



29
29

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

**"ESTUDIO DE LA VARIACION COLONIAL DE ESCHERICHIA
COLI DE ORIGEN DIARREICO Y SU RELACION
CON LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS"**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Rosa Herlinda López Cossío

Wiliado Alamilla Mendoza

Director de Tesis: M.C. Clara Inés Alvarez Manrique

Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx. a 14 de Nov. de 1986



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.

I N D I C E

1. INTRODUCCION	
1.1. Generalidades. Aspectos económicos.....	1
1.2. Factores bacterianos involucrados en el proceso - diarreico en lechones neonatos.....	3
1.2.1. Las adhesinas.....	3
.1. Mecanismo de adhesión.....	4
.2. Naturaleza de los receptores.....	6
1.2.2. La colonización.....	9
.1. Colonización fimbrial.....	9
.2. Colonización capsular.....	10
1.2.3. Las toxinas bacterianas. Mecanismo de acción y naturaleza de sus receptores.....	12
1.3. Agentes coliformes enterotoxigénicos involucrados en la diarrea de los lechones neonatos.....	14
1.3.1. <u>Klebsiella sp.</u>	15
1.3.2. <u>Escherichia coli</u>	18
.1. Clasificación bioquímica.....	18
.2. Clasificación serológica.....	18
.3. Asociación de las adhesinas y los serogru- pos O.....	19
.4. Enterotoxinas.....	25
.4.1. Asociación de las adhesinas y la pro- ducción de enterotoxinas.....	26
.4.2. Mecanismo de acción.....	28
.4.3. Formas de detección.....	35
.5. Epidemiología.....	37
.6. Patogenia.....	38
1.4. Variación colonial.....	41
1.5. Justificaciones.....	44

2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIALES Y METODOS.....	46
3.1. Origen de las muestras.....	46
3.2. Aislamiento colonial.....	46
3.3. Producción de las enterotoxinas de <u>E. coli</u>	47
3.3.1. Prueba del ratón lactante.....	47
3.3.2. Prueba de coagulación estafilococal.....	49
3.3.3. Método de cultivo directo-G _{M1} -ELISA.....	52
4. RESULTADOS.....	55
5. DISCUSION.....	72
6. CONCLUSIONES.....	77
Apéndice.....	78
Bibliografía.....	80

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

La incidencia de mortalidad en los lechones recién nacidos es considerable y en la actualidad dentro de los factores que influyen en ella se consideraron: el peso al nacer, el número de lechones en la camada, los trastornos congénitos y hereditarios, la edad al destete, el grado de cosanguinidad, las enfermedades y los aspectos nutricionales tanto de la hembra como del neonato (Uruchurtu y cols., 1976; -- Uruchurtu y Doportó, 1975).

La colibacilosis entérica, provocada por Escherichia coli enteropatógena (EPEC), ó E. coli enterotoxigénica (ETEC), ó E. coli enteroadherente (EAEC), es una enfermedad infecciosa del cerdo importante y de gran significado a nivel de lechones neonatos aún cuando también ocurre típicamente en cerdos destetados a partir de las dos o tres horas ó -- hasta algún tiempo después del destete (Wilson, 1981).

A pesar de la importancia económica aceptada de la colibacilosis entérica en los Estados Unidos de Norteamérica, en donde Bergeland (1980; citado por Wilson, 1981) reportó -- que E. coli fué el agente etiológico en el 48% de los casos de diarrea neonatal; no se conocen las pérdidas anuales reales (en dólares, número de animales o de producción) y no son disponibles los registros para recopilar tales datos. Cuando los registros detallados son disponibles incluyen cuadros de mortalidad y no se incluyen las pérdidas en la producción como resultado de la colibacilosis en

térica y el costo del tratamiento. Cuando se mantienen registros completos de mortalidad, los diagnósticos no se dan ó son de precisión dudosa. Se ha demostrado que del 10 al 25% de los lechones que nacen vivos mueren antes de las 8 semanas de vida. La mayoría de las muertes de los lechones durante la primera semana, se deben principalmente a la colibacilosis entérica (Barnum, 1967).

De forma similar, en México, los estudios realizados sólo proporcionan porcentajes de mortalidad y no se cuenta con datos publicados de pérdidas reales (en pesos, número de animales ó de producción).

A pesar de que la porcicultura ha tenido avances notables en instalaciones, nutrición y mejoramiento en los piés de cría (Rivera, 1977), las cifras de mortalidad en granjas con sistemas de explotación común, van del 23 al 28.37% -- (Uruchurtu y Doporto, 1975). En otro estudio realizado en el Estado de Hidalgo, México; se observó que el 63.5% de las muertes ocurrieron durante la primera semana de vida y la colibacilosis entérica como causa de mortalidad, ocupó el 15.5% (Trujano y Méndez, 1981).

Estas cifras adquieren relevancia para el porcicultor ya que ocasionan pérdidas económicas debido al bajo número de cerdos destetados.

1.2. Factores bacterianos involucrados en el proceso diarreico en lechones neonatos.

El agente bacteriano que causa mayores pérdidas económicas durante la primera semana de vida es E. coli, la cual puede ser adquirida por el cerdo inmediatamente después de nacer por vía digestiva y pasar a formar parte de la flora intestinal normal (Rivera, 1977).

Los síndromes entéricos presumiblemente están asociados -- con un incremento anormal de la bacteria enteropatógena en el intestino delgado. Se sabe que el ácido gástrico destruye muchas bacterias que pasan por el estómago y que éste -- ácido en el intestino delgado superior inhibe parcialmente su crecimiento en ésta área. Sin embargo, en los primeros días de vida del animal la acidéz gástrica es relativamente baja, lo que explica en parte la alta susceptibilidad -- de los animales recién nacidos a los agentes bacterianos -- (Barnum, 1967).

Dentro de los factores de origen bacteriano que contribuyen a desencadenar el proceso diarreico se consideran:

1.2.1. Las adhesinas

La superficie de las células bacterianas está cubierta con sustancias capaces de producir reacciones inmunológicas. -- Estos antígenos de superficie se clasifican como ADHESINAS las cuales son responsables de la adhesión de las células al epitelio de la mucosa (Gaastra y de Graaf, 1982).

Las adhesinas han sido identificadas como apéndices no flagelares, filamentosos y protéicos; las terminologías más comunes para éstas estructuras son: Fimbria (=fibers) y Pili (=hairs) (Brinton, 1965).

Las fimbrias son más delgadas y más numerosas que los flagelos y le confieren propiedades adhesivas a las bacterias incluyendo la actividad hemoaglutinante. Tanto Brinton (1965) como Duguid y cols. (1966), distinguen varios tipos de fimbrias entre la Enterobacteriaceae basados principalmente en sus propiedades morfológicas y hemoaglutinantes.

La mayoría de las cepas de E. coli producen fimbrias tipo I, éstas permiten a la E. coli adherirse a una variedad de células eucarióticas; sus propiedades adhesivas se inhiben por la D-manosa; son las adhesinas más universales de E. coli. Estas propiedades pueden ayudar a colonizar las superficies epiteliales y por lo tanto contribuir con la patogenicidad. Otra clase de fimbria de E. coli es la caracterizada por cierta especificidad de huésped. En contraste con la fimbria tipo I, ésta adhesina parece producirse exclusivamente sobre las cepas enterotoxigénicas; se adhieren al epitelio intestinal de un número muy limitado de especie animal y aglutinan específicamente ciertas especies de eritrocitos. En contraste con la fimbria tipo I, su actividad hemoaglutinante no se inhibe por la D-manosa (Gaagtra y de Graaf, 1982).

.1. Mecanismo de adhesión.

Aunque no hay duda de que las adhesinas de las cepas ente-

ropatógenas le confieren propiedades adhesivas a la bacteria, poco se conoce del mecanismo de adhesión. Se supone que están involucradas características de superficie celular tales como carga y propiedades hidrofóbicas. Recientemente Rutter y Vincent (1980), han revisado los aspectos físicoquímicos de la adhesión. La superficie, tanto de la célula procariótica como de la eucariótica, está cargada negativamente. Las fuerzas electrostáticas repulsivas entre éstas superficies celulares, pueden superarse por fuerzas atractivas de largo y de corto alcance. Las uniones específicas de la fimbria a los receptores pueden vencer las fuerzas repulsivas entre bacteria y célula epitelial. Se ha demostrado el papel de las interacciones hidrofóbicas de corto alcance en las propiedades adhesivas de las cepas enterotoxigénicas fimbriadas (Smyth y cols., 1978; Wadström y cols., 1980; citados por Gaastra y de Graaf, 1982). Smyth y cols. (1978), sugieren que la reducción en el potencial eléctrico de la superficie celular, se debe al ocultamiento de la carga de los antígenos K polisacáridos y lipopolisacáridos por las adhesinas con características hidrofóbicas que promueven la adhesión y entonces las uniones hidrofóbicas pueden involucrarse en la interacción de éstas adhesinas con la mucosa intestinal.

Cravioto y cols. (1979), describieron la adherencia de E. coli a las células HEP-2 de cultivo de tejido. McNeish y cols. (1975), observaron la adherencia de la misma bacteria a las células mucosas del intestino delgado fetal humano. Carvalho y cols. (datos no publicados; citado por Sca-

letsy y cols., 1984), encontraron que muchas cepas de E. coli se adhieren a las células HeLa y que ocurren dos modos de unión. En el primero, la bacteria se vé alrededor ó cubriendo toda la superficie de la célula; éste modelo se llama adherencia difusa (DA). En la segunda clase de unión la bacteria se une a áreas localizadas de la célula en la que forman microcolonias cortadas muy clara; éste modelo se denomina adherencia localizada (LA). Por medio de la -- adición de D-manosa al medio de cultivo fué posible distinguir entre la adherencia manosa-sensible y la manosa-resistente. También encontraron que las cepas enteropatógenas -- serogrupos O55, O86, O111ab, O119, O125, O128ab, y O142, -- generalmente muestran adherencia localizada cuando se prueba en la presencia de D-manosa. La adherencia localizada, no se demostró ni en las cepas de E. coli aisladas a partir de orina, ni en cepas de E. coli enterotoxigénicas ni en las enteroinvasivas, sólo algunas cepas mostraron adherencia difusa; la adherencia localizada y la adherencia difusa se detectó con algunas cepas de los serogrupos O55, -- O111 y O119 en la misma preparación. Los antígenos de factor de colonización (CFA/I y CFA/II) no se relacionaron -- con la adherencia manosa resistente y posiblemente estén -- relacionados con otro tipo de receptor (Scaletsky y cols., 1984).

.2. Naturaleza de los sitios receptores para las adhesinas

El análisis químico de las fracciones sobrenadantes de membranas de borde en cepillo adhesivas y no adhesivas de cer-

do reveló una diferencia en los perfiles glicolípidos. Ya que ésta fué la única diferencia, se supone que puede ser indicativa de la posible naturaleza del receptor para el antígeno K88. Sellwood (1980; citado por Gaastra y de Graaf, 1982), sugiere que en la adhesión están involucradas interacciones complejas y que los residuos galactosil pueden ser importantes (Tabla 1). La incapacidad del antígeno K88 soluble para aglutinar eritrocitos de cobayo, en presencia de glicoproteínas de la mucosa intestinal, sugieren que el residuo β -D-galactosil terminal está involucrado en la interacción y por lo tanto puede estar presente en el receptor para el antígeno (Gibbons y cols., 1975). Una especificidad diferente fué reportada por Anderson y cols. (1980), quienes usaron una prueba de unión in vitro, para

Tabla 1. Cadenas de carbohidratos en los receptores para las diversas adhesinas

Adhesina	Carbohidrato
K88	β -D-Gal ó Glc, Gal y Fuc ó GMI?
K99 CPA/I	GalNac β (1-4)Gal β (1-4)GlcCer 2 α -NeuAc

β -D-Gal = β -D-Galactosamina, Glc = Glucosamina, Gal = Galactosamina, Fuc = Fucosamina, GMI = Gangliósido, GalNac = N-acetilgalactosamina, GlcCer = Serilglucosamina, NeuAc = Acido neuramínico.

demostrar que el antígeno K88, forma complejos con las membranas aisladas de borde en cepillo intestinales porcinas. La formación de éstos complejos se inhibió por glicoproteí

nas con N-acetilglucosamina terminal y residuos de N-acetilgalactosamina y en menor grado con N-acetilhexosamina libre. La diferencia, en conclusión, puede resultar de los distintos sistemas de prueba; Gibbons y cols. (1975), lo estudiaron en eritrocitos de cobayo, mientras que Anderson y cols. (1980), emplearon membranas de borde en cepillo de intestino de cerdo.

Mooi y Olthof (datos no publicados; citados por Gaastra y de Graaf, 1982), encontraron que los extractos de membrana de borde en cepillo adhesivas obtenidas con tritón X-100 inhiben una prueba de ELISA desarrollada para el antígeno K88. Se concluyó que la extracción solubilizó una sustancia que pudiera ser el receptor para el antígeno. Sin embargo, la naturaleza química de ésta sustancia no se conoce aún.

Es probable la participación de glicolípidos en la adhesión, ya que se ha demostrado que éstos actúan como receptores de E. coli uropatógena en eritrocitos humanos y en células epiteliales urinarias. Los glicolípidos de las globoseries con Gal-1 → 4-Gal como receptor mínimo, actúan como receptores para la mayoría de las E. coli adherentes en las infecciones del tracto urinario superior (Källenius y cols., 1980; Leffler y Svanborg Edén, 1981; Vaisainen y cols., 1981; citados por Gaastra y de Graaf, 1982).

Los experimentos de competencia in vitro con pili 987P purificado como competidor, demostraron la presencia de receptores 987P específicos sobre la superficie de las células.

las epiteliales de las vellosidades del intestino delgado de los cerdos neonatos y de los conejos adultos (Dean e Isaacson 1982; Isaacson y cols., 1978). Dean e Isaacson (1982), describen la identificación de una fracción que contiene el receptor soluble (RCF) que se liberó de las membranas borde en cepillo de conejos adultos en almacenamiento a 4^o C. El RCF provocó agregación visible de las bacterias 987 piliadas (987P⁺) pero no de las no piliadas (987P⁻). No se observó este efecto usando conejos infantiles. La sensibilidad de la actividad cepa 987-aglutinante del RCF a la oxidación con peryodato y a la digestión con pronasa fué consistente con el receptor 987P. Dean e Isaacson (1985), describen la purificación y la caracterización de un receptor o sustancia de unión glicoprotéica para el pili 987P aislado. Este receptor contuvo 81% de carbohidratos y el 19% de aminoácidos por peso. La actividad cepa 987-aglutinante del receptor, se inhibió por aminoazúcares y por sus derivados N-acetilados, por compuestos que tienen un grupo amino libre, por altas concentraciones de sal y por las lectinas que reconocen a la D-galactosa.

1.2.2. La colonización

La adherencia y la colonización de las superficies celulares epiteliales del intestino delgado, sin invasión real de tejido, seguida por la proliferación de una gran población bacteriana, es consistente con las observaciones clínicas y experimentales de diarrea en animales y en humanos provocada por E. coli enterotoxigénica (Jones y Hutter, --

1972; Smith y Huggins, 1978).

.1. Colonización fimbrial

Estudios in vitro e in vivo han demostrado que los filamentos específicos, apéndices protéicos denominados pili o -- fimbria que están sobre la superficie de E. coli, facilitan la adhesión a la mucosa del intestino delgado y la colonización del mismo. Con estos filamentos las cepas pueden resistir la actividad del peristaltismo intestinal --- (Isaacson y cols., 1978; Morris y cols., 1982; Nagy y ---- cols., 1976; Sellwood y cols., 1975; Smith y Huggins 1978; citados por Runnels y Moon 1984).

Los antígenos piliares asociados con la E. coli enterotoxigénica de cerdos, corrientemente se denominan K88, K99, -- 987P y F41; también se asocian con ETEC de corderos y de -- becerros. Un limitado número de cepas enterotoxigénicas de origen humano producen el antígeno factor de colonización I (CFA/I) ó el CFA/II. Sin embargo, se han **observado** otras adhesinas con cierta especificidad. En contraste a la presencia de la fimbria tipo I que ocurre en la mayoría de -- las cepas de E. coli, se ha observado una correlación muy estrecha entre la presencia de adhesinas con cierta especificidad para el huésped, la producción de enterotoxina y el serotipo del patógeno (Gaastra y de Graaf, 1982) (Tabla 3 y 6).

La colonización (proliferación en números altos) por la -- ETEC en el intestino delgado de los animales, contribuye a

su virulencia (Runnels y Moon 1984). Aunque la colonización es un pre-requisito esencial para que la cepa produzca diarrea, la colonización por sí misma no provoca diarrea y además tiene que ser enterotoxigénica (Smith y Lingood 1971; citados por Wray 1984).

Probablemente, los determinantes genéticos que codifican para la síntesis de las adhesinas con cierta especificidad de huésped, excepto la 987P, se localizan en los plásmidos (Tabla 7). La información genética necesaria parece estar organizada en 1 ó 2 operones que codifican para algunos polipéptidos (Gaastra y de Graaf 1982). Algunas adhesinas pueden transmitirse de una cepa a otra en experimentos de cultivos mezclados. Morris y cols. (1982; citado por Hirst y cols., 1984), describen el antígeno fimbrial F41 el cual ha sido encontrado en E. coli ya sea en asociación con el antígeno K88 o sobre el antígeno mismo.

.2. Colonización capsular

La cápsula polisacárida bacteriana se asocia con la colonización a muchas superficies biológicas inertes (Costerton y cols., 1981). Muchas cepas de E. coli enterotoxigénicas de animales producen capsulas (antígeno K) del tipo A (termostable, mucóide, de alto peso molecular y baja movilidad electroforética hacia el ánodo) (Ørskov y cols., 1971). Estas cápsulas tipo A tienden a aumentar la capacidad colonizante de las cepas que las producen (Madad y Gyles 1982; Nary y cols., 1976; Smith y Huggins, 1978; citados por Runnels y Moon 1984). Las mutantes pilladas sin cápsula de mu

chas cepas, colonizan el intestino delgado menos intensamente que las cepas progenitoras encapsuladas. El polisacárido capsular se asocia estrechamente con el microvello ileal y el glicocalix de becerros colonizados con la EPEC encapsulada (Chan y cols., 1982; Chan y cols., 1983; citados por Runnels y Moon 1984). Reportes recientes indican que una cepa EPEC encapsulada, fué más virulenta en cerdos neonatos que su mutante sin cápsula y que el antígeno capsular demostró proteger contra el desafío con la cepa encapsulada en las vacunas dadas a las cerdas (Runnels y Moon 1984).

Los mecanismos posible por los cuales la cápsula polisacárida aumenta la colonización y la virulencia, sugeridos por Costerton y cols. (1981), incluyen: 1) mediación de la adherencia (posiblemente en conjugación con el pili), 2) estabilización de microcolonias, 3) protección a partir de productos solubles en la luz intestinal, 4) protección a partir de productos inmunes y 5) resistencia a la fagocitosis.

Algunos investigadores han encontrado que la adherencia de las EPEC a las membranas, células o secciones de tejidos aislados de la mucosa del intestino delgado, tienen correlación in vitro con la colonización in vivo (Girardeau 1980; Isaacson y cols., 1978; Sellwood y cols., 1975; citados por Runnels y Moon 1984); mientras que Runnels y Moon (1984), utilizando el sistema anterior encontraron que K99 es el mediador principal de la adhesión in vitro, ya que encontraron que la cápsula en vez de aumentar, reduce la -

adhesión de la ETEC a las células epiteliales intestinales aisladas de cerdos.

Ørskov y cols. (1985), demostraron en 3 cepas de E. coli - no fimbriadas, hemoaglutinantes, resistentes a la manosa, que poseen un antígeno Z1 directamente involucrado en la adhesión ya que obtuvieron primero mutantes de su antígeno K y mantuvo sus propiedades adherentes; otra mutante con cantidad reducida de los antígenos Z perdió su capacidad de adherirse, por lo tanto, se consideró que los antígenos Z1 (y Z2?) son los responsables de la adhesión. Por microscopía electrónica, el complejo anticuerpo-adhesina proteica, se encontró rodeando a la bacteria como una cápsula pesada. Después de teñir la cápsula, ésta apareció como una malla de filamentos muy finos. Se discute el papel de esta cápsula en la patogénesis de la enfermedad y opinan que el polisacárido glicocalix (cápsula) descrito por Knutton y cols. (1984), puede contener constituyentes que correspondan a las cápsulas proteicas.

1.2.3. Toxinas bacterianas. Mecanismo de acción y naturaleza de sus receptores.

Dentro de los factores bacterianos involucrados en el proceso diarreico están las toxinas, que son las que verdaderamente lo desencadenan.

Las toxinas bacterianas pueden clasificarse como: Perjudicial a la membrana ó de acción intracelular. En ésta última parece participar un mecanismo de acción común: 1) unión a los receptores específicos, 2) internación o trans-

locación a través de las barreras membranales y 3) interacción con un blanco celular (Eidels y cols., 1983). El proceso de unión de la toxina parece similar en muchos aspectos al proceso por el cual, las proteínas, las hormonas y otras macromoléculas biológicamente activas interactúan con las células. Algunos fundamentos para estas hipótesis derivan de la notable similitud estructural entre las toxinas bacterianas y las hormonas glicoprotéicas. Más específicamente, se han demostrado homologías en las secuencias de aminoácidos entre las cadenas A y B de la toxina del cólera producida por V. cholerae y las de tirotrópina, hormona luteinizante, coriogonadotropina humana, hormona foliculo-estimulante e interferón, (la cadena A o alfa posee la actividad biológica, mientras que la cadena B o beta media la unión al receptor). Tal similitud estructural sugiere mecanismos de entrada y de procesamiento similares (Middlebrook y Dorland 1984).

En las toxinas que han sido bien caracterizadas, el componente A tiene una actividad enzimática que actúa sobre un blanco intracelular, localizado ya sea en el citosol ó en la superficie interna (citosólica) de la membrana plasmática. El citosol es relativamente uniforme, carece de estructura y posee elevada viscosidad, su concentración de proteína es muy elevada, más del 20%; contiene muchas de las enzimas de E. coli así como intermediarios metabólicos y sales inorgánicas.

Se ha demostrado que las cadenas B libres o las proteínas de reacción cruzada no tóxica (CRM) con componentes A inag

tivos enzimáticamente y componentes B normales, pueden prevenir el proceso mediado por la toxina y pueden inhibir la unión de la toxina a las células al competir con la toxina por los receptores específicos. Si un receptor particular es una molécula que se encuentra por todas partes, entonces la toxina utiliza un receptor tal que puede ser capaz de afectar (o al menos unirse) a una variedad de tejidos y células de muchas especies, tal es el caso de la toxina cólera que se une a un glicolípido membranar, el gangliósido GM1 (Eidels y cols., 1983).

La entrada "productiva" es aquella que conduce a la expresión de la actividad biológica. Se encuentran vastas discrepancias entre el número de moléculas de toxina requeridas para provocar el efecto biológico, sugiriendo que muchos de éstos sitios de unión son improductivos. Por ejemplo, de 4 a 10 moléculas del fragmento A de cólera intracelular pueden efectuar estimulación máxima de Adenilato ciclasa, mientras que una sola molécula citoplásmica de toxina difteria es suficiente para provocar muerte celular. Bajo tales circunstancias es concebible que la vía de entrada productiva sea una vía auxiliar de un mecanismo secundario libre y de disposición (Middlebrook y Dorland 1984).

1.3. Agentes coliformes enterotoxigénicos involucrados en la diarrea de los lechones neonatos.

Las enfermedades diarreicas de los cerdos son un síndrome complejo y comprenden un gran número de agentes causales, oportunistas, secundarios y factores desencadenantes (Soj-

ka 1979). Dentro de los agentes bacterianos están:

1.3.1. Klebsiella

Este género pertenece a la Tribu II de la familia Enterobacteriaceae. Klebsiella pneumoniae típica es en el momento actual un agente patógeno muy común, principalmente en las infecciones del tracto respiratorio y urinario. Se caracteriza por un crecimiento mucoso, grandes cápsulas de polisacáridos y ausencia de movilidad. También fermenta muchos carbohidratos, pero las variaciones entre las cepas son grandes (Bergey 1979).

Existen diversos criterios para la tipificación bioquímica de las especies de Klebsiella por la variación tan amplia que ésta presenta; dependiendo de la eficacia del método seguido se puede detectar mayor o menor cantidad de variantes. El método más común para tipificarlas es mediante la reacción de Quellung ó por anticuerpos fluorescentes (Cowan y Steel's 1974).

Aunque la serotipificación es valiosa como información epidemiológica, otros autores afirman que es una prueba subjetiva además de presentar múltiples reacciones cruzadas ya que los serotipos capsulares están ampliamente distribuidos en la naturaleza y una cepa saprófita puede tener el antígeno capsular de uno o más miembros patógenos. El sistema de serotipificación es restringido ya que son pocos los laboratorios especializados que poseen todos los antígenos capsulares hasta ahora descubiertos. Otro método pa-

ra serotipificar Klebsiella, es a través de bacteriófagos ó bacteriocinas pero su aplicación es limitada en el primer caso o no es ampliamente usada por los resultados poco satisfactorios en el último caso (Riser y cols., 1976; Donovan 1966; Edmonson y Cooke 1979; citados por Alvarez --- 1984).

Algunas cepas localizadas en el intestino presentan la propiedad de ser enteropatógenas, debido a que cumplen los requisitos mínimos para ello, como es el de colonizar el intestino mediante la adherencia a la superficie epitelial celular y la capacidad de producir toxinas que trastornan el flujo neto de agua y electrolitos en la célula desencadenándose el proceso diarreico. También se ha demostrado la presencia de fimbrias en cepas colonizadoras del tracto urinario, encontrándose mayor presencia de microorganismos en las áreas hemorrágicas ulceradas. Ørskov y cols., citado por Fader y Davis (1980) sostienen que las Enterobacteriaceae poseen fibras tipo I con mecanismos diferentes de citoadherencia.

Se ha demostrado la capacidad de Klebsiella de producir -- toxina, así como algunas de sus propiedades: termoestable (ST), ácido-resistente, dializable y peso molecular de --- 10,000 dl. Posteriormente se cuantificó su capacidad para inducir la secreción de Cl^- y Na^+ en yeyuno e íleon de rata, siendo normal la absorción de HCO_3^- y mala la de xilosa la absorción de glucosa y la de L-leucina no se vió afectada (Klipstein y cols., 1976). La enterotoxina ST de K. --- pneumoniae y la toxina ST de E. coli tienen la misma poten

cia en la prueba de ratón lactante y muestran reactividad cruzada inmunológica en la prueba de ELISA, neutralización de la actividad secretora por antisueros hiperinmunes específicos y protección contra los cambios activos en las ratas inmunizadas con una vacuna conteniendo la enterotoxina ST de E. coli producida sintéticamente (Klipstein y cols., 1983).

Se tiene evidencia de que K. pneumoniae es capaz de producir una toxina termolábil (LT) probada en cultivo celular de ovario de Hamster chino ó en célula adrenal Y-1 (Klipstein y cols., 1978; citado por Alvarez 1984).

Klebsiella también se considera como agente causal de diarreas severas en el hombre, especialmente en áreas tropicales y en la población infantil de México (Olarte 1961; citado por Klipstein y cols., 1983; Avalos, 1978). Además, es una de las causas más frecuentes de infecciones hospitalarias (Haverkorn y Michel 1979; citados por Alvarez 1984) Alvarez (1984) confirma el caracter enteropatógeno de K. pneumoniae (sensu lato) y su intervención en las diarreas neonatales de los lechones.

Otros estudios sugieren la asociación etiológica entre --- toxinas producidas por Klebsiella y E. coli aisladas de -- diarreas en humanos recién nacidos (Deb y cols., 1980; citado por Alvarez 1984).

1.3.2. Escherichia coli

.1. Descripción y clasificación bioquímica: son bacilos -- Gramnegativos, no esporulados, crece con facilidad en la -

mayoría de los medios de cultivo, ya sean enriquecidos como el agar sangre ó simples como el agar nutritivo. En general, se usan para su crecimiento inicial medios selectivos y diferenciales como el agar MacConkey, agar EMB (rosina Azul de Metileno), agar Endo, Tergitol 7, etc. Estos medios tienen en común sustancias, como los colorantes, que inhiben el crecimiento de Grampositivos ó tienen reactivos como son las sales biliares que favorecen el desarrollo de bacterias entéricas y tienen un azúcar común, la lactosa, la cual es fermentada debido a que se sintetiza la enzima β -Galactosa que la hidroliza, dando como productos glucosa y galactosa y así entrar al ciclo de la glicolisis (Davis Dulbecco 1979). E. coli puede ser móvil ó inmóvil, producen indol y son rojo de metilo (MR) positivas; Voges-Proskauer (VP), ureasa, sulfuro de hidrógeno y citrato de Simon negativas; diferentes a la estrechamente relacionada - Klebsiella, que son citrato de Simon, VP positivas, MR negativas y producen indol (Mac Faddin 1979).

.2. Clasificación serológica: La superficie de E. coli está cubierta con sustancias capaces de provocar reacciones inmunológicas que comúnmente se usan para la clasificación serológica de cepas patógenas y no-patógenas. Los antígenos más comunes son los O, K y H. Los antígenos O somáticos son complejos lipopolisacáridos y constituyen parte de la membrana exterior, son termo-estables y no se inactivan a temperaturas de 100 a 121^oC. Los antígenos H flagelares son proteínas y se inactivan a 100^oC. Los antígenos K generalmente son polisacáridos ácidos que forman una envoltu

ra o cápsula alrededor de la pared celular (Runnels y Moon 1984).

Desde el descubrimiento del antígeno K88, el antígeno de superficie característico de las cepas de E. coli enterotoxigénicas porcinas, los antígenos de superficie han atraído considerablemente la atención. Se reconoció que la diarrea neonatal porcina se caracteriza por la proliferación de ciertos serotipos de E. coli en el intestino delgado. Los antígenos piliares asociados con la ETEC de cerdos son denominados K88, K99, 987P y F41. Ørskov y Ørskov han propuesto una nomenclatura para el antígeno pilar en el que el K88, K99 y 987P son denominados F4, F5 y F6 respectivamente. K99 y F41 también se asocian con la ETEC de cerdos y becerros (Runnels y Moon 1984).

.3. Asociación de las adhesinas y los serogrupos O: Existen al menos 160 variaciones del antígeno O, pero solo un número pequeño de éstos son patógenos de importancia para el cerdo (Tabla 2); por lo que son un instrumento de utilidad en los estudios de diagnóstico y epidemiológicos. Se sabe que la presencia de cepas de ETEC K88 positivas, de diversos grupos O, fluctúan con el área geográfica y la época, así como el sistema de vacunación de un país particular. Incidentalmente se han aislado cepas de E. coli K88⁺ que pertenecen a otros serogrupos O (Guinée y cols., 1977)

Los serotipos que ocurren frecuentemente (clásicos) asociados con diarrea en los lechones se señalan en la tabla 3.

Tabla 2. Presencia de las adhesinas y serogrupos O.

Adhesina	Origen	Serogrupos O
K88	Lechón	08,045,0138,0141,0147 0149,0157.
987P	Lechón	09,020,0141
K99	Lechón	064,0101
K99	Becerro/Gordero	08,09,020,0101
F41	Becerro	09,0101
GFA/I	Humanos	015,025,063,078
GFA/II	Humanos	06,08

Ellis (1978; citado por Sojka, 1974), encontró una distribución similar a la mostrada en la tabla 3 en los Estados Unidos. Se cree que, con variaciones menores, ésto representa el espectro de serotipos frecuentes que ocurren en los países que crían cerdos.

Los antígenos fimbriales son de mayor significado en la patogenicidad y en la inmunidad. La mayoría de los patógenos contienen uno de los antígenos K88, K99, ó 987P. La capacidad de éstas cepas de E. coli para proliferar y provocar enfermedad ha sido atribuída a sus propiedades adherentes para el epitelio intestinal de los cerdos.

El antígeno K88 le permite a los organismos proliferar en la parte anterior del intestino delgado del cerdo (Hohmann y Wilson 1975). Las cepas enlistadas en la tabla 4 poseen un antígeno K88 "adhesivo" adicional, cuyo desarrollo depende de las temperaturas de incubación. La producción de

éste antígeno adicional está determinada por un plásmido -
transmisible; se reconocen tres variantes: K88ab, K88ac, -
K88ad.

Tabla 3. Frecuencia de aislamientos de serotipos de E. coli
del sureste de Ontario (1978-1979) (Guinée y --
cols., 1977).

Serotipos	% aislamiento
0149:K91:88ac:H10	32
0157:KV17:88ac	19
0101:K30:K99	18.5
064:K7:K99	11
09:K103:H.987P ⁺	5.5
09:K35	3
0138:K81	2
0141:K85ab	1.5
0147:K89:88ac	1.5
08:K87:88ab	1.5
0139:K82:H1	1
0141:K85ab:ac	.5
09:K99	.5

En un estudio en el que se involucran las tres variantes -
K88 mencionadas, pueden distinguirse al menos cinco fenoti-
pos diferentes en la prueba adhesiva de borde en cepillo -
(Tabla 4). Un fenotipo es susceptible a las tres varian-
tes, tres fenotipos son susceptibles a una o dos varian-
tes y un fenotipo es completamente resistente a la adhesión.

diada por K88. Los experimentos en los que la adhesión de las bacterias que transportan una de las tres variantes -- K88, para los diferentes tipos de borde en cepillo, se inhibió por diversas adhesinas de K88 purificadas, indican que los sitios receptores para las adhesinas K88ab y K88ac tienen una similitud más estrecha, que el sitio receptor para la adhesina K88ad. Esta observación está de acuerdo -

Tabla 4. Adhesión de cepas de E. coli K88ab⁺, K88ac⁺, ó -- K88ad⁺ a borde en cepillo intestinal de cerdo.

Fenotipo borde en cepillo	Adhesión por células K88 ⁺		
	K88ab	K88ac	K88ad
A	+	+	+
B	+	+	-
C	+	-	+
D	-	-	+
E	-	-	-

con el hecho de que hay mucho más homología entre las estructuras primarias de las adhesinas K88ab y K88ac que las que hay entre K88ab y K88ad. La base química para los diferentes sitios receptores no se conoce (Bijlsma y cols., -- 1981; citado por Gaastra y de Graaf 1982).

Con base a lo anterior se demostraron dos fenotipos de cerdos y se designaron "adhesivos" (significando que la bacteria K88 se une a sus borde en cepillo) y "no adhesivo" --- (la bacteria K88 no se une a sus borde en cepillo)(Sell---

wood y cols., 1975; citado por Gaastra y de Graaf 1982). - Se encontró que los dos fenotipos son producto de dos alelos en un solo locus y son heredados de una manera Mendeliana simple.

La bacteria K99⁺ de algunos serotipos son igualmente capaces de proliferar en el intestino delgado de los cerdos y provocar una diarrea profusa. El número más alto de bacterias K99⁺ siempre se encuentran en el intestino delgado posterior y la concentración de bacterias disminuye progresivamente hacia el intestino delgado anterior (Smith y Huggins 1978). El antígeno K99 ocurre comúnmente entre cepas de cerdos de serogrupos O64 y O101, ocasionalmente en cepas del serogrupo O9 (Tabla 2). Aunque K99 facilita la adhesión y la colonización del intestino del cerdo, no todas las ETEC K99⁺ son capaces de hacerlo (Moon y cols., 1977). La capacidad de las cepas K99⁺ para producir diarrea parece ser dependiente de la edad, no se ha reportado de diarreas en cerdos después del destete (Sojka 1979).

El pili 987P facilita la adhesión de las cepas 987P de ETEC; por otra parte, le confieren la capacidad de adherirse in vitro a las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado y a las células de borde en cepillo de los conejos adultos (> 4 meses de edad) pero no de los conejos infantiles (< 8 días de edad) (Dean e Isaacson 1982). Nagy y cols. (1977), investigando la prevalencia del antígeno 987P encontraron que la adhesina 987P fue más común en las cepas de los serogrupos O9, O20 y O141 y se presentó ocasionalmente en los serogrupos O101 y O149 (Tabla 2).

Morris y cols. (1982), estudiaron las propiedades adhesivas de una cepa ETEC de ternera que transporta la adhesina F41 descubierta recientemente. Los lechones libres de gérmenes desarrollaron diarrea a las 10 horas de ser infectados con la cepa. La microscopía electrónica de barrido mostró placas de la bacteria adheridas en los pliegues mucosos de la vellosidad. El antígeno F41 aislado inhibió competitivamente la fijación de la cepa B41M a los borde en cepillo intestinales de la ternera.

Otras cepas de ETEC porcinas pueden producir otro tipo de adhesina de estructura desconocida y designada como 3P⁻ (Awad-Masalmeh y cols., 1982; citado por Gaastra y de Graaf 1982); éstas se adhieren y colonizan el intestino del cerdo y producen diarrea. Además, exhiben capacidad hemaglutinante manosa-resistente. Los autores no pudieron demostrar si éstas actividades estaban asociadas con un tipo particular de fimbria, pero fueron capaces de excluir un papel para la fimbria tipo I producida por éstas cepas al mediar la adhesión a la célula epitelial intestinal de los cerdos.

La capacidad de la ETEC de origen humano para producir hemaglutinación resistente a la manosa, ha sido usada para detectar 2 fimbrias adhesivas antigénicamente distintas, los factores de colonización I y II (CFA/I y CFA/II) (Evans y Evans 1978; Evans y cols., 1979; Freer y cols., 1978; Gross y cols., 1978; citados por Gaastra y de Graaf 1982). Estas adhesinas tienen características similares a la K88. Otra técnica propuesta por Changchawalit y cols., (1984) -

para detectar fimbrias desconocidas, con propiedades hidrofóbicas, es la técnica de "salting out" desarrollada por Lindahl y cols., (1981). Changchawalit y cols., no identificaron ningún otro factor de colonización diferente al I ó al II. Thomas y cols., (1982), han reportado un nuevo tipo antigénico fimbrial hemoaglutinante (E8775) que puede representar un factor de colonización en la ETEC de humanos. Candy y cols., (1982), Wevers y cols., (1980), han reportado cada uno un tipo adicional sugiriendo que pueden existir una gran variedad de fimbrias adhesivas para la ETEC de humanos (citados por Deneke 1984).

Las cepas de ETEC de humanos y de cerdos, se unen a las células de intestino aisladas de humanos o de cerdos. Ni la ETEC K99 (de cordero y de becerro), ni la cepa patógena de conejo RDEC-1 se unen a las células del intestino delgado de humanos o de cerdos bajo las mismas condiciones. La unión de la ETEC humana, patógena para la mayoría de las células del intestino delgado ampliamente disponibles, pueden proporcionar un modelo útil de la fase de unión de la colonización humana. Conocimientos más amplios de los mecanismos de unión de E. coli K88 puede tener relevancia para la enfermedad diarreica humana (Deneke y cols., 1984).

4. Enterotoxinas: Aunque la colonización es un pre-requisito esencial para que las cepas produzcan diarrea, la colonización por sí misma no provoca diarrea y las cepas deben ser enterotoxigénicas (Smith y Lingood 1971; citados por Gray 1984). Las enterotoxinas estimulan la secreción -

líquida en la luz intestinal; se reconocen dos clases principales:

a). Termo-lábil (LT), la cual es inmunogénica y se parece a la toxina de V. cholerae. Se han demostrado diferencias antigénicas entre la LT de cepas de E. coli asociadas con enfermedades en humanos y cerdos.

b). Termo-estable (ST), la cual no es inmunogénica y existe en dos formas. STa y STb, las cuales difieren en su solubilidad en metanol. Las propiedades de las enterotoxinas están enlistadas en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades de las enterotoxinas de E. coli (Wray 1984).

	ST		
	LT	STa	STb
Hipersecreción ileal	+	+	+
Peso Molecular	10^4-10^6	$4,5 \times 10^3$	10^3-10^4
Estabilidad a 65°C	-	+	+
Estabilidad a 100°C	-	+/-	+
Inmunogenicidad	+	-	-
Receptor gangliósido	+	-	?
Solubilidad al metanol	-	+	-
Plásmido	+	+	+
Mecanismo	AMPc	GNPc	GNPc
Actividad biológica:			
lechón neonato	+	+	-
lechón destetado	+	-	+
ratón lactante	-	+	-

Todas las cepas de cerdo producen ST y la mayoría de las que poseen el antígeno K88 también producen LT. Kohler --- (1971; citado por Wray 1984), investigó el efecto sobre lechones de la ST cruda (caldo nutritivo) y la LT cruda (lisado celular). Con la LT, la diarrea se desarrolló más tarde, fué persistente y la mayoría de los lechones murieron, comparado con la ST en que ninguno de los lechones murió.

Muchas cepas de E. coli enterotoxigénica aisladas de cerdo producen una hemolisina que parece que no contribuye a la virulencia.

.4.1. Asociación de las adhesinas y la producción de enterotoxinas: Inicialmente se pensó que las cepas clásicas de E. coli enterotoxigénica de cerdo caían en dos categorías: cepas que producen solo ST y cepas que producen tanto ST como LT. Se encontró que el antígeno K88 está asociado con cepas que producen ambas enterotoxinas (Gyles y cols., --- 1971; Gyles y cols., 1974; citado por Gaastra y de Graaf - 1982). Guinée y Jansen (1979; citados por Gaastra y de Graaf 1982), reportaron que 37 de 58 cepas K88⁺ producen solamente LT, mientras que las otras 15 cepas producen ST+LT. Söderlind y Mølbj (1969), reportaron una correlación casi completa entre producción de K88 en cepas que pertenecen a serogrupos O149 y la producción tanto de ST como de LT; -- sin embargo, observaron que las cepas K88⁺ que pertenecen al serogrupo O8 producen solamente ST. Obviamente, la presencia del antígeno K88 puede asociarse con ST, LT ó ambas toxinas (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación de las adhesinas y la producción de enterotoxinas (Gaastra y de Graaf 1982).

ADHESINAS	Enterotoxinas		
	ST	LT	ST+LT
K88	+	+	+
987P	+	-	-
K99	+	-	-
F41	+	-	-
CFA/I	+	+	+
CFA/II	-	-	+

La adhesina 987P de cepas ETEC de cerdo, siempre se encuentra asociada con la producción de ST (Guinée y Jansen 1979 Moon y cols., 1980; citados por Gaastra y de Graaf 1982). También para el antígeno K99 ha sido reportada una correlación positiva con producción de ST (Isaacson y cols., 1978 Moon y cols., 1976; citados por Gaastra y de Graaf, 1982). Con cepas bovinas, Guinée y Jansen (1979), detectaron una correlación 100% positiva entre producción de St y la presencia del antígeno K99. Moon y cols., (1976) e Isaacson y cols., (1978)(citados por Gaastra y de Graaf 1982), reportaron que solamente el 67% del 87% de las cepas enterotoxigénicas poseen el antígeno K99. Las diferencias en la frecuencia de la asociación probablemente se deban a las dificultades en la detección del antígeno K99 (Guinée y cols., 1976; Ørskov y cols., 1975; citados por Gaastra y de Graaf 1982). Sin embargo, la presencia de adhesinas desconocidas

nueden excluirse. En la mayoría de las cepas de ETEC porci-
na y bovina, la producción de las adhesinas y de entero-
toxinas parece codificarse en plásmidos separados. En algu-
nas cepas K99⁺ la capacidad para producir K99 y ST parece
estar codificada por un solo plásmido (S.L. Gyles, comuni-
cación personal; citado por Jaastra y de Graaf 1982).

.4.2. Mecanismo de acción

Toxina LT: Escherichia coli produce una enterotoxina termo-
lábil (LT) plásmido codificada (Gyles y cols., 1974), que
provoca diarrea severa tanto en humanos como en animales -
(Sack 1975). La LT consiste de dos subunidades diferentes,
A (PM=29,000) y B (PM=11,500) (Spicer y cols., 1981; citado
por Hirst 1983), las cuales están presentes en una rela-
ción estequiométrica de 1A:5B (Gill y cols., 1981; citados
por Hirst 1983). La subunidad B es la responsable de la --
unión al receptor, gangliósido GM1 ó a receptores glicopro-
téicos, sobre la mucosa intestinal de los mamíferos. La --
subunidad A cataliza la modificación covalente de la adeni-
lato ciclasa (cataliza la transferencia de ADP-ribosa a --
partir de NAD⁺ a la subunidad reguladora de la enzima) ---
(Holmgren y Lönnroth 1980; citado por Hirst, 1983). El ---
NAD⁺ es un cofactor necesario para la activación de la ade-
nilato ciclasa (Gill y cols., 1976; Moss y Richardson ----
1978; citados por Hirst y cols., 1984). Usando NAD⁺ radio-
marcado, dos grupos diferentes de investigadores observaron
incorporación de la radioactividad a la toxina catalizada
sobre un componente membranal de PM=42,000 (subunidad regu-

ladora de la enzima). Subsecuentes estudios han confirmado éstos reportes y han desarrollado el siguiente modelo: el componente catalítico de la enzima se une a la membrana y se localiza en el lado citoplásmico. La enzima puede existir de dos formas, activa e inactiva. Hay un componente regulador (proteína G, G/F ó proteína Ns) de la ciclase que tiene un sitio de unión para GTP. El complejo G-GTP interacciona con el componente catalítico para formar un sistema ternario activo en la síntesis de AMPc a partir de ATP. La hidrólisis de GTP a GDP convierte a la proteína G en -- una forma que ya no activa la unidad catalítica; a la hidrólisis de GTP le sigue la inhibición de GTPasa que conduce a una activación persistente del componente catalítico ciclase. Algunas líneas de evidencia indican que el sustrato para la ribosilación del ADP es la proteína G. La -- reacción de ribosilación del ADP depende de la presencia -- de la toxina, NAD^+ , una fuente membranar de proteína G, -- GTP y Mg^{2+} (Middlebrook y Dorland 1984).

El incremento de AMPc provoca cambios en el flujo iónico -- en el epitelio intestinal, ocasionando deshidratación celular y diarrea.

La toxina LT es similar a la toxina de V. cholerae (CT) en sus propiedades inmunológicas (Clements y Finkelstein --- 1978; Holmgren y Svennerholm 1979; citados por Hirst y --- cols., 1984), estructurales (Dallas y cols., 1980; citado por Hirst y cols., 1984) y funcionales (Holmgren 1973; --- Moss y Richardson 1978; citados por Hirst y cols., 1984). Sin embargo, varios estudios han revelado características

distintivas entre la CT y la LT.

- 1).- La subunidad A de la CT se activa por un "corte" proteolítico, lo que da origen a dos polipéptidos (A_1 y A_2) - que se unen por un puente de cistina (Holmgren y Lönnroth 1975; VanHeyningen 1976; citados por Hirst y cols., 1984). La subunidad A de la LT "no se corta" (Kunkel y cols., --- 1979; citado por Hirst y cols., 1984).
- 2).- La subunidad B de la LT se une a receptores glicoproteicos así como al gangliósido GM1 (Holmgren y cols., 1982 citado por Hirst y cols., 1984).
- 3).- La CT es secretada por V. cholerae (Finkelstein y LoSpalluto 1970; Richardson 1970), mientras que la LT se asocia a la célula (Kunkel y Robertson 1979; citados por --- Hirst y cols., 1984) y se localiza dentro del espacio periplásmico de E. coli (Avans y cols., 1974; Hirst y cols., - 1984a; citados por Hirst y cols., 1984).

El ensamblaje de la LT involucra la unión de la subunidad A a un oligómero de la subunidad B, además de la transferencia de los polipéptidos a través de la membrana. La formación de complejos proteicos en las envolturas bacterianas no es exclusivo de la LT. Algunas otras proteínas membranales se ensamblan en los oligómeros que funcionan como poros, a través de los cuales pueden pasar pequeñas moléculas (Hirst y cols., 1983).

Parece probable que la toxina sea exportada a la superficie celular bacteriana o liberada en el entorno extracelular. Para que tenga acceso al epitelio intestinal, tanto las subunidades A y B que comprenden la toxina, como los -

precursores que contienen secuencia de señales que permiten la transferencia de éstos polipéptidos, se sintetizan a través de la membrana citoplásmica de la envoltura celular bacteriana (Jallas y Falkow 1980; Palva y cols., 1981; Spicer y Noble 1982; citados por Hirst y cols., 1984). Tales precursores polipeptídicos son característicos de las proteínas que finalmente se localizan en el periplasma o en la membrana exterior o se liberan en el medio circundante.

Muchas de las etapas en la exportación de la CT y la LT -- presumiblemente son comunes, incluyendo por ejemplo, la -- síntesis de las subunidades precursoras, la translocación a través de la membrana citoplásmica, la maduración y el ensamblaje de la subunidad (Palva y cols., 1985; Mekalanos y cols., 1983; Hirst y cols., 1983; citados por Hirst y -- cols., 1984). Sin embargo, la capacidad de V. cholerae para secretar la CT en el entorno celular es una etapa adicional no encontrada en la exportación de LT por E. coli. Es improbable que esto se deba solamente a las diferencias entre CT y LT, ya que la clonación de genes CT en E. coli provocó la acumulación de la CT asociada a la célula (Pearson y Mekalanos 1982; Gennaro y cols., 1982; citados por Hirst y cols., 1984). Por lo tanto, puede razonarse que V. cholerae posee factores fisiológicos o mecanismos que reconocen y secretan CT. Hirst y cols., (1984), reportan que V. cholerae también puede mediar la secreción de la LT humana y porcina derivada de E. coli. Neil y cols., (1983; -- citado por Hirst y cols., 1984), describen una cepa de V.

cholerae toxigénica que alberga un plásmido ENT que secreta LT porcina en el entorno extracelular. De este modo, estas cepas de V. cholerae que produce LT provee un nuevo camino para estudiar el mecanismo de exportación y de secreción de estas bacterias.

Hirst y cols., (1984), usando diversos plásmidos recombinantes que codifican ya sea para las subunidades A ó B de la LT, han investigado el papel de estas subunidades en el proceso secretor y proponen que la entrada de la toxina en la etapa secretora de la vía de exportación está mediada por un aparato secretor que reconoce dominios estructurales dentro de la subunidad B de la LT.

Toxina ST: La segunda enterotoxina producida por E. coli se refiere a la toxina termo-estable (ST), la cual provoca algunas enfermedades diarreicas, incluyendo la diarrea de los viajeros en humanos (Merson y cols., 1976; citado por Brandwein y cols., 1985) y diarrea ó colibacilosis en lechones y becerros (Gyles 1971; Moon y cols., 1980; citados por Brandwein y cols., 1985). La ST producida por E. coli de humanos, bovinos y porcinos, está codificada por elementos genéticos estrechamente relacionados (Saeed y cols., - 1984). La ST es muy pequeña (P_w=de 1000 a 10,000) y aparentemente produce una respuesta enterotoxigénica al activar la guanilato ciclase en las membranas de la mucosa intestinal (Hughes y cols., 1978; Field y cols., 1978; Guerrant y cols., 1980). No está claro si la toxina entra o no a las células para llevar a cabo su acción.

Se conoce poco acerca de la ST. Hasta ahora se ha reportado la existencia de dos diferentes tipos de enterotoxinas termo-estables de E. coli, STa y STb (Alderete y Robertson 1978; Burgess y cols., 1978; Gyles 1979; citados por Kennedy y cols., 1984). La STb recientemente descrita, no está bien caracterizada, solamente se ha observado en cerdos y becerros (Greenberg y Guerrant, 1980; citados por Brandwein y cols. 1985). Se desconoce el papel preciso que juega en la patogenicidad. Esto se debe en gran parte a lo incómodo de la prueba requerida para detectar su actividad tóxica. Se ha demostrado que algunas E. coli aisladas a partir de lechones con diarrea producen STb pero no STa ó LT. Sin embargo, éstas cepas son incapaces de provocar la enfermedad en lechones infectados experimentalmente (Moon y cols., 1980; citados por Brandwein y cols., 1985). So y McCarthy (1980; citados por Kennedy y cols., 1984), han demostrado que la STa y STb son distintas genéticamente. Se han clonado y secuenciado los genes que codifican para STa y demuestran ser distintos de las dos diferentes secuencias de DNA que codifican para STa (Moseley y cols., 1983 citados por Echeverría y cols., 1985). Por otra parte, los genes que codifican para LT, STa y para resistencia a drogas, han sido identificados en el mismo plásmido (Gyles y cols., 1977; citados por Echeverría y cols., 1985). Echeverría y cols. (1985), identificaron cinco E. coli las cuales contienen plásmidos que codifican tanto para la resistencia a la tetraciclina como para STb éstos plásmidos fueron transferidos por conjugación bacteriana a E. coli K-12 Esta observación sugiere que el uso muy difundido de los -

antibióticos puede incrementar la distribución de genes -- que codifican para STb así como para los que codifican para LT y STa (Gyles y cols., 1977; citado por Scheverría y cols., 1985).

Por otro lado, la STa parece ser una familia de al menos -- dos toxinas polipeptídicas bien caracterizadas genética y químicamente (So y cols., 1981; So y cols., 1979; So y --- McCarty 1980; Staples y cols., 1980; citados por Lee y --- cols., 1983). Sin embargo, el mecanismo preciso por el --- cual induce el desequilibrio electrolítico que conduce a -- la diarrea es aún pobremente entendido. Se ha demostrado -- que estimula la guanilato ciclase in vitro (Field y cols., 1978) y un modelo basado en las últimas 18 secuencias de -- aminoácidos de la molécula tiene un notable parecido a un ionóforo (Gill, comunicación personal; citado por Lee y -- cols., 1983). En un estudio reciente hecho por Brandwein y cols., (1985) se indica que al purificar las STas parece -- ser que se componen de 18 y 19 aminoácidos respectivamente pero sin reafirmarse. También hay considerables evidencias de que la STa ejerce su efecto vía activación de la guanilato ciclase en las células mucosas intestinales y elevación de los niveles de GMPc (Gianella y Drake 1979; Gue--- rrant y cols., 1980; citados por Brandwein y cols., 1985). Se efectúa una respuesta secretora inmediata del líquido -- intestinal resultando primero la inhibición de la absor--- ción de sodio y cloro por las membranas de borde en cepi--- llo (Alderete y Robertson, 1978; Field y cols., 1978; Hugh es y cols., 1978; Staples y cols., 1980; Takeda y cols., -

1979; citados por Kennedy y cols., 1984). La STa es soluble en metanol y su actividad generalmente se ensaya en ratón lactante (Dean y cols., 1972). La STb es insoluble en metanol y su actividad es probada en asas yeyunales de cerdo (Shine y Dalgarno 1974; citados por Lee y cols., 1983). Probablemente la STb tenga un mecanismo de acción diferente al de la STa (Kennedy y cols., 1984).

Brandwein y cols., (1985), demuestran la utilidad de los anticuerpos monoclonales para la rápida cuantificación de la toxina STa de humanos así como para la investigación y quizá la intervención en la interacción de la toxina con los componentes celulares.

.4.3. Formas de detección de las enterotoxinas: Hay una variedad de sistemas de prueba de gran efectividad para detectar E. coli enterotoxigénica, se incluyen modelos en animales, líneas celulares de cultivo y pruebas in vitro. Aunque son de gran utilidad a nivel de investigación, ninguno de éstos sistemas son fácilmente adaptables para su uso de rutina en los laboratorios de diagnóstico (Brill y cols., 1974):

Las cepas productoras de LT son identificadas en asas ligadas de conejo, por la capacidad de los filtrados de cultivos bacterianos para causar acumulación de líquidos en las asas a las 18 horas (Evans y cols., 1973). En cultivos celulares como el de células de ovario de Hamster Chino (CHO) (Guerrant y Brunton 1977) ó de células VERO (Speirs y cols., 1977) ó de células adrenales Y-1, que han dado --

excelentes resultados debido a su crecimiento abundante y rápido; la reacción se manifiesta por pérdida de su refractibilidad (Donta y cols., 1973). En pruebas de hemoaglutinación pasiva (Holmes y cols., 1978), hemoaglutinación --- (Finkelstein y Peterson 1970), inmunohemólisis pasiva (Evans y Evans 1977), inmunohemólisis pasiva radial (Bramucci y Holmes 1978), por producción del factor de permeabilidad vascular (Evans y cols., 1973), pruebas inmunosorbentes ligadas a enzimas (ELISA) (Holmgren y Svennerholm 1973) y en radioinmunoensayos (Ceska y cols., 1978; Greenberg y cols., 1977; citados por Bramucci y Holmes 1978). La introducción de la técnica de coaglutinación estafilococal ---- (Staph-CoA) para detectar la presencia de los polisacáridos capsulares de las bacterias, provee un procedimiento de ayuda en el estudio de la enteritis por E. coli y es de utilidad en los laboratorios microbiológicos.

Las cepas que producen ST^a son identificadas por la capacidad de los filtrados de cultivo para producir una temprana acumulación de líquidos en las asas ligadas de conejos a las 8 horas (Evans y cols., 1973). La E. coli que produce ST^a se detecta al probar sobrenadantes de cultivos en la prueba intragástrica del ratón lactante (Dean y cols., --- 1982). La ST^b provoca secreción de líquidos en las asas ligadas de los lechones (Burgess y cols., 1978) pero son negativas en la prueba del ratón lactante (Dean y cols., --- 1972). Recientemente, Waldwan y cols., (1984), desarrollaron una prueba que se inicia por la adición de Mg^{2+} -GTP y son incubados a 37°C por el tiempo indicado en la presen--

cia de varias preparaciones de toxina, filtrado de cultivo crudo y buffer como control. Estas pruebas se hacen por duplicado y finalmente se adiciona 0.9 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM. Posteriormente la cantidad de GmPc formada es determinada por Radioinmunoanálisis (RIA) (Kimura y Murand 1974; Steiner y cols., 1972; citados por Waldman y cols., 1984). Esta prueba denominada de Guanilato ciclasa tiene varias ventajas como son: 1) permite el procesamiento de gran número de muestras rápidamente, 2) es cuantitativa y permite la estimación directa de los niveles de toxina en una muestra y 3) es aproximadamente 10 veces más sensible que la bioprueba del ratón lactante. En resumen esta prueba, con el sistema automático de RIA, se cuantifica la toxina Sr en menos de 20 minutos comparado con 3 a 6 horas que se requiere para la prueba del ratón lactante -- (Waldman y cols., 1984).

.5. Epidemiología: Sorpresivamente poco se conoce del medio por el cual la S. coli se propaga. Se asume que la mayoría de las cerdas transportan algunas S. coli patógenas. Después del nacimiento el lechón puede infectarse a través de la contaminación del medio ambiente, ésta contaminación solo puede provenir de la cerda ó de la materia fecal persistente en una área de parto inadecuadamente limpia. Sin embargo, la enfermedad ocurre bajo muchos de los estándares higiénicos mantenidos rígidamente, mientras que puede no presentarse en medios menos deseables. Bajo circunstancias normales, la enfermedad no se propaga rápidamente. La incidencia en una sala de parto, aumenta lentamente hasta

un punto máximo y luego desciende persistiendo a lo que algunos consideran un nivel tolerable. Ocasionalmente hay comienzos muy severos en piaras recién establecidas en salas nuevas, presumiblemente a causa de la carencia de un estado inmune común a los diversos tipos anti-génicos capaces de producir diarrea (Wilson 1981).

.6. Patogenia: La E. coli que produce diarrea generalmente posee las siguientes propiedades:

- a) Capacidad para colonizar y multiplicarse en el intestino delgado.
- b) Puede producir enterotoxinas la que en un huésped susceptible provoca aumento de secreción líquida hacia el lumen intestinal y subsecuentemente diarrea.

Tales cepas de E. coli se adhieren a la superficie mucosa del epitelio veloso del intestino delgado, lo que permite superar la remoción mecánica por la motilidad intestinal y facilitar su colonización. La adherencia está mediada por antígenos termolábiles (Tabla 7) los que pueden verse en la micrografía electrónica como finas estructuras filamentosas fimbriadas o semejantes a pilis. Estos antígenos poseen algún grado de especificidad de huésped. Muchas son mediados por plásmidos (Tabla 7) y algunos pueden ser transmitidos de una cepa a otra en experimentos de cultivos mezclados (Hirst y cols., 1984).

Las E. coli enteropatógenas (EPEC) se definen como los serogrupos somáticos específicos que epidemiológicamente han sido incriminados como patógenos pero cuyos mecanismos de

infección son a través de enterotoxinas o enteroinvasión - (Welman y Levine 1983; citados por Mathewson y cols., --- 1985).

Tabla 7. Adhesinas encontradas en E. coli enterotoxigénica (Mathewson y cols., 1985).

Adhesina	Hemoaglutinación MR ^a	Localización genética
K88	eritrocito de cobayo	plásmido conjugativo
987P	--	cromosoma
K99	eritrocito de caballo	plásmido conjugativo
F41	eritrocito de oveja	?
CFA/I	eritrocitos humanos	plásmido no conjugativo
CFA/II	eritrocitos de bovinos	

MR^a = Manosa-resistente

Las lesiones características causadas por los serotipos -- tradicionales de EPEC son: La adherencia a la mucosa intes tinal con destrucción local del microvello (Rothbaum y --- cols., 1983; Clausen y Christie 1982; Moon y cols., 1983; citados por Mathewson y cols., 1985).

Cravioto y cols., (1979), demostraron que la mayoría de -- las cepas de E. coli enterotoxigénicas y las cepas de E. coli de individuos sanos no se adhieren a las células ---- Hep-2 de cultivos de tejidos, mientras que el 90% de las - cepas EPEC sí se adhieren. La adherencia a las células --- Hep-2 puede ser un modelo de la adherencia de la EPEC in vivo (Welman y Levine 1983; Clause y Christie 1982; cita dos por Mathewson y cols., 1985).

Estudios previos de la diarrea de los viajeros han demostrado que la ETEC provoca aproximadamente la mitad de los casos pero en aproximadamente el 25% de ellos no se identificó ningún agente etiológico (Dupont y cols., 1976; Sack y cols., 1978; citados por Mathewson y cols., 1985) y la mayoría de estos casos respondieron a la terapia con los agentes antimicrobianos (Dupont y cols., 1982; Gorbach --- 1982; Ericson y cols., 1983; citados por Mathewson y cols., 1985), un hecho que sugiere que pueden existir enteropatógenos bacterianos no reconocidos. Mathewson y cols., ----- (1985), encontraron una prevalencia de 30.4% de EABC, un hallazgo que sugiere que la EABC se asocia con la diarrea de los viajeros y que puede explicar el efecto de los antibióticos en la prevención y terapia en los pacientes con enteropatógenos no reconocidos.

1.4. Variación colonial

Se usa mucho el término de disociación microbiana como sinónimo de variación es decir, que se refiere a los cambios que -- conducen al desarrollo de nuevas formas permanentes especialmente en lo que concierne al aspecto o tipo de colonias. Se han distinguido diferentes tipos de formas coloniales designadas con los nombres de lisas (S), rugosas (R), intermedias (RS), mucoides (M), enanas (D) y gonidiales (G) (Sánchez, 1961).

La importancia de las variaciones puede reflejarse en los sistemas de clasificación. Ya que las condiciones del medio en que se desarrollen las bacterias están sujetas a cambios diversos y las probabilidades de variación son múltiples, esto puede modificar el aspecto fenotípico que depende de la naturaleza del medio y de su interacción con las bacterias. Cualquier variación del genotipo se transmite inmediatamente a su descendencia, así mismo el medio no influye mucho sobre la dirección de las mutaciones, pero sí sobre el crecimiento y la supervivencia de los mutantes. Es preciso no confundir, -- mutación que es el cambio permanente con una mera adaptación de los microorganismos al medio, hecho desde luego circunstancial y no hereditario. Hay variaciones genotípicas que pueden manifestarse en la disociación ó en cambios en las características del cultivo, es decir, morfología de las colonias. Pueden presentarse mutaciones nutricionales y pérdida de la propiedad de sintetizar algún compuesto en particular (Sánchez, 1961).

Es bien sabido que las bacterias y en general todos los mi--

croorganismos sujetos a la acción diversa del medio ambiente pueden cambiar de forma y aún sus propiedades fisiológicas generales. En la actualidad se sabe perfectamente que los microorganismos pueden cambiar de forma por una multitud de causas y estas variaciones pueden ser temporales y desaparecer en -- cuanto cesa la causa que le dió origen ó bien pueden ser permanentes y en este caso afectar la estructura genética del orden de la sucesión de los nucleótidos de un gen y de esta forma la variación recibe el nombre de mutación. Las variaciones pueden únicamente referirse a la morfología, fisiología ó también a la variación antigénica (Richard Calendar, 1980).

Swanson efectuó un estudio con las variantes de color y opacidad en colonias de gonococos, en donde los factores que intervinieron fué el de la temperatura ya que en las colonias que se incubaron de 21 a 24 hrs. fueron opacas, mientras que con incubación por 40 hrs. no mostraron ésta característica. Las variaciones en colonias bacterianas en color y en opacidad se ha observado desde 1958, en general hay correlación -- entre las propiedades ópticas de las colonias y las propiedades mismas de la bacteria. En las colonias opacas las bacterias (gonococos) estaban muy agregados mientras que en las colonias lisas se observaban separadas y en empalizada. Visto al microscopio electrónico las colonias opacas mostraban una adhesión intercelular. Este autor no explica las diferencias desde el punto de vista genético pero por medio de estudios preliminares parece que está relacionado con la ausencia ó presencia de proteínas o con componentes de lipopolisacáridos en el medio de cultivo (Swanson, 1971).

Lacey citado por Ezzel demostró que la expresión de ciertos antígenos de superficie celular de Bordetella bronchiseptica puede ser controlada fenotípicamente variando las concentraciones de iones en el medio de cultivo. Y mencionan que el cambio genotípico está asociado con la alteración de la composición ó tipo de proteínas de la membrana y por lo tanto se reflejan en las variantes que denominaron fases I, II, III y IV, pero ésta bacteria puede pasar de la fase I a la fase IV y el cambio de fase es reversible, lo que indica que el medio de cultivo influye de una manera definitiva en la expresión de la morfología colonial. (Ezzel, 1984).

La patogenicidad de muchas bacterias tiene una relación directa con la morfología colonial ya que se ha demostrado en cepas de Pasteurella capsuladas dan origen a colonias mucoides debido a la composición polisacárida de la cápsula y son muy virulentas, no pasando lo mismo con las que carecen de ésta estructura (Enf. Respiratorias, 1979).

1.5. JUSTIFICACION

Como se mencionó anteriormente la variación colonial es importante desde diferentes puntos de vista:

- a) Para hacer una clasificación presuntiva, tal es el caso de aquellas enterobacterias que fermentan la lactosa, ejemplo; - E. coli y lactosa negativa Salmonella sp.
- b) Para relacionar alguna característica de patogenicidad como sucede con gran variedad de bacterias, ejemplo: la cápsula en Pasteurella multocida y que a su vez se vé reflejada en el aspecto de la colonia en medios enriquecidos (Enfermedades -- Respiratorias, 1979).

Estas características parecen estar relacionadas con su Código Genético y posiblemente halla una variante colonial directamente relacionada con la capacidad de producción de toxinas. Es cierto que no existe una regla fija a éste respecto, y -- así como es muy importante y significativo el grado de disociación bacteriana como en el caso de Brucella, Pasteurella y Salmonella en cuanto a sus características de patogenicidad, -- también lo sea para E. coli y si con frecuencia se encuentran variantes coloniales en ésta bacteria pueden no ser tomadas -- en cuenta al elaborar autovacunas de E. coli para ser aplicadas en una granja determinada, ya que en dicha granja pueden estar actuando cepas que produzcan LT y ST ó solamente ST ó -- LT, es por lo que se podría estar inmunizando con cepas que -- a lo mejor producen un solo tipo de toxina quedando desprotegidos los animales respecto a la otra producida por cepas -- atínicas de E. coli. (Sánchez, 1961; Gunther, 1979).

2. OBJETIVO

- Estudiar la variación colonial de E. coli para su identificación inicial y examinar su posible relación con la capacidad de producir enterotoxinas y apoyar la hipótesis de que existen cepas de E. coli enterotoxigénicas atípicas, que pasan inadvertidas y que pueden incorporarse al momento de la elaboración de autovacunas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Origen de las muestras

Fueron obtenidas muestras de heces de 83 lechones con diarrea aguda, durante los primeros 25 días de edad, pertenecientes a 4 granjas porcicultoras del Edo. de México.

3.2. Aislamiento colonial

Las muestras se recolectaron directamente del lechón, por medio de presión sobre sus intestinos, cayendo la evacuación directamente a una bolsa de polietileno. Esto se hizo cuando no transcurrirían más de dos horas para su análisis. En caso contrario se tomaban hisopos rectales que eran transportados en medio de Stuart y posteriormente procesada en el laboratorio. Cada muestra fué sembrada sobre una caja de agar MacConkey incubándose después 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo - se buscó la variación colonial por medio del microscopio estereoscópico.

Las diferentes formas coloniales aisladas, correspondientes a las bacterias, se sembraron en agar Triple-Azúcar-Hierro -- (TSI), de donde, después de 24 horas de incubación a 37°C, se procedió a clasificarlas bioquímicamente. El criterio para la identificación bioquímica que se utilizó fué el de McFaddin (1976). En las colonias aisladas se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas: tinción Gram, Azufre-Indol-Motilidad -- (SIM), Rojo de Metilo (MR)-Voges Proskauer (VP), citrato de Simon, urea, malonato, gluconato. Para mantener las cepas se sembró en el medio de Dorset.

3.3. Producción de las enterotoxinas (LT y ST) de E. coli.

Las cepas de E. coli aisladas, se probaron para detectar su producción de enterotoxinas.

Para detectar la producción de la toxina ST se empleó la prueba del ratón lactante (Dean y cols., 1972) y para la detección de la toxina LT se utilizaron las pruebas de coagulación estafilococal (staph-CoA) (Brill y cols., 1979) y el método de Cultivo Directo-G_{MI} - ELISA (DCM-G_{MI} - ELISA) (Ristaino y cols., 1983).

3.3.1. Prueba del ratón lactante

La inoculación intragástrica de ratones recién nacidos con toxina es una prueba más uniforme, rápida, confiable, fácil de realizar y barata, que la prueba de asa ligada en conejos. Esta prueba detecta solamente la E. coli productora de la toxina STa, que provoca diarrea en los humanos y en los animales (Dean y cols., 1972).

Procedimiento: El material enterotóxico se preparó inoculando Caldo Soya Trypticaseína (TSB) con un cultivo del organismo crecido toda la noche en Caldo Biotriptasa, el cual fué sembrado posteriormente en 10 ml. de TSB, luego sobre un agitador se colocó el matríz durante toda la noche a 37°C a 140 rpm. El cultivo obtenido se centrifugó a 5,000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se filtró a través de filtro Milipore con poro de 0.45 µ.

Los ratones cepa B7A se obtuvieron del bioterio de la Unidad I de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores.

riores-Cuautitlán y del Bioterio del Instituto Nacional de --
Ciencia y Tecnología (INCYTAS-DIF), de 1 a 4 días después de --
nacidos.

Los ratones lactantes se inocularon con 0.1 ml. del material --
de prueba directamente dentro del estómago, teniendo la precau--
ción de que estuvieran recién alimentados para hacer más evi--
dente su estómago; se empleó jeringa hipodérmica con aguja de
27x13mm. Cada mililitro de inóculo fué teñido con una gota de
azul de Evans al 2% para facilitar la lectura y comprobar la --
correcta inoculación.

Los ratones fueron separados de sus madres antes de inocular--
se y de dividirse aleatoriamente en grupos de cuatro.

A las cuatro horas de inoculados, se sacrificaron los ratones
mediante inspiración de una sobredosis de éter, luego se le --
efectuó la necropsia. Sus intestinos fueron removidos con pin--
zas.

Lectura: Se pesaron por separado y junto al cuerpo o carcasa,
los intestinos. Se calculó la relación:

$$\frac{\text{peso del intestino}}{\text{peso del resto del cuerpo}}$$

Las relaciones menores de 0.07 se consideraron negativas, las
relaciones en el rango de 0.070 a 0.090 se consideraron positi--
vas.

Las relaciones superiores a 0.090 se consideraron fuertemente
positivas (Dean y cols., 1972), Tomando en cuenta los contro--
les positivos y negativos.

Se probaban los filtrados el mismo día de su obtención. Cuando
ésto no era posible, los filtrados se congelaban a -72°C para

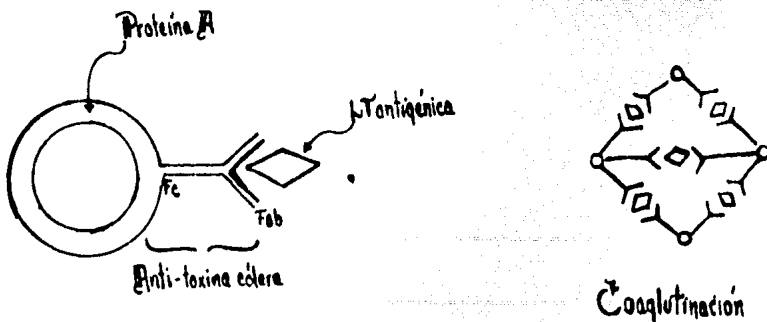
probarlos en los ratones, en no más de dos días.

3.3.2. Prueba de coagulación estafilococal (staph-CoA)

En esta técnica se emplean estafilococos que contienen proteína A, previamente recubiertos con antisuero específico para detectar la enterotoxina LT de E. coli. La base para sensibilizar suspensiones estabilizadas de la cepa Cowan I de Staphylococcus aureus con anticolerágeno se basa en la reactividad inmunológica cruzada de la LT de E. coli con la toxina (colerágeno) de V. cholerae.

La proteína A en la pared celular del estafilococo se une a las moléculas de inmunoglobulinas a través de la porción Fc, orientando de esta manera, los sitios Fab libres hacia afuera. Cuando se mezclan con el antígeno apropiado, los estafilococos sensibilizados aglutinan (Esquema 2).

Esquema 2. Representación del principio de la técnica staph-CoA. El sistema antígeno-anticuerpo ilustrado es el de la reacción del anticolerágeno con la LT antigénica.

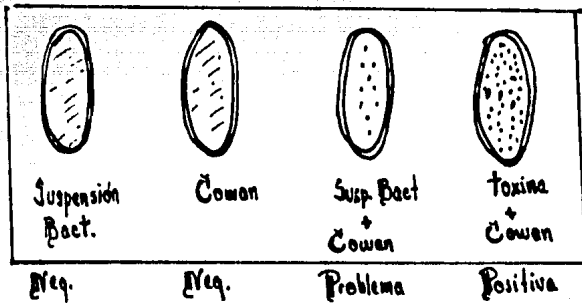


La técnica es simple, relativamente barata y requiere de la inmunoglobulina del anticolerágeno como único reactivo específico y se utiliza de rutina en los laboratorios de Microbiología Diagnóstica.

Procedimiento: La cepa Cowan I de S. aureus (donada por el Dr A. Cravioto, INCYTAS-DIF), se sembró en 10 cajas de agar soya tripticaseína (TSA), mismas que se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente las células se cosecharon y se lavaron 3 veces con solución salina estéril. Se preparó una suspensión al 10% (vol/vol) en solución salina conteniendo formalina al 0.5%. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos horas con agitación ocasional, luego las células fueron lavadas 3 veces con solución salina y resuspendida hasta obtener una suspensión al 10% en solución salina. Esta suspensión se colocó durante 1 hora en baño maría a 80°C; se lavaron nuevamente, volviéndose a resuspender, hasta tener de nuevo una concentración al 10% en solución salina. A un mililitro de esta suspensión se le adicionó 0.1 ml. de una dilución 1:8 del anticolerágeno purificado, constituyendo ésta suspensión final de trabajo. La fracción IgG del antisuero preparado en conejo por inmunización con el colerágeno purificado fué proporcionado por el Dr. A. Cravioto (INCYTAS-DIF).

En un portaobjetos se colocaron 10 µl de solución salina para suspender la cepa de E. coli a probar previamente sembrada en tubos de TSA. A ésta suspensión bacteriana se le adicionaron 10 µl de la suspensión al 10% de los estafilococos sensibilizados. También se colocaron en mismo portaobjetos un control positivo y un control de reactivos (Esquema 3).

Esquema 3. Representación de la técnica staph-CoA.



3.3.3. Método de cultivo directo-GML-ELISA (DCM-GML-ELISA)

Esta técnica es una modificación de la GML-ELISA que emplea antitoxina cólera. Involucra el cultivo directo de la cepa de E. coli en los pozos de la placa de microtitulación revestida con el gangliósido GML y a continuación se lleva a cabo la prueba de ELISA. Este método no solamente agiliza el diagnóstico sino que también ahorra materiales y reactivos; las densidades ópticas netas que resultan de esta prueba permite que la prueba sea leída visualmente sin espectrofotómetro. La DCM-GML-ELISA provee una prueba simple, práctica y eficiente para la LT.

Procedimiento: Los pozos de la placa de microtitulación se revistieron toda la noche a temperatura ambiente (20-22°C) con 100 µl de GML (presentación comercial: 600 nanomoles/10 ml; 60 nm son suficientes para revestir cuatro placas) en PBS (pH=7.2). Las placas se lavaron tres veces con PBS, los restantes sitios de unión no-unidos se bloquearon por la adición de 200 µl de Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS a todos los pozos durante 30 min. a 37°C. Los pozos se vaciaron y se lavaron tres veces con PBS, después de lo cual se adicionó 200 µl del medio de Mundell y las cepas a probar se inocularon directamente en los pozos. Después de 24 hrs. de incubación sobre una plataforma de agitación rotatoria (150 rpm) a 37°C, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05%, adicionando después 100 µl de anti-toxina cólera 1:500 a todos los pozos y se incubó durante 1 hr. a 37°C. Después de otro lavado se inocularon en todos los pozos bajo las mismas condiciones 100 µl del conjugado anti-IgG-Fog fatasa alcalina (1:200). Se efectuó un lavado final y luego

100 μ l de p-Nitrofenilfosfato (Sigma) diluido a 1 mg/ml en buffer de carbonato (pH=8.5). La reacción se paró con la adición de 25 μ l de NaOH 3N, las densidades ópticas se midieron con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm. Se calculó la densidad óptica neta, restando la densidad óptica de los pozos controles de fondo a la densidad óptica correspondiente a los pozos de prueba.

Esta técnica se efectuó en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología (INCYTAS-DIF). El material y los reactivos empleados (ver apéndice), fueron proporcionados por el Dr. A. Cravioto, subdirector del mismo instituto.

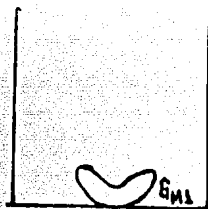
ELISA sandwich-antiglobulina.

Adsorber a la placa Ab específico A
(Gangliósido G_{M1})

Incubar y lavar

Bloquear sitios de reacción no unidos
(Albúmina sérica bovina)

Incubar y lavar

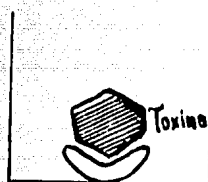


Añadir medio de Mundell

Inocular cepas a probar

Incubar

Lavar



Añadir Ab específico B

(anti-toxina cólera)

Incubar

Lavar

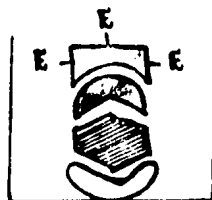


Añadir Conjugado

(γ -globulina anti-B marcada)

(anti-IgG-Fosfatasa alcalina)

Lavar

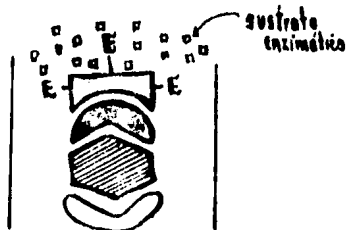


Añadir sustrato enzimático

(p-nitrofenil fosfato)

Añadir NaOH 3N

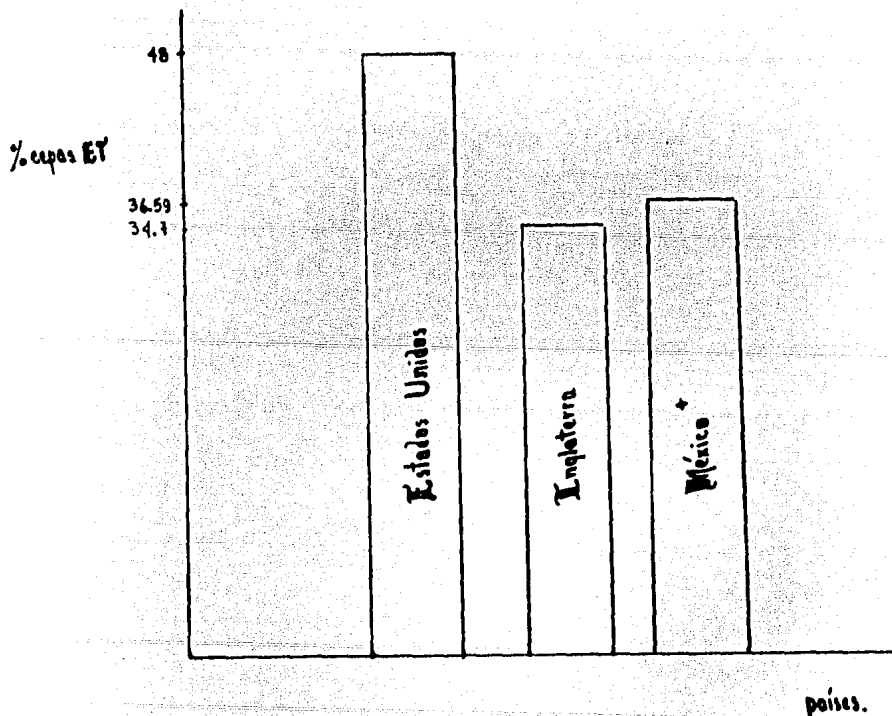
Medir densidad óptica ó --
leer visualmente.



4. RESULTADOS

Se encontró que 30 (36.59%) de las 83 muestras analizadas tenían al menos una cepa de E. coli enterotoxigénica, en las 52 (63.45%) muestras restantes no se aisló ninguna cepa positiva. Estos datos se ven en la gráfica 1 comparándolos con los obtenidos en otros países (Wilson 1981).

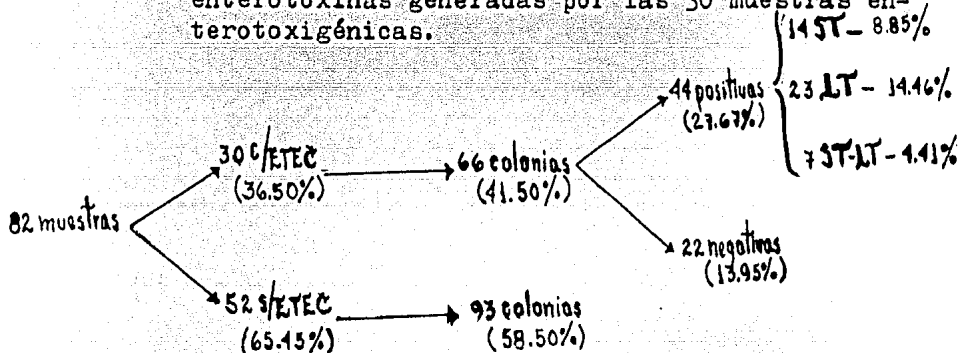
Gráfica 1. Porcentaje de cepas enterotoxigénicas aisladas en lechones neonatos con diarrea en U.S.A, Inglaterra y México.



* el dato corresponde al obtenido en ésta tesis.

Las 30 muestras con cepas enterotoxigénicas generaron 66 colonias diferentes (41.5%), de las cuales el 27.67% fueron positivas a una de las dos enterotoxinas reconocidas (LT, ST) ó a ambas (LT-ST) (Esquema 4).

Esquema 4. Porcentaje de colonias positivas y negativas a enterotoxinas generadas por las 30 muestras enterotoxigénicas.



Gráfica 2. Porcentaje de colonias positivas y porcentaje de colonias generadas por las muestras analizadas.

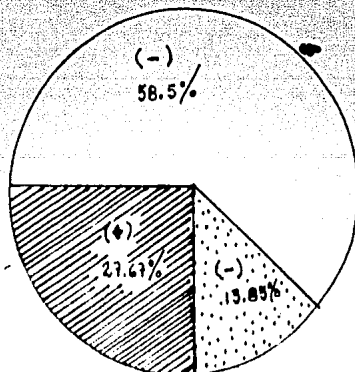


Tabla 8. Diferentes cepas enterotoxigénicas aisladas de las -
30 muestras que resultaron positivas.

ST	LT	ST + LT
138-1	135-1	122-1 .
154-3	146-3	137-1 .
163-2	146-4	139-1 .
170-1	148-1	154-3 .
173-3	148-3	176-1 (d)
176-1	149-2	200-1 .
187-1	151-1	203-1 + .
201-1	151-2	
201-2	151-3	
202-1	161-3 (d) &	
202-3	161-4 (d) &	
203-2 +	162-3 (d) &	
204-1	164-4 (d) &	
204-2	165-3 (d) &	
	171-2	
	174-1 (d) &	
	175-2 (d) &	
	176-1 (d) &	
	178-1 (d) &	
	186-2 (d) &	
	195-1 (d) &	
	198-2 (d) &	
	203-3 + &	
TOTAL = 14		7

& Toxinas LT detectadas por coaglutinación.

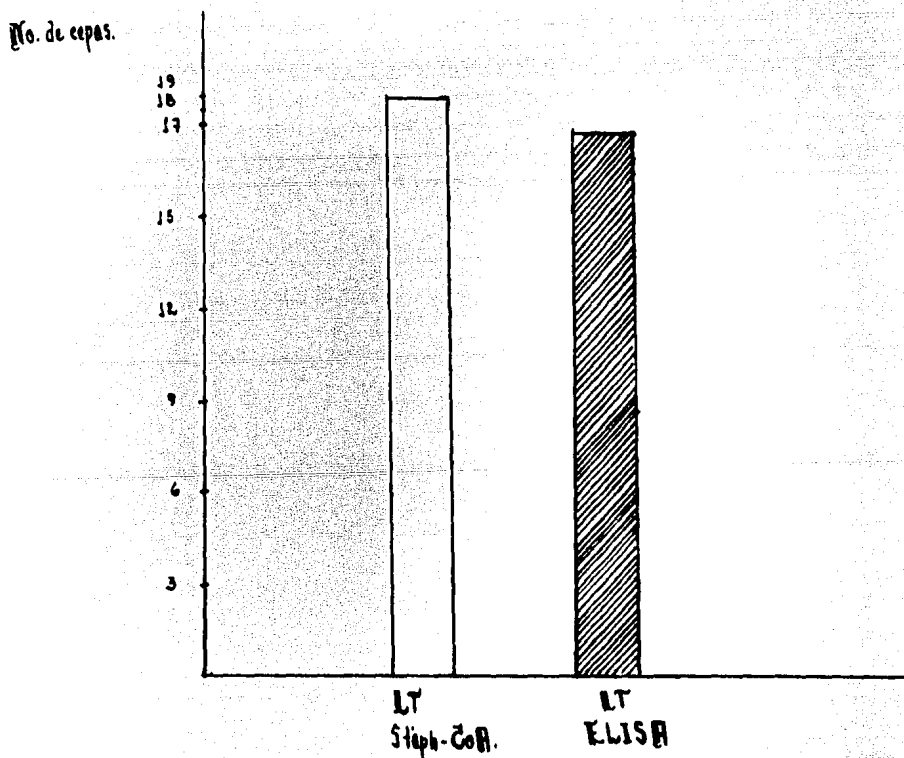
. Las toxinas LT de cepas que también producen ST se detectaron por coaglutinación y por ELISA.

+ Esta muestra generó: Una colonia productora de ST,
una colonia productora de LT y
una colonia productora de ST+LT

(d): Presentaron una reacción débil positiva en la prueba de --
coaglutinación siendo negativas en la prueba de ELISA.

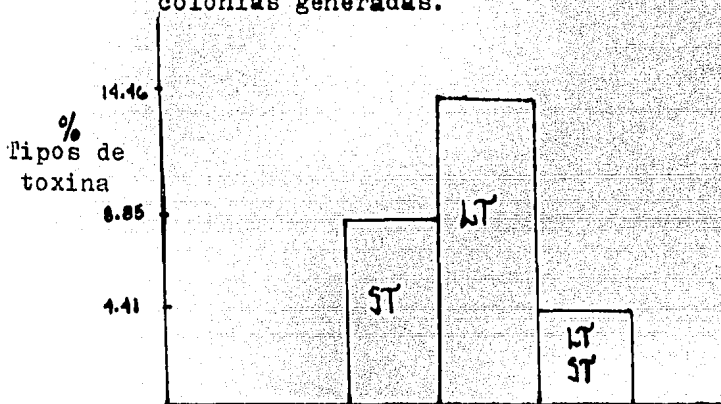
El número de cepas productoras de la toxina LT detectadas por la prueba de coagulación fueron en total 19 y el número de cepas productoras de la toxina LT detectadas por la prueba de ELISA fueron en total 17 (Gráfica 3).

Gráfica 3. Número de cepas productoras de LT detectadas por la prueba de coagulación y por la prueba de ELISA.



En la gráfica 4 se observa que predominan las cepas productoras de LT seguidos de cepas productoras de ST y en menor cantidad las positivas a ST + LT.

Gráfica 4. Distribución del tipo de toxina en las diferentes colonias generadas.



La variación colonial más evidente en las cepas de E. coli -- aisladas fué la del color de la colonia, siendo rojo total ó rojo parcial tanto en las cepas positivas como en las negativas, como se vé en el esquema 5.

Esquema 5. Porcentaje de colonias rojo total y rojo parcial - en cepas positivas y negativas a enterotoxinas.

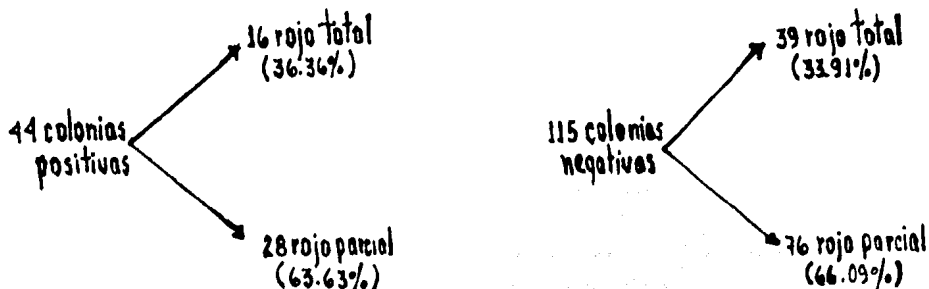


Diagrama 1. Porcentaje de colonias rojo total y parcial en colonias enterotoxigénicas.

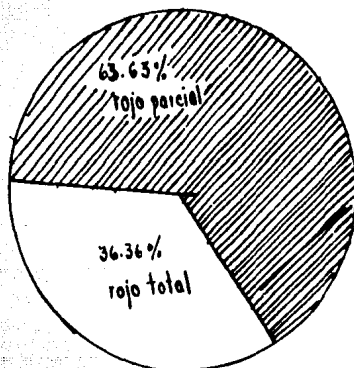
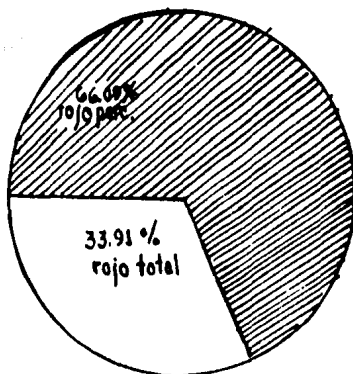


Diagrama 2. Porcentaje de colonias rojo total y parcial en colonias no-enterotoxigénicas.



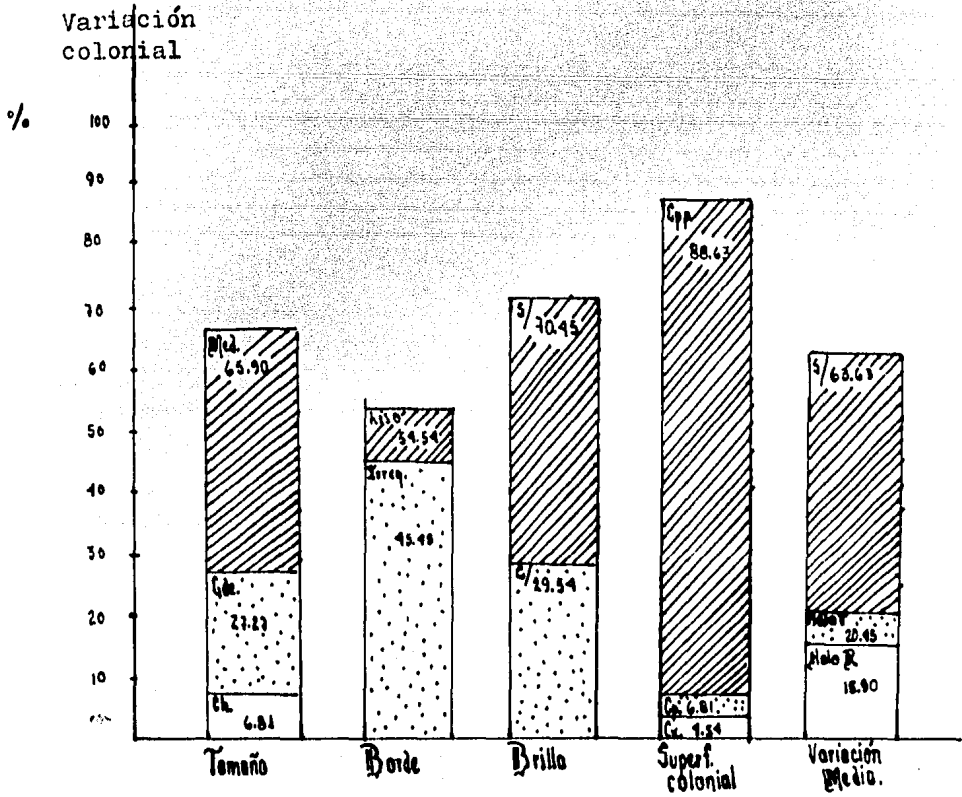
Además, de éstas colonias se tomaron en cuenta otras características coloniales como son: tamaño, borde, brillo, superficie colonial y variación ó no del medio de cultivo.

En las cepas enterotoxigénicas predominaron las siguientes características coloniales: tamaño mediano (65.9%), borde irregular (45.45%) y/o liso (54.54%), sin brillo (70.45%), cóncava - poco prominente (88.65%) y sin variación en el medio (63.63%) (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de variación colonial presentada por las cepas de E. coli enterotoxigénica.

	Tamaño			Borde		Brillo		Superf. colonial			Variación medio		
	Gde	Med	Chico	Irreg	Liso	con	sin	Čp.	Čpp	Čx	sin	Halo T	Halo R
Cols. Positivas	12	29	20	20	24	13	31	3	39	2	28	9	7
%	27.27	65.90	6.81	45.45	54.54	29.54	70.45	6.81	88.63	4.54	63.63	20.45	15.90

Gráfica 5. Porcentaje de la variación colonial presentada por las cepas enterotoxigénicas.

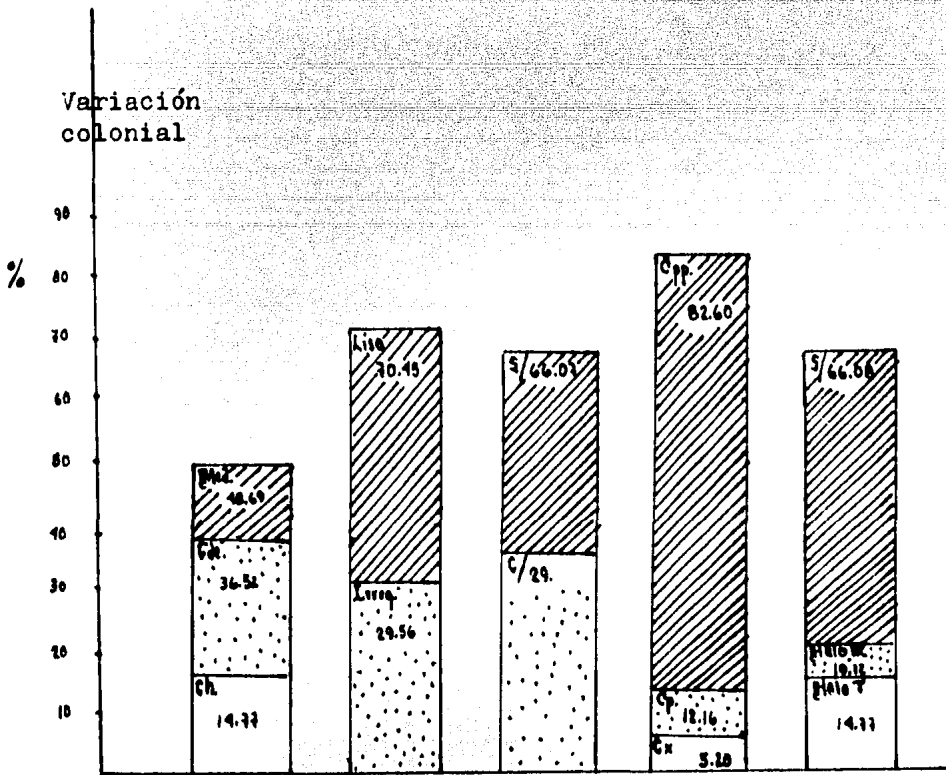


En las cepas no-enterotoxigénicas predominaron las siguientes características coloniales: tamaño mediano (48.69%), borde liso (70.43%), sin brillo (66.07%), cóncava poco prominente -- (83.6%) y sin variación en el medio (66.08%) (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de la variación colonial presentada por las cepas no-enterotoxigénicas.

	Tamaño			Borde		Brillo		Superf. colonial			Variación Medio		
	Gde.	Med.	chico	Ireq.	Liso	con	sin	Ĉp	Ĉpp	Ĉx	sin	Halo T	Halo R
Cols. Negativas	42	56	17	34	81	39	76	14	95	6	76	17	22
%	36.52	48.69	14.77	29.56	70.43	33.90	66.07	12.16	82.60	5.20	66.08	14.17	19.12

Gráfica 6. Porcentaje de la variación colonial presentada por las cepas no-enterotoxigénicas.

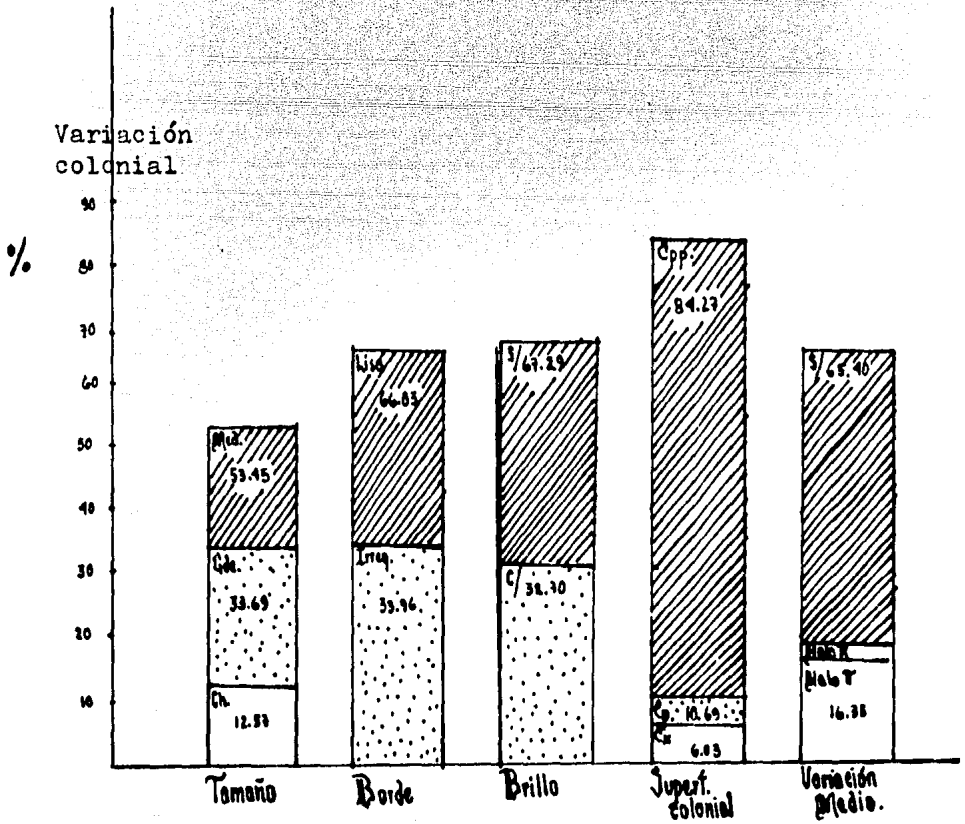


Las características morfológicas comunes de la E. coli más -- frecuentemente aisladas de diarrea son las siguientes: tamaño mediano, borde liso, sin brillo, cóncava poco prominente y -- sin variación en el medio, según la tabla 11 y representado -- en la gráfica 7.

Tabla 11. Porcentaje de variación colonial presentada, en general, por las cepas de E. coli.

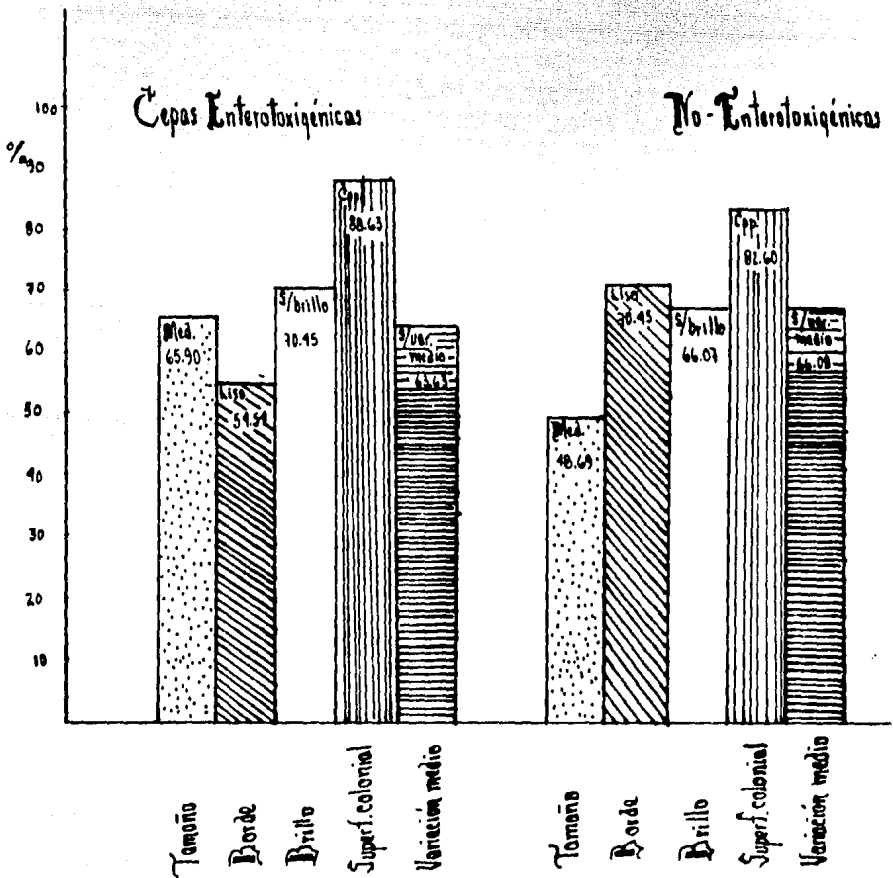
	Tamaño			Borde		Brillo		Superf. colonial			Variación Medio		
	Gde.	Med	chico	Irreg	liso	con	sin	Čp.	Čpp	Čx	sin	Halo T	Halo R
Colonias	54	85	20	54	105	52	107	17	134	8	104	26	29
%	33.96	53.45	12.57	33.96	66.03	32.70	67.29	10.69	84.27	6.03	45.40	16.35	18.23

Gráfica 7. Porcentaje de la variación colonial presentada, en general, por las cepas de E. coli.



Las cepas enterotoxigénicas no presentan una variación muy - marcada en cuanto a predominio de sus características, compara das con las colonias no-enterotoxigénicas según la gráfica 8.

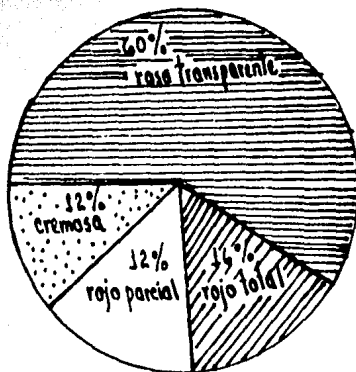
Gráfica 8. Comparación de características coloniales de cepas enterotoxigénicas y no-enterotoxigénicas.



Las características señaladas anteriormente pueden presentarse en algunas otras Enterobacterias, principalmente en Klebsiella sp. La característica más evidente es la de ser rosa transparente, aunque también presentaron colonias similares a las obtenidas con E. coli (Diagrama 3).

Diagrama 3. Porcentaje de variación en color presentada por Klebsiella.

Color	Número	Porcentaje
Rojo total	4	16
Rojo parcial	3	12
Cremoso	3	12
Rosa transparente	15	60

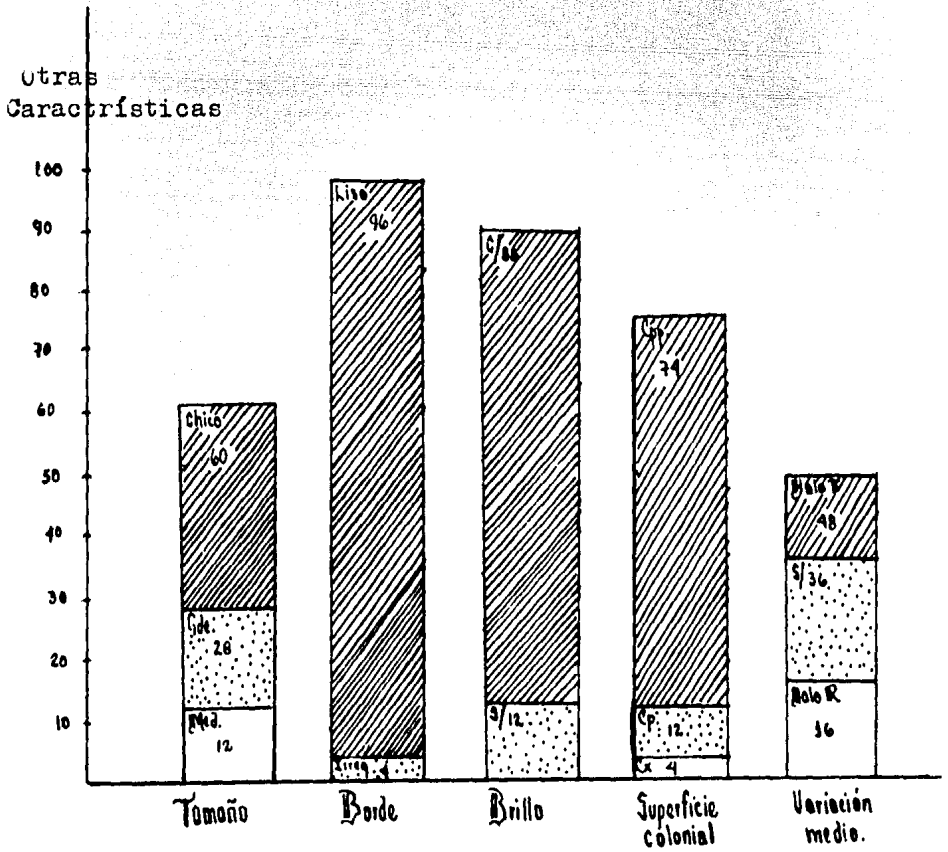


Otras características en las cepas de *Klebsiella* se ilustran en la tabla 12.

Tabla 12. Otras características morfológicas predominantes - de *Klebsiella* spp. (derivadas de 25 cepas aisladas en éste trabajo).

	Tamaño			Borde		Brillo		Superf. colonial			Variación Medio		
	Ede	Med.	Chico	Irreg.	Liso	con	sin	Čp	Čpp.	Čx	sin	Halo T	Halo R
<i>Klebsiella</i>	7	3	15	1	24	22	3	3	21	1	9	12	4
%	28	12	60	4	96	88	12	12	74	4	36	48	16

Gráfica 9. Porcentaje de otras características predominantes - en Klebsiella.



Además de las *Klebsiellas* ya mencionadas, también se aislaron otras bacterias (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de otras bacterias con características semejantes a *E. coli*.

Bacteria	No.	Porcentaje
<u><i>Alkalescens dispar</i></u>	9	5.5%
<u><i>Edwarsiella tarda</i></u>	3	1.8%
<u><i>Shigella spp.</i></u>	2	1.2%

1) En las cepas de *Alkalescens dispar*, predominaron las características morfológicas siguientes: transparentes, de tamaño variable, liso, con brillo, cóncava poco prominente y sin variación ó con halo transparente en el medio.

2) En las cepas de *Edwarsiella tarda*, predominaron las características morfológicas siguientes: blancas transparentes con centro rojo, de tamaño variable, bordes liso ó irregular, cóncava poco prominente y halo transparente en el medio.

3) En las cepas de *Shigella spp.*, predominaron las siguientes características morfológicas: color rosa tenue granulosa, tamaño variable, lisa, brillantes, cóncava poco prominente y -- halo transparente en el medio.

5. DISCUSION

Debido a que la colibacilosis entérica es una enfermedad infecciosa importante, de gran significado a nivel de lechones neonatos (Wilson, 1981) y que ocasiona pérdidas económicas -- importantes para el porcicultor debido al bajo rendimiento -- económico en el cerdo, se han hecho estudios exhaustivos de -- ésta enfermedad diarreica en diferentes países. Es interesan- te conocer los problemas ocasionados por la colibacilosis en y la manera como deben enfrentarse tales problemas, por lo -- que como objetivo de éste trabajo se propuso identificar, -- aparte de las colonias típicas, las colonias atípicas enterotoxigénicas de E. coli que suelen pasar inadvertidas y por lo tanto queden fuera de las autovacunas, ocasionando que la inmunización de los lechones sea incompleta.

En los Estados Unidos, Bergeland (1980), reporta que la E. coli es el agente etiológico en el 48% de los casos de dia- rrea y durante la primera semana de vida de los lechones.

En Inglaterra y en el país de Gales, Wray (1984) menciona que la E. coli enterotoxigénica prevaleció en el 34.7% de los -- 1913 lechones neonatos con diarrea estudiados durante el pe- ríodo 1975-1983. En éste estudio se encontró a la E. coli enterotoxigénica con una prevalencia del 36.59% en los 33 casos de diarrea neonatales analizadas correspondientes a 4 granjas (Gráfica 1). Apparently hay una similitud con los resulta- dos obtenidos en los países mencionados, pero aún así son re- sultados que no revelan la verdadera prevalencia de la E. co- li pues éste porcentaje pudo haber sido más alto ya que en -- una de las granjas estudiadas se había estado empleando como

método de inmunización una bacterina preparada a partir de la LT y del antígeno K38 de E. coli. Sería conveniente, realizar estudios en granjas en donde no se esté empleando algún sistema de inmunización para obtener resultados más objetivos de tan importante enfermedad infecciosa. También se tiene que tomar en cuenta que la prueba del ratón lactante es específica para detectar la enterotoxina STa pero no detecta la STb, por lo que las cepas productoras de STb no fueron detectadas, dando con ésto un dato inexacto de la prevalencia de la colibacilosis en casos de que hubiesen cepas que solo produjeran STb.

Aparentemente (Gráfica 3) la prueba de coagulación es más sensible que la prueba de ELISA para detectar las cepas productoras de LT. El resultado aparente se debe a que con la prueba de coagulación se detectaron reacciones débiles que fueron tomadas como positivas y que deberían ser desechadas y solo tomar en cuenta aquellas reacciones evidentes y claras. Con el método de cultivo directo-G_M-ELISA, cuya sensibilidad se ha demostrado que es igual a la del cultivo de células adrenales Y-1 (Ristaino y cols., 1983), se detectaron más cepas de E. coli enterotoxigénicas que con la prueba de coagulación, por ser ésta menos sensible. Justificando los resultados falsos positivos se debe a las características lipopolisacáridas en la superficie de las células bacterianas pues se empleó la técnica directamente en las suspensiones bacterianas que, por las características ya mencionadas, aglutinaban dando resultados falsos positivos, por lo que los datos de la gráfica 3 se constituyen en dudosos en cuanto a la incidencia de las cepas productoras de LT. Sin embargo, la técnica es --

adecuada si se requiere un diagnóstico rápido y puede ser más específica si se emplea directamente en filtrados de cultivos bacterianos, pero esto tiene sus inconvenientes, pues se requiere invertir más tiempo, el procedimiento es más laborioso por lo que es un trabajo exhaustivo para un reducido número de personas. Se debe tener precaución al usar la prueba de coagulación como prueba diagnóstica única y deberán tomarse en cuenta otros parámetros para el diagnóstico como pueden ser los datos clínicos.

Con el fin de encontrar cierta relación entre la morfología de E. coli y su capacidad para producir enterotoxinas y después de un análisis de las características morfológicas, se encontraron colonias enterotoxigénicas atípicas de E. coli (rojo parcial), en un porcentaje de 63.63%, en contraste con las colonias típicas (rojo total) del 36.36% (Esquema 5).

Las colonias de E. coli analizadas, enterotoxigénicas o no-enterotoxigénicas presentan, en general, características morfológicas semejantes (Gráfica 5). Siendo la característica más evidente la del color de la colonia, ya que predominó el rojo parcial y en la práctica común de aislamientos se toma la colonia de color rojo total como colonia de E. coli y se desprecian las colonias atípicas. En base a estos resultados podemos predecir que E. coli no tiene una característica morfológica única que por sí misma sea sugestiva de enterotoxigenicidad y por lo tanto no se puede encaminar el diagnóstico hacia la búsqueda de una forma bacteriana que nos sugiere que la muestra analizada macroscópicamente posea cepas de E. coli productoras de enterotoxinas, pero sí condujo a deducir que es necesario analizar varios tipos de colonias y no solo enfocarse al tipo

colonial clásico de E. coli, a saber, rojo total, borde liso, brillante.

Es de interés el hecho de que una muestra pudiera generar más de un tipo de colonia, pues podrían pasar inadvertidas otras cepas de E. coli que pudieran ser enterotoxigénicas.

Otro hecho de interés es el de que una muestra se encontró una cepa productora de ST, una cepa productora de LT y una cepa productora de ambas enterotoxinas (tabla 8), lo que conduce a predecir que para lograr una inmunización más efectiva, se deben tomar en cuenta todas las variantes coloniales que se presenten cuando se quieran elegir serotipos enterotoxigénicos para la elaboración de autovacunas. El desechar una forma colonial puede conducirnos a desechar una cepa productora de enterotoxina que no quedaría incluida en la vacuna oral, dando como consecuencia una inadecuada inmunización de los lechones. Con éste último aporte en la tesis se cubre el objetivo inicialmente propuesto.

Es por eso que en estudios efectuados en gonococos, brucella y pasteurella se ha determinado que son una variedad de factores los que intervienen de tal manera que no es exclusiva una morfología para predecir que es enterotoxigénica, dentro de éstos se encuentra el medio de cultivo, temperatura, cambio fisiológico y cambios antigénicos. (Swason, 1971; Szzel, 1984)

No se realizó un estudio comparativo entre las cuatro granjas que proporcionaron las muestras, porque además de las diferencias que prevalecían en cada una de ellas, el número de muestras obtenidas de las mismas fluctuaban entre 4 y 53, cifras

que no son adecuadas si se desean obtener datos reales acerca de la situación de la presencia de ceras enterotoxigénicas en una granja dada. Si tal fuera el caso, lo indicado sería hacer el estudio en una sola granja, con un número adecuado de muestras, con problemas de diarreas, pero sin medidas de inmunización ó sin antibioticoterapia como método de control.

Ciertas formas coloniales de Klebsiella presentan características semejantes a las de E. coli, por lo que pueden confundirse (Diagrama 3). Es necesario, aparte de tener experiencia en el aislamiento de colonias, que se haga una adecuada identificación bioquímica de las mismas.

Se considera importante reportar el aislamiento de Shigella - a partir de diarreas de lechones. Posiblemente sea un contaminante de origen humano, constituyendo ésto un problema de salud pública. Respecto a su morfología se considera que puede confundirse con ciertas formas coloniales de E. coli si no se tiene experiencia en su aislamiento.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la Escherichia coli enterotoxigénica no presenta una característica morfológica única que por sí misma sea sugestiva de enterotoxigenicidad, ésto por diversas causas tales como; el medio nutricional, cambios fisiológicos y antigénicos que influyen de tal manera que pueden producir una mutación de diferente origen.

Del estudio morfológico puede derivarse el hecho de que deben de tomarse las variantes en cuenta ya mencionadas, cuando se quieren elegir serotipos enterotoxigénicos que van a ser empleados en la elaboración de autovacunas, utilizadas éstas, como método de control de la diarrea de los lechones con el fin de lograr una inmunización más efectiva de los mismos.

APENDICE

1. Reactivos utilizados en DCM-G_{ML}-ELISA.

Gangliósido G_{ML}. Presentación comercial: 600 nanomoles/10 ml.
(60 nm son suficientes para 4 placas)

Solución buffer de fosfatos (PBS) (pH=7.2)

NaCl 0.8 g
KCl 0.02 g
Na₂HPO₄ 0.115 g
KH₂PO₄ 0.02 g
Agua dest. c.b.p. 100 ml.

Medio casaminoácidos de Mundell (pH=8.5)

Casaminoácidos (Difco) 20 g
Extracto de Levadura (Difco) 6 g
NaCl 2.5 g
K₂HPO₄ 8.7 g
Glucosa 2.5 g
Sol. trazas de sales 1 ml.

Sol. trazas de sales

MgSO₄ 5%
MnCl₂ 0.5%
FeCl₃ 0.5%

Tratamiento con antibiótico: Se adicionó lincomicina al medio a una concentración de 45 µl/ml. para asegurar su efecto sobre la inducción de la toxina.

Anti-toxina cólera (1:500): Los anticuerpos anti-toxina cólera fueron provistos por el Dr. Alejandro Cravioto (INCYFAS-DIF).

Conjugado: Los anticuerpos anti-IgG marcados con fosfatasa -- alcalina, fueron provistos por el Dr. A. Cravioto (INCYFAS-DIF).

BIBLIOGRAFIA

- Alderete J.F., and D.C. Robertson
Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli.
Infect.Immun. 19(3):1021-1030, 1978.
- Alvarez M.C.I.
Patogenia de Klebsiella pneumoniae (sensu lato) en la diarrea de los lechones.
Tesis maestría. FESC-UNAM. México, 1984.
- Anderson M.J., J.S. Whitehead, and Y.S. Kim; citados por Gaastra y de Graaf, 1982.
Interaction of Escherichia coli K88 antigen with porcine intestinal brush borders membranes.
Infect.Immun. 29:897-901, 1980.
- Avalos L.C.
Investigación de enterotoxina producida por Klebsiella aisladas de materia fecal de niños.
Tesis lic. IPN. México, 1978.
- Bergey's manual of determinative bacteriology
Baltimore; The Williams and Wilkins.
10a. ed., 1979; pag. 283-285.
- Bramucci M.G. and R.K. Holmes.
Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat labile enterotoxin produced by individual colonies of Escherichia coli or Vibrio cholerae
J.Clin.Microbiol. 8(2); 252-255, 1978.
- Brandwein H., A. Deutsch, M. Thompson, and R. Giannella.
Production of neutralizing monoclonal antibodies to Escherichia coli heat-stable enterotoxin.
Infect.Immun. 47 (1);242-246, 1985.
- Brill B.M., B.L. Waislauskas, and S.H. Richardson.
Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli.
J.Clin.Microbiol. 9(1):49-55, 1979.

- Brinton Ch.C

The structure, function, synthesis, and genetic control of bacterial pili and a molecular model of DNA, and RNA transport in Gram negative bacteria.

Trans.N.Y. Acad.Sci. 27:1003-1054, 1965.

- Burgess M.N., R.J.Bywater, C.M.Cowley, N.A.Mullan, and P.M. Newsome; citados por Kennedy y cols., 1934.

Biological evaluation of methanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits - and calves.

Infect.Immun. 21:526-531, 1978.

- Changchawalit S., P.Scheverria, N.D.Taylor, U.Leksomboom, Ch.Tirapat, B.Kampokalap, B.Rowe.

Colonization factors associated with enterotoxigenic Escherichia coli isolated in Thailand.

Infect.Immun. 45(2):525-527, 1984.

- Costerton J.W., R.T.Irvin, and K.J.Cheng; citados por Kun nel y Moon, 1984.

The bacterial glycocalyx in nature and disease.

Annu.Rev.Microbiol. 35:299-324, 1981.

- Cowan S.T., y J.Steel's

Manual para la identificación de bacterias de importancia médica.

CECSA, México, pág.158-159, 1974.

-- Gravioto A., R.J.Gross, S.W.Scotland, and B.Rowe; citados por Scaletsky y cols., 1984.

An adhesive factor found in strains of E. coli belonging - to traditional infantile enteropathogenic serotypes.

Curr.Microbiol. 3:95-99, 1979.

- Cross S.A., P.Gemski, C.J.Sadoff, P.Ørskov, and I.Ørskov.

The importance of the K1 capsule in invasive infection caused by Escherichia coli.

J.Infect.Dis. 149(2):184-193, 1984.

- Dean A.G., Y.Ching, R.G.Williams, L.B.Harden.

Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: - Application in study of diarrhea in children in Honolulu.

J.Infect.Dis.125(4):407-411, 1972.

- Dean E.A., and R.E.Isaacson; citados por Dean e Isaacson, 1985. In vitro adhesion of piliated Escherichia coli to --

small intestinal villous epithelial cells from rabbits and the identification of a soluble 987P pilus receptor-containing fraction.

Infect. Immun. 36:1192-1198, 1982.

- Dean E.A., and R.E. Issacson.

Purification and characterization of a receptor for the 987P pilus of Escherichia coli.

Infection Immun. 47(1):98-105, 1985.

- Deneke F.C., K. McGowan, D.A. Larson and L.S. Gorbach.

Attachment of human and pig (K88) enterotoxigenic Escherichia coli strain to either human or porcine small intestinal cells.

Infect. Immun. 45(2):522-524, 1984.

- Donta S.T., H.W. Moon, and S.C. Whipp; citados por Bramucci y Holmes, 1973.

Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture.

Science. 183:334-336, 1973.

- Duguid J.P., E.S. Anderson, and J. Campbell; citados por Gaastra y de Graaf, 1982.

Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae.

J. Pathol. Microbiol. 92:107-137, 1966.

- Echeverria P., J. Seriwatana, N.D. Taylor, Ch. Tirapat, and B. Rowe.

Escherichia coli contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance.

Infect. Immun. 48(3):843-846, 1985.

- Eidels L., L.R. Proia, and D.A. Hart.

Membrane receptors for bacterial toxins.

Microbiol. Rev. 47(4):596-620, 1983.

- Evans D.G., D.J. Evans, and N.F. Pierce; citados por Alvarez, 1984.

Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of Escherichia coli

Infect. Immun. 7:873-880, 1973.

- Evans D.J., Jr., and D.G. Evans.

Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli using passive immune hemolysis.

Infect. Immun. 16:604-609, 1977.

- Ezzel W.J., Watter J.D.
Phase-shift markers in bordetella; alterations in envelope proteins.
J.Infect.Dis., 143(4):562-577, 1981.
- Field M., L.H.Graf, W.J.Laird and T.L.Smith; citados por Lee y cols., 1983
Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effect on guanylate cyclase activity, cyclic AMP concentration and ion transport in small intestine.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 75: 2800-2804, 1978.
- Finkelstein R.A. and J.W.Peterson; citados por Bramucci y Holmes, 1978.
In vitro detection of antibody to cholera enterotoxin in cholera patients and laboratory animals.
Infect.Immun. 1:21-29, 1970.
- Gaastra W. and de Graaf F.K.
Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains.
Microbiol. Rev. 46(2):129-161, 1982.
- Gaston M.A., C.Bucher and T.L. Pitt.
O serotyping scheme for Enterobacter cloacae.
J.Clin.Microbiol. 18(5):1079-1083, 1983.
- Gibbons R.A., G.W.Jones and R.Sellwood.
An attempt to identify the intestinal receptors for the K88 adhesin by means of hemagglutination inhibition test -- using glycoproteins and fraction from sow colic rum.
J.Gen.Microbiol. 86:228-240, 1975.
- Guerrant R.L., J.M.Hughes, B.R.Chang, D.C.Robertson and F. Murad; citados por Brandwein y cols., 1985.
Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of Escherichia coli.
J.Infect.Dis. 142:220-228, 1980.
- Guerrant R.L. and L.L.Brunton; citados por Bramucci y Holmes, 1978.
Characterization of the chinese ovary cell assay for the enterotoxins of V. cholerae and Escherichia coli and for antitoxin: differential inhibition of fangliosides, specific antisera and toxoid.
J.Infect.Dis. 135:720-723, 1977.

- Gunther S., Stent.
Molecular Genetic
Ed. W.A. Freeman and company; 2a. ed.; 1979; pag. 736-739
- Guinée P.A.M., C.M. Agterberg, W.H. Jansen and J.F. Frick
Serological identification of pig enterotoxigenic Escherichia coli not belonging to the classical serotypes.
Infect. Immun. 15(2):549-555, 1977.
- Gyles C.L., M. So and S. Falkow; citado por Hirst y cols.
1984.
The enterotoxin plasmids of Escherichia coli
J. Infect. Dis. 130:40-49, 1974.
- Hirst T.R., S.J.S. Hardy, L.L. Randall
Assembly in vivo of enterotoxin from Escherichia coli: --
Formation of the subunit oligomer.
J. Bacteriol. 153(1):21-26, 1983.
- Hirst T.R., J. Sánchez, J.B. Kaper, S.J.S. Hardy and J. Holmgren.
Mechanism of toxin secretion by Vibrio cholerae investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7752-7756, 1984.
- Hirst T.R., L.L. Randall y S.J.S. Hardy.
Cellular location of heat-labile enterotoxin in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 157(2):637-642, 1984.
- Hughes M.J., F. Murad, B. Chang, L.R. Guerrant.
Role of cyclic in the action of heat-stable enterotoxin -
of Escherichia coli.
Nature 271(23):755-756, 1978.
- Hohmann A. and M.R. Wilson.
Adherence of enteropathogenic Escherichia coli to intestinal epithelium in vivo.
Infect. Immun. 12(4):866-880, 1975.
- Holmgren J. and A.M. Svennerholm; citado por Bramucci y Holmes, 1978.
Enzyme linked immunosorbent assays for cholera serology.
Infect. Immun. 7:759-763, 1973.
- Isaacson R.A., P.C. Fusco, C.G. Brinton and H.W. Moon; ci-

tados por Dean e Isaacson, 1985.

In vitro adhesion of Escherichia coli to porcine small intestinal.

Infect.Immun. 21:392-397, 1978.

- Jones W.S. and W.J.Rutter.

Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal -- diarrhea caused by Escherichia coli in piglets.

Infect.Immun. 6(6):918-927, 1972.

- Kennedy D.J., M.N.Greenberg, J.A.Dunn, R.Abernathy, J.S. - Nyerse and R.L.Guerrant.

Effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin STb on intestines.

Infect.Immun. 46(3):639-643, 1984.

- Klipstein A.F. and F.R.Engert.

Purification and properties of Klebsiella pneumoniae heat-stable enterotoxin.

Infection.Immun. 13(2):373-381, 1976.

- Knutton S., P.H.Williams, D.R.Lloyd, D.G.A.Candy and A.S. McNeish; citados por Ørskov y cols., 1985.

Ultrastructural study of adherence to and penetration of -- cultured cells by two invasive Escherichia coli strains -- from infants with enteritis.

- Lee C.H., S.L.Moseley, H.W.Moon, S.C.Whipp, G.L.Gyles -- and M.So.

Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic Escherichia coli heat-stable toxin II producers.

Infect.Immun. 42(1):264-268, 1983.

- Mathewson J.J., P.C.Johnson, H.I.Dupont, D.R.Worgan, S.A. Thomson, L.V.Wood and Ch.D.Ericsson.

A newly recognized cause of traveler's diarrhea, enteroadherent Escherichia coli.

J.Infect.Dis. 151(3):471-475, 1985.

- McNeish A.S., P.Turner, J.Fleming and N.Evans.

Mucosal adherence of human enteropatogenic Escherichia coli.

Lancet; 946-948, 1975.

- Middlebrook J.L., and R.B.Dorlad.

Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action.
Microbiol. Rev. 48(3):199-221, 1984.

- Moon H.W., B. Nagy, R.E. Isaacson and I. Ørskov.
Occurrence of K99 antigen on Escherichia coli isolated ---
from pigs and colonization of pig ileum by K99 enterotoxi-
genic E. coli from calves and pigs.
Infect. Immun. 15(2):614-620, 1977.

- Ørskov F., I. Ørskov, B. Jann and K. Jann; citados por Run-
nells y Moon, 1984.
Immunoelectrophoretic patterns of extracts from all Esche-
richia coli and K antigen test strains correlation with pa-
thogenicity.
Acta, Pathol. Microbiol. Scand, 79b:142-152; 1971

- Ristaino P.A., M.M. Levine and Ch.R. Young.
Improved GMI-Enzyme-linked immunosorbent assay for detec-
tion of Escherichia coli heat-labile enterotoxin.
J. Clin. Microb. 18(4):805-815, 1983.

- Rivera H.J., citado por Alvarez C.I., 1984.
Problemas de enterobacterias en cerdos.
Porarama, 53:45-47, 1977.

- Runnells P.L., and H.W. Moon.
Capsule reduces adherence of enterotoxigenic Escherichia -
coli to isolated intestinal epithelial cells of pigs.
Infect. Immun. 45(3):737-740, 1984.

- Rutter P.R. and B. Vincent; citados por Gaastra y de --
Graaf. 1982.
The adhesion of micro-organisms to surfaces physico-chemi-
cal aspects, p. 79-92. In R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Me-
lling, P.R. Rutter and B. Vicent (ed.), Microbial adhesion -
to surfaces.
Ellis Horwood Ltd., Chinchester, England.

- Sack A.D. and B.R. Sack.
Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y1 adre-
nal cells in miniculture.
Infect. Immun. 11(2):334-336, 1975.

- Saeed K.M.A., S.N. Magnuson, Sriiraganathan, D. Burger and W.
Josand.
Molecular homogeneity of heat-satable enterotoxins produ-
ced by bovine enterotoxigenic Escherichia coli.
Infect. Immun. 45(1):242-247, 1984.

- Sánchez del Angel L.S.

Estudio sobre el desarrollo de colonias atípicas de Staphylococcus aureus procedentes de carnes, en el medio de Baird-Parker.

Tesis Lic. F.E.C.-U.M.A.M., 1984

- Shannon C.W.

Physiology of diarrhea-small intestines.

JAVMA. Vol.173; 5(2) 662-667.

- Smith H.W. and M.B.Huggins; citados por Gaastra y de Graaf, 1982.

The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic Escherichia coli on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs.

J.Med.Microbiol. 11:471-492, 1978.

- Sojka W.J.

Colibacilosis entérica en cerdos.

Primer curso latinoamericano F.E.S.C.-U.N.A.M. 1979.

- Swanson John.

Estudies on gonococcus infection. XII, Colony color and opacity variants of gonococci.

Infection and Immun.; 19(1); 1978; 320-331

- Speirs J.I., S. Starric and J.Konowalchuch.

Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxin whit Vero cells.

Infect.Immun. 16(2):617-622, 1977.

-Trujana C.M. y M.D.Méndez; citados por Alvarez C.I., 1984

Causas de mortalidad de lechones en dos granjas de Tepeji del Rfo.

XVII.Asoc.Méx. de especialistas en cerdos. 1981.

- Uruchurtu M.A. y J.M.Doporto.

Mortalidad de los lechones. Estudio recapitulativo

Veterinaria, Méx. VI 4:96-106, 1975.

- Uruchurtu M.A., D.Méndez, J.M.Doporto, R.M.Romero, Y. López y F. Sánchez.

Un estudio sobre la mortalidad en lechones en México.

Veterinaria, Méx, VII 4:111-123, 1976.

-Waldman A.S., O.P.Hanley, S.Falkow, G.Schoolnick and F.Murad

A simple, sensitive and specific assay for the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 149(1):83-89, 1984.

- Wilson M.R.

Diseases of swine.

Fifth edition; A.D. Lehman, Glock, Straw.

The Iowa, State University, Press Iowa USA.

pr 471-477, 1981.

- Wray C.

Enteric diseases in animals caused by Escherichia coli; --
their control and prevention.

Biochemical Society Transactions 12;192-193, 1984.