOS DE ENTEROTOXINAS

Diez colonias lactosa positivas en el McConkey se resembraron en agar soya tripticasa, en tubos de tapón de rosca. Se llevó a cabo la identificación de enterotoxinas mediante el método de búsqueda de efecto citopático en células adrenales para LT (109) y en prueba hecha en ratón lactante para ST (40), en las diez colonias a la vez.

#### ENSAYO DE HEMAGLUTINACION SENSIBLE Y RESISTENTE A MANOSA

Las cepas de ETEC se aglutinaron con eritrocitos de diferentes especies, con y sin manosa correlacionando el patrón de hemaglutinación con alguno de los siete tipos descritos (33).

#### PREPARACION DEL CONCENTRADO DE FCI Y FCII.

Se preparó un concentrado de factor de colonización I y II mediante el método descrito por Evans (24) modificado por Macías (81). La modificación principal consistió en la utilización de la resina DEAE-SephaseI en lugar de DEAE-Sephadex, dado que se observó mejor resolución con su utilización.

El concentrado de FCI se preparó a partir de la cepa H-1047, (078:H11) y el concentrado de FCII a partir de la cepa PB-176, (06:H16). La metodología empleada en ambos casos fue similar, procesando cada factor de colonización por separado. Las colonias seleccionadas se cultivaron en agar CFA en grupos de 100 en botellas de Roux. Después de 48 hrs los cultivos se homogenizaron y centrifugaron. El sobrenadante con FC se filtró a través de una membrana millipore de 0.65 nm de poro. El filtrado se precipitó con sulfato de amonio al 20% de saturación por 30 min. a 4 grados centígrados; posteriormente se centrifugó a 17,000 rpm por 20 min. a 4 grados centígrados. El precipitado se desechó y el

sobrenadante se precipitó nuevamente con sulfato de amonio al 40% de saturación por 30 min a 4 grados centígrados, se centrifugó nuevamente a 17,000 rpm durante 20 min a 4 grados centígrados; el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en amortiguador de fosfatos a 0.05 molar a pH 7.2, dializándose en forma exhaustiva. Se purificó el FC mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephacel (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). La concentración de factor de colonización recuperada fue de 1.5 mg/ml. Se esterilizó por membrana millipore 0.02 en campana de flujo laminar. Cada dosis del concentrado se colocó en frascos goteros. Para la fase I se prepararon frascos goteros que contenían 5 ml de la mezcla a una concentración de 50 microgramos/ml de cada uno de los pili purificados; para la fase II se prepararon frascos goteros que contenían 5 ml a una concentración de 100 microgramos/ml de cada uno de los pili purificados. El placebo se preparó con 5 ml de solución salina también en frasco gotero. Los envases se mantuvieron en refrigeración a 4 grados centígrados.

#### Evaluación de la estabilidad del concentrado de FCI y FCII.

Una vez envasado el concentrado de FCI y FCII se midió mediante el método de ELISA ya descrito, la concentración de cada factor de colonización en .01 ml tomado de cada envase una semana antes y una semana después de su administración.

#### VOLUNTARIOS

Participaron en la fase I cincuenta voluntarios de origen mexicano sanos, de ambos sexos, mayores de 18 años a quienes se les determinaron niveles de anticuerpos contra FCI y FCII en suero. De estos 50 sujetos se seleccionaron 5 sujetos sin anticuerpos anti FCI para administrarles el concentrado.

En la fase II participaron 50 sujetos sanos, de ambos sexos, estudiantes norteamericanos, con no más de una semana de estancia en México, mayores de 18 años, sin síntomas intestinales agudos, crónicos o recurrentes. Se excluyeron mujeres embarazadas y sujetos alérgicos a sulfas. Antes de ingresar al estudio se les practicó historia clínica completa así como los siguientes exámenes: citología hemática, glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, y general de orina.

Los voluntarios de la fase II se dividieron en dos grupos, un grupo de estudio y un grupo testigo, asignándose cada sujeto a alguno de ellos mediante números aleatorios en forma doble ciega. (Se explicó el estudio en detalle y se obtuvo del consentimiento escrito testificado de todos los sujetos participantes).

## Administración del concentrado de FCI y FCII

En la fase I se administró el concentrado a los sujetos los días 0,2,3, y 5 del estudio a dosis de 125, 25-25-25 microgramos de cada factor de colonización.

En la fase II se administró el concentrado o el placebo los días 0,3,5, y 28 del estudio, a dosis de 250,50,50 y 50 microgramos de cada factor de colonización respectivamente. Todos los voluntarios tomaron 200 ml de agua con 1 gramo de Na HCO<sub>3</sub> y tres minutos después ingirieron el concentrado. Los sujetos se encontraron en ayuno de 4 hrs y no tomaron alimentos durante las 3 hrs. siguientes.

### SEGUIMIENTO CLINICO

La fase I se llevó a cabo en la Cd. de México permaneciendo los sujetos ambulatorios. Se les siguió por 15 días a partir de la administración del concentrado.

La fase II se llevó a cabo en la Cd. de Guadalajara permaneciendo los sujetos ambulatorios. Se les administró en forma profiláctica Cotrimoxazol desde dos días antes de ingerir el concentrado a dosis de trimetoprim 80 mg y sulfametoxazol 400 mg dos veces por día durante 10 días. El motivo fue proteger a los sujetos durante el período inicial de inmunización antes de que existiera títulos significativos y evitar que fueran inmunizados en forma natural durante este período. Se siguieron a los sujetos por 35 días a partir de la ingestión del concentrado.

En todos los voluntarios se practicaron revisiones clínicas en forma cotidiana, exceptuando los fines de semana durante los cuales los sujetos podían asistir a un consultorio en caso de requerirlo. Se llevó registro de la sintomatología referida. En caso de diarrea, la cual se definió como más de 4 evacuaciones en 24 hrs. o más de 3 en 8 hrs. de características anormales, acompañadas de síntomas gastrointestinales se practicó coprocultivo. Se tomaron muestras para medición de anticuerpos séricos los días 0,14 a los sujetos de la fase I y 0,14 y 35 a los de la fase II. Asimismo se tomó muestra para exámenes generales (enumerados anteriormente) los días 0 y 35. A juicio del investigador se dio tratamiento en caso de diarrea el cual fue variable: Pepto-bismol, loperamida, cotrimoxazol, furoxona, trimetoprim o ampicilina.

### ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se analizaron por la prueba de ji cuadrada.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las pruebas de seguridad general fueron los siguientes:

**Pruebas de toxicidad:** Todos los ratones aumentaron de peso (Tabla 1). El promedio del incremento fue de 5.8 g en comparación con 4 g del ratón control; los dos cobayos aumentaron de peso, el promedio del incremento fue de 52 g comparados con 40.0 g del control. (Tabla 2)

**Prueba de esterilidad:** No hubo desarrollo en los medios de tioglicolato y soya tripticasa durante los días de prueba.

**Prueba de pirógenos:** La prueba en conejos fue positiva. Se observó aumento de la temperatura en los 3 conejos mayor a 0.6 grados centígrados siendo la suma del incremento mayor a 1.4 grados centígrados.

La prueba de amebocito de *Limulus polyphemus* también resultó positiva. No hubo cuantificación de endotoxinas por este método.

**Prueba de identidad:** Al realizar las pruebas confirmatorias de pureza del FC se obtuvo: En inmunodifusión de Duchterlony se demostró una banda al probar el primer pico de la cromatografía contra el anticuerpo específico. Al llevar a cabo inmunolectroforesis también contra el pico 1 se observaron 2 bandas. En la prueba de enfoque isoeléctrico también se obtuvieron 2 bandas.

Evaluación de la estabilidad del concentrado de FCI y FCII.

Se encontró que la concentración de FCI y FCII antes de administrar el preparado y en el material residual después de haberlo administrado fue la esperada (50 microgramos/ml en los envases utilizados en la Fase I y 100 microgramos/ml en los utilizados en la Fase II).

### FASE I

#### Resultados de Serología

Los títulos de anticuerpos basales y a los 14 días se muestran en la tabla 3. 4/5 sujetos elevaron niveles séricos en forma significativa (dos o más titulaciones) para FCI y 3/5 para FCII.

#### Tolerancia al concentrado de FCI y FCII

Ningún sujeto presentó sintomatología atribuible a la administración del concentrado, no hubieron complicaciones o reacciones adversas.

## FASE II

Se asignaron 26 sujetos al grupo de estudio y 24 sujetos al grupo testigo. En el grupo de estudio el rango de edad fue de 19 a 60 años, con una media de 33 años, en el testigo de 20 a 68 años, con una media de 34 años, en el grupo de estudio hubieron 19 mujeres y 7 hombres, en el grupo testigo 17 mujeres y 7 hombres. (Tabla 4)

Durante el periodo de seguimiento 14/26 sujetos (53.6%) en el grupo de estudio y 12/24 sujetos (50.0%) en el grupo testigo presentaron diarrea ( $p$  mayor de 0.5, no significativa), (Tabla 5) constituyendo un total de 15 episodios diarreicos en el grupo de estudio y 14 episodios en el grupo testigo ( $p$  mayor de 0.5, no significativa)

En el grupo de estudio 13 sujetos presentaron un episodio diarreico, y un sujeto 2 episodios; en el grupo testigo 10 sujetos presentaron un episodio y 2 sujetos dos episodios, ( $p$  mayor de 0.5, no significativa) (Tabla 6).

Tres muestras no se cultivaron, 2 del grupo de estudio y 1 del grupo testigo. En el grupo de estudio se presentaron 7/13 episodios por ETEC, (53.84%), 5/13 cultivos negativos (38.46%) y 1/13 con etiología mixta (ETEC+Shigella). (7.69%). En el grupo testigo hubieron 4/13 cultivos por ETEC pura, (30.76%), 3/13 por Shigella (23.07%), 1/13 por Salmonella (7.69%) y 1/13 negativo (7.69%). Cuatro cultivos fueron mixtos, (30.76%), (dos por Shigella + ETEC, uno por Salmonella + ETEC, y uno por Plesiomona + ETEC). No se encontró diferencia significativa entre ETEC y las demás etiologías en ambos grupos. En el grupo de estudio se aislaron 8 cepas de ETEC y una de Shigella, siendo 5 cultivos negativos; en el grupo testigo se aislaron 8 cepas de ETEC, 5 de Shigella, 2 de Salmonella, 1 de Plesiomona y se tuvo un cultivo negativo. (Tabla 7).

En cada grupo se aislaron 8 cepas de ETEC. La distribución de enterotoxinas fue la misma en ambos grupos: 6 termoestables, 1 termolábil y 1 termolábil/termoestable. (Tabla 8).

Se realizó hemaglutinación en las 16 cepas aisladas de ETEC, ocho aisladas del grupo de estudio y ocho del grupo testigo. En seis del grupo de estudio y en cuatro del grupo testigo no se demostró hemaglutinación resistente a manosa. Las dos cepas positivas del grupo de estudio correspondieron a los patrones VA una de ellas y la otra tuvo dos patrones de hemaglutinación VC y VA. Las cuatro cepas restantes del grupo testigo correspondieron a los patrones IIIA (dos cepas), VA (una cepa), y VC (una cepa). Ninguno de estos patrones se ha asociado a FCI y FCII (33).

Durante el tiempo en que se administró el cotrimoxazol se presentaron dos episodios diarreicos, ambos con cultivo negativo, uno en cada grupo. Ninguno de estos episodios se consideró en el análisis. El promedio de día de inicio de la diarrea en el grupo de estudio fue de 20.73 +/- 6.4; el del grupo testigo fue de 21.64 +/- 5.94. (p mayor de 0.5, no significativa).

De los 26 sujetos del grupo de estudio 5 (19.2%) elevaron sus títulos en forma significativa (dos o más veces) para FCI y/o FCII; en el grupo testigo 1 de un total de 24 sujetos (4%) elevó sus títulos en forma significativa. La distribución de respuesta para FCI y FCII fue la siguiente: En el grupo de estudio: Un sujeto elevó anticuerpos tanto para FCI como para FCII, dos sujetos tuvieron anticuerpos para FCI y dos para FCII. El sujeto testigo presentó elevación para anticuerpos para FCI. No hay diferencia significativa en cuanto a seroconversión entre los dos grupos.

Un sujeto en el grupo testigo presentó eritema papular diseminado a tórax, cara y extremidades el día 10 del estudio, un sujeto en el grupo de estudio presentó prurito en toda la superficie corporal, con duración de 24 hrs, el día 12 del estudio. No se reportaron otros síntomas atribuibles a la administración del concentrado o del placebo. Uno de los sujetos en el grupo testigo se encontró con anemia ferropénica en las determinaciones basales, la cual se corrigió con hierro oral. No hubo otra alteración en los exámenes practicados.

## DISCUSION

En este trabajo se describe la preparación de una mezcla de factores de colonización (FCI y FCII) de ETEC y su administración por vía oral a dos grupos diferentes. La administración del concentrado a voluntarios provenientes de una población en la que la infección por ETEC es endémica estimuló la formación de anticuerpos detectables en suero, IgG antiFCI e IgG anti FCII. En cambio, la administración del concentrado al grupo no expuesto a la infección por ETEC en forma endémica no estimuló la formación de anticuerpos séricos. En ambos grupos se demostró la ausencia de toxicidad del preparado. En el grupo no endémicamente expuesto no se pudo correlacionar la administración del concentrado con protección específica ya que las cepas productoras de diarrea en este grupo no fueron portadoras de FCI o FCII.

La administración del inmunógeno por vía oral se basa en la evidencia de que el tejido linfoide asociado al intestino se estimula más eficazmente por la administración local del antígeno que por vía parenteral. Desde los experimentos de Craig (12) que en 1971 postuló la hipótesis de que por vía oral podían inmunizarse mucosas, existe evidencia de que el compromiso de los inmunoblastos cuando la



administración del antígeno es por vía oral ocurre en la mucosa. Aparentemente los inmunoblastos se encuentran establecidos en el intestino. El epitelio intestinal de las criptas se ha especializado (94) para efectuar el muestreo y selección de los antígenos específicos (93) los cuales son presentados al inmunoblasto por los macrófagos. Posteriormente los linfocitos ya comprometidos recirculan (49,42) por el conducto torácico a ganglios mesentéricos, bazo, placas de Peyer y demás tejido linfoide localizado a glándulas exocrinas (tracto respiratorio, salival, glándulas mamarias).

Diferentes autores han demostrado la eficacia de la estimulación oral para la producción de anticuerpos locales y el hecho de que éstos se correlacionan mejor que los séricos con protección específica contra infecciones locales (132,83,118,85).

Se ha estudiado la respuesta inmune sérica y local en poblaciones endémicamente expuestas a la infección por ETEC (125). Se ha encontrado que existe respuesta tanto en mucosas medida en secreción intestinal, saliva y leche materna, como en suero.

La respuesta que encontramos en los mexicanos probablemente sea del mismo tipo y comparable a la obtenida por Evans (27) en voluntarios con historia de infección por ETEC. En nuestro estudio encontramos producción de anticuerpos séricos, los cuales se ha visto se correlacionan con la producción de anticuerpos locales. Si bien atribuimos la respuesta serológica detectada en el grupo de voluntarios mexicanos a la administración del concentrado de factores de colonización, no podemos descartar que haya sido debida a infección asintomática por ETEC ya que este grupo no recibió cotrimoxazol que lo protegiera de infección natural durante el periodo transcurrido entre la administración del concentrado y la elevación de los títulos.

Estos resultados sugieren que la presentación molecular y bioquímica del antígeno es la adecuada para producir respuesta inmune. Las pruebas de identidad corroboraron la presencia de FCI y FCII a través de inmunodifusión, inmunoelectroforesis e isoelectroenfoque. El hecho de que se hayan observado dos bandas tanto mediante inmunoelectroforesis como por enfoque isoelectrico en las pruebas de identificación de ambos antígenos puede tener varias explicaciones. En el caso de FCI pudiera deberse a fraccionamiento de la proteína. No podemos descartar el que el producto final no haya sido totalmente puro y que existiera alguna otra proteína que se identificara mediante el anticuerpo utilizado dado que se utilizaron anticuerpos policlonales. En el caso de FCII, además de las hipótesis ya mencionadas, la identificación de dos bandas pudo haber

correspondido a los antígenos descritos por Cravioto y cols (14). Este investigador observó que en pruebas de inmunodifusión para detectar FCII, practicadas a cepas FCII+, con serotipo 06.H16 se identifican dos líneas de precipitación correspondientes a dos componentes antigénicos: componentes 3 y componente 2 ó 3. Smyth (121) y Svennerholm y Ahren (127) han descrito hallazgos similares. Smith utiliza la designación CS1, CS2, y CS3 para designar los mismos componentes descritos por Cravioto y cols. Por lo tanto la identificación de dos bandas en las pruebas practicadas al concentrado de FCII pudo haber correspondido a estos antígenos. Lo anterior hace evidente que es necesario tanto mejorar la técnica de purificación como llevar a cabo una mejor identificación de los productos finales para su utilización como inmunógenos.

Se ha encontrado en los diferentes sistemas en que se ha estudiado inmunización de mucosas que el tipo de respuesta que se encuentre depende en gran parte del estado inmunológico previo del huésped; este factor seguramente influyó en la falta de respuesta sérica que obtuvimos en el grupo de voluntarios norteamericanos.

En varios estudios se ha demostrado que la administración repetida de antígeno por vía oral bloquea la producción de anticuerpos séricos. Experimentalmente se ha visto que células T provenientes de placas de Peyer agregadas a cultivos celulares también de placas de Peyer suprimen la síntesis de IgG e IgM mientras que estimulan la formación de IgA (22). Otros autores han encontrado que la administración oral de ovalúmina induce la producción de IgA y suprime la de IgG (100). La administración oral de antígenos provenientes de pneumococo induce la formación de anticuerpos locales, principalmente IgA, en ausencia de anticuerpos séricos. (86). Por lo tanto, puede existir disociación completa entre el sistema inmune de mucosas y el sistémico; es decir, pueda existir tolerancia sistémica que coexista con respuesta secretora activa. La inducción de tolerancia se ha atribuido al desarrollo de células T supresoras o a la presencia de factores inhibidores en el suero que se originarían en el tejido linfoide asociado al intestino como respuesta a la administración del antígeno. (129). Este fenómeno sería la imagen en espejo de la supresión que existe de la respuesta local frente a la administración parenteral del antígeno (97). La ausencia de respuesta sérica que obtuvimos en el grupo de norteamericanos podría corresponder a un fenómeno de tolerancia oral, inducido por la administración del inmunógeno.

Es necesario por lo tanto, hacer más estudios que definan la cinética de la respuesta inmune en población no expuesta a la administración local de factores de colonización así como encontrar métodos prácticos que midan secreción intestinal. A este respecto los estudios

practicados no han definido parámetros claramente relacionados con secreción intestinal medidos en otras secreciones (125).

Posterior a la realización de nuestro estudio, Evans (27) administró 5mg de FCI y FCII sin obtener respuesta sérica ni local en voluntarios no expuestos previamente; la dosis administrada fue varias veces mayor que la administrada por nosotros. La falta de respuesta podría deberse a que en estos sujetos la presentación del antígeno es ineficaz para producir estimulación de linfoblastos en la placa de Peyer. Un factor del huésped que pudo haber contribuido a disminuir la cantidad de antígeno disponible para la estimulación del tejido linfoide intestinal residido en la acidez gástrica y la actividad proteolítica del contenido estomacal. Existe evidencia "in vitro" de que tanto la antigenicidad como la estructura proteica de FCII se alteran con la combinación de ácido (pH 1.3) y pepsina (114), lo cual explicaría el que el aumento de la dosis del antígeno no haya sido eficaz para mejorar su inmunogenicidad. En vista de que aumentar la dosis parece no ser útil, puede serlo la combinación del antígeno con adyuvantes. Existen varias sustancias que se han empleado como adyuvantes orales como son los liposomas, el dipéptido de muramilo (MDP), la avridina y la combinación de ellos.

Los liposomas son estructuras microscópicas formadas por una o más bicapas concéntricas de lípidos que rodean un compartimento acuoso. Existen varias hipótesis que intentan explicar su utilidad como adyuvantes orales. Se supone que puedan actuar modificando la superficie molecular del antígeno o disminuyendo la necesidad de estimular a los macrófagos (37). Existe evidencia de que pueden resistir extremos de pH y la presencia de sales biliares y lipasa pancreática y absorberse a través de la pared intestinal (102). Tienen inmunogenicidad intrínseca baja, aparentemente debido a la pobre inmunogenicidad de fosfatidil-colina que es uno de sus principales constituyentes. Se ha demostrado su utilidad como adyuvantes orales en diferentes experimentos (16,37). Finalmente existe evidencia de que son independientes del sistema de células T lo cual tiene ventajas en el sistema de IgA que depende en gran medida de aquél (131,137,138).

La estructura mínima activa como adyuvante de los péptidoglicanos bacterianos es el MDP. Su mecanismo de acción parece ser a través de un efecto directo en las células B imitando la función de las células T ayudadoras (37). Se ha administrado por vía oral combinado con albumina bovina y liposomas demostrándose potenciación de la producción de IgA salival comparada con controles (37).

En experimentos relacionados con la toxina del cólera, Pierce (99) demostró potenciación al administrar por vía oral toxina del cólera asociada a liposomas a los que se les había incorporado lípido A. El mismo autor (98) encontró que la administración simultánea de avridina (amina lipóidea sintética) administrada oralmente en forma de suspensión liposomal junto con toxina del cólera disminuía las dosis requeridas para obtener una respuesta local determinada.

Existe por lo tanto evidencia que apoya la utilización de adyuvantes orales para potenciar el efecto de antígenos que se administren por la vía oral.

El inmunógeno utilizado en nuestro estudio no presentó toxicidad lo cual aunado a su preparación más sencilla que los inmunógenos parenterales permitiría su utilización en estudios posteriores.

La presentación de eritema papular en uno de los sujetos del grupo testigo fue atribuido al cotrimoxazol ya que cedió al suspender el medicamento. En cuanto al prurito presentado por el voluntario del grupo de estudio, no contamos con una explicación para el mismo, y dado que fue fugaz y sin manifestaciones de eritema o pápulas lo consideramos inespecífico.

En nuestro estudio no fue evaluable la protección otorgada por el concentrado de FCI y FCII a los sujetos que los recibieron ya que en las cepas de ETEC aisladas de los episodios diarreicos que presentaron tanto los sujetos del grupo de estudio como del testigo no demostramos la presencia de FCI ni de FCII. En estudios previos se había identificado hasta un 47% de cepas de ETEC, provenientes de turistas norteamericanos en México como portadoras de FCI o FCII (103). En nuestro estudio, el 62.5% (10/16) de las cepas de ETEC no tuvieron un patrón identificable por hemaglutinación resistente a manosa y el restante correspondió a los patrones III y V. Ninguna correspondió a los patrones I y II que se han asociado con FCI y FCII (33). Este hecho confirma diversos estudios en los que se han encontrado cepas de ETEC en las que no se identifican FCI o FCII a pesar de contar las cepas con estructuras filamentosas (135,77,43,84). Por lo tanto y apoyando los argumentos de Ruiz-Palacios en (103), es probable que FCI y FCII no sean los únicos factores de colonización que median la adherencia en cepas de ETEC provenientes de humanos y que la prueba de hemaglutinación resistente a manosa no detecte estos otros factores.

En cuanto a la metodología utilizada para la identificación de toxinas debemos señalar que se hizo en el conjunto de diez colonias lactosa positivas aisladas por episodio diarreico, lo cual impide conocer la proporción de

colonias productoras de cada toxina por muestra. En la actualidad se cuenta con otros métodos, identificación mediante anticuerpos específicos, (80), que permiten la identificación individual de cada colonia por muestra.

En lo que se refiere al método de hemaglutinación utilizado para detección de factores de colonización tiene deficiencias comparado con otras técnicas disponibles actualmente como es la de ensayo inmunoenzimático en réplicas de nitrocelulosa (79). La técnica de hemaglutinación comparada con esta última es poco sensible (56% vs 99%) para la detección de FCII. En cuanto a la sensibilidad para detección de FCI, comparada con la prueba mencionada es de 93% vs 97%, y en cuanto a especificidad es de 92% vs 99% en el caso de FCI y 95% vs 100% en el caso de FCII (79). Por lo tanto, pudimos haber tenido un problema de falsas negativas en el caso de FCII. La técnica de hemaglutinación depende además de que el antígeno se exprese en la superficie de la bacteria, característica que puede perderse espontáneamente, situación que en caso de haber ocurrido también nos hubiera impedido la identificación de los gérmenes portadores de FCI o FCII. Sin embargo, fue utilizada por nosotros por ser la única disponible en el momento de la realización del estudio.

La producción de un inmunógeno fabricado a partir de factores de colonización, deberá fundamentarse en una mayor caracterización de los diferentes tipos de pili existentes. Es probable que tenga que abarcar otros pili además de FCI y FCII. Un producto polivalente podrá actuar aún cuando la distribución característica de los pili en determinada región se modificara lo cual es de esperar dado que estos antígenos están mediados por plásmidos. Finalmente, la combinación con otros antígenos (toxinas y sus fracciones) y la utilización de bacterias completas a las que se introduzca la información genética adecuada son otras posibilidades que habrán de tomarse en cuenta para la producción de un inmunógeno que prevenga la diarrea por ETEC.

TABLA I  
Prueba de toxicidad en ratón

---

Ratón No.	Peso inicial	Peso final
1-	19.0 g	23.5 g
2-	20.0 g	26.5 g
3-	18.5 g	25.0 g
4-	19.5 g	25.5 g
5- ( control )	19.5 g	23.5 g

Inóculo de 0.5 ml. con una concentración de 100  
microgramos/ml. de FCI + FCII..

Resultado: Aceptable

---

**TABLA 2**  
**Prueba de toxicidad en cobayo**

---

<b>Cobayo No.</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Peso final</b>
1-	326.0 g	385.5 g
2-	326.5 g	371.0 g
3- ( control )	340.0 g	380.0 g

**Inóculo de 2.5 ml. con una concentración de 100  
microgramos/ml. de FCI + FCII.**

**Resultado: Aceptable**

---

TABLA 3

Inmunoglobulina G sérica anti FC/I y FC/II de E.coli  
Enterotoxigénica en 5 sujetos mexicanos vacunados Técnica de  
(ELISA)

Fase I

Sujeto No.	FC/I		FC/II	
	1a.	2a.	1a.	2a.
1-	NEG.	800	800	800
2-	NEG.	800	NEG.	400
3-	NEG.	200	NEG.	800
4-	NEG.	NEG.	200	NEG.
5-	NEG.	400	200	800



**TABLA 4**

**Distribución por edad y sexo (grupo de estudio y testigo**

**Fase II  
Estudiantes Norteamericanos**

	<b>Estudio</b>	<b>Testigo</b>
<b>Número</b>	<b>26</b>	<b>24</b>
<b>Edad</b>		
<b>Rango</b>	<b>19-60</b>	<b>20-68</b>
<b>Media</b>	<b>33</b>	<b>34</b>
<b>Sexo</b>		
<b>Mujeres</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
<b>Hombres</b>	<b>7</b>	<b>7</b>

**TABLA 5**  
**Incidencia de diarrea en estudiantes Norteamericanos.**  
**Fase II**

	Estudio	Testigo
<b>Sujetos</b>		
<b>Con diarrea</b>	<b>14</b>	<b>12</b>
<b>Sujetos</b>		
<b>Sin diarrea</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>T O T A L</b>	<b>26</b>	<b>24</b>

P: NS

**TABLA 6**  
**Número de episodios diarreicos. (grupo de estudio y testigo)**

**Fase II**  
**Estudiantes Norteamericanos**

Episodios Diarreicos (No.)	Estudio	Testigo	P
1	13 (50.0%)	10 (41.66%)	NS
2	1 ( 3.8%)	2 ( 8.33%)	NS
0	12 (46.15%)	12 (50.0 %)	NS
<b>Total</b>	26	24	

TABLA 7

Frecuencia de enteropatógenos aislados en los episodios  
de diarrea

Fase II  
Estudiantes Norteamericanos

Gérmen	Grupo de Estudio (13)	Grupo Testigo (13)
ETEC	8	8
Shigella	1 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>
Salmonella	0	2 <sup>c</sup>
Plesiomona	0	1 <sup>a</sup>
Negativos	5	1

( ) Número de episodios diarreicos

a Asociados a ETEC

b 2 de 5 asociados a ETEC

c 1 de 2 asociados a ETEC

**TABLA 8**

**Tipos de Enterotoxinas. (Grupo de estudio testigo)**

**Fase II**

**Estudiantes Norteamericanos**

<b>Enterotoxina</b>	<b>Grupo de Estudio (8)</b>	<b>Grupo Testigo (8)</b>
ST	6 (75.0%)	6 (75.0%)
LT	1 (12.5%)	1 (12.5%)
ST/LT	1 (12.5%)	1 (12.5%)

( ) No. de cepas aisladas

Anexo 1

Forma de Consentimiento

Fase 1

IMUNOGENICIDAD DE LOS FACTORES DE COLONIZACION  
I y II DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICA EN VOLUNTARIOS.

Forma de consentimiento escrito:

- 1) Estoy dispuesto a participar en el estudio de inmunización con factor de Escherichia coli enterotoxigénica llevado a cabo por el Departamento de Infectología (Jefe Dr. Guillermo Ruiz-Palacios).

La patogenicidad de Escherichia coli enterotoxigénica depende en parte de la adherencia de la bacteria a la pared intestinal la cual está dada por el factor de colonización y en parte por la actividad de sus enterotoxinas. El propósito de administrar un concentrado de factor de colonización es el de estimular la producción de anticuerpos específicos que impidan la adherencia de la bacteria y por lo tanto eviten su patogenicidad. Los objetivos inmediatos del trabajo son en primer lugar determinar la tolerancia al concentrado de factor de colonización y en segundo lugar determinar la dosis necesaria para que efectivamente sea inmunogénico.

- 2) El estudio consistirá en la administración oral de un concentrado de factor de colonización puro (I y II) en cantidad total de 200 microgramos por cada uno divididos en 4 tomas los que se administrarán los días 10,12,13 y 15 de junio. Es de mi conocimiento que se ha administrado la bacteria completa a humanos produciendo diarrea en personas susceptibles. Es de esperarse que la administración de los factores de colonización no la produzca ya que la diarrea es causada por las toxinas producidas por la bacteria.
- 3) El estudio incluye la toma de sangre (5 c.c.) los días 10 y 24 de junio; además de recolección de heces en caso de diarrea en cualquier momento del estudio. La vigilancia clínica estará a cargo de la Dra. Ma. de Lourdes García y del Dr. Guillermo Ruiz-Palacios; la preparación y administración del antígeno a cargo de la Química Srita. Rosa Ma. Macías.
- 4) Al dar mi consentimiento comprendo que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo darme de baja en cualquier momento.

...

- 5) Me será notificado cualquier hallazgo importante que se descubra durante el estudio y que pueda estar relacionado con mi anuencia para continuar en él.
- 6) Se me ha informado que el número total de participantes en el estudio es de 5 personas.

Nombre y firma del voluntario.

ANEXO 2  
 INMUNIZACION CON PILI DE ETEC  
 FORMA DE REGISTRO  
 FASE 1 y FASE 2

NOMBRE				
FECHA DE NACIMIENTO				
SEXO				
RAZA				
OCUPACION				
CONSENTIMIENTO	SI	NO		FECHA
DATOS FAMILIARES				
DIABETES	SI	NO		
HIPERTENSION	SI	NO		
HEMATOLOGICOS	SI	NO		
NEOPLASICOS	SI	NO		
OTROS	SI	NO		
DATOS PERSONALES				ESPECIFIQUE
ALERGIA	SI	NO		
DROGA	SI	NO		
ALCOHOLISMO	SI	NO		
TABAQUISMO	SI	NO		
INMUNIZACIONES PREVIAS	SI	NO		TIPO      FECHA
				-----
				-----
				-----
ENFERMEDADES PREVIAS				-----
				-----
				-----





ANEXO 3  
 Forma de seguimiento de diarrea  
 Fase 1 y Fase 2

LLENESE EN CASO DE DIARREA

FECHA	VOL	S	SS	SL	L	MOCO	SANGRE	COLICO	PUJO	TENESMO	FIEBRE
1a.											
2a.											
3a.											
4a.											
5a.											
6a.											
7a.											
8a.											
9a.											

Clave: Vol.: Volumen  
 S : Sólida  
 SS : Semisólida  
 SL : Semilíquida  
 L : Líquida  
 + = SI  
 - = NO

ANEXO 4  
FORMA DE CONSENTIMIENTO  
FASE 2

IMMUNOGENICITY OF ORAL VACCINE AGAINST ENTEROTOXIGENIC E. coli

I'm being asked to participate in a research study of an oral vaccine. This vaccine is made from surface structures (pili) of E. coli germ. These pili allow certain E. coli germs to remain in the gut and cause diarrhea. I will take oral doses of purified pili to see whether my body will make a protective immunologic (antibody) response. If I do make antibodies, it is possible I might benefit by being protected against diarrhea caused by E. coli, which accounts for 40 to 50% of diarrhea in newly arrived US adults in Guadalajara.

I understand I will be assigned randomly (like the flip of coin) to 1 of 2 treatment groups. One group takes 4 doses the other group receives a placebo (inactive and not effective) vaccine. Therefore, my chance of receiving a potentially protective vaccine is 50%.

During the 6-week study I will need to give a total of 3 blood samples to check on my body's response to the vaccine. Each blood sample is 2 teaspoons, and I understand blood taking can be painful at the site of the needle puncture where a bruise might also occur.

The pili vaccine has been tested for side effects in volunteers in Mexico. It contains no live germs and should not cause fever or other bad side effects, but I understand one other purpose of this study is to watch out for possible but unlikely side effects of the vaccine. For this reason I will need to make daily 10-minute visits to the diarrhea clinic (except weekends) and keep a diary of how I feel. If I should develop diarrhea, I will need to submit an additional stool sample immediately for analysis; I will be treated at no cost, and I will continue with the study as usual.

Alternative approaches to the prevention of diarrhea do exist, including use of antibiotics or Pepto-Bismol but neither approach is recommended by the investigators for longer than 1 or 2 weeks. Alternatively, I might prefer to take no form of prevention at all and treat diarrhea that might occur with such medicines as antibiotics or Pepto-Bismol.

My participation in this study is voluntary, I may withdraw my consent at any time without jeopardy to my participation in other research studies which the investigators might be conducting. All the results of this study will be treated in strict confidence and should they be published, my name will not be used. I have been informed that should I suffer any physical injuries as a result of participation in this research activity, all the necessary medical facilities are available for treatment. I understand however, that I cannot expect to receive any payment for hospital expenses or any financial compensation for such an injury.

I will take a known preventive of diarrhea, trimethoprim/sulfa methoxazole ( septra, bactrim ), daily for 10 days to give the vaccine a chance to work. I am not allergic to this drug or sulfa and have read the product brochure about side effects. The drug will be stopped if reactions occur.

I have had an opportunity to read this form and my questions have been answered.

---

Signature

---

Date

---

Witness

---

Date

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acres, S.D., Isaacson, R.E., Babiuk, L.A., et. al. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified k99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.* 25: 121-126, 1979.
- 2.- Ahrén, C.M., and A.M. Svennerholm. Synergistic protective effect of antibodies against Escherichia coli enterotoxin and colonization factor antigen. *Infect. Immun.* 38: 74-79, 1982.
- 3.- Allison, A.C. and G. Gregoriades. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature (London)* 252, 252, 1974.
- 4.- Black, R.E., Merson, M.H., Huq, I., et. al. Incidence and severity of rotavirus and Escherichia coli diarrhea in rural Bangladesh. Implications for vaccine development. *Lancet* 1: 141-143, 1981.
- 5.- Boedeker, E.C., Young, C.R., Collins, H.H., et. al. Towards a vaccine for traveler's diarrhea (T.D.): Mucosally administered Escherichia coli colonization factor antigens (CFAs) elicit a specific local immunoglobulin A response in isolated intestinal loops. *Gastroenterology* 82: 1020, 1982.
- 6.- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., et. al. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 526-531, 1978.
- 7.- Burrows, M.R., Sellwood, R., and Gibbons, R.A. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the k99 antigen of bovine strains of Escherichia coli. *J Gen. Microbiol.* 96: 269-275, 1976.
- 8.- Cabada de la, F.J., Evans, D.G., and Evans, D.J., Jr. Immunoprotection against enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea in rabbits by peroral administration of purified colonization factor antigen I (CFA/I). *FEMS Microbiol. Letters* 11: 303-307, 1981.

- 9.- Clements, J.D., and R.A. Finkelstein. Immunological cross reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of Escherichia coli and subunits of Vibrio cholerae enterotoxin. *Infect. Immun.* 21: 1036-1039, 1978.
- 10.- Clements, J.D. and E. Sawson. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-Escherichia coli related diarrheas. *Infect. Immun.* 46, 564-569, 1984.
- 11.- Code of Federal Regulations. Title 21. Food and Drugs. Subchapter F (part 610). Biologics. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 38-56, 1981.
- 12.- Craig, S.W. and J.J. Cebra. Peyer's patches: An enriched source of precursors for Ig-A producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 134: 188-200, 1971.
- 13.- Cravioto, A. Prospectos para la elaboración de una vacuna antiadhesiva contra cepas de Escherichia coli causantes de diarrea en humanos (1ª, 2ª, 3ª partes). *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 41: 122-128, 188-196, 253-261, 1984.
- 14.- Cravioto, A., Scotland S., and Rowe, B. Hemagglutination activity and factor antigens I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. *Infect. Immun.* 36: 189-197, 1982.
- 15.- Chan, S.K. and R.A. Gianella. Aminoacid sequence of heat stable enterotoxin produced by Escherichia coli pathogenic for man. *J. Biol., Chem.* 256: 7744-7746, 1981.
- 16.- Dapergolas, G. and G. Gregoriads. Hypoglycemic effect of liposome entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet* 2: 824-827, 1976.
- 17.- Donta, S.T., Wallace, R.B., Whipp, S.C., and Olarte, J. Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in Mexican children. *J. Infect. Dis.* 135: 482-485, 1977.

- 18.- Dorner, F., Mayer, P., and Leskova, R. Immunity to Escherichia coli in piglets: the role of colostral antibodies directed against heat-labile enterotoxin in experimental neonatal diarrhea. Zentralbl. Veterinärmed. 27: 207-221, 1980.
- 19.- DuPont, H.L., Evans, D.G., Rios, N. et. al. Prevention of traveler's diarrhea with trimethoprim/sulfamethoxazole. Rev. Inf. Dis. 4: 533-539, 1982.
- 20.- DuPont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., et. al. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. N. Engl. J. Med. 285: 1-9, 1971.
- 21.- DuPont, H.L., Sullivan, P., Evans, D.G., et. al. Prevention of travelers' diarrhea (emporiatric enteritis): Prophylactic administration of subsalicylate bismuth. J. Am. Med. Assoc. 243: 237-241, 1980.
- 22.- Elson, O., Heck, J.A., and Strober, W. T-cell regulation of murine IgA synthesis of the polyclonal stimulation of IgA production in vitro by LPS is likely under the control of an IgA specific T-helper cell. J. Exp. Med: 149, 632-643, 1974.
- 23.- Evans, D.G. and D.J. Evans, Jr. New surface associated heat-labile colonization factor (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of sero-groups O6 and O8, Infect. Immun. 21: 638-647, 1978.
- 24.- Evans, D.G., Evans, D.J. Jr., Clegg, S., et. al. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 25: 738-748, 1979.
- 25.- Evans, D.G., Evans, D.J. Jr., Thoa, W.S., and DuPont, H.L. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. 19: 727-736, 1978.
- 26.- Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., and Thoa, W. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea: Correlation with colonization factor. Infect. Immun. 18: 330-337, 1977.
- 27.- Evans, D.G., Graham D.Y., Evans, D.J., Jr. Administration of purified colonization factor antigens (CFAI, CFAII) of Enterotoxigenic Escherichia coli to volunteers. Gastroenterology 87: 934-40, 1984.

- 28.- Evans, D.G., Olarte, J., DuPont, H.L., et. al. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. J. Ped. 91: 65-68, 1977.
- 29.- Evans, D.G., Satterwhite, H.K., Evans, D.J., Jr. et. al. Differences in serological responses and excretion patterns of volunteers challenged with enterotoxigenic Escherichia coli with and without colonization factor. Infect. Immun. 19: 883-888, 1978.
- 30.- Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J., Jr. et. al. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun., 12: 656-667, 1975.
- 31.- Evans, D.J.; Jr., Chen, L.C., Curlin, G.T., et. al. Stimulation of adenylyl cyclase by Escherichia coli enterotoxin. Nat. (London) New Biol., 236: 137-138, 1972.
- 32.- Evans, D.J., Jr., Evans, D.G., and DuPont, H.L. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic Escherichia coli determined with human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. Infect. Immun. 23: 336-346, 1979.
- 33.- Evans, D.J., Jr., Evans, D.G., Young., L.S., et. al. Hemagglutination typing of Escherichia coli: Definition of seven hemagglutination types. J. Clin. Microbiol. 12: 235-242, 1980.
- 34.- Evans, D.J., Jr., Ruiz-Palacios, G., Evans, D.G., et. al. Humoral immune response to the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli in naturally acquired diarrhea and antitoxin determination by passive immune hemolysis. Infect. Immun. 16: 781-788, 1977.
- 35.- Field, M., Gral, L.H., Jr., Laird, W.J., et. al. Heat stable enterotoxin of Escherichia coli: In Vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP, concentration and ion transport in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 2800-2804, 1978.
- 36.- Furer, E., Cryz, S.J., Jr., Dorner, F., et. al. Protection against colibacillosis in neonatal piglets by immunization of dams with procholeraenoid. Infect. Immun. 35: 887-894, 1982.



- 37.- Genco, R.J., Linzer, R., and Evans, R.T. Effect of adjuvants on orally administered antigens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 409: 650-667, 1983.
- 38.- Gerlier, D.F., Sakai, F., and Dore J.F. Induction of antibody response to liposome associated gross virus cell-surface antigen. Br. J. Cancer 41:236-242, 1980.
- 39.- Germanier, R. Oral vaccination against enteric bacterial infections: An overview. Infection 13: S206-S209, 1985.
- 40.- Gianella, R.A. Suckling mouse model for detection of heat stable Escherichia coli enterotoxin. Characteristics of the model. Infec. Immun. 14: 95-99, 1976.
- 41.- Gorbach, S.L., Kean, B.H., Evans, D.G., et. al. Travelers' diarrhea and toxigenic Escherichia coli. N. Engl. J Med. 292: 933-936, 1975.
- 42.- Gowans, J.L. and E.J. Knight. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. Proc. R. Soc. London Ser. B. 159, 257-282, 1964.
- 43.- Gross, R.J., Cravioto, A., Scotland, S.M. et. al. The occurrence of colonisation factor (CF) in enterotoxigenic Escherichia coli. FEMS Microbiol. Letters., 3: 231-233, 1978.
- 44.- Guerrant, R.L., Kirchhoff, L.V., Shields, D.S., et. al. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil. Patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. J. Infect. Dis. 148: 986-997, 1983.
- 45.- Guerrant, R.L., Rouse, J.D., Hughes, J.M., and Rowe B. Tourists among members of the Yale Glee Club in Latin America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 895-900, 1980.

- 46.- Gyles, C.L. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of Escherichia coli and Vibrio cholerae. Infect. Immun. 9: 564-570, 1974.
- 47.- Gyles, C.L. Relationships among heat-labile enterotoxins of Escherichia coli and Vibrio cholerae. J. Infect. Dis. 129: 277-283, 1974.
- 48.- Gyles, C.L. and D.A. Barnum. A heat-labile enterotoxin from strains of Escherichia coli enteropathogenic for pigs. J. Infect. Dis. 120: 419-426, 1969.
- 49.- Hall, J.G., and M.E. Smyth. Homing of lymph born immunoblasts to the guts. Nature (London) 226: 252-262, 1970.
- 50.- Holmgren, J., Svennerholm, A.M. Ouchterlony, O., et. al. Antitoxic immunity in experimental cholera; Protection and serum and local antibody responses in rabbits after enteral and parenteral immunization. Infect. Immun. 12: 1331-1340, 1975.
- 51.- Houghten, R.A, Engert, R.F., Ostresh, J.M., et al A completely synthetic toxoid vaccine containing Escherichia coli heat-stable toxin and antigenic determinants of the heat-labile toxin B subunit. Infect. Immun. 48:735-740, 1985.
- 52.- Hughes, J.M., Murad, F., Chang, G., et. al. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Nat. 271:755-756,1978.
- 53.- Isaacson, R.E. K99 surface antigen of Escherichia coli: Purification and partial characterization. Infect. Immun. 15:272-279,1977.
- 54.- Isaacson, R.E., Fusco, P.C. Brinton, C.C., et.al. In vitro adhesion of Escherichia coli to porcine small intestinal epithelial cells. Pili as adhesive factors. Infect. Immun. 21:392-397,1978.

- 55.- Jacks, T.M. and B.J. Wu. Biochemical properties of Escherichia coli low-molecular-weight, heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 9:342-347,1974.
- 56.- Jones, G.W., and J.M. Rutter. The association of k88 with hemagglutinating activity in porcine strains of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 84:135-144,1974.
- 57.- Jones, G.W., and J.M., Rutter. Role of the k88 antigen of Escherichia coli in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by Escherichia coli in piglets. Infect. Immun. 6: 918-927,1972.
- 58.- Kean, B.H., and S. Waters. The diarrhea of travelers to Mexico: Summary of a five years study. Ann. Intern. Med. 59:605-614,1963.
- 59.- Klipstein, F.A., and R.F. Engert. Protective effect of immunization of rats with holotoxin or B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. 31:144-150,1981.
- 60.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Clements, J.D. Arousal of mucosal secretory immunoglobulin A antitoxin in rats immunized with Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. 37:1086-1092,1982.
- 61.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Clements, J.D. Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against Escherichia coli producing either enterotoxin. Infect. Immun. 37:550-557,1982.
- 62.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Clements, J.D. Immunization of rats with heat-labile enterotoxin provides uniform protection against heterologous serotypes of Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 32:1100-1194,1981.
- 63.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Clements, J.D., Protection in rats immunized with Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 34:637-639,1981.

- ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA
- 64.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., Clements, D. Protection against human and porcine Enterotoxigenic strains of Escherichia coli in rats immunized with a cross-linked toxoid vaccine. Infect. Immun. 40:924-929,1983.
- 65.- Klipstein, F.A. Engert, R.F., and Houghten, R.A. Properties of synthetically produced Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 39:117-121,1983.
- 66.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Houghten, R.A. Protection in rabbits immunized with a vaccine of Escherichia coli heat-stable toxin cross-linked to the heat-labile toxin B subunit. Infect. Immun. 40:888-893,1983.
- 67.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Houghten, R.A. Properties of cross-linked toxoid vaccines made with hyperantigenic forms of synthetic Escherichia coli heat-stable toxin, Infect. Immun. 44:268-273,1984.
- 68.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Houghten, R.A. Immunisation of volunteers with a synthetic peptide vaccine for enterotoxigenic Escherichia coli. Lancet i:471-473,1986.
- 69.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Sherman, W.T. Peroral immunization of rats with Escherichia coli heat-labile enterotoxin delivered by microspheres. Infect. Immun. 39:1000-1003,1983.
- 70.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., and Short, H.B. Protective effect of immunization with heat-labile enterotoxin in gnotobiotic rats monocontaminated with Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 28:163-170,1980.
- 71.- Kohler, E.M. Enterotoxic activity of whole cell lysates of Escherichia coli in young pigs. Am. J. Vet. Res. 32:731-737,1971.

- 72.- Kohler, E.M. Neonatal enteric colibacillosis of pigs and current research on immunization. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173:588-591,1978.
- 73.- Lenette, E.H. ed. Manual of Clinical Microbiology. 4 th. Edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1985.
- 74.- Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., et. al. Evaluation in humans of attenuated *Vibrio Cholerae* El Tor Ogawa strain Texas Star-Sr as a live oral vaccine. Infect. Immun. 43:515-522,1984.
- 75.- Levine, M.M. Losonsky, G., Herrington, D. et. al. Pediatric diarrhea: The challenge of prevention. Ped. Infect. Dis.: 5, s29-243, 1986.
- 76.- Levine, M.M., Nalin, D.R., Hoover, D.L., et. al. Immunity to Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 23:729-736, 1979.
- 77.- Levine, M.M., Rennels, M.G., Daya, V., and Hughes, T.P. Hemagglutination and colonization factors in Enterotoxigenic and Enteropathogenic Escherichia coli that cause diarrhea. J. Infect. Dis. 141:733-737,1980.
- 78.- López, Y. Determinación de anticuerpos contra el factor de colonización de Escherichia coli enterotoxigénica en calostro y leche materna por el método inmunoensayo enzimático (ELISA). Tesis. Escuela de Ciencias Químicas. U.A.P., Puebla. 1980.
- 79.- López-Vidal, Y., Svennerholm, A. Hemadsorption and Enzyme-linked immunosorbent assay nitrocellulose replica methods for identification of colonization factor antigen (CFA)-Positive Escherichia coli colonies and for isolation of CFA-negative mutants. J. of Clin. Microbiol. 24: 615-619, 1986.
- 80.- López-Vidal, Y., Ahrén, C., Svennerholm, A. Colonization, diarrhoea and protective immunogenicity of a CFA-Deficient, enterotoxin-producing *Escherichia coli* mutant in a non-ligated intestine experimental model. Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect B 95:000-000, 1987.

- 81.- Macías, R.M. Purificación del factor de colonización de Escherichia coli cepa H:10407. Tesis. Facultad de Química, U.N.A.M., México, 1981.
- 82.- Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., et. al. Trabelers' diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. N. Engl. J. Med. 295:1299-1305,1976.
- 83.- Mestecky, J., McGhee, J.R., Arnold, R.R., et. al. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. J. Clin. Invest. 61:731-737,1978.
- 84.- Mett, H. Kloetzlen, L. and Vosheck, K. Properties of pili from Escherichia coli SS142 that mediate mannose-resistant adhesion to mammalian cells. J. Bacteriol. 153:1038-1044,1983.
- 85.- Michalek, S.M., McGhee, J.R., Mestecky, J., et. al. Ingestion of Streptococcus mutans induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. Science, 192:1283-1290,1976.
- 86.- Montgomery, P.C., Chon, J. and Lally, E.T., The induction and characterization of secretory IgA antibodies In the Immunoglobulin A System. Mestecky, J, Lawton, A.R. Eds: Adv. Exp. Med. Biol. Plenum Press, New, York, 45:453-462,1974.
- 87.- Moon, H.W., Baetz, A.L., and Gianella, R.A. Immunization of swine with heat-stable Escherichia coli enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an Escherichia coli strain that produces Heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 39:990-992, 1983.
- 88.- Moon, H.W., Whipp, S.C., Engstron, G.W., et. al. Response of the rabbit ileal loop to cell free products from Escherichia coli enteropathogenic for swine. J. Infect. Dis. 121:182-187, 1970.

...

- 89.- Morgan, R.L., Isaacson, R.E., Moon, H.W., et. al. Immunization of suckling pigs against Enterotoxigenic Escherichia coli induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 985 or k99 pili: Protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect. Immun.* 22:771-777,1978.
- 90.- Nagy, B., Moon, H.W., Isaacson, R.E., et. al. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic Escherichia coli infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* 21:269-274,1978.
- 91.- Newsome, P.M., Burgess, M.N., and Mullan, N.A. Effect of Escherichia coli heat stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine. *Infect. Immun.* 22:290-291,1978.
- 92.- Orskov, I. and F. Orskov. Episome carried surface antigen k88 of Escherichia coli. I. Transmission of the determinant of the k88 antigen and influence of the transfer of chromosomal markers. *J. Bacteriol.* 91:69-75,1966.
- 93.- Owen, R.L. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in normal, unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterology*, 72:440-451, 1977.
- 94.- Owen, R.L. and A. L. Jones. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66:189-203,1974.
- 95.- Pickering, L.K., Evans, D.J., Muñoz, O., et. al. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. *J. of Ped.* 93:383-388,1978.
- 96.- Pierce, N.F. Induction of optimal mucosal antibody responses: Effects of age, immunization route (s), and design schedule in rats. *Infect. Immun.* 43:341-346,1984.

- 97.- Pierce, N.F., and F.T. Koster Priming and suppression of the intestinal immune response to cholera toxoid toxin by parenteral toxoid in rats. *J. Immunol.* 124:307-311,1980.
- 98.- Pierce, N.F. and J.B. Sacci, Jr. Enhanced mucosal priming by cholera toxin and procholera toxin with a lipidal amine adjuvant (Avridine) delivered in liposomes. *Infect. Immun.* 44:469-473,1984.
- 99.- Pierce, N.F., Sacci Jr., J.B., Alving, C.R., et. al. Enhancement by lipid A of mucosal immunogenicity of liposome associated cholera toxin. *Rev. Infect. Dis.* 6:563-566,1984.
- 100.- Richman, L.K., Graeff, A.S., Yarchoan, R., et. al. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T-cells and IgG suppressor T-cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.* 126:2079-2083,1981.
- 101.- Rosenberg, M.L., Koplan, J.P., Wachsmuth, I.K., et. al. Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic Escherichia coli: a large waterborne outbreak. *Ann. Inter. Med.* 86:714-718,1977.
- 102.- Rowland, R.N. and J.F. Woody. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 620:400-409,1980.
- 103.- Ruiz-Palacios, G. Etiologic agents of acute diarrhea: Bacterial and Parasitic in Bellanti, J.A., ed. *Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children.* Nestlé Nutrition Workshop Series, Vol. 2, Raven Press, New York, 67-70,1983.
- 104.- Ruiz-Palacios, G.M., Escamilla, E., and Torres, J. Production of enterotoxins by *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. 22nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Miami, Florida, 1982.
- 105.- Ruiz-Palacios, G.M., López-Vidal, Y., and Macías, R.M. Natural immune response to the Colonization Factor I of enterotoxigenic Escherichia coli during childhood. International Symposium on Enteric Infections. Brugge, Belgium. September, 1981.



- 106.- Rutter, J.M., Burrows, M.R., Sellwood, R., et. al. A genetic basis for resistance to enteric disease caused by E. coli. Nat. 257:135-136,1975.
- 107.- Rutter, J.M., Jones, G.W., Brown, G.T.H., et. al. Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by k88 positive Escherichia coli. Infect. Immun. 13:667-676,1976.
- 108.- Sack, D.A., Kaminsky, D.C., Sack, R.B., et. al. Prophylactic doxycycline for travelers' diarrhea. Results of a prospective double blind study of Peace Corps volunteers in Kenya. N. Engl. J. Med. 298:758-763,1978.
- 109.- Sack, D.A. and R.B. Sack. Test for Enterotoxigenic Escherichia coli using Y1 adrenal cells in miniculture. Infect. Immun. 11:334-336, 1975.
- 110.- Sack, R.B. Immunization with Escherichia coli enterotoxin protects against homologous enterotoxin challenge. Infect. Immun. 8:641-644, 1973.
- 111.- Sack, R.B., Hirschhorn, N., Brownlee, I., et. al. Enterotoxigenic Escherichia coli-associated diarrheal disease in Apache children. New. Engl. J. Med. 292:1041-1045,1975.
- 112.- Sack, R.B., Kirshbam, N., Woodward W.E., et. al. Antibodies to heat-labile Escherichia coli enterotoxin in Apaches in Whiteriver, Arizona. Infect. Immun. 12:1475-1477,1975.
- 113.- Satterwhite, T.K., DuPont, H.L., Evans, D.G., et. al. Role of Escherichia coli colonization factor antigen in acute diarrhea. Lancet ii:181-184,1978.
- 114.- Schmidt, M., Kelly, E.P., Tseng, L.Y., et. al. Towards and oral E. coli pilus vaccine for travelers' diarrhea: susceptibility of purified colonization factor antigen/II to proteolytic digestion. Gastroenterology, 88:1575,1985.

- 115.- Sherman, D.M., Acres, S.D., Sadowski, P.L., et. al. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered Escherichia coli k-99 specific monoclonal antibody. Infect. Immun. 42:653-658,1983.
- 116.- Shields, D.S., Kinchoff, L.V., Sauer, K.T., et. al. Prospective studies of diarrhea illness in NE Brazil: Patterns of disease, etiologies and risk factors. 22nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Miami, Florida, 1982.
- 117.- Shore, E.G., Dean, A.G., Holik, K.J. et. al. Enterotoxins producing Escherichia coli and diarrheal disease in adult travelers: a prospective study. J. Infect. Dis. 129:577-582,1974.
- 118.- Smith, D.M., Taubman, M.A., and Ebersole. J.L. Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. Infect. Immun. 26:83-89,1979.
- 119.- Smith, H.W., and S. Halls. Studies on Escherichia coli enterotoxin. J. Pathol. Bacteriol. 92:531-543,1967.
- 120.- Smith, H.W. and S. Halls. The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. 52:319-334,1968.
- 121.- Smyth, C.J. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic Escherichia coli of serotype O6:K15:H16 or H- isolated from travellers' and infantile diarrhoea. J. Gen. Microbiol., 128:2081-96, 1982.
- 122.- Snodgrass, D.R., Nagy, L.K., Sherwood, D., and Campbell, I. Passive immunity in calf diarrhea: Vaccination with k99 antigen of Enterotoxigenic Escherichia coli and Rotavirus. Infect. Immun. 36:586-591,1982.
- 123.- Söderling, O., Olsson, E., Smyth, C.J., and Möllby, R. Effects of parenteral vaccination of dams on intestinal Escherichia coli in piglets with diarrhea. Infect. Immun. 36:900-906,1982.

- 124.- Staples, S.J., Asher, S.E., and Gianella, R.A. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of E. coli pathogenic for man. J. Biol. Chem. 255:4716-4721,1980.
- 125.- Stoll, B.J., Svennerholm, A.M., Gothefors, L., et. al. Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea in an endemic area. J. Infect. Dis. 153: 527-534,1986.
- 126.- Strim., S., Orskov, F., Orskov, I., et. al. Episome carried surface antigen k88 of Escherichia coli: III. Morphology. J. Bacteriol. 93: 740-748,1967.
- 127.- Svennerholm, A.M., Ahren, C. Serological subtypes of Escherichia coli colonization factor antigen II. Eur. J. Clin. Microbiol. 1: 107-111, 1982.
- 128.- Thomas, L.V., Cravioto, A., Scotland, S.M., and Rowe, B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in Enterotoxigenic Escherichia coli in humans. Infect. Immun. 35:1119-1124,1982.
- 129.- Tomasi, T.B., Oral tolerance. Transplantation, 29:353-355,1980.
- 130.- Turner, A.C. Travellers'diarrhea: a survey of symptoms, occurrence and possible prophylaxis. Br. Med. J. 4:651-654,1967.
- 131.- Van-Houte, A.J., Snippe, H., and Willers, J.M.N. Characterization of immunologic properties of haptened liposomal model membranes in mice. I. Thymus independence of the antigen. Immunology 37:505-514,1979.
- 132.- Waldman, R.H., Stone, J., Lazzell, V., et. al. Oral route as method for immunizing against mucosal pathogens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 409: 510-516,1983.

...

- 133.- Weikel, C.S., Nellans, H.N., Guerrant, R.L. In vivo and in vitro effects of a novel enterotoxin, Stb, produced by Escherichia coli. J. Infect. Dis. 153: 893-901, 1986.
- 134.- Wilson, M.R. and A.W. Hohman. Immunity to Escherichia coli. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to isolated intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 10: 776-782, 1974.
- 135.- Wood, L.V., Olfe, H. Ruiz-Palacios, G.M., et. al. An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin producing strain of Escherichia coli. Infect. Immun. 41: 931-934, 1983.
- 136.- Yamamoto, T., Tamura, Y. and Takeshi Y. Enteroadhesive fimbriae and enterotoxin of Escherichia coli: Genetic transfer to a Streptomycin-resistant mutant of the gal E oral-route live-vaccine Salmonella typhi Ty 21a. Infect. Immun. 50:925-928, 1985.
- 137.- Yasuda, T., Dancey, G.F., and Kinsky, S.C. Immunogenic properties of liposomal model membranes in mice. J. Immunol. 119: 1863-1867, 1977.
- 138.- Yasuda, T., Tadakuma, T, Pierce, C.W., et. al. Primary in vitro immunogenicity of liposome model membranes in mouse spleen cultures. J. Immunol. 123: 1535-1539, 1979.
- 139.- Yolken, R., Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z. ELISA for rotavirus. Lancet 2: 819, 1977.