



**SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA MEDICA**

**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA DIRECTA PARA LA
DETECCION DE LA ENTEROTOXINA TERMOLABIL DE
ESCHERICHIA COLI A PARTIR DE SUS COLONIAS
EN COPROCULTIVO.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
OLGA MADALEINE TENEUQUE GONZALEZ**

MONTERREY, N. L. MEXICO. JULIO 1988

TM

Z6658

FM

1988

T4



1020091086

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y
ESTUDIOS DE POSTGRADO.

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA MEDICA

IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA DIRECTA PARA LA DETECCION
DE LA ENTEROTOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli
A PARTIR DE SUS COLONIAS EN COPRO CULTIVO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

OLGA MADALEINE TENEYUQUE GONZALEZ

MONTERREY, N.L. MEXICO. JULIO DE 1988.

TM
Z66 8
FM
1988
T4



FONDO TESIS

63105

El presente trabajo se llevó a cabo en el
Depto. de Microbiología de la Facultad de
Medicina de la U.A.N.L.

Bajo la asesoría de

Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla
Jefe del Departamento

DEDICATORIA

A Dios Nuestro Señor:

Por permitirme culminar esta meta.
Por su infinita bondad.
Por SER.

A mis Padres, con todo mi amor:

Sr. Eduardo Teneyuque Guardiola
Sra. Olga M. González de Teneyuque

Por el inmenso cariño e infinito amor
que me han brindado a través de la
vida, con su confianza, estímulo
y comprensión.
Por ayudarme a ser lo que ahora soy.

Mil Gracias

A mis hermanos:

Eduardo y Aracely Cecilia

Por su cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor Académico y de Tesis:

Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla

Por su brillante dirección científica y sus consejos durante mi preparación.

A mis maestros:

Por las enseñanzas impartidas.

A mis compañeros y amigos:

Por la amistad brindada, muy especialmente a mi amiga y compañera QFB MC Gloria Ma. González G., sin cuya ayuda y orientación, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Srita ISC Ma. del Carmen Ramírez Chi:

Por su ayuda, apoyo y paciencia en la transcripción de esta tesis.

A todas aquellas personas que de alguna forma u otra colaboraron para la realización de este trabajo.

I N D I C E

| | Pag. |
|--------------------|--------------|
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIAL Y METODOS | 15 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSION | 41 |
| RESUMEN | 45 |
| BIBLIOGRAFIA | 46 |

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

Escherichia coli o bacilo de coli, pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo gram negativo, aeróbico y anaeróbico facultativo, mide de 1 a 3 μ de largo por 0.5 μ de diámetro, se encuentra aislado, o agrupado en pares y cadenas cortas (12,35a), generalmente no capsulado, móvil por flagelos peritricos (con algunas variantes inmóviles) y presenta "pilis" o "fimbrias" (12,24).

Este microorganismo fué descubierto por Buchner en 1885 y estudiado con más detalle por Theodore Escherich en 1886 (72), durante sus investigaciones sobre la flora bacteriana normal del recién nacido (50).

Posee 3 tipos de antígenos: somático ("O"), flagelar ("H") y capsular o ectoplásmico ("K"), que a su vez se subdivide en B, L y A (9,12,24). Actualmente se sabe que existen alrededor de 50 antígenos "H", 90 antígenos "K" y 164 antígenos "O" (12).

El bacilo es considerado como parte de la flora normal del intestino grueso (razón quizá por la que se le llame "colibacilo") (63). Ocupa una posición única entre los bacilos entéricos oportunistas. Intra y

extraintestinalmente, es capaz de desempeñar un papel patógeno. En el primer caso e incluyendo al intestino delgado ocasiona enteritis agudas, benignas y a veces diarreas de tipo disenteriforme o coleriforme; en el segundo caso ocasiona meningitis, onfalitis (recién nacido), colecistitis, pielitis, cistitis y uretritis, así como peritonitis, septicemia y abscesos localizados en distintas partes del cuerpo (12).

Actualmente se sabe que existen 4 grupos de E. coli enteropatógenas: E. coli enteroinvasiva, E. coli enterotoxigénica, E. coli enteropatógena y E. coli enteroadherente (15).

En este trabajo se estudiará la E. coli enterotoxigénica para lo cual se encontró la existencia de dos enterotoxinas, una termoestable (TE) y una termolábil (TL) (55,22), siendo esta última el foco de atención por su importancia clínica.

La diarrea, es una de las causas principales de muerte en niños menores de 5 años de edad, que viven en países en desarrollo, y es considerada como causa significativa de enfermedad en adultos de esas áreas (52,55,66).

Después de estudios realizados por Escherich siguió una etapa de minuciosos estudios encaminados a probar la

relación de los colibacilos en la diarrea infantil. Lesage (1897) y Nobecourt (1899) de Francia, sostuvieron el papel patógeno de este microorganismo en diarreas infantiles. Hasta 1910 quedó todo olvidado. Durante los siguientes 30 o 35 años solo esporádicamente se intentó demostrar su participación en las enteritis (50).

Desde hace muchos años, los veterinarios saben que ciertas cepas de E. coli provocan diarreas graves entre lechones y terneras. No es raro el caso de muerte de camadas completas de lechones, víctimas de una diarrea severa que los mata en unas cuantas horas o días (62).

Parte de la incapacidad de hacer frente al ~~problema~~ ha sido, en general, la falta de conocimientos de la etiología de la diarrea.

Estudios bacteriológicos de diarreas en diferentes áreas geográficas, han dado esencialmente el mismo resultado; la gran mayoría de los casos (60-80%) están asociados con enteropatógenos reconocidos como desconocidos o no identificados. Como resultado de ciertos estudios recientes de E. coli, la ignorancia en esta área disminuyó, al aparecer nuevos alcances del control de la enfermedad. Cuando E. coli se ve limitada a su nicho ecológico usual en el tracto intestinal en el humano, es llamada "flora normal", digno de un reporte benigno en el laboratorio bacteriológico. La excepción se

encuentra en niños menores de 2 años con diarrea; en los cuales la E. coli fecal fué anteriormente identificada como perteneciente a un pequeño número de biovariedades (52), que se presumía, eran responsables de enfermedades diarreicas. Aunque esta información fué de poco valor para el médico con fines terapéuticos, si tuvo valor con fines epidemiológicos en guarderías, ya que las diarreas fueron causadas por una sola biovariedad de E. coli (55).

Durante 1945 y 1947 ocurrieron varios brotes epidémicos de diarrea mortal, que afectaron sobre todo a lactantes, como en: Inglaterra (Bray, quien llamó a este microorganismo Bacterium coli neapolitanum), México (Varela) y Escocia, encontrando rangos de mortalidad tan altos como 50%, mostrando la autopsia, mínima inflamación del intestino delgado, la mucosa algo edematizada y ausencia de ulceración (9,55,62). En 1949, Giles y col. incriminaron una cepa de E. coli como la causa de otro brote epidémico de diarrea. La cepa de Bray fué identificada como E. coli alfa y la cepa de Giles como E. coli beta. En 1949, Taylor y col. aislaron una cepa serológicamente homogénea, identificándola como E. coli D-433, aislada de cuadros diarreicos en bebés de guarderías. En las epidemias se encontraron varias biovariedades de E. coli, entre ellas O111:B4 y O55:B5, como causantes de diarreas infantiles, con mayor frecuencia que otras biovariedades (14,50).

Como estos estudios epidemiológicos de laboratorio fueron en aumento, Kauffman y DuPont (50) desarrollaron un esquema serológico que permitiera el reconocimiento entre B. coli neapolitanum de Bray, E. coli alfa de Giles y E. coli D-433 de Taylor, los cuales pertenecían al mismo grupo "O" designado como O111 y que la E. coli beta de Giles pertenecía al grupo O55, todo esto sucedió entre 1951 y 1955 (50). La mayoría de las epidemias de diarrea infantil ocasionadas por E. coli enteropatógenas, fueron causadas por 12 a 15 biovariedades diferentes por ej. O26, O55, O86, O111, O112, O119, O124-128, etc. (9,58,62)., siendo demostrado por Ewing en 1957; sin embargo, la patogénesis estaba pobremente entendida, debido en parte, a la incapacidad para producir la enfermedad en animales de experimentación, lo único que se podía decir, era lo reportado por June y col. y Ferguson y June en relación a la severidad de la enfermedad, es decir, que esta dependía de la dosis ingerida (9,35a).

Aquí comienzan a presentarse hallazgos patológicos en diarrea por E. coli con similitud a los de cólera (35). En particular, Koya y col. (18) en 1954, mostraron en voluntarios que la biovariedad O111 causaba enfermedad por proliferación y colonización en el intestino delgado como en cólera. Fue Thompson (18) en 1955 al parecer, el primero en reconocer las semejanzas entre Vibrio cholerae y E. coli enteropatógena, encontrando un alto número de E. coli O111, O55 y O26 en la parte alta del

intestino delgado en niños enfermos vivos y en muertos (en autopsia), con ausencia de anormalidad seria, como invasión del tejido; situación sugestiva de la presencia de una enterotoxina reconocida como mediador de una enfermedad diarreica y encabezando las investigaciones de pacientes no coléricos con similitud clínica (18). Casi al mismo tiempo que Thompson, De y col. (64) en 1956 en un estudio realizado en la India con su reciente prueba desarrollada en asa ligada de ileon de conejo, encontraron que ciertas cepas de E. coli O111, causaban diarrea secretora, similar a la de V. cholerae (no encontrando otras biovariedades presentes en casos similares). Ellos concluyeron que "la serología, no daría una prueba final de patogenicidad de las de Bacterium (Escherichia) coli". Hasta aquí los investigadores habían demostrado que una substancia enterotoxigénica producida por E. coli era la responsable de la diarrea (18).

Esto abrió el camino a la investigación del principio enterotoxigénico. A finales de 1960, Sack y Gorbach demostraron lo propuesto por Thompson (50). Así mismo, Taylor y Bettelheim (9,50), en 1966, reafirmaron los conocimientos de Thompson al encontrar que solo los cultivos muertos por cloroformo y no los muertos por calor, retenían la capacidad de producir la acumulación de fluidos en el asa ligada de ileon de conejo y que el material tóxico, era muy lábil al calor y podía perderse

con facilidad, por ej., en el almacenamiento en el laboratorio.

En 1967 en Calcutta y en 1970 Rowe (Inglaterra) (52), demostraron que E. coli enterotoxigénica puede ser una causa importante de enfermedad diarreica en el adulto. El primer estudio (Calcutta) se realizó en adultos con diarrea parecida al cólera, en los cuales la diarrea era de aspecto de agua de arroz profusa, acompañada de deshidratación y shock, sin estar presente V. cholerae; quizá, la diferencia con cólera era, que la diarrea cesaba a las 24 a 30 horas sin antibioticoterapia, después de haber ingerido al microorganismo, y en cólera esto no sucede, encontrando durante la fase aguda de la diarrea y con un período de incubación de 16 - 24 horas, una gran población de E. coli en el intestino delgado, aproximadamente $10^7 - 10^9$ Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml), aislándose frecuentemente una a dos biovariedades; en el segundo estudio (Inglaterra) realizado en soldados británicos, se encontró una biovariedad identificada como O148 (9,55).

Durante los pasados 17 años, el reconocimiento de E. coli enterotoxigénica, en la producción de diarrea en los humanos, se ha extendido, ya que encierra un amplio espectro clínico, desde una ligera "diarrea del viajero" (4,24,35) hasta una severa diarrea parecida al cólera que

involucra a todos los grupos de edades desde pediatría hasta geriatría (55).

En 1967, se reportó el primer caso de E. coli enterotoxigénica, durante la investigación del cólera en el área veterinaria. Los siguientes 3 años se siguió confirmando el principio enterotoxigénico el cual fué asociado con un antígeno específico "K" (24,55,70) dando como resultado el descubrimiento de dos enterotoxinas producidas por E. coli: una enterotoxina termolábil (LT o TTL) y una enterotoxina termoestable (ST o TTE), en ambas la producción era controlada por un plásmido (10,30,31,35,41,61,67,70). No se ha encontrado relación alguna entre la toxina TL y la ~~TE~~ con las biovariedades, aunque algunas se vean implicadas (20,24,50).

Evans y col. (11,48), demostraron que una condición importante para la producción de la enfermedad, era que las cepas enterotoxigénicas de origen humano, poseían unos factores de adherencia llamándolos CFAI y CFaII, los cuales también eran mediados por un plásmido (24,31). Sin embargo, Sack (56), consideró que esto no era un prerrequisito. Este plásmido puede ser transferido a otras cepas de E. coli y más aún, a otros géneros de enterobacterias (2,50,55).

Se ha encontrado una marcada diferencia entre las dos enterotoxinas. En primer lugar en el peso molecular, la

TTL tiene un peso aproximado de 95,000 daltons (8) y la TTE lo tiene entre 1,000 y 6,000 daltons; en segundo lugar la resistencia al calor, la TTE resiste 100°C durante 15 minutos mientras que la TTL es sensible a éstas mismas condiciones y en tercer lugar, la capacidad antigénica de la TTL y que no posee la TTE (3,55).

Lohnrath y Holmgren mostraron que, al igual que la enterotoxina de V. cholerae, la enterotoxina TL de E. coli, tiene 2 tipos de subunidades, la subunidad B (PM 11,600 daltons) y la subunidad A (PM 28,000 daltons), que a su vez se subdivide en A-1 (PM 23,000 daltonss) y A-2 (PM 5,000 daltons) (69,70,73).

E. coli enterotoxigénica produce diarrea secretora (45) y vómitos, que involucran una discreta inflamación o cambios patológicos imperceptibles en el tubo digestivo (50). Se ve íntimamente ligada con la "diarrea del viajero" (4,24,35,45,46,66), diarrea de la infancia de intensidad moderada o severa (51), síndrome semejante al cólera en adultos que viven en áreas endémicas (5,54,66) y ocasionalmente, en diarrea epidémica en hospitales infantiles o guarderías (50).

Se desconoce la frecuencia con que las cepas toxigénicas producen procesos diarreicos en la especie humana, pero se cree que jueguen un papel importante en los procesos diarreicos agudos en niños de corta edad, en

la "diarrea del viajero" (66) y en los episodios de intoxicación alimentaria (44,63), ya que se ha visto que la ingestión del microorganismo puede ser, por el agua y ciertos alimentos contaminados con la bacteria (60), los que incluyen carne de puerco, carnes frías, embutidos y hamburguesas (9,44).

En E. coli no se ha determinado la dosis infectante pero se piensa que sea semejante a la de V. cholerae de 10^6 UFC.

En la tabla 1, se observan algunas de las características más importantes de las enterotoxinas de V. cholerae y termolábil de E. coli.

Para que se produzcan los procesos diarreicos, el microorganismo necesita rebasar los mecanismos propios de defensa; entre los que están: la acidez gástrica, la fagocitosis, el movimiento intestinal (50), etc. En 1969, Gyles y Barnum (33) demostraron por primera vez una interacción inmunológica entre la enterotoxina termolábil de E. coli y la toxina de V. cholerae. Entre 1971 y 1974, Smith y Sack (6,33), Evans (6,17) y Donta y Smith (33,72), encontraron que la enterotoxina TL de E. coli se neutralizaba con su antisuero homólogo y en menor proporción con el antisuero de la toxina de V. cholerae. Gyles, Klipstein y Engert (27,31,37) en 1977 confirmaron que la antitoxina de V. cholerae neutralizaba no solamente

TABLA No. 1
 CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES DE LAS ENTEROTOXINAS DE
Vibrio cholerae Y LA TERMOLABIL DE Escherichia coli

| | TTL* <u>E. coli</u> | T <u>V. cholerae</u> |
|---------------------------------------|---|---|
| Peso Molecular | 73,000-95,000 | 84,000 |
| Subunidades | A y B | A y B |
| Resistencia al calor (100°C/15min) | Se inactiva | Se inactiva |
| Naturaleza Química | Protéica | Protéica |
| Receptores en mucosa | Gangliósido GM-1 | Gangliósido GM-1 |
| Métodos de ensayo | Modelos anima- les, cultivos - celulares, meto- dología immuno- lógica. | Modelos anima- les, cultivos celulares, me- todología immu- nológica. |
| Control genético | Plásmido | Cromosómico |

* TTL - Toxina termolábil de Escherichia coli.

a su antígeno homólogo, sino también a la enterotoxina TL de E. coli, en estudios realizados con animales como asa ligada de ileon de conejo y en cultivos celulares en células CHO (ovario de hámster chino) (6,7,29,64), etc.

Existen diferentes estudios que se han realizado en relación a la detección de la TTL de E. coli; modelos animales, como asa ligada de ileon de conejo (50,64), punción intragástrica en conejos recién nacidos (50), etc. cultivos celulares, en células CHO (ovario de hámster chino), VERO (riñón de mono verde)(50,65), Y-1 (tumor adrenal de ratón) (13,50), etc., para medir la actividad enterotóxica. Sin embargo, estos tienen como inconveniente el ser de alto costo y difíciles de manejar en un laboratorio pequeño. Existen también pruebas inmunológicas como serodiagnóstico para detectar el antígeno específico, que incluyen inmunohemólisis pasiva (50,60,68), inhibición de la inmunohemólisis (21,50), radio inmuno ensayo (27,28,50), inmunodifusión (50), ELISA (50,53,59,67,72), etc.

Muchos de estos ensayos no son prácticos para propósitos de diagnóstico clínico, porque se necesita de material o técnicas especiales o ambas, un gran número de animales, un "stock" de líneas celulares, radioisótopos (32), etc., por lo que para un laboratorio que no cuenta con muchos recursos económicos requeriría de una fuerte inversión; por lo tanto, quizá algunos de los ensayos más

prácticos incluirían, la coagulación estafilocócica (2,59), la aglutinación con partículas de látex (23,70), el Western Blot (2) (aunque se considera costoso) y una modificación de la prueba de Elek (propuesta por Honda) (32,34), considerada por algunos autores como una prueba simple y económica (23).

En 1948, Elek (16), estableció una técnica sencilla para identificar cepas de Corynebacterium diphtheriae productoras de toxina "in vitro" a partir de colonias, la cual consistía en inocular el microorganismo en el medio de cultivo en forma de estría, y colocar entre el medio y transversalmente a la línea de inoculación, la antitoxina diftérica embebida en una tira de papel filtro. Elek fundamentó su técnica en 3 principios: a) obtener una rápida y máxima producción de toxina, b) producir un gradiente de antitoxina en el medio como para dar una reacción con variabilidad en la concentración de la toxina y c) proveer constituyentes séricos no específicos en cantidad suficiente para hacer una reacción de precipitación fácilmente visible (16). King y colaboradores la modificaron en la forma en que actualmente se utiliza (36).

En 1981, Honda y col. modificaron la técnica de Elek para demostrar la presencia de la enterotoxina termolábil de Escherichia coli, colocando el antisuero correspondiente en un pozo central, a 6 mm de distancia de

la colonia, llamándola prueba de Biken (32,34). Sin embargo, su técnica no resultó ser muy práctica para uso rutinario en el laboratorio clínico principalmente por el factor tiempo (32,67).

Por todo lo anteriormente expuesto, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

Se puede utilizar el efecto de reacción cruzada del antisuero de la enterotoxina de V. cholerae, para detectar la enterotoxina termolábil de E. coli a partir de las colonias aisladas en coprocultivos, para aplicarla al diagnóstico rutinario de cepas enterotoxigénicas.

Objetivo a lograr:

Detectar la enterotoxina termolábil de Escherichia coli mediante una técnica simple, económica, rápida y segura que permita la diferenciación entre las cepas productoras de la enterotoxina termolábil y las cepas no productoras, de la "flora normal" de las heces.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

En el presente trabajo, se decidió tomar como base la técnica de Elek (16) y la técnica de Biken (32), variando algunos parámetros para acortar su tiempo de reacción, pues el reportado por Honda y col. (32) de 96 horas no era apropiado para un diagnóstico oportuno. Se utilizó la toxina de Vibrio cholerae (Sigma Chemical, Co.) para realizar la reacción inmunológica.

Se trabajó con la cepa de Escherichia coli H-10407 (24) productora de enterotoxina termolábil (TL). (*)

Para diseñar la técnica propuesta, se tomaron en cuenta diferentes parámetros, tales como temperatura y tiempo de incubación, volumen de antisuero, tiempo de liberación de la toxina de la cepa y otros que se mencionarán más adelante.

(*) Cepa cedida por la Dra. S. Giono Cerezo y el Dr. C. Eslava del Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

I OBTENCION DE LA TOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli

La cepa de E. coli H-10407 fué inoculada en medio de cultivo CAYE-2 (Tabla 4) (17,19,20) modificado por Honda y col. (32), el cual consiste en un hidrolizado de caseína o casamino ácidos (Difco) al 2% , extracto de levadura (Difco) al 1.5%, cloruro de sodio al 0.25%, fosfato dibásico de potasio al 1.5%, solución de sales 0.05 ml% (sulfato de magnesio al 5%, cloruro férrico al 0.5% y cloruro de cobalto hexahidratado al 2%, disueltas en ácido sulfúrico 0.001 N), glucosa al 0.5% y lincomicina 90 µgr/ml (32,39,40,71), el pH se ajustó a 7.5 (Ver Tabla 4). La esterilización se efectuó a 10 lbs de presión/116-118°C, durante 15 minutos, adicionando posteriormente el antibiótico asépticamente, una vez que el caldo alcanzó una temperatura aproximada de 45-50°C.

Con el objeto de obtener la toxina a un alto rendimiento, se trabajó con la técnica de Evans y Gyles (20,21,31) que consiste en lo siguiente:

Se inoculó la cepa de E. coli H-10407 en caldo de soya y tripticaseína, se incubó estáticamente a 37°C durante 18 hs. De este cultivo se tomó un inóculo de 2.5 ml y se agregó a 25 ml de caldo de CAYE-2 modificado (caldo de Biken) (32) en un matraz erlenmeyer de 250 ml con el objeto de lograr un campo de aereación de 90% aproximadamente. Se procedió a incubar en baño metabólico

(Duodonoff) (6,47) a 37°C durante 20-24 horas y con una agitación de 150 rpm aproximadamente. Después de la incubación las células fueron removidas por centrifugación a 12,000 x g durante 15 minutos en centrífuga Servall SS-34 a temperatura ambiente. El paquete de células se lavó 3 veces con una solución amortiguadora de TRIS-NaCl pH 8.0 (20) y finalmente se le agregó solución de sulfato de polimixina B a una concentración de 20,000 U/ml (20,32,34,38), suspendida en una solución amortiguadora de TRIS-NaCl a un pH de 6.6 (17,19,31) para liberar la toxina. De la anterior solución, se hizo una dilución de 1:4 y se agregó a cada botón celular, 1 ml (500 U respectivamente por matraz). Se incubó 1-3 horas a 37°C en agitación, se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se recolectó, manteniéndolo en refrigeración por un período no mayor de 2 días ; se liofilizó en pequeños frascos de tapón hermético, manteniéndose después a 4°C.

II OBTENCION DEL ANTISUERO DE LA TOXINA DE V. cholerae

El antisuero para la toxina de V. cholerae fué obtenido, utilizando 3 conejos Nueva Zelanda con un promedio de peso de 3,0 Kg, aplicando subcutáneamente, una serie de dosis de la toxina pura (Sigma Chemical, Co.) en diferentes sitios, según el esquema siguiente:

ESQUEMA DE INMUNIZACION:

El esquema de inmunización que se siguió fue el sugerido por Salinas Carmona (57) del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., en base a las dosis de la toxina en el esquema de Beutin y col. (1), el cual se presenta en la tabla 2.

Los animales fueron sangrados en la vena marginal de la oreja obteniendo entre 10 y 12 ml de sangre por conejo, en las semanas 9 y 10 de iniciado el esquema de inmunización. Al cumplirse la semana 11, se obtuvieron entre 25 y 30 ml de sangre por conejo. Pequeños sangrados fueron realizados, intercalados a las inmunizaciones a partir de la 3a. semana para seguir la respuesta de anticuerpos, utilizando la técnica de Duchterlony (26,49).

**III OBTENCION DE LA FRACCION GAMMA GLOBULINA DE
LOS SUEROS DE CONEJOS**

La técnica utilizada fue la descrita por Garvey, Cremer y Sussdorf (25,31).

Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio ajustando su pH a 7.8 con NaOH 1 N a 4°C, justo antes de utilizarse.

TABLA No. 2

ESQUEMA DE INMUNIZACION

| Secuencia de Inyecciones de la toxina. | Dosis (μ gr toxina por conejo). | Vía de Inoculación | Sitio de Inoculación |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| 1a. Semana | 25 * | Intradérmica sitios múltiples | Dorso del conejo |
| 3a. " | 50 ** | Intradérmica sitios múltiples | Dorso del conejo |
| 4a. " | 50 *** | Intraperitoneal | Peritoneo |
| 5a. " | 50 " | Intramuscular | Muslo |
| 6a. " | 50 " | " | " |
| 7a. " | 50 " | Intraperitoneal | Peritoneo |
| 8a. " | 50 " | Intramuscular | Muslo |
| 9a. " | 50 " | " | " |
| 10a. " | 50 " | " | " |

* En adyuvante completo de Freund.

** En adyuvante incompleto de Freund.

*** En solución salina estéril al 0.85%

Se colocó el antisuero (76 ml) en un matraz erlenmeyer con un agitador magnético sobre baño de hielo, se goteó a razón de 20 gotas por minuto la solución saturada de sulfato de amonio a 1/3 de saturación (38 ml). La agitación fue suave teniendo cuidado de no formar espuma o burbujas. Una vez lograda la precipitación, de las gammaglobulinas se continuó la agitación durante 30 minutos. El volumen total se colocó en tubos y se centrifugó a 10,000 x g en una centrífuga Servall-34 durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió con solución salina al 0.85% hasta alcanzar el volumen original del suero. Se revisó nuevamente el pH de la solución de sulfato de amonio y se repitió el procedimiento anterior dos veces más. Una vez centrifugadas, las gammaglobulinas fueron suspendidas en una solución amortiguadora de salina-boratos pH 7.8 a la mitad del volumen original del suero. Se transfirió a una bolsa de celofán y se dializó contra una solución amortiguadora de salina-boratos pH 8.4 - 8.5 a 4°C. Cada 24 horas se estuvo determinando la presencia de sulfatos en la solución amortiguadora de diálisis, haciendo cambios de esta solución diariamente, dejando de hacerlo una vez que desaparecieron los residuos de sulfato de amonio (25).

Al material dializado (gammaglobulinas), se les realizó una electroforesis para verificar la pureza de ellas. Así mismo, se llevó a cabo una titulación de

anticuerpos, como se mencionará en la siguiente sección. Una vez realizado lo anterior, se procedió a colocar alícuotas de 1 ml en pequeños frascos de fondo plano para su posterior liofilización. Los frascos liofilizados se mantuvieron a 4°C.

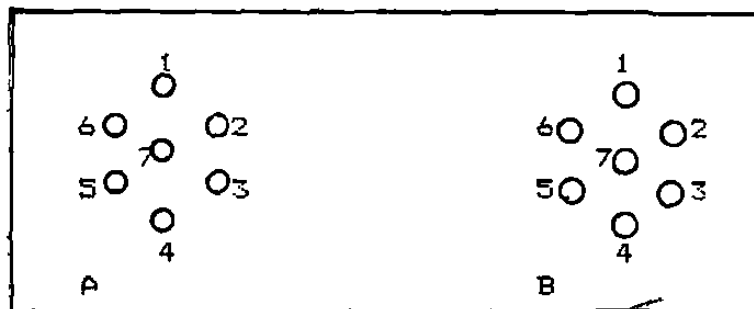
IV DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE ENTEROTOXINA TERMOLABIL
DE Escherichia coli POR TECNICAS INMUNOLOGICAS USANDO
ANTISUERO PARA LA TOXINA DE Vibrio cholerae.

PRECIPITACION EN GEL DE DUCHTERLONY (DOBLE DIFUSION)

Para demostrar la presencia de la enterotoxina termolábil de E. coli se realizó ~~la~~ técnica de precipitación en gel de Duchterlony, utilizando agar noble al 1.6% en solución salina al 0.85% adicionada de unas gotas de merthiolate blanco (26,49). Se colocó sobre un portaobjetos (25 x 75 mm) estéril una capa del agar de aproximadamente 3 - 4 mm de altura y se dejó solidificar en una cámara húmeda. Se perforaron 6 pozos concéntricos a un pozo que contendría el antisuero de la toxina de V. cholerae en diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8 en un volumen de 20 µl y a una distancia de 6 mm de los pozos de la periferia. En los pozos de la periferia se colocó la enterotoxina cruda obtenida de la cepa patrón de E. coli H-10407 en un volumen de 20 µl. Se utilizó como control la toxina de V. cholerae en solución, a una concentración de 2.5 µgr/20 µl, de acuerdo a la Figura 1.

FIGURA No. 1

DIAGRAMA REPRESENTATIVO PARA LAS INMUNODIFUSIONES.



A:- 1 al 6, antisuero contra la toxina de V. cholerae en diluciones desde 1:1 hasta 1:32; y 7, toxina de V. cholerae (2.5 μ gr/20 μ l). B:- 1, 3 y 5, toxina termolábil de E. coli cruda; 2, 4 y 6 toxina de V. cholerae (2.5 μ gr/20 μ l); y 7 antisuero contra la toxina de V. cholerae en diluciones de 1:2 , 1:4 y/o 1:8.

Esta misma técnica de Ouchterlony (26,49) se utilizó para la titulación del antisuero colocando 2.5 µg/20 µl de la toxina de V. cholerae en el pozo central (32,34) y el antisuero de la toxina de V. cholerae a diferentes diluciones; 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 en los pozos de la periferia.

V IMPLEMENTACION DE LA TECNICA.

La prueba diseñada se implementó de la siguiente manera:

Se utilizó el medio de cultivo de Biken-2 (2,32,34), con la fórmula siguiente:

| CONSTITUYENTES | % |
|-----------------------------|---------|
| Casamino ácidos | 2.0 gr |
| Extracto de levadura | 1.0 " |
| Cloruro de sodio | 0.25 " |
| Fosfato dibásico de potasio | 1.5 " |
| Glucosa | 0.5 " |
| Mezcla de sales * | 0.05 ml |
| Agar noble | 1.5 gr |
| pH | 7.5 |
| Lincomicina ** | 9.0 gr |

* Sulfato de magnesio 5%, cloruro férrico 0.5% y cloruro de cobalto hexahidratado 0.5% disueltas en ácido sulfúrico 0.001N.

** La Lincomicina se agregó una vez que el medio alcanzó una temperatura aproximada de 45-50°C en condiciones asepticas.

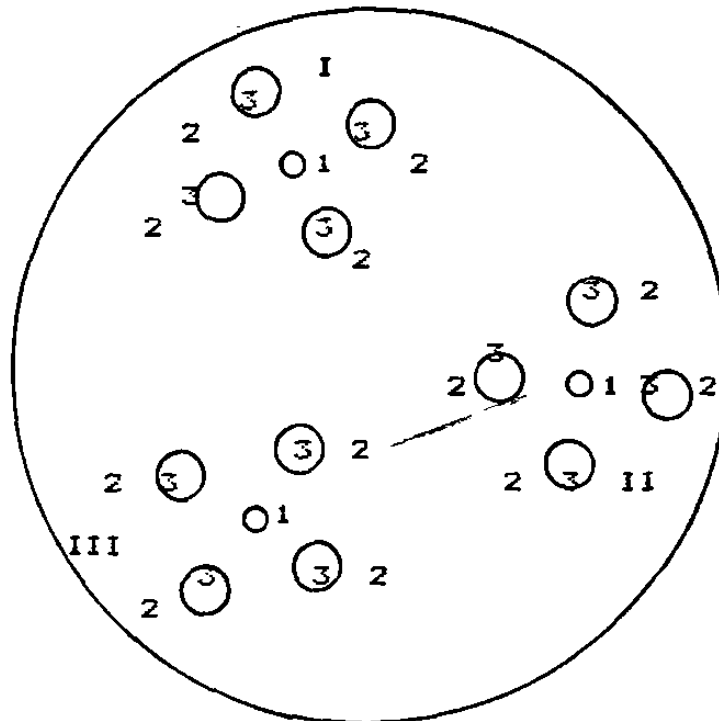
Se esterilizó por autoclaveado a 118°C/10 lb/15 min.

PROCEDIMIENTO:

Se utilizaron como patrones, cajas de petri de 15 x 100 mm, con el medio de Biken-2, con un pozo central de 3 mm y a unos 6 mm de distancia se colocaron inóculos para formar colonias de E. coli. Ver Figura 2.

Partiendo de un cultivo de la cepa de E. coli H-10407, se inoculó en las cajas, el inóculo del cultivo fué hecho con un asa de ojillo pequeño. Se incubó a 37°C durante 40-48 hs. Se colocaron sobre las colonias, discos de papel filtro Whatmann #AA, con un diámetro de 6 mm y un volumen de absorción de 20 µl, impregnados de una solución de sulfato de polimixina B a una concentración de 20,000 U/ml (20,32,34). Se incubó a 37°C durante 5-7 hs (32). Después de ese tiempo se agregó el antisuero para la toxina de V. cholerae en los pozos centrales de cada juego (20 µl diluidos 1:4) y finalmente se llevó a incubar a 37°C durante 12-24 hs.

FIGURA No. 2
 PLANTILLA REPRESENTATIVA PARA EL CULTIVO UTILIZADO
 EN EL PRESENTE TRABAJO.



Medio de Biken-2 modificado. I, II y III.- juegos de muestras que se pueden ensayar en una misma caja ; 1, antisuero contra la toxina de V. cholerae; 2, muestras inoculadas (E. coli H-10407 y muestras de materia fecal artificialmente contaminadas) y 3, polimixina B (400 U/disco).

VI CALIBRACION DE LA TECNICA

Para la calibración de la técnica se partió de la metodología original propuesta por Honda, variando diferentes parámetros que se describen a continuación:

- a) Temperatura y tiempo de incubación de la colonia.
- b) Concentración de sulfato de polimixina B por disco.
- c) Temperatura y tiempo de liberación de la toxina.
- d) Cantidad de antisuero.
- e) Concentración del agar.

Para trabajar con los parámetros anteriormente mencionados, partimos de un cultivo de 18 hs (20,31) realizándolo de la siguiente manera:

Se tomó una asada del cultivo de E. coli H-10407, se suspendió en 5 ml de caldo de soya y tripticaseina. Se incubó a 37°C durante 18 hs estáticamente.

a) Temperatura y tiempo de incubación de la colonia:

Se inculó el medio de Biken-2, como se muestra en la Figura 2, mediante una asa bacteriológica y por extendido del inóculo.

Las temperaturas probadas fueron: 4°C, 25°C y 37°C.

Los tiempos de incubación fueron los siguientes: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 hs.

b) Concentración de sulfato de polimixina B por disco.

Se ensayaron discos impregnados de una solución de sulfato de polimixina B a una concentración de 400 U/disco (20 µl de una solución de 20,000 U/ml) y de 500 U/disco (20 µl de una solución de 25,000 U/ml).

c) Temperatura y tiempo de liberación de la toxina.

Una vez inoculada la caja de petri con el medio de Biken-2, incubada y colocado el disco de polimixina B, se ensayaron diferentes tiempos y temperaturas.

Las temperaturas probadas fueron: 4°C, 25°C y 37°C.

Los tiempos fueron: 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 hs.

d) Volumen de antisuero.

Se ensayó, llenando con 20 y 40 µl de antisuero de la toxina de V. cholerae diluido 1:2 y 1:4.

e) Concentración de agar.

Se preparó el medio de Biken-2 variando la concentración de agar noble:

Las concentraciones ensayadas fueron: 1.5%, 1.0%, 0.9% y 0.75%.

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

VII SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA DISEÑADA Y MODIFICADA

Una vez calibrada la técnica, se procedió a demostrarlo, tomando en cuenta otros parámetros que a continuación se mencionan:

- a) Sensibilidad de la prueba, en cuanto al menor número de microorganismos que la técnica es capaz de detectar.
- b) Sensibilidad de la prueba, de acuerdo al número de colonias a seleccionar del coprocultivo.

Para realizar la calibración se preparó un cultivo en las mismas condiciones de la sección anterior, realizando una curva de crecimiento y determinando el número de UFC/ml, en cultivo estático de 18 hs para cuenta viable, en dilución seriada decimal, en gelosa.

- a) Sensibilidad de la prueba, en cuanto al menor número de microorganismos que la técnica es capaz de detectar.

Partiendo de un cultivo de 18 hs en caldo de soya y tripticaseína, se realizaron las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000. Se tomó una alícuota de 1 a 5 μ l de cada dilución incluyendo el cultivo original y se inoculó en las cajas

de petri con el medio de Biken-2 en las actuales condiciones, y por la metodología original.

b) Sensibilidad de la prueba, de acuerdo al número de colonias a seleccionar del coprocultivo.

Se inocularon 2 cajas de petri con medio de cultivo de EMB: Primero, E. coli no productora de enterotoxina TL y en la otra E. coli H-10407 productora de enterotoxina TL. Se incubaron a 37°C durante 20-24 hs, a continuación se prepararon juegos de "mezclas de colonias" con diferentes números de colonias de acuerdo a la relación mencionada más adelante, y fueron suspendidas en tubos de ensayo de 13 x 100 mm estériles conteniendo 0.1 ml de solución salina estéril al 0.85%. Las "mezclas de colonias" se prepararon de la siguiente manera:

| | Número de Colonias | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 |
| <u>E. coli</u> no enterotoxigénica | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 |
| <u>E. coli</u> enterotoxigénica | 30 | 27 | 24 | 21 | 18 | 15 | 12 | 9 | 6 | 3 | 0 |
| Total de colonias | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

Una vez preparadas las "mezclas de colonias", el procedimiento que se siguió fue como el que ya se mencionó en la sección anterior, inoculando en Biken-2 original y en Biken-2 modificado.

Todas las pruebas fueron realizadas por quintuplicado.

VIII DETECCIÓN DE LA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE
Escherichia coli EN MATERIA FECAL
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA.

Se seleccionaron muestras de materia fecal "normal" de personas sanas a las cuales no se les encontró ningún microorganismo de los conocidos como patógenos.

Se cultivó la cepa de E. coli H-10407 productora de enterotoxina termolábil en caldo soya y tripticaseína, se hicieron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000. De estas diluciones se tomó un ml de cada una, incluyendo ~~el~~ cultivo original y se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 x g. El sobrenadante se descartó asépticamente y sobre los botones de centrifugado se agregó 1 ml de materia fecal al 10% (un gramo de la materia fecal se suspendió en 9 ml de solución salina estéril).

De esta mezcla se tomó con hisopo una muestra y se descargó en una caja de petri con medio de cultivo de agar EMB, estriando con asa bacteriológica. Se hizo por duplicado.

Las cajas de petri con agar EMB fueron incubadas a 37°C. Un juego de cajas con las diferentes diluciones se incubó durante 12 hs y otro durante 24 hs.

Al término de sus respectivos tiempos de incubación, se prepararon las "mezclas de colonias" en selección de 10, 20 y 30 UFC y se procedió a desarrollar la técnica de Biken modificada.

10. Se inoculó un juego por tetraplicado de cada una de las "mezclas de colonias" en el medio de Biken modificado (0.75% de agar noble).
20. La incubación se hizo a 37°C durante 10-12 hs.
30. Se colocaron los discos de polimixina B con 400 U/disco.
40. Se incubó a 37°C durante 3-4 hs.
50. Se agregaron 20 µl de antisuero para la toxina de V. cholerae a los pozos centrales.
60. Se incubó a 37°C durante un mínimo de 12 hs.

R E S U L T A D O S

I OBTENCION DE LA TOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli.

Se obtuvieron 5 ml de extracto crudo de enterotoxina TL de E. coli, siendo el rendimiento del volumen total de 125 ml del medio de cultivo inoculado con E. coli H-10407.

II OBTENCION DEL ANTISUERO DE LA TOXINA DE V. cholerae.

Se recolectaron de los tres conejos inmunizados, 135 ml de sangre total (45 ml por animal en promedio). De estos se obtuvo un volumen de 76 ml de suero sanguíneo inmune.

En general, todos los conejos resultaron buenos respondedores a la toxina colérica, excepto uno de ellos que murió por causas desconocidas a la 4a semana de iniciado el esquema de inmunización, continuándose la inmunización en los 3 conejos restantes.

TABLA No. 3

TITULACION DE ANTICUERPOS PARA LA TOXINA DE V. cholerae
 EN SUERO DE CONEJOS INMUNIZADOS

| Semanas de acuerdo al esquema de inmunización y sangrados. | Título de Anticuerpos |
|--|-----------------------|
| 3a. Semana | 1:2 |
| 4a. " | 1:2 |
| 5a. " | 1:4 |
| 6a. " | 1:8 |
| 7a. " | 1:8 |
| 8a. " | 1:16 |
| 9a. " | 1:32 |
| 10a. " | 1:32 |
| 11a. " final | 1:32 |

III OBTENCION DE LA FRACCION GAMMA GLOBULINA DE LOS SUEROS DE CONEJOS.

Una vez obtenidas las fracciones gammaglobulínicas, se realizó la titulación de anticuerpos, obteniendo un título de 1:32, al final de la inmunización, como se muestra en la Tabla 3.

Las fracciones gammaglobulínicas de los sueros inmunes, ensayadas por electroforesis en acetato de celulosa, mostraron un solo pico correspondiente a la fracción gammaglobulina por su desplazamiento en el campo eléctrico.

IV DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE ENTEROTOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli POR TECNICAS INMUNOLOGICAS UTILIZANDO ANTISUERO PARA LA TOXINA DE Vibrio cholerae.

Se practicaron pruebas de inmunodifusión en portaobjetos para determinar la presencia de la enterotoxina TL de E. coli a partir de la cepa de referencia. La positividad de la reacción antígeno-anticuerpo se manifestó con la formación de bandas de precipitación. Estas bandas fueron teñidas con azul de coomasie al 0.1% en ác.acético, metanol y agua (26), encontrando una reacción positiva a una dilución no mayor de 1:8.

V IMPLEMENTACION DE LA TECNICA.

La técnica implementada resultó satisfactoria, aunque el tiempo de lectura final de la reacción, resultó prolongado para los objetivos de este trabajo. Esto obligó a buscar modificaciones que permitieran tener, una técnica cuyos resultados se logaran en un tiempo corto, manteniendo las condiciones de exactitud y precisión.

VI CALIBRACION DE LA TECNICA.

Los parámetros variados en pruebas independientes con el objeto de encontrar las condiciones más adecuadas se mencionan a continuación:

- a) La temperatura de incubación de la colonia que brindó mejores resultados fué de 37°C.
- b) El tiempo de incubación de la colonia fué de 10-12 hs.
- c) La concentración de polimixina B por disco fué de 400 U.
- d) El tiempo de liberación de la enterotoxina más apropiada fué la de 3 - 4 hs.
- e) La dilución del antisuero que brindó mejores resultados fué de 1:2 en un volumen de 20 µl.
- f) La concentración de agar se redujo a 0.75%.
El tiempo final de la técnica implementada fué de 36-48 hs a diferencia de lo informado en la literatura que señala de 72 a 96 hs. Ver Tablas 4 y 5.

VII SENSIBILIDAD DE LA TECNICA DISEÑADA Y MODIFICADA.

La técnica de Biken modificada, mostró tener buen grado de sensibilidad, lo cual puede ser observado en los resultados que a continuación se mencionan:

- a) El menor número de UFC/ml que la técnica detectó fue de 5 UFC/ml al descargar o tomar la muestra.
- b) Se encontró que existiendo de 6 a 9 colonias productoras de enterotoxina TL de E. coli en la mezcla bacteriana seleccionada (cuenta viable de 5.2×10^9 UFC/ml.) fueron suficiente para dar una prueba positiva en la técnica modificada propuesta en este trabajo. Ver Tabla 6.

VIII DETECCION DE LA ENTEROTOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli EN MATERIA FECAL ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA.

La técnica de Biken modificada, brindó resultados buenos y reproducibles. Se pudo demostrar que el tiempo total de la técnica desde el arribo de la muestra de materia fecal hasta la detección de la enterotoxina TL de E. coli, fue de 2 a 3 días aproximadamente, es decir, el tiempo necesario para el diagnóstico osciló entre 48 y 72 hs, tiempo mínimo necesario para cualquier estudio bacteriológico rutinario en heces.

TABLA No. 4

COMPOSICION DE LOS MEDIOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCION
DE LA ENTEROTOXINA TERMOLABIL DE Escherichia coli.

| | CAYE-2 Evans y Mundell | BIKEN-2 Honda | BIKEN Modifica ción -- nuestra |
|---------------------------------|------------------------------|------------------|---|
| Casamino ácidos | 2.0 gr% | 2.0 gr% | 2.0 gr% |
| Extracto de levadura | 0.6 " | 1.0 " | 1.0 " |
| Cloruro de sodio | 0.25 " | 0.25 " | 0.25 " |
| Fosfato dibásico de potasio. | 0.871 " | 1.5 " | 1.5 " |
| Glucosa | 0.25 " | 0.5 " | 0.5 " |
| Mezcla de sales *,** | 0.1 ml% * | 0.05 ml% ** | 0.05 ml% ** |
| pH | 8.5 | 7.5 | 7.5 |
| Lincomicina *** | --- | 9.0 mg% | 9.0 mg% |
| Agar noble | --- | 1.5 gr% | 0.75 gr% |

* Sulfato de magnesio 5%, cloruro de manganeso 0.5% y cloruro férrico 0.5% disueltas en ác. sulfúrico 0.001 N.

** Sulfato de magnesio 5%, cloruro férrico 0.5% y cloruro de cobalto hexahidratado 2.0% disueltas en ác. sulfúrico 0.001 N

*** La Lincomicina se adicionó en condiciones asepticas, una vez esterilizado el medio e inmediatamente previo al vaciado en las cajas de petri.

El número de colonias en la "mezcla bacteriológica" de trabajo fue de 25 a 30 para obtener resultados reproducibles. Con menos colonias, los resultados no eran predecibles. Por otro lado, los resultados positivos para la detección de enterotoxina se observaron solo en aquellas muestras cuyo número de E. coli productoras de enterotoxina TL fue de 5.2×10^8 a 5.2×10^9 UFC/gr heces.

Los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6.

TABLA No. 5

| Variables ensayadas | Condiciones óptimas |
|--|---------------------|
| Temperatura de crecimiento de la bacteria. | 37°C |
| Tiempo de incubación de la - bacteria. | 10-12 hs.* |
| Tiempo de liberación de la - toxina. | 3-4 hs. |
| Cantidad de antisuero | 20 µl |
| Cantidad de polimixina B (20,000 U/ml). | 400 U/disco |
| Concentración de agar noble | 0.75 % |

* En el coprocultivo el tiempo fué aumentado a 18-24 hs.

TABLA NO. 6

| Variables ensayadas | Condiciones óptimas |
|---|-------------------------------------|
| Menor número de colonias que la técnica detecta. | 5 |
| Selección de colonias del coprocultivo. | 30 |
| Número de microorganismos necesarios presentes en materia fecal para detectarlos. | $5.2 \times 10^8 - 5.2 \times 10^9$ |

D I S C U S I O N

La obtención de la enterotoxina termolábil de E. coli fué lograda satisfactoriamente por el método elegido, por lo que el uso de la cepa de E. coli H-10407 fué apropiada para este estudio, ya que se ha descrito en la literatura que la capacidad de producción de la toxina puede ser fácilmente perdida (2,50).

De los varios esquemas de inmunización elegibles, el sugerido por Salinas Carmona (57) y utilizado en este trabajo, ofreció resultados aceptables que permitieron obtener un buen título de anticuerpos, aunque fué conveniente aumentar en 2 dosis la inmunización, debido a que el título de anticuerpos obtenido hacia la 8a. semana no fué el deseado, lográndose un título mayor (1:32) a la 10a. semana, de manera tal que el sangrado final se realizó hasta la 11a. semana.

Como el contenido de proteínas se vió elevado en los antisueros, se trató de comprobar si realmente el incremento se debía a un aumento en la fracción gammaglobulínica, para lo cual se llevó a cabo una electroforesis, demostrándose que efectivamente el incremento correspondía exclusivamente a la fracción gammaglobulina. Se demostró por la técnica de Duchterlony

(26) que la fracción de inmunoglobulina purificada daba reacción de identidad con la toxina de V. cholerae, que era el resultado esperado.

El antisuero obtenido en este laboratorio, resultó ser apropiado para ser utilizado en la técnica de Biken.

En la realización de la técnica de Biken, los resultados obtenidos corroboraron lo ya reportado, sin embargo el factor tiempo continuó siendo de suma importancia.

Si bien es cierto que algunos autores como Honda y col. (32,34) mencionan que a menor tiempo de incubación de las colonias, la reacción es visible débilmente, se pudieron observar buenos resultados en este trabajo. Otro de los elementos que aportó este trabajo, fué el que solo 400 U/disco de polimixina B fueron necesarias para la prueba.

Lo que marcó un dato significativo fué la reducción de la concentración del agar noble a la mitad de la concentración original. Esto llevó a obtener una reacción más rápida, quizá debido a que un medio semisólido a esa concentración, permite una mejor difusión de la enterotoxina y del antisuero, permitiendo lograr acortar el tiempo y así poder cumplir con uno de los objetivos principales del trabajo.

La sensibilidad de la técnica se pudo observar bien y pudo ser detectada por inmunodifusión, aunque la reacción antígeno-anticuerpo fué más débil con un menor número de microorganismos, sin embargo pudo ser observada por personas no familiarizadas con técnicas inmunológicas. Cuando se usó un número bajo de colonias de E. coli productoras de enterotoxina TL se encontró que efectivamente la reacción de precipitación fué claramente visible aún por personas ajenas al laboratorio.

Algunos autores reportan desde 5 UFC (42,43), solo que con técnicas más sensibles tales como cultivos celulares, sin embargo en el presente trabajo se pudo observar que no eran suficientes, razón por la que el número fué elevado a 30 UFC.

Es interesante señalar que se conoce de algunos casos de muestras de materia fecal de personas "normales", a las cuales se les ha encontrado la presencia de E. coli productoras de enterotoxina termolábil, sin sintomatología, sin embargo, las muestras de materia fecal que se ensayaron en forma directa y con dilución de 1:10, no presentaron reacción alguna detectable por esta técnica.

La hipótesis propuesta inicialmente fué probada: El antisuero de la toxina de V. cholerae pudo utilizarse

en sustitución al antisuero contra la enterotoxina termolábil de Escherichia coli, para su diagnóstico directamente de las colonias de primoaislamiento.

La técnica utilizada se puede considerar como efectiva, siempre y cuando el número de E. coli productoras de enterotoxina termolábil en heces sea alto (se conoce que cuando hay colonización de E. coli, se halla el número elevado). Si bien es cierto que existen otras pruebas más sensibles, la implementada en este trabajo cumple con los objetivos planeados ya que resultó ser sencilla, reproducible, económica, rápida y con un grado de sensibilidad necesario para incluirse en el laboratorio clínico en la rutina diagnóstica.

Es recomendable para probar la eficacia de esta técnica, montar un estudio epidemiológico preferentemente en lactantes y niños de edad preescolar, ya que son los más afectados con estos gérmenes.

RESUMEN

Para la obtención de la enterotoxina termolábil de Escherichia coli, se utilizó la cepa H-10407.

Se realizó un ensayo inmunológico para demostrar la presencia de la TTL de E. coli, por inmunodifusión en gel en portaobjetos.

El antisuero se obtuvo por inmunizaciones en conejos con toxina pura de V. cholerae (Sigma Chemical, Co.), obteniéndose los anticuerpos para montar la técnica de Biken.

La técnica se estandarizó, variando diferentes parámetros: temperatura y tiempo de: a) incubación de la colonia y b) liberación de ~~la~~ toxina; volumen del antisuero, concentración de la polimixina B, etc. Se determinó el menor número de UFC que la técnica detecta y el número de UFC a seleccionar en un coprocultivo. Se contaminó artificialmente materia fecal de personas sanas con la cepa H-10407 de E. coli a diferentes concentraciones, demostrando la presencia de la enterotoxina termolábil (TL) de E. coli.

La prueba de Biken modificada en este trabajo, resultó ser un ensayo simple, económico y reproducible, con las condiciones operativas de nuestro medio científico-técnico, considerándola como efectiva y de gran sensibilidad diagnóstica, al lograr realizarse en el tiempo mínimo necesario para cualquier estudio bacteriológico rutinario en heces.

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

- 1.- Beutin, L.; L. Bode; T. Richter; G. Peltre and R. Stephan. 1984. Rapid visual detection of Escherichia coli and Vibrio cholerae heat-labile enterotoxins by Nitrocellulose Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. 19:371-375.
- 2.- Brill, B.M.; B.L. Wasilauskas and S.H. Richardson. 1979. Adaptation of Staphylococcal Coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 9: 49-55.
- 3.- Brooks, J.B.; M.T. Basta; A.M. El Kholly and C. Wayne Moss. 1984. Rapid differentiation of enterotoxigenic Escherichia coli that produced heat-stable and heat-labile toxins by frequency-pulse electron capture gas-liquid chromatography analysis of diarrheal stool. J. Clin. Microbiol. 20:1145-1153.
- 4.- Brown, M.R.; H.L. DuPont and P.S. Sullivan. 1982. Effect of duration of exposure on diarrhea due to enterotoxigenic Escherichia coli in travelers from the United States to Mexico. J. Infect. Dis. 145:582.
- 5.- Calderon, R.L. and M.A. Levin. 1981. Quantitative method for enumeration of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 13:130-134.
- 6.- Clements, J.D. and R.A. Finkelstein. 1978.

- Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin of Escherichia coli and subunits of Vibrio cholerae enterotoxin. *Inf. Immun.* 21:1036-1039.
- 7.- Clements, J.D. and R.A. Finkelstein. 1978. Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from Vibrio cholerae and Escherichia coli. *Inf. Immun.* 22:709-713.
- 8.- Clements, J.D.; R.J. Yancey and R.A. Finkelstein. 1980. Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. *Infect. Immun.* 29:91-97.
- 9.- Cooke, E. M. 1974. Escherichia coli and Man. Ed. Churchill Livingstone.
- 10.- Dallas, W.S.; D.M. Gill and S. Falkow. 1979. Cistrons encoding Escherichia coli heat-labile toxin. *J. Bacteriol.* 139:850-858.
- 11.- Deneke, C.F.; G.M. Thorne and Sh.L. Gorbach. 1981. Serotypes of attachment pili of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from humans. *Infect. Immun.* 32:1254-1260.
- 12.- Divo, A. 1977. Enterobacteriaceae. Consideraciones generales. Géneros Escherichia, Enterobacter, Klebsiella y Citrobacter. Su importancia médica. *Microbiología Médica*. 3a. Ed. Editorial Interamericana. pp.163-165.
- 13.- Donta, S.T. and H.W. Moon. 1974. Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of

- Adrenal cells in tissue culture. *Science*. iii:334-336.
- 14.- DuPont, H.L.; S.G. Formal; R.B. Hornick; M.J. Snyder; J.P. Libonate; D.G. Sheahan; E.H. La Brec and J.P. Kalas. 1971. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *New Engl. J. Med.* 285:1-9.
 - 15.- Edelman, R. and M.M. Levine. 1980. Acute diarrheal infections in infants. II Bacterial and Viral causes. *Hosp. Pract.* 97-104.
 - 16.- Elek, S.D. 1948. The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro. *Brit. Med. J.* 493-495.
 - 17.- Evans, D.G.; D.J. Evans Jr. and Sh.L. Gorbach. 1973. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Infect. Immun.* 8:731-735.
 - 18.- Evans, D.J. and D.G. Evans. 1973. Three characteristics associated with enterotoxigenic Escherichia coli isolates from man. *Infect. Immun.* 8:322-328.
 - 19.- Evans, D.J. Jr.; D.G. Evans and Sh.L. Gorbach. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. *Infect. Immun.* 8:725-730.
 - 20.- Evans, D.J. Jr.; D.G. Evans and Sh.L. Gorbach. 1974. Polymixin B induced release of low molecular weight, heat-labile enterotoxins from Escherichia coli. *Infect. Immun.* 10:1010-1017.
 - 21.- Evans, D.J. Jr. and D.G. Evans. 1977. Inhibition of immunehemolysis: serological assay for the heat-

- labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 5:100-105.
- 22.- Field, M. 1979. Modes of action of enterotoxins from Vibrio cholerae and Escherichia coli. Rev. Infect. Dis. 1:918-926.
- 23.- Finkelstein, R.A. and Z. Yang. 1983. Rapid test for identification of heat-labile enterotoxin producing Escherichia coli colonies. J. Clin. Microbiol. 18:23-28.
- 24.- Gaastra, W. and F.K. de Graaf. 1982. Host specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. Microbiol. Rev. 46:129-161.
- 25.- Garvey, J.C.; N.E. Cremer and D.H. Sussdorf. 1977. Ammonium Sulfate Precipitation. Methods in Immunology. 3th ed. W.A. Benjamin, Inc. pp 218-219.
- 26.- Garvey, J.C.; N.E. Cremer and D.H. Sussdorf. 1977. Gel Diffusion. Methods in Immunology. 3th ed. W.A. Benjamin, Inc. pp 313-321.
- 27.- Greenberg, H.B.; D.A. Sack; W. Rodriguez; R.B. Sack; R.G. Wyatt; A.R. Kalika; R.L. Horswood; R.M. Chanock and A.Z. Kapikian. 1977. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Infect. Immu. 17:541-545.
- 28.- Greenberg, H.B.; D.A. Sack; W. Rodriguez; R.B. Sack; R.G. Wyatt; A.R. Kalika; R.L. Horswood; R.M. Chanock and A.Z. Kapikian. 1979. Solid-phase microtiter radioimmunoassay blocking test for detection of antibodies to Escherichia coli heat-labile

- enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 9:60-64.
- 29.- Guerrant, R.L.; L.L. Brunton; T.C. Schnaitman; L.L. Rebhun and A.S. Gilman. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese Hamster Ovary cells morphology; a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun. 10:320-327.
- 30.- Guerrant, R.L.; R.A. Moore; P.M. Kirshenfeld and M.A. Sande. 1975. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med. 293:567-573.
- 31.- Gyles, C.L. 1974. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of Escherichia coli and Vibrio cholerae. Infect. Immun. 9:564-570.
- 32.- Honda T.; S. Taga; Y. Takeda and T. Miwatani. 1981. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 13:1-5.
- 33.- Honda, T.; T. Tsuji; Y. Takeda and T. Miwatani. 1981. Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 34:337-340.
- 34.- Honda, T.; M. Arita; Y. Takeda and T. Miwatani. 1982. Further evaluation of the Biken test (Modified Elek test) for detection of enterotoxigenic Escherichia coli producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 16:60-62.

1020091086

- 35.- Isaaccson, R.E, and H.W. Moon. 1975. Induction of heat-labile enterotoxin synthesis in enterotoxigenic Escherichia coli by Mitomycin C. Infect. Immun. 12:1271-1275.
- 35a- Joklik, W.K.; H.P. Willet y D.B. Amos. Enterobacteriaceae oportunistas. 1983. Microbiología de Zinsser. 17a. Ed. español. Ed. Panamericana. p691-693.
- 36.- King, E.O.; M. Frobisher Jr. and E.I. Parsons. 1949. The "in vitro" test for virulence of Corynebacterium diphtheriae. Am. J. Pub. Health. 39:1314-1320.
- 37.- Klipstein, F.A. and R.F. Engert. Immunological relationship of different preparations of coliform enterotoxins. Infect. Immun. 21:771-778.
- 38.- Kunkel, S.L. and D.C. Robertson. 1979. Factors affecting release of heat-labile enterotoxins by enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 23:652-659.
- 39.- Levner, M.H.; F.P. Wiener and B.A. Rubin. 1977. Induction of Escherichia coli and Vibrio cholerae by an inhibitor of protein synthesis. Infect. Immun. 15:132-137.
- 40.- Levner, M.H.; C. Urbano and B.A. Rubin. 1980. Lincomycin increases synthesis rate and periplasmic pool size for cholera toxin. Infect. Immun. 143:441-447.
- 41.- Merson, M.H.; G.K. Morris; D.A. Sack; J.G. Wells;

- J.C. Feeley; R.B. Sack; W.B. Creeck; A.Z. Kapikian and E.J. Gangarosa. 1976. Travellers' diarrhea in México. A prospective study of physicians and family members attending a congress. *New Engl. J. Med.* 294:1299-1305.
- 42.- Merson, M.H.; R.B. Sack; A.K.M. Golam Kibriya; Abdullah-Al-Mahmood; Q.Sh. Adamed and I. Huq. 1979. Use of colony pools for diagnosis of enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 9:493-497.
- 43.- Merson, M.H.; R.H. Yolken; R.B. Sack; J.L. Froehlich; H.B. Greenberg; I. Huq and R.W. Block. Detection of Escherichia coli enterotoxins in stools. *Infect. Immun.* 29:108-113.
- 44.- Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). July 30, 1976. Diarrheal illness on a Cruise Ship caused by enterotoxigenic Escherichia coli.
- 45.- Morgan, D.R.; H.L. DuPont; L.V. Wood and Ch.D. Ericsson. 1983. Comparison of methods to detect Escherichia coli heat-labile enterotoxin in stool and cell-free cultures supernatants. *J. Clin. Microbiol.* 18:798-802.
- 46.- Morris, G.K.; M.H. Merson; D.A. Sack; J.G. Wills; W.T. Martin; W.E. Dewitt; J.C. Feeley; R.B. Sack and D.M. Bessudo. 1976. Laboratory investigation of diarrhea in travelers to México: Evaluation of methods for detecting enterotoxigenic Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 3:486-495.

- 47.- Mundell, D.; C.R. Anselmo and R.M. Wishnow. 1976. Factors influencing heat-labile Escherichia coli enterotoxin activity. *Infect. Immun.* 14:383-388.
- 48.- Orskov, F. 1978. Virulence factors of the bacterial cell surface. *J. Infect. Dis.* 137:630-633.
- 49.- Duchterlony, O. 1949. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26:507-515.
- 50.- Pérez P., G.I. 1983. Toxina Termolábil (TL) de Escherichia coli. *Infectología.* 5:223-232.
- 51.- Pickering, L.K.; D.J. Evans Jr.; O. Munoz; H.L. DuPont; P. Coello-Ramírez; J.J. Vollet; R.H. Conklin; J. Olarte and S. Kohl. 1978. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México. *J. Ped.* 93:383-388.
- 52.- Reis, M.H.L.; D.P. Matas; A.F. Pestana de Castro; M.R.F. Toledo and L.R. Trabulsi. 1980. Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 28:24-27.
- 53.- Ristaino, P.A.; M.M. Levine and Ch.R. Young. 1983. Improved GM-1 Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 18:808-815.
- 54.- Sack, R.B.; N. Hirschhorn; I. Brownlee; R.A. Cash; W.F. Woodward and D.A. Sack. 1975. Enterotoxigenic Escherichia coli-associated diarrheal disease in Apache children. *New. Engl. J. Med.* 292:1041-1045.
- 55.- Sack, R.B. 1975. Human diarrheal disease caused by

- enterotoxigenic Escherichia coli. Annu. Rev. Microbiol. 29:333-353.
- 56.- Sack, R.B. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli. Identification and characterization. J. Infect. Dis. 142:279-286.
- 57.- Salinas C.,M.C. 1986. Comunicacion personal.
- 58.- Scotland, S.M.; N.P. Day; A. Cravioto; L.V. Thomas and B. Rowe. 1981. Production of heat-labile or heat-stable enterotoxins by strains of Escherichia coli belonging to serogroups O44, O114 and O128. Infect. Immun. 31:500-503.
- 59.- Sen, D.; M.R. Saha and S.C. Pal. 1984. Evaluation of three simple and rapid immunological tests for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 19:194-196.
- 60.- Serafim, M.B.; A.F. Pestana de C.; M.H. Lemos Das Reis and L.R. Trabulsi. 1979. Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by Escherichia coli isolated from different sources. Inf. Immun. 24:606-610.
- 61.- Smith, H.W. and Sh. Halls. 1968. The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. 52:319-334.
- 62.- Sommers, H.M. Diarreas Infecciosas. Youmans, G.P.; P.Y. Paterson y H.M. Sommers. 1982. Infectología

- Clínica. 1a. ed. español. Ed. Interamericana. pp.610-613.
- 63.- Sonnenwirth, A.C. Bacilos entéricos y otras bacterias gramnegativas. Davis, B.D.; R. Dulbecco; H.N. Eisen; H.S. Ginsberg; W.B. Wood y M. McCarty. 1978. Tratado de Microbiología. 2a. ed. español. Ed. Salvat. pp.791-793.
- 64.- Spira, W.M.; R.B. Sack and J.L. Froehlich. 1981. Simple adult rabbit model for Vibrio cholerae and enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. Infect. Immun. 32:739-747.
- 65.- Stavric, S.; J.I. Speirs; J. Konowalchuk and D. Jeffrey. 1978. Stimulation of cyclic AMP secretion in Vero cells by enterotoxins of Escherichia coli and Vibrio cholerae. Infect. Immun. 21:514-517.
- 66.- Stoll, B.J.; A-M, Svennerholm; . Gothefors; D. Barua; Sh. Huda and J. Holmgren. 1986. Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea in an endemic area. J. Infect. Dis. 153:527-534.
- 67.- Svennerholm, A-M. and G. Wiklund. 1983. Rapid GM-1 Enzyme linked immunosorbent assay with visual reading for identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 17:596-600.
- 68.- Tsukamoto, T.; Y. Kinoshita; S. Taga; Y. Takeda and T. Miwatani. 1980. Value of passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by

- enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 12:768-771.
- 69.- Yamamoto, T.; T. Yokota and A. Kaji. 1981. Molecular organization of heat-labile enterotoxin genes originating in Escherichia coli of human origin and construction of heat-labile toxoid-producing strains. J. Bacteriol. 148:983-987.
- 70.- Yamamoto, T. and T. Yokota. 1982. Release of heat-labile enterotoxin subunits by Escherichia coli. J. Bacteriol. 150:1482-1484.
- 71.- Yoh, M.; K. Yamamoto; T. Honda; Y. Takeda and T. Miwatani. 1983. Effects of Lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 42:778-782.
- 72.- Yolken, R.H.; B.B. Greenberg; M.H. Merson; R.B. Sack and A.Z. Kapikian. 1977. Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 6:439-444.

