



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS ENTEROTOXIGÉNICAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
POR HIBRIDIZACIÓN DE ADN EN COLONIA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A  
HORTENSIA E. LEMUS DIAZ.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I.	RESUMEN.	PAG	1
II.	INTRODUCCION	"	2
III.	ANTECEDENTES	"	6
IV.	OBJETIVOS	"	13
V.	MATERIAL Y METODOS	"	14
VI.	RESULTADOS	"	42
VII.	TABLAS	"	51
VIII.	DISCUSION	"	56
IX.	CONCLUSIONES	"	60
X.	FIGURAS	"	62
XI.	BIBLIOGRAFIA	"	66

## RESUMEN

Uno de los mecanismos por medio de los cuales Escherichia coli puede causar diarrea aguda en los mamíferos superiores es por la producción de enterotoxinas, siendo esta una característica difícil de detectar se han desarrollado diversos ensayos para identificar a las cepas productoras de enterotoxinas .

El carácter genético de la producción de toxinas debe determinar por un lado, que los ensayos sean sensibles y específicos, y por otro lado que se pueda estudiar el mayor número de cepas en el menor tiempo posible.

El objetivo de este trabajo fue utilizar la hibridización del ADN en colonia para detectar estas cepas enterotoxigénicas, para lo cual primero se obtuvieron los segmentos de ADN que codifican para la toxina termoestable y la termolábil, y así elaborar las sondas radioactivas, estos fragmentos habían sido clonados previamente en vectores conocidos. Por hibridización del ADN, se estudiaron 1000 cepas provenientes de individuos con diarrea y 200 cepas de individuos asintomáticos.

Los resultados obtenidos demostraron que el ensayo con sondas radioactivas es específico y más sensible que los bioensayos que emplean líneas celulares, o modelos animales, y aún más sensible que el ensayo molecular que emplea las sondas enzimáticas.

## INTRODUCCION

De acuerdo al Manual de Bergey, Escherichia coli pertenece al Reino Procarytae, a la Division Bacteriae y a la Familia Enterobactereaceae.

El Género Escherichia está constituido por bacilos Gram positivos, no esporulados, móviles por flagelos peritricos o no móviles, anaerobios facultativos que crecen en medios de cultivo simples o en medios sintéticos con glicerol o glucosa como única fuente de carbono. Fermentan una gran variedad de carbohidratos produciendo ácido y gas. En medios de cultivo sólidos las colonias son circulares, lisas, convexas de bordes continuos; algunas cepas pueden ser mucoides (Bergey, 1974, Gross y Holmes, 1983).

El habitat primario de esta bacteria es el tracto intestinal de mamiferos y aves, cuando se le encuentra en suelo o agua es un indice de contaminación fecal (Sussman, 1985).

En los humanos, la colonización con E.coli ocurre después del nacimiento y las fuentes de esta colonización son la madre y el medio ambiente; una vez establecida permanece como flora normal. De acuerdo a los estudios de Kauffman y Perch en 1943 (Sussman, 1985) la población de E.coli consiste en su mayor parte de un serotipo y minorías de diferentes serotipos; otras evidencias nos dicen que los serotipos cambian de tiempo en tiempo (Kennedy y cols., 1965) y que los nuevos serotipos provienen de alimentos contaminados. Sin

embargo, E.coli es solo un miembro minoritario en la flora total del intestino (Russell y Melville, 1978).

En un principio se consideraba a E.coli como una bacteria no patógena, aunque Theodor Escherich ya la había aislado con relativa frecuencia de pacientes con infección en el tracto urinario. Reportes posteriores que la relacionaban con otras infecciones permitieron considerar a E.coli como una bacteria oportunista no solo capaz de ocasionar infecciones gastrointestinales, sino también causante de peritonitis, meningitis, neumonías y septicemias (Sussman, 1985).

#### Factores de Virulencia de E.coli.

a) Factores de colonización. La colonización intestinal es un requisito para el establecimiento de la infección, ya que los microorganismos que no se adhieren a la mucosa son fácilmente evacuados. En el caso de E.coli se han descrito diferentes adhesinas fimbriales, aunque también se han descrito cepas carentes de fimbrias capaces de adherirse a la mucosa por medio de mecanismos aún no dilucidados (Sussman, 1985).

b) Endotoxinas. La membrana celular de lipopolisacáridos de E.coli así como la de todas las enterobacterias es causante directa de fiebre y choque endotóxico (Bradley, 1979).

c) Exotoxinas. Las cepas de E.coli son capaces de sintetizar diversas toxinas; las más conocidas son la termolábil y la termoestable que serán descritas más adelante.

c) Invasividad. Ciertas cepas de E.coli son capaces de invadir las células de la mucosa intestinal produciendo un síndrome semejante a la disenteria (DuPont y cols., 1971, Guerrant y cols., 1975).

Relación de E.coli con la diarrea aguda infecciosa. Se comprobó plenamente por Bray en 1945, quién encontró que 42 de 44 cepas aisladas en un brote de diarrea infantil pertenecían al mismo serotipo, para esa época, el estudio sistemático por serología había sido desarrollado por Kauffman en 1944 (Sussman, 1985, Clearly y cols., 1986).

La diarrea aguda infecciosa constituye la causa principal de muerte en los niños menores de 5 años (42.7%), y es una causa significativa en la morbilidad de los adultos de acuerdo a la información estadística del sector salud. De las bacterias aisladas en los casos de diarrea, E.coli representa del 10 al 40 % de todos los aislamientos (DuPont, y cols., 1971).

De acuerdo al mecanismo de patogenicidad que han desarrollado, las cepas de E.coli asociadas con la diarrea infecciosa se han separado en tres grupos. El grupo más estudiado corresponde a las cepas productoras de enterotoxinas, el segundo grupo es el de las enteropatógenas primeras en asociarse con la diarrea en los niños, algunas de ellas pueden sintetizar citotoxinas, y el tercer grupo es el de las cepas enteroinvasivas causantes de un síndrome similar a la disenteria (Sack y cols., 1975, Sussman, 1985).

Sin embargo no es fácil identificar estos tres distintos mecanismos en las cepas de E.coli, ya que con las pruebas bioquímicas que las identifican no se determinan los mecanismos de patogenicidad. Para identificar a las enteropatógenas es necesario efectuar reacciones de aglutinación y así identificar a aquellas cepas que pertenezcan a los serogrupos reconocidos como enteropatógenos (Gross y cols.,1985); para identificar a las cepas de E.coli reconocidas como enteroinvasivas se utiliza un ensayo biológico desarrollado para Shigella, aunque en la actualidad se está estudiando un ensayo molecular, éste emplea una sonda específica para estas cepas (Sethabutr y cols., 1986). Para estudiar las cepas enterotoxigénicas se han desarrollado una gran variedad de ensayos, desde los biológicos hasta los moleculares( Dean y cols.,1972, Donta y cols., 1974, Evans y cols.,1977, Frantz y cols.,1981, Sack y cols., 1980, Echeverria y cols., 1984, Seriwatana y cols., 1987, Oprandy y cols.,1988).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fué preparar sondas radioactivas a partir de los plásmidos ya descritos en la literatura, para identificar las cepas enterotoxigénicas de E.coli provenientes de un estudio epidemiológico, pudiendose comprobar la especificidad y sensibilidad de estas sondas.



## ANTECEDENTES

La infección por cepas enterotoxigénicas parece prevalecer en los países tropicales en desarrollo, afecta principalmente a los niños menores de cinco años (DuPont y cols., Guerrant y cols., 1975, Malin, 1975, Gross y cols., 1979), y a quienes viajan a esos lugares (Rowe y cols., 1970, Sack y cols., 1977, Shore, 1974, DuPont, 1980, Rosenberg y cols., 1977).

### Estudios Genéticos.

Estas cepas enterotoxigénicas poseen la información genética para la síntesis de dos toxinas diferentes, una termolábil (LT) y/o una termoestable (ST) en plásmidos designados Ent (Smith y cols., 1971a, 1971b, Gyles y cols., 1974, Elwell 1980).

Estos plásmidos son autotransferibles (Smith y cols., 1968, Gyles y cols., 1974, 1977 y 1978) y a veces poseen información para resistencia a antimicrobianos (Gyles y cols. 1974 y 1978, Echeverria y cols., 1980, Mazaitis, 1980, McConnell y cols., 1980, 1981, Scotland y cols., 1979), aunque también se ha descrito la síntesis de toxina LT causada por la presencia de un fago (Takeda y cols., 1978).

Los plásmidos Ent pueden codificar para LT (Gyles y cols., 1974, McConnell y cols., 1979), para toxina ST (Gyles y cols., 1974), o para ambas toxinas LT y ST (Gyles y cols., 1977, Scotland y cols., 1979).

Se sabe que los plásmidos Ent ST son heterogéneos tanto en su tamaño como en la secuencia de nucleótidos (Gyles y cols., 1974); esta heterogeneidad se puede deber a la naturaleza de transposon del gene *est* (Willshaw y cols., 1980), con un

tamaño de alrededor de  $60 \times 10^6$  daltones y un contenido de G + C aproximadamente del 50 % (Gyles y cols., 1978 ). Algunos plásmidos Ent LT se han estudiado con detalle y se ha demostrado que poseen un alto grado de homología, la cual varía dependiendo del origen del plásmido, esto es si son de origen humano o animal ( So y cols., 1975, Elwell y cols., 1980).

Se ha demostrado que los plásmidos Ent LT pueden ser agrupados de acuerdo a sus propiedades genéticas y moleculares como son la homología en los nucleótidos (So y cols., 1980). Los plásmidos de cepas pertenecientes a diferentes serotipos y de diversas localidades geográficas pueden compartir un 95 % o más de homología en la secuencia de nucleótidos del plásmido entero (McConnell y cols., 1979). Los plásmidos LT/ST no están relacionados con los ST ( So M. y cols.,1979), y los plásmidos LT/ST y los LT están relacionados con los grupos de incompatibilidad FI, FII, y FIV (Willshaw y cols.,1980).

#### Producción de Toxinas

Las dos toxinas producidas por estas cepas a su vez han sido objeto de estudios detallados que empezaron a principios de los años 70, lo que ha conducido a un conocimiento casi completo de ambas toxinas ( Alderete y cols., 1978, Field y cols., 1978, Holmgren y cols., 1974, Kapitanny y cols.,1979).

La toxina LT es una proteína con un peso molecular de alrededor de 86,000 daltones, inmunológica y funcionalmente

es similar a la toxina del cólera; está constituida por una subunidad A con actividad tóxica, y cinco subunidades B, las cuales son reconocidas por receptores de los enterocitos de la mucosa intestinal constituidos por gangliósidos y glicoproteínas relacionadas. La subunidad A induce la ADF-ribosilación de la enzima adenil ciclása de los enterocitos, activando la síntesis de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) lo que provoca una hipersecreción prolongada de líquidos, y electrolitos hacia el lúmen intestinal ( Gill y cols., 1981, Clements y cols., 1979, Klipstein y cols, 1978, Lindholm y cols.,1983, Robertson y cols.,1983, Holmgren, 1985). Existe una toxina similar a LT en su actividad biológica pero no inmunológica, reportándose dos pesos moleculares para esta toxina ( 11.8 y 20 KDal ) y lo más interesante es que no está codificada en plásmidos, por lo que se le ha denominado LT II ( Picket y cols., 1986 ).

La toxina ST posee un peso molecular entre 1,500 a 5,000 daltones, no se han identificado subunidades ni receptores, no es inmunogénica en estado natural, y la enzima que activa en los enterocitos es la guanil ciclása que aumenta los niveles de guanosin monofosfato cíclico (GMPC), esto a su vez ocasiona una hipersecreción de corta duración de líquidos y electrolitos. Se han descrito dos tipos de toxina ST, una producida sólo por cepas aisladas de animales (STb) y la otra aislada de cepas humanas y animales (STa). Además se ha reportado que dentro de estas dos clases existen diferencias entre las toxinas producidas (Dreyfus y cols., 1983, Lallier y cols.,

1980, Takeda y cols., 1979, Wolk y cols., 1980, Holmgren, 1985).

Los ensayos que se han desarrollado para detectar estas cepas enterotoxigénicas son de cuatro clases:

a) Ensayos en Modelos Animales. Se basan en la inoculación de asas de intestino ligadas, o de inoculación intragástrica con los sobrenadantes de cultivos bacterianos (Dean y cols., 1972, Moon y cols., 1966 y 1970 ).

b) Ensayos en Cultivos Celulares. Estan basados en el cambio morfológico que se produce en algunas líneas celulares establecidas en presencia de la toxina LT. Estas líneas celulares son la de glándula adrenal de rata (Y1) y la de ovario de hamster chino (CHO). No se ha reportado este tipo de ensayos para las toxinas ST ( Donta y cols., 1974, Guerrant y cols., 1974, Sack y cols., 1975 ).

c) Ensayos Inmunológicos. Tal vez los más desarrollados, comprenden desde la inmunodifusión radial ( Honda y cols., 1981), la hemólisis pasiva (Evans 1977, Tsukamoto 1980) y la coaglutinación ( Ronnberg y cols., 1983 ) para detectar toxina LT; el ensayo inmunoenzimático ( Frantz y cols., 1981, Klipstein y cols., 1984, Sack y cols., 1980, Svennerholm y cols., 1986, Thomson y cols., 1984 ) y el radionunmoensayo ( Frantz y cols., 1981, Gianella y cols., 1981 ) para la detección de ambas toxinas.

d) Ensayos Moleculares. Algunos laboratorios de investigación han desarrollado la hibridización del ADN con sondas radioactivas elaboradas con fragmentos de los genes que codifican para ambas toxinas ( Echeverría y cols., 1984, 1985, 1986, Lanata y cols., 1985, Moseley y cols., 1980, 1982, Patamaroj y cols., 1983, Seriwatana y cols., 1983, 1986 ), también se han desarrollado las sondas sintéticas radioactivas ( Hill y cols., 1983, 1984, 1985, Sommerfelt y cols., 1988 ). En la actualidad se han desarrollado las sondas enzimáticas ( Georges y cols., 1983, Langer y cols., 1981, Oprandy y cols., 1988, Romick y cols., 1987, Seriwatana y cols., 1987, Sethabutr y cols., 1986 ) las cuáles se encuentran ya en el mercado.

#### Consideraciones sobre estos ensayos

Los modelos animales, los ensayos con cultivos celulares y los inmunológicos presentan serias desventajas e inconvenientes. De una manera general consumen mucho tiempo y son costosos ya que requieren por un lado sembrar las cepas en medios líquidos para obtener los sobrenadantes necesarios en estos estudios, por otro lado los modelos animales requieren de área y personal extra en un laboratorio, y para los ensayos con cultivos celulares es necesario contar con las líneas celulares, equipo, medios de cultivo y sueros de animales muy específicos. Además para los ensayos inmunológicos es indispensable contar con las toxinas purificadas, obtener los antisueros específicos, y en el caso de la toxina ST la dificultad aumenta debido a la poca

antigenicidad que ésta posee .

### Ventajas de los Ensayos Moleculares

La hibridización del ADN es una metodología que se basa en el reconocimiento por complementariedad de bases en segmentos de ADN. Este método ha permitido la identificación de los segmentos que contienen los genes que codifican para la síntesis de las enterotoxinas de algunas cepas de E.coli ( Denhardt 1966, Pardue y cols., 1969, Grunstein y cols, 1975 y cols., 1984, Eisenstein, 1986 ).

Ha sido empleada desde 1978 por So M, y cols, Dallas W. y cols, en 1979, Lathe R. y cols, en 1980, primero para el estudio de los segmentos que codifican para estas enterotoxinas, lo que condujo a la clonación de los genes elt ( So M. y cols, 1979 y 1980, Yamamoto T. y cols. 1980 y 1981, Moseley S. y cols, 1983, Lee C. y cols, 1983, Picken R. y cols, 1983, Picket C. y cols, 1986 ).

También ha sido utilizada para la identificación de cepas enterotoxigénicas aisladas de pacientes con diarrea ( Moseley S. y cols, 1982 y 1983, Seriwatana T. y cols, 1983 y 1987, Lanata C. y cols, 1985, Sethabutr O. y cols, 1986, Sommerfelt H. y cols, 1988, Thompson M. y cols, 1988 ) y finalmente en estudios epidemiológicos en donde se han identificado estas cepas al analizar muestras provenientes de humanos, de animales y del ambiente ( Echeverria P. y cols, 1984, 1985, 1986, Georges M. y cols, 1983, Hill W. y cols, 1983, 1984, 1985, Lee C. y cols, 1983, Oprandy J. y cols, 1988,

Patamaroj V. y cols, 1983, Sayler G. y cols, 1985, Wateson Y. y cols, 1988 ), lo que permitió conocer en estos casos la probable diseminación de los brotes.

Esta técnica ha facilitado la identificación de las cepas enterotoxigénicas de E.coli, ya que es relativamente rápida y permite el estudio de un gran número de cepas al mismo tiempo sin perder sensibilidad ni especificidad. Al comparar esta técnica con los ensayos tradicionales se había observado la misma especificidad, aunque con problemas de sensibilidad relacionados con factores técnicos como lo son el uso de fragmentos de ADN demasiado grandes o bien relacionados con purificaciones defectuosas de los fragmentos ( Moseley S. y cols, 1982, Seriwatana J. y cols, 1983, Echeverria P. y cols, 1986 ), afortunadamente tales problemas se han subsanado. En la actualidad es posible procesar un gran número de muestras al mismo tiempo con mayor sensibilidad y especificidad que la que presentan los ensayos tradicionales. Por lo tanto un laboratorio de bacteriología en donde se lleven a cabo estudios epidemiológicos debe contar con esta metodología.

## OBJETIVOS

Los Objetivos de este trabajo fueron :

1. Uso de las sondas de ADN clonado como herramienta para identificar las cepas enterotoxigénicas de E.coli.
2. Determinar la sensibilidad y especificidad de las sondas radioactivas obtenidas .



## MATERIAL Y METODOS.

### ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Material Biológico. Cepa C 600 de E.coli con plásmido EWD 299 y Cepa C 600 de E.coli con plásmido SLM004. Células de glándula adrenal de rata (Y1), ratones blancos de 1 a 4 días de nacidos y las cepas de E.coli provenientes del estudio epidemiológico.

Medios de cultivo. Caldo tripticaseína de soya (Difco), agar McConkey (Bioxon), medio F12 adicionado de suero fetal de ternera y suero de caballo (In Vitro, S.A.).

Reactivos. Los reactivos empleados fueron grado analítico.

#### 1. Detección de toxina termolábil en cultivo de células adrenales de rata (Y1).

El modelo fué diseñado por Donta, 1974, la presencia de LT se pone de manifiesto por el cambio morfológico de las células en presencia de la toxina.

#### Preparación de sobrenadantes de cultivos bacterianos.

Las cepas a estudiar y los controles se inocularon en 5 ml de caldo de tripticaseína de soya, se incubaron a 37 C por 18 a 24 horas en agitación (130 rpm). El cultivo se centrifugó a

6000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se esterilizó por filtración por membrana Millipore (0.22  $\mu$ m); el filtrado se inoculó directamente al cultivo de células.

#### Mantenimiento de las células Y1.

Las células se mantuvieron en botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio F12 adicionado de suero fetal de ternera (2.5 %) y suero de caballo (12.5 %), la botella se incubó a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>; cuando las células formaron monocapa, se les retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con amortiguador de fosfatos, se les añadió un ml de tripsina:verseno (0.125 %:0.2 %), el cual se retiró después de 2 minutos. La botella se incubó a 37 °C durante 3 a 4 minutos; cuando se empezaron a desprender las células se les añadió 1 ml de medio de crecimiento, la suspensión celular se homogeneizó, y se retiraron 0.7 ml de la suspensión para descartar, se añadieron 5 ml de medio de crecimiento y se volvieron a incubar a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, este procedimiento se repitió una vez a la semana mientras se trabajó con las células.

#### Ensayo.

Una botella con células que han crecido durante una semana se tripsinizó de acuerdo al procedimiento anterior, y se obtuvo un paquete celular por centrifugación a 1500 rpm, se determinó la concentración celular del paquete, tificando con colorante de Rappaport en un hemacitómetro para preparar una suspensión celular en medio de cultivo de crecimiento con una

concentración de  $2.5 \times 10^5$  cel/ml. De esta suspensión se adicionó 0.2 ml a cada uno de los 96 pozos de una placa de microtitulación para cultivos celulares, la cual se incubó hasta que las células formaron monocapa (48-72 hrs). Antes del ensayo, el medio de cultivo se reemplazó con 0.2 ml de medio sin suero. Las muestras se inocularon por duplicado adicionando 25  $\mu$ l del sobrenadante filtrado por pozo.

La placa se reincubó a 37 °C durante 24 hrs; después de este tiempo se retiró el medio de cultivo y se adicionó metanol a cada pozo para fijar las células durante 5 minutos. El metanol se retiró y se añadió colorante de Giemsa al 5 %, dejando teñir durante 45 minutos. La placa se lavó con agua bidestilada hasta retirar el exceso de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. Se examinó al microscopio, checando primero los controles positivos para reconocer el redondeamiento ocasionado a las células ( Donta y cols., 1974, Guerrant y cols., 1974, Sack D. 1975, Scotland y cols.,1975).

## 2.Detección de toxina termoestable en ratón lactante.

El modelo fué diseñado por Dean, 1972, emplea ratones lactantes de uno a cuatro días de nacidos, a los que se inocula por vía intragástrica con el sobrenadante de los cultivos bacterianos; la presencia de la toxina se pone de manifiesto por la acumulación de líquidos en el intestino del ratón.

### Preparación de sobrenadantes de cultivos bacterianos.

Los sobrenadantes empleados fueron los mismos que se utilizaron para la detección de la toxina LT, solo se adicionó a cada mililitro de sobrenadante una gota de colorante azul de Evans al 2 %.

### Ensayo.

Para que el estómago de los ratones fuera visible al estar lleno de leche, éstos se separaron de la madre un poco antes de ser inoculados por vía intragátrica con 0.1 ml de sobrenadante, inoculando dos ratones por muestra a estudiar. Los ratones se mantuvieron a 28 C, después de cuatro horas se sacrificaron con eter, se disectaron y se examinó el intestino delgado el cual se separó con pinzas y tijeras del resto del cuerpo.

Se reunieron los intestinos de los dos ratones y por separado los cuerpos, se pesaron y se obtuvo el coeficiente del peso intestinos/cuerpos para cada muestra, el cual debería ser de 0.09 o mayor para aquellas muestras que resultaran positivas (Dean A.G., 1972, Scotland y cols., 1985).

### **Caracterización Electroforética de cepas donadoras de Plásmidos.**

Material Biológico. Cepa C 600 de E.coli con plásmido

EWD 299, cepa C 600 de E.coli con plásmido SLM004 y cepa de E.coli H 10407. Estas cepas fueron proporcionadas por el

cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas y por el Dr. A. Cravioto del DIF.

#### Aislamiento de ADN de plásmido

Las cepas C600 con los plásmidos EWD299 y SLM004 así como la H10407 se inocularon en tubos conteniendo 2 ml de caldo tripticaseína, adicionado de tetraciclina (25 ug/ml) o de ampicilina (15 ug/ml) para los plásmidos EWD299 y SLM004 respectivamente, la cepa H10407 no requirió de antibiótico.

Los tubos se incubaron de 6 a 8 horas a 37 C en agitación constante (75 rpm). Un ml de cada cultivo se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se centrifugaron a 6Krpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y a cada tubo se le adicionaron 500 ul de una solución de dextrosa 2.5 % adicionada de lisozima (5 ug/ml) en tris-base 0.025 M pH 8.0. Los tubos se agitaron en vortex y se mantuvieron a 4 C durante 20 minutos, se añadieron 100 ul de NaOH 0.2 N en SDS al 10 %, se dejaron 5 minutos a 4 C y finalmente se añadieron 50 ul de acetato de sodio .1 M pH 8.0 y 100 ul de RNasa (10 ug/ml). La suspensión se dejó 30 minutos a 4 C, centrifugando 10 minutos a 4 C y 8-9000 rpm en centrifuga Sorvall.

A los sobrenadantes se les adicionó 2 volúmenes de etanol y se dejaron precipitando toda la noche. El precipitado se recuperó por centrifugación a 12 Krpm a 0 C durante 15 minutos, desecando al vacío durante 4 horas. Finalmente se resuspendió en 10 ul de Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 10 mM y E.D.T.A. 1 mM pH 8.0 ( Birnboim y cols., 1979 ).

### Electroforesis de ADN de Plásmido

Se preparó amortiguador de Tris-Boratos ( Tris-base 0.089 M, Acido bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M ) concentrado 10 veces, el colorante indicador de corrimiento fué azul de bromofenol (0.025 % en glicerina 7.5 % y dextrosa 7 % ). Para cada corrimiento se preparó gel de agarosa al 1 %, disolviendo en amortiguador de tris-boratos 1X, calentando hasta disolver por completo, evitando la evaporación de la solución. Una vez que la solución de agarosa estaba fría y antes de que gelificara, se vació dentro de la cámara en la cual se había colocado el peine que daría origen a los carriles de corrimiento. Después de que el gel solidificó, se retiró con cuidado el peine humedeciendo los dientes previamente con amortiguador.

A las muestras de ADN se les adicionó 2 ul de colorante aplicandose 10 ul de cada muestra en cada carril. Los tanques de los electrodos se llenaron con amortiguador, de manera que éste quedó en contacto tanto con la parte superior del gel (polo negativo) como con la parte inferior (polo positivo). Se aplicó una corriente de 150 V durante dos horas, al cabo de las cuales, el amortiguador se retiró y con mucho cuidado se retiró el gel pasandolo a un recipiente con bromuro de etidio (5 ug/ml) en agua desionizada. El gel se dejó tñendo durante 10 minutos, se lavó con agua desionizada y se llevó al transiluminador de luz U.V. de onda corta para observar las bandas de ADN( Meyer y cols.,1976, Shaberg 1981, Yamamoto

y cols., 1980, 1981, 1983 ).

## Hibridización de ADN.

### A. Sondas radioactivas.

Material Biológico. Cepa C 600 de E.coli con plásmido EWD 299, cepas C 600 de E.coli con plásmido SLM004, cepa C 600 con plásmido pBR322, cepa de E.coli H 10407, 1200 cepas de E.coli provenientes del estudio epidemiológico y ADN de fago lambda como marcador de peso molecular.

### 1. Purificación de Plásmidos.

#### Plásmido EWD299.

Este plásmido está constituido del plásmido pBR313 al cual le fué insertado un fragmento de 1.2 KDaI en el sitio de restricción Hind III. Este fragmento codifica tanto para la subunidad A como para la B de la toxina, y fué obtenido a partir de una cepa productora de toxina termolábil ( Dallas y cols., 1979, Bolivar y cols., 1977. Diag. No.1).

La cepa E.coli C 600 portadora del plásmido EWD299 se cultivó inicialmente en 50 ml de caldo de tripticaseína de soya adicionado de 15 ug de tetraciclina por ml., se incubó 18 hrs. a 37 C. A partir de este cultivo se inocularon 6 matraces bafleados de 250 ml de capacidad, con 75 ml de medio de cultivo con tetraciclina, así como un matraz para densitómetro con la misma cantidad de medio y tetraciclina.

Los matraces se incubaron a 37 C con agitación constante de 75 rpm hasta que el crecimiento bacteriano alcanzó una D.O. de 0.4 a 550 nm (alrededor de cuatro horas), a cada matraz se le adicionó cloranfenicol a concentración final de 170 ug/ml, y se dejó incubando 18 hrs más, al cabo de las cuales los cultivos se reunieron, se centrifugaron a 8-9000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga Sorvall.

El paquete celular se lavó con amortiguador de tris 6 mM, cloruro de sodio 6 mM y EDTA 0.2 mM (amortiguador 6,6,0.2) y se volvió a centrifugar. El paquete se resuspendió en una solución de dextrosa 5 mM adicionada de lisozima (2 mg/ml) y RNasa (0.05 mg/ml) en el amortiguador 6,6,0.2. Esta suspensión se mantuvo a 4 C durante 20 minutos, al cabo de los cuales se añadió NaOH 0.2 N con SDS al 10 % (50 ml) dejándose 5 minutos a la misma temperatura, finalmente se añadió citrato de sodio 3 M (38 ml), la suspensión ahora viscosa se dejó durante 60 minutos a la misma temperatura. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó a 8-9 Krpm durante 20 minutos a 4 C. El sobrenadante se filtró pasando por una gasa triple y se le adicionó un volumen de etanol absoluto, llevándose a una temperatura de -20 C durante 18 a 24 hrs.

El precipitado se recuperó por centrifugación a 15 Krpm durante 20 min a 0 C y se resuspendió en 6,6,0.2 llevándose a un gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio, con Tris 1 M pH 8.4 (310 ul), Tris 1 M pH 9.4 (310 ul), EDTA 0.2 M (125 ul), sarcosyl al 10 % (125 ul), 2.5 ml de la



suspensión de ADN, cloruro de cesio ajustando el índice de refracción a 1.3 y bromuro de etidio (125 ul), en tubo de polihalómero mezclando hasta disolver las sales y después centrifugándose a 40,000 rpm durante 20 hrs a temperatura ambiente. La recuperación de ADN plásmido se llevó a cabo dentro de un cuarto oscuro.

La banda que contiene el ADN circular de doble cadena (plásmidos) se retiró puncionando la parte inferior de los tubos de polihalómero, recibiendo por goteo en un tubo de polivinilo. A cada tubo que se recuperó se le adicionó un volúmen de agua bidestilada desionizada y dos volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se llevó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. El precipitado formado se recuperó centrifugando a  $12^{\circ}\text{Krpm}$  a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El precipitado se secó al vacío, se resuspendió en 6,6,0.2 y se le adicionó sarcosyl al 0.2% (0.2 ml) y cloruro de litio 8 M (0.5 ml), se extrajeron proteínas adicionando fenol saturado:cloroformo (1:1) agitando bien la mezcla en vortex y centrifugando a 6 Krpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa y a ésta se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 hrs. El precipitado recuperado por centrifugación y secado al vacío se resuspendió en 500 ul de 6,4,0.2 determinandose la cantidad de ADN recuperada y la pureza de éste al espectrofotómetro, para lo cual se hizo una dilución 1:50 y se leyó al espectro a las longitudes de onda de 260 y 280 nm.

El bromuro de etidio se retiró mediante extracciones con n-butanol saturado con agua, recuperandose la fase acuosa y repitiendose la extracción hasta que desapareció el color del bromuro, el ADN se precipitó con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, el precipitado se resuspendió en 400ul de 6,6,0.2, se fraccionó en alícuotas de 50 ul y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  ( Bolivar y cols., 1977, Birnboim y cols., 1977, Dallas y cols., 1979, Echeverria y cols., 1984, Maniatis y cols., 1982 ).

#### Plásmido SLM 004

Este plásmido está constituido por el pBR322 que contiene además un fragmento de aproximadamente 840 pares de bases del gene que codifica para la toxina ST-H (Moseley S. y cols., 1983, Maniatis y cols., 1982, Fig. 2).

El procedimiento para la purificación de este plásmido fue el mismo que para el anterior, con la diferencia de que el antibiótico empleado para el crecimiento de la cepa fue ampicilina a una concentración de 15 ug/ml.

## 2. Obtención de Fragmentos .

### 2.1 Fragmento LT del plásmido EWD 299

#### Digestión con Hinc II.

Se preparó el amortiguador de reacción ( Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Ditiotreititol 0.5 mM, albúmina bovina 100 ug/ml) para la reacción se procedió de la siguiente manera:

- 10 ul de ADN plásmido (50ug).
- 2 ul de enzima Hinc II ( 100 U).
- 18 ul de amortiguador de reacción.

Para determinar el tamaño de los fragmentos generados, se empleó ADN de lambda digerido con la enzima Hind III.

La mezcla se incubó en un tubo Eppendorf de 500 ul de capacidad a 37 °C durante toda la noche, la reacción se paró con 5 ul de EDTA 0.5 M.

Se practicó una electroforesis horizontal en agarosa de bajo punto de fusión al .75 % en amortiguador de tris-boratos, aplicando una corriente de 100 volts durante dos horas. El gel se tizó con bromuro de etidio ( 5 ug/ml ) y se procedió a observar con ayuda del transiluminador de luz U.V.

De acuerdo al diagrama de restricción del pBR313, obtuvimos cinco fragmentos, el que ocupó el quinto lugar (0.8 megadaltones) fué el que se recuperó del gel por extracción fenólica.

Esta banda (quinta) se cortó con una navaja estéril, se

desmenuzó en pequeños fragmentos, y con ayuda de una espátula estéril los fragmentos se pasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, se les adicionó 400 ul de amortiguador 6,6,0.2, incubándose en baño maría a 65 ° durante cinco minutos, al cabo de los cuales el tubo se agitó vigorosamente y se adicionaron 400 ul de fenol saturado, la mezcla se agitó en vortex y se centrifugó a 6 Krpm durante cinco minutos. La fase acuosa fué recuperada, y ésta se extrajo una vez más con fenol saturado:cloroformo (1:1), repitiéndose la agitación y la centrifugación. La fase acuosa se trató finalmente con cloroformo recuperándose la fase acuosa, a la que se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto y 15 ul de acetato de sodio 3 M, se dejó precipitando toda la noche a -20 ° C. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 12 Krpm a 0 ° C durante 15 minutos, el precipitado se lavó una vez con etanol al 70 %, se secó al vacío y se resuspendió en 50 ul de amortiguador 6,6,0.2. Para verificar que efectivamente se había recuperado el fragmento, se practicó una electroforesis horizontal en una minicámara en agarosa al .75 % y tris-boratos como amortiguador, la electroforesis se corrió durante 45 minutos a 80 volts. Se aplicaron 2 ul de la muestra y 2 ul de colorante ( azul de bromofenol 0.125 %, glicerina 25 % y dextrosa 25 % ). El ADN así obtenido se dividió en alícuotas y se congeló a -70 ° C ( Moseley y cols., 1982, Echeverría y cols., 1984, 1985, 1986, Southern 1975, 1978, Maniatis y cols., 1982).

## 2.2 Fragmento STa-H del plásmido SLM004.

### Digestión con Taq I.

Se preparó el amortiguador de reacción ( Tris-HCl 10 mM pH 8.4, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM ), la composición del volumen de digestión fué la siguiente:

- 10 ul de ADN (50ug).
- 2 ul de enzima Taq I (100U).
- 8 ul de amortiguador.

Como control de digestión se empleó el plásmido pBR322, la mezcla se incubó a 37 C durante toda la noche, adicionando 5 ul de EDTA 0.5 M para detener la reacción. Se corrió una electroforé<sup>o</sup>sis vertical en gel de agarosa 0.75 % en amortiguador tris-boratos y corriente de 100 volts durante dos horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio ( 5 ug/ml ) durante 10 minutos, y se observó el patrón de bandas obtenido con ayuda del transiluminador.

Se obtuvieron 9 bandas en el plásmido SLM004 y 8 en el pBR322, la banda presente en el SLM004 y ausente en pBR322 es el fragmento de 840 pares de bases que es el fragmento ST-H insertado en el pBR322.

Este fragmento se cortó con navaja estéril, se partió en fragmentos más pequeños y se extrajo y purificó de la manera antes mencionada.

### Digestión con Hpa II .

Teniendo en cuenta que la cantidad de ADN se ha reducido al 16 % ( de 50 ug a > 8 ug ) se reúnen los fragmentos de varias reacciones para obtener una buena cantidad de ADN, preparándose el siguiente volúmen de digestión:

- 10 ul ADN (10 ug).
- 2 ul de enzima Hpa II (30 U).
- 6 ul de amortiguador .
- 2 ul de agua desionizada.

El amortiguador empleado fué el recomendado por Maniatis. La mezcla se incubó toda la noche, se adicionó 5 ul de EDTA 0.5 M para detener la reacción. En esta ocasión la electroforesis se corrió en gel de acrilamida al 8 %, en cámara vertical, con amortiguador de tris-boratos y corriente de 80 volts durante dos horas. El gel se tñó con bromuro de etidio (1ug/ml), las bandas se visualizaron por medio del transiluminador de luz UV.

Se obtuvieron 4 bandas (~290, 240, 200, y 116 pares de bases), la tercer banda se retiró cortando con una navaja. Para retirar la acrilamida se procedió de la siguiente manera: el gel se desmenuzó y los pequeños trozos se pasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, al cual se le añadió 500 ul de amortiguador de extracción ( Tris-HCl 50 mM pH 8.0, SDS 0.2 %, acetato de sodio 0.3 M, EDTA 4 mM ), la mezcla se incubó 16 horas con agitación constante a 37 C. Se

centrifugó a 8 Krpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y la acrilamida se volvió a lavar con el mismo amortiguador. Los sobrenadantes se reunieron y se precipitaron con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. El precipitado se recuperó por centrifugación a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos a 12 Krpm, y se lavó una vez con etanol al 70%, finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador, se dividió en alícuotas de  $\sim 12 \mu\text{l}$  y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Por electroforesis se comprobó que el fragmento se había recuperado (Moseley y cols., 1982, Maniatis y cols., 1982).

### 3. Conjugación a Compuestos Radiomarcados .

#### 3.1 Fragmento Hinc II (LT) y Fragmento Taq I + Hpa II (STa-H) por "Nick Translation".

El material necesario para esta reacción fué adquirido en un juego o equipo (New England Nuclear) que contiene los siguientes componentes:

Amortiguador ( Hepes pH 6.6,  $\text{MgCl}_2$  albúmina bovina y 2-mercaptoetanol ), mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados en concentración de 100  $\mu\text{M}$  de dATP, dGTP, y dTTP, DNA polimerasa I o fragmento de Klenow 2.0 U/ $\mu\text{l}$  en Tris-HCl pH 7.5, 2-mercaptoetanol y glicerol, desoxicitidina trifosfatada marcada con  $^{32}\text{P}$  en posición alfa con 3000 Ci/mmol, 10mCi/ml, además otros reactivos como trietilamina 10 mM en Tris-HCl para purificar el ADN en columna y n-propanol al 20 %.

Para desnaturalizar el ADN obtenido de los plásmidos se requirió calentar la muestra en baño maría a ebullición durante tres minutos y enfriar en hielo inmediatamente. Se añadió ADN en exceso, por ejemplo si se necesitaban 50 ng se adicionaron 150 ng para asegurar que después de la desnaturalización hubiera ADN suficiente.

La mezcla para marcar consistió de lo siguiente:

- 12 ul de ADN desnaturalizado (150 ng).
- 6 ul de amortiguador.
- 6 ul de nucleótidos trifosfatados no marcados.
- 6 ul de agua desionizada.
- 10 ul de dCTP marcado.
- 1 ul de polimerasa.

Los componentes se incorporaron de acuerdo al orden presentado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, el cual se centrifugó por 20 a 30 segundos para que la muestra quedara en el fondo del tubo, el tubo se dejó a temperatura ambiente por tres horas. La reacción fué detenida adicionando 400 ul de trietilamina. Mientras la mezcla estaba en incubación, se activó el cartucho de purificación ( Sephadex G75 ) lavando primero el interior con 2 ml de metanol utilizando una pipeta Pasteur, después con ayuda del adaptador de la columna y una jeringa de 5 ml se hizo bajar el metanol por la columna, la velocidad de flujo fué de una gota cada dos segundos, de la misma manera se pasaron 2 ml de trietilamina y la columna se mantuvo todo el tiempo hidratada con la trietilamina.



La mezcla radiomarcada se añadió con una micropipeta (430 ul), y con la misma jeringa se aplicó un poco de presión para que la muestra bajara por la columna. Se añadieron 2 ml de trietilamina para lavar el exceso de nucleótidos no incorporados, el flujo de elución fué el mismo que el anterior o un poco menor ( una gota cada 4 segundos ). Para eluir la "sonda" o sea el fragmento de ADN ya marcado, se aplicó 1 ml de n-propanol al 20 % al tope de la columna y se hizo pasar por la columna con ayuda de la jeringa. Se colectaron fracciones de 400 ul. Para determinar el pico del eluado se tomó 1 ul de cada fracción y se absorbió sobre membrana de fibra de vidrio, la membrana se pasó a un vial que contenía líquido de centelleo (2-5 difenil oxazol en tolueno) y se midieron las emisiones en un contador de partículas radioactivas.

Una vez determinada la actividad específica, las "sondas" se mantuvieron a <sup>o</sup>-20 C ( Manual de Procedimientos RPELS-NEP-103, NEN DuPont, Maniatis y cols., 1975, 1982, Pardue 1969, Picken y cols., 1983, Rigby y cols., 1977, Saylor y cols., 1985 ).

### 3.2 Oligonucleótido Sintético (LT,ST-H)

Estos oligonucleótidos (~21 bases) sintetizados por el Dr. W. Hill y amablemente proporcionados por el Dr. Cebula de la Administración de Alimentos y Drogas de EUA (FDA) y por el Dr. Cravioto del DIF, se utilizaron para estudiar todas las

muestras y así poder establecer la sensibilidad y especificidad de las sondas clonadas.

Para esta reacción se requiere del siguiente material:

ADN (75-125 ng).	5	ul.
<sup>32</sup> P ATP 3000Ci/mmol	3	ul.
Cinasa de T4 (20U)	1	ul.
Amortiguador Denhardt	2.5	ul.
Agua bidest. desion.	13	ul.

Los componentes se mezclaron y se centrifugaron brevemente ( 2 a 3 segundos ) se incubaron a 37 ° C durante una hora al cabo de la cual se detuvo la reacción con 1.6 ul de acetato de amonio 4 M.

Una microcolumna con DEAE-Celulosa se equilibró durante una hora con acetato de amonio 0.25 M con flujo de una gota cada dos segundos. La mezcla radioactiva ya incubada se aplicó a la columna, y ésta se lavó con 4 ml de amortiguador para retirar el ATP libre. Se añadieron 400 ul de acetato de amonio 4 M y se colectaron fracciones de 200 ul. La actividad de los eluados se comprobó en un contador de partículas radioactivas.

#### 4. Desnaturalización y Fijación de ADN.

Las 1200 cepas se obtuvieron de clínicas de Medicina Familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social. Proviene de pacientes que acuden a consulta médica a causa de la diarrea aguda con menos de 15 días de evolución. Se seleccionaron

aquellos pacientes que no habían recibido tratamiento con antibióticos por lo menos una semana antes del estudio. El grupo control o asintomático, se seleccionó muestreando un individuo por cada 4 pacientes con diarrea, y consistió de pacientes que habían asistido a la clínica por otras causas diferentes a la diarrea.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas por una enfermera sanitarista durante los meses de mayo a agosto de 1988, hasta que se completó el número mencionado. Las colonias aisladas del coprocultivo e identificadas como E.coli se utilizaron para esta parte del trabajo. Además todas las cepas fueron estudiadas por serología para identificar aquellas cepas pertenecientes a los grupos enteropatógenos y enterotoxigénicos mas frecuentes.

El ADN de las colonias tanto de las cepas conocidas como el de las cepas del estudio epidemiológico fué desnaturalizado y fijado sobre papel filtro Whatmann 541 mediante el procedimiento siguiente.

Las cepas se inocularon en picadura en medio de agar de MacConkey (20 cepas por membrana además del control negativo y del control positivo), por duplicado y se dejaron incubando a 37° C durante 18 a 24 horas. Un papel filtro de 9 mm se colocó sobre la superficie de cada placa con las colonias crecidas a manera de hacer una impresión de éstas, se dejó durante una hora. Después de este tiempo los papeles filtro se retiraron de la superficie del agar y se desnaturalizaron sobre la superficie de papel filtro Whatmann No. 1 impregnado

con NaOH al 2 % en NaCl 1.5 M y a temperatura de ebullición en baño maría durante 3 minutos, al cabo de los cuales se colocaron sobre una papel filtro Whatmann No.1 saturado con Tris 1 M pH 7.2 en NaCl 1.5 M dejandose por espacio de 4 minutos, se retiraron y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente se almacenaron en desecador al vacío hasta el momento de ser utilizados (Maas R. 1985 ).

### 5. Hibridización de ADN en Colonia.

Para la hibridización en colonia se preparó amortiguador SSC 20X (Citrato de Sodio 3.5 M Cloruro de Sodio 3 M) 15 ml de solución Denhardt ( albúmina bovina 5% , polivinyl pirrolidona 5% , SDS 10 % ), agua desionizada (28.9 ml), EDTA 0.5 M (100 ul), ADN de timo de ternera sonicado y desnaturalizado por ebullición durante 5 minutos (1 ml).

Esta solución se vació en una caja de Petri desechable limpia, y con una micropipeta se adicionó la "sonda" ( la clonada o la sintética, con una cuenta radioactiva mínima de  $1 \times 10^6$  cpm ). Los filtros con el ADN desnaturalizado de las colonias se metieron uno a uno en esta solución, con una rejilla de malla de alambre entre cada filtro. Se incubaron a  $45^\circ \text{C}$  durante toda la noche.

Después de 18 horas de incubación, los filtros se lavaron con una solución 6X de SSC precalentada a  $50^\circ \text{C}$  para LT y a  $54^\circ \text{C}$  para ST-H. Los filtros se incubaron a estas temperaturas durante una hora, el lavado y la incubación se repiten una

véz más. Finalmente se lavaron con SSC 2X a temperatura ambiente. Se retiró toda la solución de las cajas Petri, los filtros se secaron a temperatura ambiente colocándolos sobre toallas de papel absorbente. Una vez secos se pegaron con cinta adhesiva a una mica o un separador de mica, y ésta mica así "cargada" se metió dentro de un chasis o pantalla intensificadora. Dentro de un cuarto oscuro se introdujo una hoja de película para rayos X dentro de la pantalla de intensificación y sobre la mica donde fueron adheridos los filtros. El chasis bien cerrado se envolvió bien con una bolsa de plástico y se llevó al congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 50 a 72 horas. Después de este tiempo la película se sacó (en cuarto oscuro) y se reveló de acuerdo a las instrucciones del proveedor, Kodak de México (Denhardt 1966, Grunstein y cols., 1975, Laskey y cols., 1977, Meinkoth y cols., 1984, Pardue y cols., 1969 ).

#### **B. Sondas Enzimáticas.**

Estas sondas fueron desarrolladas y manufacturadas por Molecular Biosystems, Inc. para New England Nuclear de DuPont. Los nucleótidos (15-35 bases) poseen una molécula de fosfatasa alcalina en enlace covalente con el C-5 de una timina. El nucleótido marcado se detecta por la adición de sustrato que formará un precipitado de color en presencia de la enzima.

Material Biológico. Cepa H10407 de E.coli, 1200 cepas de E.coli provenientes del estudio epidemiológico.

Medios de Cultivo. Agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato).

#### 1. Preparación de Cultivos Bacterianos.

Las cepas control y las provenientes del estudio se inoculan sobre membrana de nitrocelulosa y después de un crecimiento de 4-5 horas las membranas se retiran y se procesan para desnaturalizar el ADN. Antes de inocular primero se marcaron los puntos de referencia en la membrana de nitrocelulosa con un lápiz 3H, estos puntos servirán de guía en la inoculación con palillo.

Después de marcar la membrana e identificarla, se procedió a colocarla sobre la superficie del agar XLD contenido en una caja de Petri, las cepas se fueron inoculando con los palillos de madera estériles, teniendo cuidado de no romper la membrana. Cada membrana incluyó 45 cepas con dos controles positivos y un negativo, las membranas se inocularon por duplicado.

Las placas de agar con las membranas inoculadas se incubaron a 37 C durante 4 -5 horas, dependiendo del desarrollo de las colonias. Después de este tiempo la membrana se retiró colocandola durante 5 minutos sobre un disco de papel filtro impregnado con SDS al 10 % para lizar la pared celular. La membrana se retiró del SDS y se pasó a un papel filtro saturado con NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 M para desnaturalizar el ADN.

Después de cinco minutos se retiró la membrana y se colocó durante 5 minutos en un papel filtro saturado con Tris base 0.5 M pH 7.5 en NaCl 1.5 M. Se hizo otro pase de la membrana a un papel filtro saturado con la misma solución anterior durante cinco minutos para completar la neutralización. Al cabo de este tiempo la membrana se retiró, se dejó secar al aire y se pasó a una estufa con vacío a 80 °C durante una hora para fijar el ADN sobre la membrana, éstas se pueden almacenar dentro de un desecador (Protocolo, Universidad de Ghotenburgh).

## 2. Hibridización de ADN.

El equipo para hibridizar contiene:

Sonda marcada con fosfatasa alcalina, ADN control, nitroazul de tetrazolio (NTB), 5-bromo 4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP), amortiguador para la reacción enzimática y agua desionizada estéril.

En cada reacción de hibridización se trabajaron dos membranas por bolsa, previa a la hibridización se humedecieron con SSC 5X, se introdujeron dentro de la bolsa adicionando 3 ml de amortiguador de Denhardt, las burbujas de aire se retiraron con cuidado antes de sellar la bolsa, de manera que la solución estuviera siempre en contacto con las membranas y se llevó a incubar en baño maría a la temperatura indicada por el proveedor (50 °C para LT y 50 °C para ST). La bolsa se retiró del baño después de 15 minutos y las

membranas se pasaron a otra bolsa a la cual se le adicionó 1 ml de amortiguador de Denhardt y 5 ul de la sonda enzimática.

La bolsa sin burbujas y bien sellada se llevó al baño metabólico a la temperatura indicada durante 15 minutos. Después de este tiempo se retiró la bolsa del baño, se sacaron las membranas y se lavaron por separado dentro de cajas de Petri desechables para evitar que se adhieran.

Para el lavado de las membranas se procedió de la siguiente manera:

- 2 lavados de 5 minutos cada uno con SSC 1 X con SDS al 1 %, a la temperatura indicada ( 45 ° para LT y 50 ° para ST ).
- 2 lavados de 5 minutos cada uno con SSC 1 X adicionado de tritón al 1 % a la misma temperatura.
- 2 lavados de 5 minutos cada uno con SSC 1 X adicionado de tritón al 1 % a temperatura ambiente con agitación.
- 2 lavados de 5 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente con SSC 1 X.

Después de los lavados, las membranas se metieron a una bolsa adicionando 7.5 ml de amortiguador (Tris-HCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> y azida de sodio 0.02 % ), 33 ul de NTB ( Nitro azul de tetrazolio ) y 25 ul del sustrato 5-bromo-cloro-3 indolil fosfato ( BCIP). Se retiraron las burbujas de aire, la bolsa se selló muy bien, y ésta se dejó a temperatura ambiente durante 4 a 6 horas. Después de este tiempo las membranas se lavaron con agua desionizada y se determinaron reacciones



positivas a aquellas colonias que hubieran fijado el colorante NTB( Denhardt 1966, Georges y cols., 1983, Kincaid y cols., 1988, Langer y cols., 1981, Manual de Instrucciones NEN [SNAP] DuPont, Oprandy y cols., 1988, Romick y cols., 1987, Seriwatana y cols., 1987, Sethabutr y cols., 1986, Smith y cols., 1988, Wateson y cols., 1988 ).

### Identificación Serológica

El esquema para serogrupar E.coli está basado en el descrito por Kauffman y depende de la identificación de los antígenos somáticos "O" constituidos por lipopolisacáridos.

La técnica básica utilizada para identificar el antígeno O es la de aglutinación en tubo. El procedimiento descrito aquí se emplea en el Laboratorio Central de Salud Pública de Colindale en Londres, Inglaterra( Gross y cols., 1985 ).

### Material Biológico

-Cepas de E.coli enteropatógenas control.

026,055,011,0127,086,0119,0125,0125,0126, y 0128

-Antisueros para grupos enteropatógenos de E.coli (Difco).

026,055,0111,0127,086,0119,0124,0125,0126,0128

-Antisueros para grupos enterotoxigénicos y algunos enteropatógenos de E.coli proporcionados por S.S.

018ab,018ac,044,078; 06,08,015,020,025,027,063,0148 y 0159

-Cepas provenientes de estudio epidemiológico.

Medios de Cultivo. Agar de McConkey, tripticaseína de soya y gelosa nutritiva.

#### Preparación de Antígenos Control

Las cepas de E.coli enteropatógena fueron proporcionadas por el Dr. A. Cravioto y además de servir de control nos permitieron obtener el título de trabajo de los antisueros.

Cada cepa se inoculó en 5 ml de caldo de tripticaseína incubándose a 37 C durante 18 a 24 horas. Después de este tiempo el cultivo se llevó a ebullición en baño maría durante una hora. Los cultivos se enfriaron y se les adicionó formaldehído a una concentración final de 0.06 %. Esta suspensión se mantuvo en refrigeración constantemente.

#### Titulación de Antisueros

Esta titulación en ajedrez, se llevó a cabo para conocer no solo la dilución de trabajo del antisuero sino para determinar el título aproximado de la suspensión de antígeno, para así determinar la D.O. de éste.

El suero se diluyó en solución salina adicionada de fenol (0.05%) practicando diluciones desde 1:5 hasta 1:160, incluyendo 1:10; 1:20; 1:40; 1:80 y 1:100. En una placa de microtitulación se dispuso el antígeno ocupando 7 hileras con 7 pozos cada una, esto es una hilera con 7 pozos para cada dilución de antígeno; las diluciones de antígeno utilizadas fueron: 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:8 y 1:10 . Se adicionaron

50 ul de dilución de antígeno por pozo ocupando una hilera por cada dilución. Se adicionó el antisuero, también 50 ul en cada pozo y una hilera de pozos por cada dilución.

La placa se agitó durante 15 minutos a 100 rpm, se cubrió con papel parafilm y se dejó incubando a 50 C toda la noche.

Para interpretar los resultados, se buscó la dilución más alta del suero que fué capaz de aglutinar el antígeno, así mismo se buscó la dilución de antígeno que aglutinó por completo.

Una vez que se conoció la dilución de trabajo del antígeno, se les determinó la D.O. a 660 nm, para ajustar a esta densidad las suspensiones bacterianas del estudio epidemiológico.

Las cepas del estudio epidemiológico fueron inoculadas y tratadas de la misma manera que las cepas control, ajustando la D.O. a la establecida con las cepas control ( D.O. = 0.24-0.32).

#### Determinación de Serogrupo

Una vez preparada la suspensión del antígeno, las cepas se aglutinaron primero con los sueros polivalentes A y B; éstos contienen una mezcla de antisueros para cada una de las cepas control. Todas aquellas cepas que aglutinaron con los sueros polivalentes se llevaron a aglutinar con los sueros monovalentes de cada grupo; es decir si la cepa aglutinó con el suero polivalente A, entonces solo se probó la segunda vez con aquellos antisueros monovalentes del grupo A, ésto es

solo se aglutinó con los antisueros 026,055,0111 y 0127 para determinar a cual de ellos pertenece el antígeno O de la cepa en cuestión.

## RESULTADOS

### 1. Ensayos Biológicos de las Cepas Donadoras.

Con el objeto de determinar si realmente las cepas donadoras producían las toxinas, se realizaron los ensayos biológicos con células adrenales de rata para la toxina LT, y para la toxina ST con ratones lactantes.

El ensayo practicado a la cepa portadora del plásmido EWD299 dio el redondeamiento característico las células Y1.

Como controles positivos se emplearon la toxina de cólera purificada y la toxina de esta cepa que se purificó en el desarrollo de este trabajo (Figs. No. 5 y 6).

Como control negativo se usaron las cepas C600 sin plásmido y C600 con plásmido SLM004 que codifica para la toxina STa-H.

El ensayo del ratón lactante practicado a la cepa portadora del plásmido SLM004 dió el resultado siguiente:

#### Primer ensayo

peso intest. 0.53/peso cuerpos 4.62 Coeficiente = 0.114

#### Repetición del ensayo

peso intest. 0.66/peso cuerpos 6.89 Coeficiente = 0.0957

El promedio de ambos resultados es de 0.104 el cual fué mayor que el coeficiente de 0.09 considerado como positivo (Fig. No. 7)

### 3.1 Hibridización con Sondas Clonadas Radioactivas

Se estudio un total de 1151 cepas provenientes de 232 individuos; 164 de ellos con diarrea de menos de 15 dias de evolución, 22 con diarrea con sangre y 46 individuos asintomáticos para este padecimiento.

El primer ensayo practicado fué un tamiz para eliminar la mayor parte de las cepas que resultarían negativas. Para ésto se reunieron todas las cepas de cada individuo ( 2 a 5 por individuo) de tal modo que la colonia crecida y de la cual se tomarían las impresiones sobre el papel filtro representaría a todas las E.coli de cada individuo (mezcla).

De esa manera en este ensayo tamiz, se analizaron 232 colonias, 20 en cada filtro además de los controles positivos y los negativos.

En el segundo ensayo, se analizaron aquellas colonias que resultaron positivas, en esta ocasión las cepas pertenecientes a estas colonias se sembraron individualmente para determinar cuantas cepas por paciente resultaron positivas( Fig.No. 3).

Para esta sonda resultaron positivos 42 casos para la toxina LT y 25 para STa-H. A estas cepas les corresponde el siguiente fenotipo:

24 casos con cepas productoras de LT solamente, 7 casos con cepas productoras de STa-H y 18 casos con cepas productoras de ambas toxinas LT/STa-H, el resto de los casos fueron negativos.

### 3.2 Hibridización con Sondas Sintéticas Radioactivas

Para eliminar la mayor parte de los aislamientos que resultan negativos, se procedió de la misma manera que en el ensayo anterior. El primer ensayo con las sondas sintéticas radioactivas, fué un tamiz, cada colonia sembrada representó todas los aislamientos por paciente, aquellas colonias que resultaron positivas fueron sembradas individualmente para determinar las cepas positivas de cada mezcla.

Para esta sonda resultaron positivas 38 casos para LT y 23 para STa-H, el resto de las muestras resultaron negativas; por lo tanto el fenotipo de las cepas resultó el siguiente: 20 casos con cepas productoras de toxina LT solamente, 5 de STa-H y 18 casos con cepas productoras de ambas toxinas LT/STa-H.

Era claro que los resultados obtenidos con esta sonda no coincidieron con los resultados del ensayo con sondas clonadas, se repitieron ambos ensayos dando el mismo resultado para LT y para STa-H dos casos fueron dudosos.

	No.Casos	LT	STa-H	LT/STa-H
Sonda Clonada	232	24	7	18
Sonda Sint.	232	20	5	18

Esto nos indicó claramente que teniamos 4 casos falsos positivos para LT y dos para STa-H, ninguna de estas falsos

positivos posea fenotipo LT/STa-H. Esta diferencia se debió probablemente a que para elaborar la sonda para la toxina LT, se utilizó un fragmento demasiado grande y en el caso de los falsos positivos para STa-H pudo deberse a una mala interpretación o a una contaminación de las cepas.

Entonces tenemos que para determinar la especificidad de la sonda clonada respecto a la sintética :

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{No. Verdaderos Positivos} - \text{Falsos Negativos}}{\text{Verdaderos Positivos}} \times 100$$

$$S = \frac{43 - 0}{43} \times 100 = 100 \% \text{ Para ambas sondas LT y STa-H}$$

y para determinar la especificidad tenemos:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{No. Verdaderos Negs.} - \text{Falsos Positivos}}{\text{Verdaderos Negativos}} \times 100$$

$$E = \frac{194 - 4}{194} \times 100 = 97.3 \% \text{ para LT}$$

$$E = \frac{209 - 2}{209} \times 100 = 99.04 \% \text{ para STa-H}$$



## OTROS ENSAYOS

### Hibridización con Sondas Enzimáticas

Este ensayo se llevó a cabo para comparar la sensibilidad y especificidad de la sonda clonada con respecto a otro tipo de sonda. No se pudo trabajar con las mezclas o pooles, donde se reunían todos los asilamientos de cada paciente en una colonia. Se hicieron dos intentos en los cuales los resultados no fueron satisfactorios, pero cuando se trabajó con cada una de las colonias aisladas, los resultados mejoraron.

Debido a que la disponibilidad de estas sondas enzimáticas fué escasa, sólo se estudiaron 68 cepas para toxina LT, 34 que habían sido positivas a las sondas radioactivas y 34 que resultaron negativas; para STa-a se estudiaron 54 cepas, de estas cepas, 20 habían resultado positivas a la sonda radioactiva y 34 negativas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para la toxina LT las 34 colonias negativas para sondas radioactivas resultaron negativas en el ensayo de sondas enzimáticas; de las 34 cepas positivas para las sondas radioactivas, solo 28 fueron positivas para el ensayo enzimático de LT, lo que nos indicó que hubo un total de 6 falsas negativas, y por lo tanto la especificidad de estas sondas enzimáticas fué de 82.35 % y la sensibilidad del 100 %.

Para la toxina STa-H las 34 colonias negativas para sonda

radioactiva lo fueron también para la sonda enzimática, lo que nos indicó que la especificidad fue del 100 %. De las 20 cepas positiva a las sonda radioactiva, solo 16 fueron positivas al ensayo de sondas enzimáticas para STA-H, esto nos indicó que tenemos 4 falsas negativas, y por lo tanto la sensibilidad fue de 80.0 %.

## Ensayos Biologicos

### Ensayo de Células Adrenales de Rata Y1

Para la toxina LT se estudiaron todos los casos que habían resultado positivos para las sondas radioactivas, y 37 casos que habían resultado negativos. Para este ensayo se trabajo con mezclas de aislamientos por cada paciente.

Todos los 37 casos que habían sido negativos para las sondas radioactivas fueron negativos al ensayo con células Y1, y de los 37 casos positivos a las sondas radioactivas solo 29 fueron positivos al ensayo con células, de esta manera tenemos 8 casos falsos negativos lo que nos dió una sensibilidad para el ensayo biológico de 78.3 %.

### Ratón Lactante

Se estudiaron 23 casos en mezclas positivas a las sondas radioactivas para STA-H y 30 casos negativos. Todos los 30 casos negativos para las sondas radioactivas fueron negativos

para el ensayo del ratón lactante; de los 23 casos positivos a las sondas radioactivas solo 17 fueron positivos a ratón lactante, esto nos dió una sensibilidad de tan solo 73.91 % para el ensayo con ratón lactante.

Desde el punto de vista clínico los resultados nos indican que:

Cuando relacionamos cuadro clínico con la identificación de E.coli enterotoxigénica, tenemos que en el grupo asintomático con 46 casos estudiados, se identificaron estas cepas en 9 de ellos, lo que nos dió un 19.56 % de incidencia para este grupo. En el grupo de 164 individuos con diarrea se identificaron cepas enterotoxigénicas en 32 casos, correspondiéndole a este grupo un 19.51 % de incidencia, y al grupo de diarrea con sangre le correspondió un 9.09 %. En forma global se identificaron 43 casos con cepas enterotoxigénicas de 232 estudiados, lo que representó una incidencia del 18.53 (Tabla No.1).

El porcentaje de cepas enterotoxigénicas identificadas en el grupo asintomático fué similar al porcentaje del grupo de pacientes con diarrea, esto nos sugiere que en el primer grupo encontramos cepas que poseen la información para producir diarrea pero no la están expresando, o bien se trata de portadores asintomáticos que en cualquier momento pueden enfermar.

Cuando relacionamos grupo de edad y el cuadro clínico con la identificación de E.coli enterotoxigénica tenemos que en el

grupo de los asintomáticos o grupo control se estudiaron 17 casos de menores de 5 años encontrándose 5 positivos; en los casos de 5 años a menores de 15 se estudiaron 11, resultando dos positivos; y en los mayores de 15 años fueron 18 los casos estudiados con dos positivos. En el grupo de diarrea se estudiaron 50 casos de menores de 5 años, 22 casos de 5 años a menores de 15, y 92 casos de mayores de 15 años, resultando 11 positivos para los primeros, cuatro para los segundos y 17 para los últimos. En el grupo de diarrea con sangre se estudiaron 7 casos de menores de 5 años, cuatro casos de individuos de 5 años a menores de 15, y 11 de mayores de 15 años, identificándose un caso para los primeros y uno para los últimos (Tabla No.2).

Cuando relacionamos el tipo de cepa enterotoxigénica tanto con el cuadro clínico como con el grupo de edad no existe diferencias significativas (Tablas No. 3 y 4).

En cuanto al predominio de cepas productoras de un solo tipo de toxinas, nos encontramos que no hubo diferencia entre el número de cepas que produjeron solo LT y las cepas que produjeron ambas toxinas LT/STa-H, las cepas productoras sólo de toxina STa-H fueron menos numerosas.

### Serología

Las cepas fueron estudiadas con algunos sueros comerciales y otros proporcionados por el laboratorio de bacteriología del

Centro de Referencia de la Secretaria de Salud; estos sueros estan preparados contra serotipos de E.coli reconocidos en el laboratorio clinico como enteropatogenos, cabe mencionar que las cepas aún cuando poseen estos serotipos no son reconocidas como patogenas hasta que no se establezca que poseen efectivamente un mecanismo de patogenicidad.

De las 1151 cepas estudiadas solo aglutinaron 60 pertenecientes a 21 casos, debido a que de todas las cepas aisladas por individuo (2-5) a veces solo aglutinaron una, dos o tres de las cepas de cada paciente.

De las cepas que aglutinaron sólo lo hicieron con los antisueros pertenecientes al grupo de los enteropatogenas, y de éstas únicamente con los serogrupo O18ab, O18ac, O44, O55, O86, O111, y O126. Ninguna cepa aglutinó con los serogrupos enterotoxigenicos probados. De los resultados obtenidos se puede apreciar que el mayor número de cepas que aglutinó provienen de niños menores de dos años (61.9%) y el siguiente grupo (niños de 2 a 5 años) con el 28.5% de las cepas identificadas. Destaca también el hecho de que el 76.19 % de estas cepas pertenecen a niños con diarrea, mientras que al grupo asintomático solo correspondió el 19.04 %. (Tablas No. 5 y 6).

TABLA No.1

RELACION DE CUADRO CLINICO CON IDENTIFICACION DE E.COLI  
TOXIGENICA

Cuadro Clínico	Casos Estudiados	Casos Positivos	Por ciento
Control	46	9	19.56
Diarrea	164	32	19.51
Diarrea/sangre	22	2	9.09
Total	232	43	18.53

TABLA No. 2

RELACION DE GRUPO DE EDAD Y CUADRO CLINICO CON IDENTIFICACION DE E. COLI TOXIGENICA.

Grupo de Edad	Control No. Casos/+	Diarrea No. Casos/+	Diarrea/sangre No. Casos/+
Menores 5 años	17/5	50/11	7/1
5 años a menores 15	11/2	22/4	4/-
Mayores 15 años	18/2	92/17	11/1
Total	45/9	164/32	22/2

TABLA No.3

TIPO DE CEPA ENTEROTOXIGENICA Y CUADRO CLINICO.				
Cuadro Clinico	LT No./%	STa-H No./%	LT/STa-H No./%	Total
Control	2 (22.2)	2 (22.2)	5 (55.5)	9
Diarrea	17 (53.1)	3 (9.3)	12 (37.5)	32
Diarrea con Sangre	1 (50.0)	-	1 (50.0)	2
Total	20 (46.5)	5 (11.6)	18 (41.86)	43

TABLA No.4

RELACION DE TIPO DE CEPA ENTEROTOXIGENICA Y GRUPO DE EDAD.			
Grupo de Edad	LT No. / (%)	STa-H No. / (%)	LT/STa-H No. / (%)
Menores 5 años	9 (45)	1 (20)	7 (38.8)
5 años a Menores 15	2 (10)	1 (20)	3 (16.6)
Mayores 15 años	9 (45)	3 (60)	8 (44.4)
Total	20 (100)	5 (100)	18 (100)



TABLA No. 5

RELACION DE GRUPOS DE EDAD Y SEROGRUPOS\* DE E. COLI

Serogrupo	Grupo de Edad			
	2 años	2 a 5 años	5 a 10 años	>15 años
	No. Cepas	No. Cepas	No. Cepas	No. Cepas
018ab	4	2		
018ac	2	1		1
044	2	1		
055	1	1		
086	-	1	1	
0111	3			
0126	1			
<b>Total</b>	<b>13 (61.9%)</b>	<b>6 (28.57%)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\* Sero grupos reconocidos como enteropatógenos en laboratorios clínicos.

TABLA No.6

RELACION DE CUADRO CLINICO Y SEROGRUPOS DE <u>E.COLI</u>			
Serogrupo	Cuadro Clínico		
	Asintomático	Diarrea	Diarrea con Sangre
	No.Cepas	No.Cepas	No.Cepas
O18ab	2	4	
O18ac	1	2	1
O44		3	
O55		2	
O86	1	1	
O111		3	
O126		1	
Total	4 (19.%)	16 (76.1%)	1

\* Serotipos reconocidos como enteropatógenos en laboratorios clínicos.

\*Sero grupos reconocidos como enteropatógenos en laboratorios clínicos.

## DISCUSION

Los resultados nos indican que las sondas obtenidas fueron sensibles y específicas para detectar solamente las cepas de E.coli enterotoxigénica y no otras cepas tanto de E.coli no enterotoxigénica como otras enterobacterias, ya que antes de ensayar las cepas provenientes del estudio epidemiológico, se ensayaron cepas productoras de toxinas, cepas no productoras de toxinas y otras enterobacterias

Por otro lado cuando se compararon los resultados de las sondas clonadas radioactivas con las sondas sintéticas radioactivas se obtuvo una sensibilidad del 100 % para las sondas clonadas tanto la de toxina LT como la de toxina STa-H, con respecto a especificidad la sonda clonada para la toxina LT resultó con 97.3 % y la sonda para la toxina STa-H con 99.04 %. Esta diferencia se debió probablemente a las falsas positivas encontradas ( 4 para LT y 2 para STa-H). Sin embargo estas cepas que dieron falsas positivas aún son susceptibles de ser estudiadas especialmente las dos cepas para STa-H.

Cuando se utilizaron otros ensayos, fué claro que no son tan sensibles como las sondas radioactivas; en el caso de las sondas sintéticas marcadas con fosfatasa alcalina la sensibilidad fué de 82.35 % para LT y 80.0% para STa-H. Además con el inconveniente de tener que analizar cepa por cepa de cada paciente,ésto es, no se pueden reunir en mezclas ya que se enmascaran facilmente las cepas positivas.

Otro de los factores que pudo haber influido en la sensibilidad tan baja para estas sondas enzimáticas, fué la temperatura a la cual se llevó a cabo tanto la hibridización como los lavados ( 50 y 45 C ); Kincaid y cols., en 1988 encontraron una buena correlación con la sondas radioactivas cuando se elevó la temperatura de incubación y de lavado principalmente para la sonda de STa-H. En ensayos posteriores en donde utilizamos estas sondas radioactivas en cepas de otros estudios, se logró una mayor especificidad elevando la temperatura de incubación para la sonda STa-H.

Cuando se analizaron los resultados de los ensayos biológicos se vió que éstos nos dieron sensibilidades muy bajas, de 78.3 % para el ensayo de células (LT) y de 73.91 para el ensayo del ratón lactante (STa-H), que es lo esperado en este tipo de ensayos. Echeverría P., y cols, encontraron que solo del 82 al 85 % de las cepas que hibridizaron con sondas radioactivas fueron positivas a los ensayos biológicos.

Aún cuando los ensayos biológicos resultan menos sensibles para detectar a las cepas enterotoxigénicas que las sondas moleculares, estos ensayos son considerados como estandar de oro para determinar si las cepas están sintetizando toxinas biológicamente activas, por otro lado que las cepas posean los genes *ent* y no los esten expresando podrían ser estudiadas utilizando anticuerpos poli o monoclonales, para así determinar si la toxina se encuentra presente pero no es funcional.

No se descarta la posibilidad de que algunas cepas de

las detectadas por hibridación con sondas radioactivas bien pudieran no estar sintetizando la toxina biológicamente activa, por lo que no son detectadas con ensayos biológicos.

Desde el punto de vista clínico los resultados obtenidos nos indican por un lado que E.coli enterotoxigénica puede ser aislada tanto de casos con diarrea como de casos sin diarrea, por lo que la identificación de estas cepas no es muy significativa en los casos de diarrea aguda, por lo que no es indispensable determinar este mecanismo de patogenicidad en un laboratorio clínico, y por otro lado, que los estudios transversales de la diarrea aguda no proporcionan información adecuada respecto a los agentes etiológicos de la diarrea, por lo que deben efectuarse estudios longitudinales. En la literatura se encuentran estudios como el de Calva J. y cols., quienes reportan una incidencia alta de infecciones asintomáticas por Campylobacter jejuni en niños mexicanos.

En cuanto a los resultados de serología fué muy claro que la identificación de serotipos conocidos en laboratorios clínicos fueron similares a los reportados con anterioridad; la identificación de cepas con estos serotipos es mayor en el grupo de menores de 2 años (61.9 % en nuestro trabajo) y en el siguiente grupo en donde también se identificó con frecuencia alta fué en el de niños de 2 a 5 años ( 28.5% ). Así mismo el hecho de que se identificara en el 76.19 % de los niños con diarrea y solo en el 19.04 de los controles,

estableció una relación de estos serotipos encontrados con la diarrea de niños menores de 5 años. La ausencia de estos serotipos entre las cepas aisladas de los grupos de mayor edad podría estar relacionada con una posible inmunidad local en estos grupos.

## CONCLUSIONES

- Las sondas clonadas obtenidas para la identificación de cepas enterotoxigénicas de E.coli fueron tan específicas y sensibles como las sintéticas radioactivas.
- Las sondas radioactivas fueron más específicas y sensibles que las sondas enzimáticas, y tal parece que los ensayos con sondas enzimáticas requieren aún de estandarización con respecto a algunos parámetros.
- Los ensayos biológicos son menos sensibles y específicos que los ensayos moleculares con sondas radioactivas, pero no deben ser sustituidos por los ensayos moleculares ya que detectan la producción de toxina biológicamente activa.
- El inconveniente principal en los ensayos con sondas radioactivas es el empleo de isótopos con una vida media tan corta, además del riesgo que conlleva el trabajar con éstos, por lo tanto creemos que los ensayos con sondas enzimáticas deben ser optimizados, ya que estas sondas se pueden mantener en refrigeración hasta 6 meses sin menoscabo de su sensibilidad y especificidad.
- El empleo de sondas radioactivas o enzimáticas solo es recomendable para el estudio epidemiológico de gran número de cepas, y no lo es para la identificación de estas cepas en laboratorios clínicos ya que resultarían demasiado onerosos en este caso.

- La identificación de serotipos reconocidos como patógenos estableció una buena relación de éstas con la diarrea aguda infecciosa en los niños menores de 5 años. Sin embargo siempre será indispensable que los sueros empleados para la identificación de estas cepas, sean comprobados con las cepas tipo específicas para evitar el utilizar antisueros mal preparados que nos den resultados falsos .

- La identificación de cepas pertenecientes a serotipos relacionados con la diarrea aguda, no es suficiente para establecer que estas cepas posean mecanismos de patogenicidad.



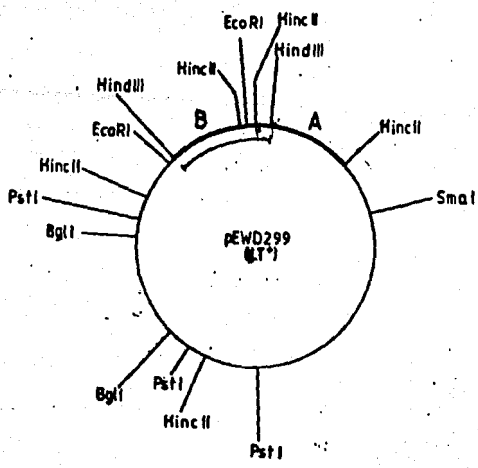


Diagrama No. 1 Plásmido EWD299 donde se señalan algunos sitios de restricción.

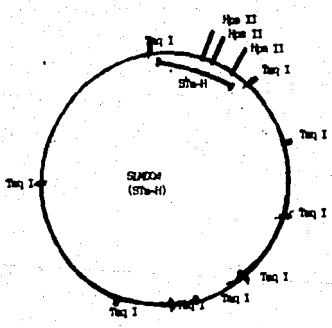


Diagrama No. 2 Plásmido SIM004 donde se señalan los sitios de restricción para Taq I, y los sitios de restricción para Hpa II dentro del fragmento Sma-H.

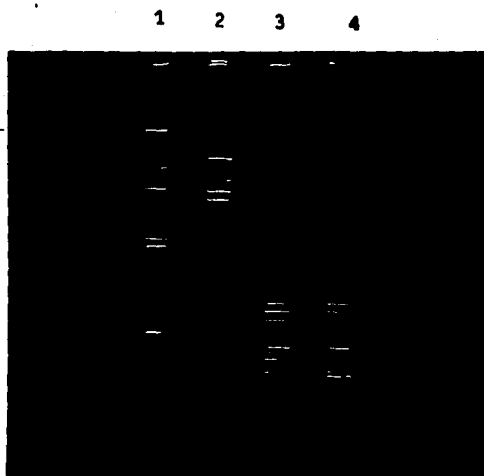


Figura No. 1 Electroforésis en Gel de Agarosa al .7 % . Carril 1 Fago Lambda + Hind III como marcador de peso molecular. Carril 2 Plásmido EMD299 + Hinc II. Carril 3 Plásmido SLM004 + Taq I. Carril 4 Plásmido pBR322 + Taq I.

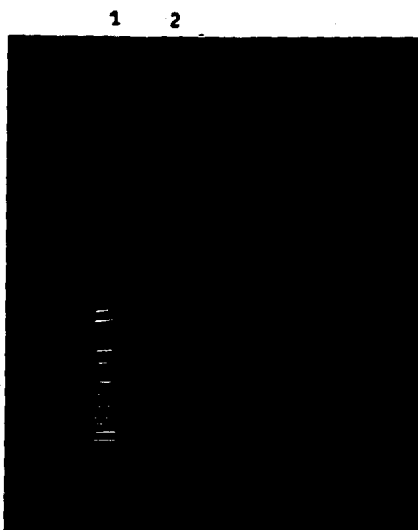


Figura No. 2 Electroforésis en Gel de Acrilamida al 8 % . Carril 1 Plásmido pBR322 + Hpa II. Carril 2 Fragmento Taq I de plásmido SLM004 (3') + Hpa II.

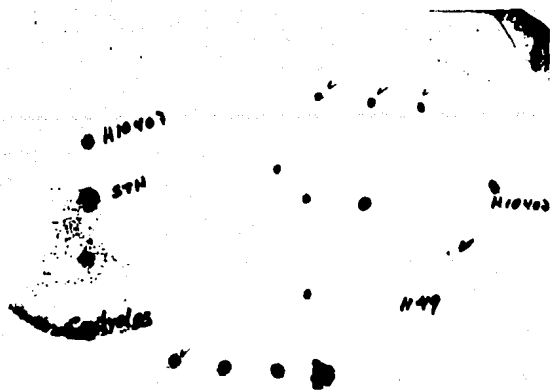


Figura No. 3 Autorradiografía de la reacción de hibridización en papel Whatmann.  
 A) Sonda LT y B) Sonda STa-H.

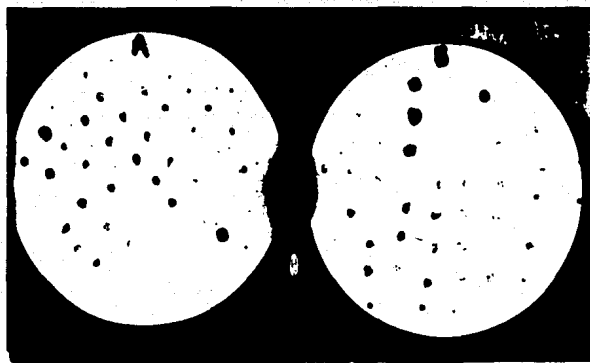
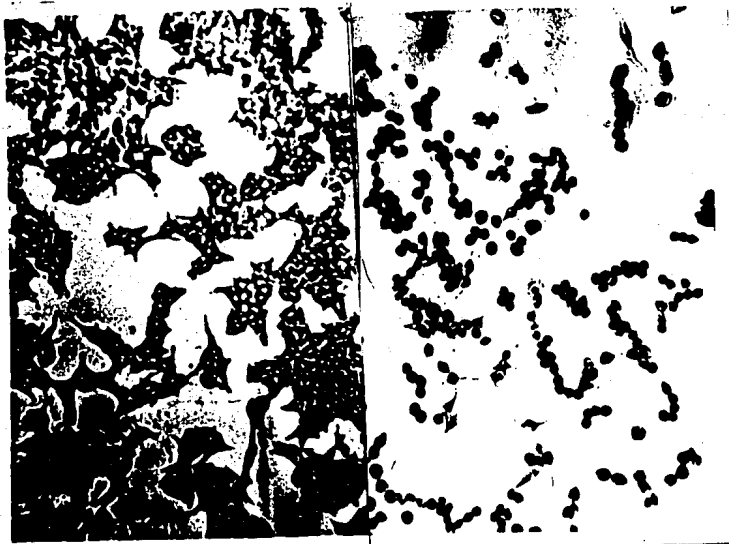
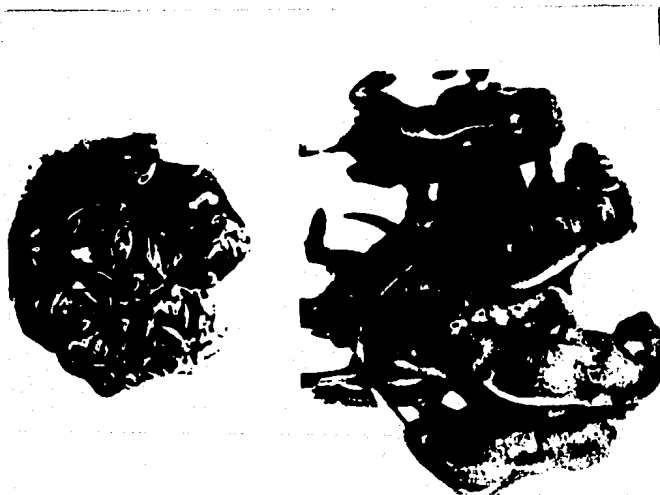


Figura No. 4 Hibridización con sonda enzimática sobre membrana de nitrocelulosa.  
 A) Sonda LT y B) Sonda STa-H.



**Figura No. 5 Detección de Toxina LT en células Y1. Izquierda células normales, derecha : con sobrenadante de un cultivo de una cepa productora de toxina LT.**



**Figura No. 6 Detección de Toxina ST en ratones lactantes. Izquierda, intestinos con líquido acumulado. Tomado de Dupont H.L. 1979.**

## BIBLIOGRAFIA

1. Alderete J.F., Robertson D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect.Immun.1978;19:1021-1030.
2. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. R.E. Buchanan & N.E. Gibbons Eds. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1974. pp.290-293.
3. Berkner K.L. Falk W.R. Polynucleotide kinase exchange reactions. J.Biol.Chem. 1977;252:3176-3184.
4. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Ac. Res. 1979;7:1513-1523.
5. Bolivar F., Rodriguez M., Betlach M., Boyer H. Construction and characterization of new cloning vehicles. Gene 1977;2:95-113.
6. Bradley S.B. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. Ann. Rev. Microbiol. 1979;33:67-94.
7. Clearly T.G., Pickering L.K. Update on infectious diarrhea en : Aronoff S. Advances in Pediatric Infectious Diseases. Year Book. Medical Publisher Inc. Chicago 1986;1:117-143.
8. Clements J.D., Yancey R.J., Finkelstein R.A. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. Infect.Immun. 1980;29:91-97.
9. Clements J.D., Flint D.C., Klipstein F.A. Immunological and physicochemical characterization of heat-labile enterotoxins isolated from two strains of Escherichia coli. Infect.Immun. 1982;38:806-809.
10. Dallas W.S., Gill D.M., Falkow S. Cistron encoding Escherichia coli heat-labile toxin. J. Bacteriol. 1979;139:850-858.
11. Dean A.G., Ching Y.C., Williams R.G., Harden L.B. Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J.Infect.Dis. 1972;125:407-411.
12. Denhardt D.T. A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res.Comm. 1966;23:641-646.

13. Donta S.T., Moon W.H., Whipps S.C. Detection of heat-stable enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue. *Science* 1974;183:334-336.
14. Dreyfus L.A., Frantz J.C., Robertson D.C. Chemical properties of heat-stable toxins produced by enterotoxigenic Escherichia coli of different host origins. *Infect. Immun.* 1983;42:539-548.
15. DuPont H.L., Formal S.B., Hornick R.B., Snyder M.J., Lobonati J.F. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *New.Engl.J.Med.* 1971;285:1-9.
16. DuPont H.L., Pickering L.K. Diarrhea of travellers. *En Infection of the Gastrointestinal Tract.* Plenum Publishing Co. 1980 pp.215-216.
17. Echeverria P., Murphy J.R. Enterotoxigenic Escherichia coli carrying plasmids for antibiotic resistance and enterotoxin production. *J. Infect. Dis.* 1980;142:273-278.
18. Echeverria P., Leksomboon U., Chaicumpa W., Seriwatana J., Tirapat C., Rowe B. Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic Escherichia coli in homes of children with diarrhea. *Lancet* 1984;i:63-65.
19. Echeverria P., Seriwatana J., Patamaroj U., Moseley S.L., McFarland A., Chityothin O., Chaicumpa W. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, water and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1984;19:489-491.
20. Echeverria P., Seriwatana J., Taylor D.N., Tirapat C., Chaicumpa W., Rowe B. Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic Escherichia coli in a longitudinal study of villages in Thailand. *J. Infect. Dis.* 1985;151:124-130.
21. Echeverria P., Taylor D.N., Seriwatana J., Chatkaeomrakot A., Khunvalert V., Sakuldapeera T., Smith R.H. A comparative study of enterotoxin gene probes and tests for toxin production to detect enterotoxigenic Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 1986;153:255-260.
22. Echeverria P., Seriwatana J., Taylor D.N., Changchawalit S., Smyth C.S., Twohig J., Rowe B. Plasmids coding for colonization factor antigens I and II, heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin A2 in Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1986;51:626-630.

23. Eisenstein B.I., Engleberg N.C. Applied molecular genetics: New tools for microbiologists and clinicians. *J. Infect. Dis.* 1986;153:416-430.
24. Elwell L.P., Shipley P.L. Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 1980;34:465-496.
25. Evans D.J., Evans D.G. Direct serologic assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.* 1977;16:604-609.
26. Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed. Ewing W.H. Elsevier New York. 1986 pp92-134.
27. Fielf M., Graf L.H., Laird W.J., Smith T.L. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978;75:2800-2804.
28. Frantz J.C., Robertson D.C. Immunological properties of Escherichia coli heat-stable enterotoxins. Development of a radioimmunoassay specific heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. *Infect. Immun.* 1981;33:193-198.
29. Georges M.C., Wachsmuth I.K., Berkness K.A., Moseley S.L., Georges A.J. Genetic probes for enterotoxigenic Escherichia coli isolated from childhood diarrhea in the Central African Republic. *J. Clin. Microbiol.* 1983;18:199-202.
30. Giannella R.A., Drake K.W., Luttrell M. Development of a radioimmunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. *Infect. Immun.* 1981;33:186-192.
31. Gill D.M., Clemens J.D., Robertson D.C., Finkelstein R.A. Subunit number and arrangement in Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 1981;33:677-682.
32. Gross R.J., Scotland S.M., Rowe B. Enterotoxin testing of Escherichia coli causing epidemic enteritis in the United Kingdom. *Lancet* 1979;ii:1629-1630.
33. Gross R.J., Holmes R. The Enterobacteriaceae. In Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 7th. Ed. Vol. 2 G.S. Wilson, A.A. Miles, M.T. Parker Eds. E. Arnold London. 1983 pp. 272-284.

34. Gross R.J., Rowe B. Serotyping of Escherichia coli.  
 In The Virulence of Escherichia coli. M Sussman Ed.  
 Academic Press London 1985, pp.345-364.
35. Grunstein M., Hogness D.S. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contains a specific gene.  
 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1975;72:3961-3965.
36. Guerrant R.L., Brunli L.L., Schnaitman T.C. Cyclic adenosin monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology. A rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxin of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect.Immun.1974;20:320-327.
37. Guerrant R.L., Moore R.A., Kirschenfold B.A. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. New E.J.Med. 1975;293:567-573.
38. Gyles G., So M., Falkow S. The enterotoxin plasmids of Escherichia coli.  
 J. Infect. Dis. 1974;130:40-49.
39. Gyles G., Palchaudhuri S., Maas W.K. Naturally occurring plasmids carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. Science 1977;198:198-199.
40. Gyles G., Falkow S., Rollins L. In vivo transfer of an Escherichia coli enterotoxin plasmid possessing genes for drug resistance.  
 Am. J. Vet. Res. 1978;39:1438-1441.
41. Hill W.E., Madden J., McCardell B.A., Shah D.B., Jagow J.A., Payne W.L., Boutin B.K. Foodborne enterotoxigenic Escherichia coli detection and enumeration by DNA colony hybridization.  
 Appl. Environ. Microbiol. 1983;45:1324-1330.
42. Hill W.E., Payne W.L. Genetic methods for the detection of microbial pathogens. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization: collaborative study.  
 J. Assoc. Off. Anal. Chem.1984;67:801-807.
43. Hill W.E., Payne W.L., Zon G., Moseley S.L. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detecting heat-stable enterotoxin-producing Escherichia coli by DNA colony hybridization.  
 Applied. Environ. Microbiol. 1985;50:1187-1191.
44. Holmgren J., Lange S., Lonroth I. Reversal of cyclic AMP mediated intestinal secretion in mice by chlorpromazine. Gastroenterology 1978;75:1105-1108.



45. Holmgren J., Svennerholm A.M. Immunologic cross reactivity with Escherichia coli enterotoxin and cholera toxin A and B subunits. *Curr. Microbiol.* 1979;2:55-58.
46. Holmgren J. Toxins affecting intestinal transport processes. En *The virulence of Escherichia coli.* M.Sussman Ed. 1985 Academic Press. London. pp 179-191.
47. Honda T., Taga S., Takeda Y., Miwarani T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Clin Microbiol.* 1981;13:1-5.
48. Información estadística sobre enfermedades transmisibles. Boletín Mensual de Epidemiología. Sector Salud México. 1986;1:56-59.
49. Kapitany R.A., Forsyth G.W., Scoot A., Mckensie S.F., Worthington R.W. Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxin produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1979;26:91-97.
50. Kennedy R.P., Florde J.J., Petersdorf R.G. Studies on the epidemiology of Escherichia coli infections. IV. Evidence for nosocomial flora. *J. Clin. Invest.* 1965;44:193-201.
51. Kincaid R.L., Nigthingale M.J. A rapid non radioactive procedure for plaque hybridization using biotinylated probes prepared by random primed labeling. *Biotech* 1988;6:42-49.
52. Klipstein F.A., Engert R.F. Immunological interrelationships between cholera toxin and heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria. *Infect. Immun.* 1977;18:11-117.
53. Klipstein F.A., Engert R.F., Houghten R.A., Rowe B. Enzyme-linked immunosorbent assay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *J. Clin Microbiol.* 1984;19:798-805.
54. Lallier R., Lariviere S., St.Pierre S. Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Rapid method of purification and some characteristics of the toxin. *Infect. Immun.* 1980;28:469-474.
55. Lanata C.F., Kaper J.B., Baldini M., Black R.E., Levine M. Sensitivity and specificity of DNA probes with the stool blot technique for detection of Escherichia coli enterotoxins. *J. Infect. Dis.* 1985;152:1087-1090.

56. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotide novel nucleic acid affinity probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981;78:6633-6637.
57. Laskey R.A., Mills A.D. Enhanced autoradiographic detection of  $^{32}\text{P}$  and  $^{125}\text{I}$  using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Letters 1977;82:314-316.
58. Lathe R., Hirth De Wilde M., Harford N., Lécocq J.P. Cell free synthesis of enterotoxin of Escherichia coli from a cloned gene. Nature 1980;284:473-474.
59. Lee C.H., Moseley S.L., Moon H.W., Whipp S.C., Gyles C.L., So M. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiology studies of enterotoxigenic Escherichia coli heat-stable toxin II producers. Infect. Immun. 1983;42:264-268.
60. Lindholm L., Holmgren J., Wilstrom M., Karlsson U., Anderson K., Lücke N. Monoclonal antibodies to cholera toxin with special reference to cross reactions with Escherichia coli heat-labile toxin. Infect. Immun. 1983;40:570-576.
61. Maas R. An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. Plasmid 1985;10:299996-298.
62. Mazaitis A.J., Maas R., Maas W.K. Structure of a naturally occurring plasmid with genes of enterotoxin production and drug resistance. J. Bacteriol. 1981;145:97-105.
63. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D.G. Nucleotide sequence of the right operator of phage . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975;72:11184-1188.
64. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1982.
65. McConnell M.M., Willshaw G.A., Smith H.R., Scotland S.M., Rowe B. Transposition of ampicillin resistance to an enterotoxin plasmid in an Escherichia coli strain of human origin. J. Bact.1979;139:346-355.
66. McConnell M.M., Smith H.R., Willshaw G.A., Scotland S.M., Rowe B. Plasmid coding for heat-labile enterotoxin production isolated from Escherichia coli 078: Comparison of properties. J. Bact.1980;143:158-167.

67. McConnell M.M., Smith H.R., Willshaw G.A. Field A.M., Rowe B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic Escherichia coli comparison of their properties. *Infect. Immun.* 1981;32:927-936.
68. Manual de Instrucciones para preparar sondas radioactivas. (Random Primer Extension Labeling System, NEP-103). DuPont, New England Nuclear Products.
69. Manual de Instrucciones para hibridizar con sondas enzimáticas (SNAP). Biotechnology System NEN. Molecular Biosystems Inc. San Diego CA.
70. Meinkoth J., Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Ann. Biochem.* 1984;138:267-284.
71. Meyer J.A., Sánchez D., Ellsall L.P., Falkow S. Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 1976;127:1529-1537.
72. Moon H.W., Sorensen D.K., Sautter J.H. Escherichia coli infection of the ligated intestinal loop of the new born pig. *Am. J. Vet. Res.* 1966;27:1317-1321.
73. Moon H.W. Whipp S.C., Engstrom G.W. Response to the rabbit ileal loop to cell free products from Escherichia coli enteropathogenic for swine. *J. Infect. Dis.* 1970;121:182-187.
74. Moseley S.L. Huq I., Alim A.R., So M., Samadpour M., Falkow S. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization. *J. Infect. Dis.* 1980;142:892-895.
75. Moseley S.L., Echeverria P., Seriwatana J., Tiripat C., Chaicumpa W., Sakuldaipeara T., Falkow S. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. Infect. Dis.* 1982;145:863-869.
76. Moseley S., Hardy J.W. Huq I., Echeverria P., Falkow S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1983;39:1167-1174.
77. Moseley S.L., Samadpour-Motalebi M., Falkow S. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in Escherichia coli H-10407. *J. Bacteriol.* 1983;156:441-443.

78. Murray B.E., Mathewson J.J., DuPont H.L., Hill W.E. Utility of oligodeoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 1987;155:809-811.
79. Nalin ., McLaughlin J.C., Raham M., Yunus M., Curtin G. Enterotoxigenic Escherichia coli and idiopathic diarrhea in Bangladesh. Lancet 1975;ii:1116-1119.
80. Oprandy J.J., Thornton S.C., Gardiner C.H., Burr D., Bachelor R., Burgeois J.A. Alkaline phosphatase conjugated oligonucleotide probes for toxigenic Escherichia coli in travelers to South America and West Africa. J. Clin. Microbiol. 1988;26:92-95.
81. Patamaroj V., Seriwatana J., Echeverria P. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from swine with diarrhea in Thailand by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. J. Clin. Microbiol. 1983;18:1429-1431.
82. Pardue M.L., Gall J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA of cytological preparations. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1969;64:600-604.
83. Picken R.N., Mazaitis A.J., Maas W.R., Rey M., Heyneker H. Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of Escherichia coli. Infect. Immun. 1983;43:269-275.
84. Pickett C.L., Twidy E.M., Belisle W.B., Holmes R.K. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Bacteriol. 1986;165:348-352.
85. Protocolo de Instrucciones para fijar ADN en membrana de nitrocelulosa. Department of Medical Microbiology. University of Ghotenburgh, Sweden.
86. Rigby P.J.W., Dieckmann M., Rhodes C., berg P., Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polimerase I. J. Mol. Biol. 1977;113:237-251.
87. Robertson D.C., McDonel J.L., Dorner T. E.coli heat-labile enterotoxin. En Cholera and related diarrheas. Eds O. Duchterlony y J. Holmgren. Kegel, Basel. 1983 pp 65-126.
88. Romick T.L., Lindsay J.A., Busta F.F. A visual DNA probe for detection of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization. Lett. Appl. Microbiol. 1987;5:87-90.

89. Ronnberg B., Wadstrom T. Rapid detection by a coagglutination test of heat-labile enterotoxin in cell lysates from blood agar grown Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 1983;17:1021-1025.
90. Rosenberg M.L., Kaplan J., Wachsmuth J.K., Will J.G., Gangarosa E.J. Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic Escherichia coli. Ann. Int. Med. 1977;86:714-718.
91. Rowe B., Taylor J., Bettelheim K.A. An investigation of travelers diarrhoea. Lancet 1970; i:1-5.
92. Russell C., Melville T.H. Bacteria in the human mouth. J. Appl. Bacteriol. 1978;44:163-181.
93. Sack D.A., Sack R.B. Test for enterotoxigenic Escherichia coli using adrenal cells Y1 in miniculture. Infect. Immun. 1975;11:334-336.
94. Sack D.A., McLaughlin J.C., Sack R.B., Orskov F., Orskov I. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients at a hospital in Dacca. J. Infect. Dis. 1977;135:275-280.
95. Sack D.A., Huda S.S., Neagi P.K.B., Daniel R.R., Spira W.M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for Vibrio and Escherichia coli heat-labile enterotoxins and antitoxins. J. Clin. Microbiol. 1980;11:35-40.
96. Sack R.B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Annu. Rev. Microbiol. 1975;29:331-351.
97. Sayler G.S., Shields M.J., Tedford E.T., Bree A., Hooper S.W., Strotkin K.M., Davies J.W. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 1985;49:1295-1303.
98. Schaberg D.R., Tompkins L.S., Falkow S. Use of agarose gel electrophoresis of plasmids deoxyribonucleic acid to fingerprint gram negative bacilli. J. Clin. Microbiol. 1981;13:1105-1108.
99. Scotland S.M., Gross R.J., Cheasty T., Rowe B. The occurrence of plasmid genes for both enterotoxin production and drug resistance in Escherichia coli of human origin. J. Hyg. Camb. 1979;79:395-403.

100. Scotland S.M., Gross R.J., Rowe B. Tests for enterotoxin production, enteroinvasion and adhesion in diarrhoeagenic Escherichia coli. E The virulence of Escherichia coli M.Sussman Ed. Academic Press. London 1985 pp. 395-406.
101. Seriwatana J., Echeverria P., Escamilla J., Glass G., Huq I., Rockhill R., Stoll B.J. Identification of Escherichia coli isolated from different sources. Infect. Immun. 1979;24:606-610.
102. Seriwatana J., Echeverria P., Taylor D.N., Sakuldapeera T., Changchawalit S., Chivoratanond O. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli with synthetic alkaline phosphatase conjugated oligonucleotide DNA probes. J.Clin.Microbiol. 1987;25:1438-1441.
103. Seriwatana J., Echeverria P., Escamilla J., Glass G., Huq I., Rockhill R., Stoll B.J. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli in patients with diarrhea in Asia with three enterotoxin gene probes. Infect. Immun. 1983;42:152-155.
104. Sethabutr O., Echeverria P., Hauchalay S., Taylor D.N., Leksomboon U. A non radioactive DNA probe to identify Shigella and and enteroinvasive Escherichia coli in stools of children with diarrhea. J. Gen. Microbiol. 1968;52:319-334.
105. Shore E.G., Dean A.G., Holik K.J. Enterotoxin producing. Escherichia coli and diarrheal disease in adult travelers. J. Infect. Dis. 1974;129:577-588.
106. Segel Sidney. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas México 1988 pp:64-68; 84-86; 120-121; 188-189.
107. Smith H.R. Scotland S.M., Rowe B. Genetics of Escherichia coli virulence. En The Virulence of Escherichia coli. M. Sussman Ed. Academic Press, London, 1985 pp:227-271.
108. Smith H.W., Halls S. The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that control enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. 1968;52:319-334.
109. Smith H.W., Linggoof M.A. Observation on the pathogenic properties of the K88 Hly and Ent plasmid of Escherichia coli with particular reference to porcine diarrhoea. J.Med.Microbiol. 1971b;4:467-485.
110. Smith H.W., Linggood M.A. The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 1971a;4:301-305.

111. Smith R.D., Trepod C.M., Tu E. Synthetic oligonucleotide hybridization probes for enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Immunopathology 1988;674:527-532.
112. So M., Dallas W.S., Falkow S. Characterization of an Escherichia coli plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. Infect. Immun. 1978;21:405-411.
113. So M., Heffron F., McCarthy B.J. The Escherichia coli gene encoding heat-stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS1. Nature 1979;277:4533-4536.
114. So M. McCarthy B.J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn 1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic Escherichia coli strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980;77:4011-4015.
115. So M., Crosa J.H., Falkow S. Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. J. Bacteriol. 1980;143:158-167.
116. Sommerfelt H., Svennerholm A.M., Kolland K.H., Haukanes B.I., Bjorvaln B. Comparative study of colony hybridization with synthetic oligonucleotide probes and enzyme-linked immunosorbent assay for identification of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 1988;26:530-534.
117. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 1975;98:503-517.
118. Southern E.M. Gel electrophoresis of restriction fragments. En Methods in Enzymology. R.V.W. Eds. Academic Press New York. Vol 68:151-176.
119. Sussman M. Escherichia coli in Human and Animal Diseases. En The Virulence of Escherichia coli. M.Sussman Ed. Academic Press. London 1985:7-45.
120. Svennerholm A.M. Wikstrom M., Lindblad M., Holmgren H. Monoclonal antibodies against Escherichia coli heat-stable toxin (STa) and their use in diagnostic ST ganglioside GM-1 enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 1984;12:585-590.

121. Takeda Y., Takeda T., Yano T., Yamamoto K., Miwarani T. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 1979;25:978-985.
122. Thompson M.R., Jordan R.L., Luttrell M.A., Brandwein H., Kaper J.B., Levine M.M., Giannella R.A. Blinded two laboratory comparative analysis of Escherichia coli heat-stable enterotoxin production by using monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmune assay, suckling mouse assay and gene probes. J. Clin. Microbiol. 1980;24:753-758.
123. Thompson M.R., Brandwein H., LaBin-Racke M., Giannella R.A. Simple and reliable enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for detection of Escherichia coli heat-stable enterotoxins. J. Clin. Microbiol. 1984;20:59-64.
124. Tsukamoto T., Kinoshita Y., Taga S., Takeda Y., Miwatani T. Value of passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 1980;12:768-771.
125. Waterson Y., Olsvik O.S., Kancke E., Boop Cha F.K. Heat-stable enterotoxin producing Escherichia coli strain isolated from dogs. J. Clin. Microbiol. 1988;26:2564-2566.
126. Willshaw G.A., Barclay E.A., Smith H.R., McConnell M.M., Rowe B. Molecular comparison of plasmids encoding heat-labile enterotoxin isolated from Escherichia coli strains of human origin. J. Bacteriol. 1980;143:168-175.
127. Wolk W., Svennerholh A.M., Holmgren J. Isolation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin by affinity chromatography. Curr. Microbiol. 1980;3:339-344.
128. Yam W.C., Lung M.L., Ng M.H. Evaluation and optimization of DNA filter assay for direct detection of enterotoxigenic Escherichia coli in the presence of stool coliforms. J. Clin. Microbiol. 1986;24:1149-1151.
129. Yamamoto T., Yokota T. Cloning of deoxyribonucleic acid regions encoding a heat-labile and heat-stable enterotoxin originating from an enterotoxigenic Escherichia coli strain of human origin. J. Bacteriol. 1980;143:652-660.



130. Yamamoto T., Yokota T., Kaji A. Molecular organization of heat-labile enterotoxin genes originating in Escherichia coli of human origin and construction of heat-labile toxoid producing strains. J. Bacteriol. 1981;148:983-987.
131. Yamamoto T., Yokota T. Plasmids of enterotoxigenic Escherichia coli H-10407. Evidence for two heat-stable enterotoxin genes and a conjugal transfer system. J. Bacteriol. 1983;153:1352-1360.
132. Yamamoto T., Nakagura T., Miyata T., Kaji A., Yokota T. Evolution and structure of two ADP-ribosylation enterotoxins of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and Cholera toxin. FEBS Letters 1984;169:241-246.