

**ADHERENCIA DE CEPAS DE Escherchia coli A CELULAS
EPITELIALES DE DUCTOS DE GLANDULA
MAMARIA BOVINA In vitro**



**TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR
FRANCISCO ESPINOZA HILARIO**

ASESOR: GUSTAVO A. GARCIA DELGADO



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

DEDICATORIAS

De una manera muy especial dedico este sencillo
trabajo realizado por mi afán de superación a:

A mis padres RAFAEL y CARMELA

por ser y estar,
y por su afán de inducir
a sus hijos por el mejor
camino.

A mis queridos hermanos,
por todo el apoyo brindado.

A todos mis tíos.
Especialmente a los que de alguna
manera han colaborado a este inicio
de mi formación, a ellos por su
siempre y solidaria ayuda.

Con amor a Rosa María

Fraternalmente a todos mis amigos,
y para aquellos que aún no lo son.

Al Departamento de Bacteriología,
por todo lo que me ha enseñado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gustavo A. García D. por su dedicación a que todo fuera realizado lo mejor posible.

Al Programa Universitario de Alimentos (PUAL) por su valioso apoyo.

A Trinidad Perusquía y Yolanda Almanza por todos sus consejos.

A los Doctores Martha Merino M., Raúl Vázquez M., Jorge Pérez M. por su ayuda, aportaciones y facilidades desinteresadas.

A Annel Meija, Irasema Yela y Antonio Aranda, por todas sus facilidades.

Al Dr Pedro Ochoa por su valiosa ayuda

A todo el personal del rastro de Ferrería.

A todos los compañeros del Departamento de
Bacteriología por su bonita y sincera amistad.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Importancia y descripción de la mastitis.....	2
Mecanismos de defensa de la glándula mamaria.....	4
Factores de susceptibilidad de la glándula.....	6
Mastitis por <u>Escherichia coli</u>	9
Adherencia bacteriana.....	10
Hipótesis y objetivo.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	20
LITERATURA CITADA.....	23
 FIG. 1 Promedio de las curvas de crecimiento de las 7 cepas de <u>E.coli</u>	 31
FIG. 2 Promedio de adherencia de <u>E.coli</u> aisladas de mastitis (m), testigos (t) y de <u>S. aureus</u> a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina.....	 32
FIG. 3 Curvas de crecimiento de <u>E.coli</u> aisladas de mas- titis bovina (m).....	33

FIG. 4	Curvas de crecimiento de <u>E. coli</u> aislada de mastitis bovina (m), osteomielitis en un gato (t) y de un intestino de un canino (ti)..	34
Cuadro 1	Cepas de <u>E.coli</u> y <u>S.aureus</u> que presentaron adherencia a 50 células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina <u>in vitro</u>	35
Cuadro 2	Comparación individual de vacas a las que existió adherencia de <u>E.coli</u>	36
Cuadro 3	Adherencia de <u>E.coli</u> aisladas de matitis (m), testigos (t) y de <u>S. aureus</u> a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina <u>in vitro</u>	37
Cuadro 4	Porcentaje de adherencia de las cepas de <u>E. coli</u>	38

RESUMEN

ESPINOZA HILARIO FRANCISCO. " Adherencia de cepas de E. coli a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina in vitro " (bajo la dirección de: Gustavo A. García Delgado).

La finalidad de este experimento fue comparar cepas de E. coli a la prueba de adherencia a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina. Se utilizaron 5 cepas de E. coli aisladas de mastitis bovina y 2 cepas de otro origen (osteomielitis de gato e intestino de perro); los resultados muestran un bajo promedio de adherencia en seis de las 7 cepas probadas, con promedio menor a 0.15 bacterias adheridas por cada célula, mientras que S. aureus utilizado como testigo positivo presentó un promedio de 1.2. No existió diferencia significativa en la adherencia entre cepas de E. coli, y el origen de la cepa no tuvo importancia en la virulencia de estos microorganismos a la mastitis. Concluyéndose que estas E. coli no mostraron poseer adhesinas para las células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina.

ADHERENCIA DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI A CÉLULAS EPITELIALES
DE DUCTOS DE GLÁNDULA MAMARIA BOVINA IN VITRO.

INTRODUCCIÓN

La mastitis (inflamación de la glándula mamaria), es la enfermedad más común en el ganado bovino productor de leche, ocasionando las mayores pérdidas económicas en la industria lechera, no tan sólo por la muy importante disminución en la producción, sino por otras pérdidas tales como: gastos en medicamentos, servicios veterinarios, diagnóstico de laboratorio y desechos de animales, entre otras. Se estima que en hatos sin programas de control contra esta enfermedad, aproximadamente el 50% de las vacas se encuentran afectadas en la mitad del número de sus cuartos (38).

En la mayoría de los cuartos enfermos no es posible detectar la afección sin usar pruebas especiales que permitan evaluar los cambios físicos, químicos o celulares en la leche, debido a que la mayoría de los animales presentan mastitis subclínica y sólo en un 2% se observa una manifestación clínica o cambios físicos en la leche que permitan evaluarlos a simple vista. Sin embargo, las infecciones subclínicas son las que ocasionan las mayores pérdidas económicas, estimándose que por cada cuarto infectado la producción láctea se reduce de un 12 a 15% (7,32,38).

Existen estudios de campo que demuestran que con el diagnóstico oportuno de la mastitis y la implantación de programas de control adecuados, la producción láctea puede aumentar hasta 2,000 kg/vaca/año, aunque por la complejidad de su etiología se dificulta su control (38,40).

La mastitis en la mayoría de los casos se inicia con la penetración (invasión) de microorganismos al interior de la glándula mamaria a través del conducto del pezón, encontrándose con un medio ambiente favorable para su multiplicación (infección) provocando una respuesta de huésped (inflamación), la inflamación dependerá de la patogenicidad y la capacidad invasora a los tejidos glandulares por parte del agente etiológico, además de la susceptibilidad de los tejidos mamarios. Como consecuencia a la agresión se pueden observar cambios en la secreción láctea, caracterizados por alteraciones: físicas (tales como cambios de color, presencia de coágulos, aumento de leucocitos, etcétera) y químicas (disminución de la grasa, caseína y lactosa, y aumento de glucógeno, suero, proteína, pH y cloruros) (7,40,41).

En el tejido glandular se observan cambios morfológicos como leucocitosis, coágulos de fibrina, suero, sangre, hiperplasia del epitelio ductular, exudado purulento y atrofia de los acines (20,22).

Al hablar de mastitis es de gran importancia citar los mecanismos de defensa y los factores de susceptibilidad del huésped. Los mecanismos de defensa pueden ser de 2 tipos (26):

A) Inespecíficos: Éstos tienen acción contra diversos microorganismos y los podemos dividir en:

- 1.- Físicos: La barrera del conducto del pezón, integridad del epitelio, descamación del epitelio, lavado mecánico a la hora del ordeño, ácidos grasos, rose-tas de fustenberg, y la queratina principalmente (3,4,44).
- 2.- Químicos: Las lacteninas son sustancias con efecto antibacteriano que comprenden al complemento, lisozimas, lactoferrinas y ciertas peroxidasas generadas en la leche. Destaca entre las lacteninas la lactoferrina, que es una proteína que compete con las bacterias por el fierro, y sus niveles se ven aumentados cuando hay inflamación de la glándula (43,44). Las peroxidasas generadas en la leche por la presencia de neutrófilos actúan junto con lactoperoxidasas como xantina oxidasa sobre tiocinato oxidado, resultando altamente inhibitorio para la multiplicación de bacterias (34,44).
- 3.- Celulares: Los leucocitos polimorfonucleares son

de vital importancia en la defensa del organismo contra cualquier agresión; en la glándula mamaria los leucocitos liberados por la irritación, además de contribuir a la fagocitosis de microorganismos, juegan un papel importante en la producción de lactoferrinas adicionales y peroxidasas lisozimales, con la función ya mencionada (32,44). Aunque existen estudios donde se demuestra que los neutrófilos en la glándula mamaria tienen disminuída su capacidad fagocítica, debido a que también fagocitan glóbulos de grasa y caseína de la leche, también tienen menos glucogeno (energía) (34,35).

- B) Específicos: Dentro de éstos, básicamente están las inmunoglobulinas (Ig) que pueden ser derivadas del suero sanguíneo (IgG e IgM) o producirse localmente (IgA) por las células plasmáticas localizadas en la submucosa de la glándula. Su producción puede estimularse con la inmunización local, aunque la protección es limitada induciendo la actividad aglutinante específica por IgA e IgE y actividad opsonizante por IgA e IgG. La IgG se secreta principalmente en el calostro siendo la inmunoglobulina de mayor concentración en la leche y calostro (28,29,33,40). Al querer vacunar contra mastitis para su control y prevención, los resultados serán de poca utilidad práctica, porque al existir etiología tan varia-

da de la mastitis bovina y la baja respuesta inmunológica de la glándula mamaria, no se obtendrán resultados satisfactorios. No obstante, se ha observado que para las bacterias Gram Negativas, por ejemplo E.coli, el mecanismo de anticuerpo-complemento es más activo, aunque los resultados no son concluyentes (4,28,36).

Así como existen factores de resistencia para mastitis, hay factores predisponentes para dicha enfermedad, los cuales se pueden clasificar de la siguiente manera:

A) Anatómicos: Relacionado con el tamaño y localización de las ubres y tetas, (por ejemplo ubres pendulosas, tetas largas), la falta del tono del meato, ausencia de la capa de queratina sobre todo al inicio de la lactancia, aumento en el diámetro en el canal de la teta, hipermastia, malformación de las tetas, defecto en la pigmentación, malformación del aparato locomotor, como defecto de los aplomos (4,6,7,32,37).

B) Fisiológicos: Fase de la lactación (cuando están en el inicio o en el pico de lactación son más susceptibles), número de lactaciones y edad de la vaca en producción (las vacas viejas son más susceptibles), vacas ordeñadas en forma incompleta o que no se ordeñen (después del

estros la incidencia aumenta), el aumento en la proteína en la dieta puede ocasionar aumento en la producción láctea, provocando una dilución en los factores defensivos, perdiéndose el equilibrio entre las bacterias y el huésped (3,4,6,18,35,37).

- C) Manejo: Este punto tiene mucha relación con la higiene en general de las instalaciones lecheras y en especial con la sala de ordeño, alojamientos inadecuados, malas prácticas de manejo en la sala de ordeño, tanto en las vacas como en el equipo de ordeño ya que esto viene a favorecer la transmisión de microorganismos entre vaca y vaca, aumentando así la incidencia y prevalencia de la mastitis (4,6,30,35).

Los microorganismos causantes de mastitis son muy variados, entre ellos: bacterias, hongos y algas (7,17).

Las bacterias son microorganismos que con mayor frecuencia causan mastitis y entre las más comunes, están Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae. Después de estos dos gémenes, la Escherichia coli ocupa un lugar importante entre los agentes etiológicos de mastitis, siendo la especie más común entre las bacterias coliformes (25,29).

La Escherichia coli es un habitante normal de las porciones inferiores del intestino de todos los vertebrados de sangre caliente, y es más abundante en animales carnívoros y omnívoros. Es un microorganismo pequeño de morfología bacilar, que mide aproximadamente $2-3\mu\text{m}$ de largo por $0.6\mu\text{m}$ de ancho, no forma esporas y puede ser capsulada, se tiñe perfectamente como Gram negativo. Crece fácilmente en todos los medios ordinarios a una temperatura óptima de 37°C (con un rango de $20-44^{\circ}\text{C}$) es aerobio o anaerobio facultativo; las colonias en gelosa son prominentes, lisas, brillantes, no pigmentados, de contorno circular de 2-3 mm de diámetro, aunque pueden presentar variaciones considerables dependiendo de las cepas (10,11,19). Para su aislamiento se utiliza agar MacConkey que es un medio que contiene lactosa y un indicador para la fermentación de ésta y así poder diferenciar de microorganismos no fermentadores de lactosa, en este medio las colonias crecen con un color rosa característico (10).

Algunas características importantes para su identificación son: acidifican y coagulan la leche tornasolada, fermentan la glucosa y la lactosa produciendo ácido y gas, producen indol en abundancia, reducen los nitratos, no desarrollan en citrato ni en urea y la reacción en voges-proskauer es negativa (10,11,19).

Las cepas de E.coli pueden presentar estructuras antigénicas tales como antígenos O (somáticos), H (flagelares) y K (cap-

sulares) éstas son estructuras muy estudiadas, son básicas para la diferenciación de los serotipos de E.coli. Los antígenos fimbriales son filamentos cortos situados sobre la superficie de la bacteria, y tienen gran importancia para la adherencia a las diferentes superficies (10,19).

Las infecciones causadas por E.coli en glándula mamaria, tienden a ser graves, proliferan en el tejido mamario, provocando cambios en la secreción glandular; la infección puede ser en forma sobreaguda, aguda o crónica. La forma sobreaguda es muy severa y el cuarto afectado cesa por completo la secreción láctea y se obtiene, solamente un líquido seroso. Esta bacteria posee en su pared una endotoxina que causa cambios en la permeabilidad vascular y produce edema en la glándula mamaria y aumento de los leucocitos en la leche pudiendo éstos alcanzar niveles hasta de 100 millones/ml, esto produce la leucopenia que el animal presenta en la fase aguda de la enfermedad; cuando el animal tiene una toxemia por exceso de absorción de las endotoxinas el cuadro es más severo, caracterizado por: fiebre, escalofrío, temblores musculares, debilidad (postración), diarrea profusa, deshidratación, leucopenia seguida de leucocitosis e hipoglucemia principalmente. Con este cuadro la mortalidad es alta hasta de un 80% (4,7,13, 19,24).

La mastitis por E.coli se presenta con mayor frecuencia en invierno y cuando se establecen programas de control contra los

gérmenes Gran positivos; ocurre usualmente un poco antes del secado, antes del parto o inmediatamente después del parto; cuando se presenta postparto puede confundirse con el síndrome de la vaca echada o paresia parturienta. Se ha observado que vacas secas con cuartos sanos, desarrollan mastitis por E.coli postparto, suponiéndose que la infección ocurrió en el periodo seco (3,7,19).

Adherencia bacteriana:

Uno de los mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de invadir los tejidos del huésped es el de la adherencia, y el mecanismo dependerá del agente etiológico y del tejido involucrado (12,31).

El fenómeno de adherencia involucra una serie de mecanismos fisicoquímicos complejos que dependen en su mayoría de la esteoquímica de la superficie celular en contacto y de diferentes tipos de adhesinas bacterianas las cuales interaccionan con los componentes celulares del huésped (37,40,41). Entre estos últimos destacan:

- a) De naturaleza proteínica: pili o fimbria y proteínas de membrana externa.
- b) De naturaleza no proteínica: polisacáridos y ácidos lipoteicoicos.

La adhesión selectiva de microorganismos a células epiteliales ha tomado importancia en la patogenia de algunas enfermedades que han sido estudiadas ampliamente, tales como las caries dentales, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto digestivo, infecciones vaginales, y otras (2,8,18,23,27,30).

La capacidad de multiplicación en los tejidos implica una interacción entre células epiteliales del huésped y las bacterias involucradas, observándose que en algunos casos no se produce la infección si no existe la interacción célula-bacteria, esto lleva a plantear a la adherencia bacteriana como el paso inicial en el desarrollo de ciertas infecciones (42).

A pesar de existir numerosos estudios sobre adherencia bacteriana a las diferentes superficies celulares, los relacionados con la adherencia a las células epiteliales de ductos y senos ductulares de la glándula mamaria son escasos.

Frost (1975) fue quien inició los estudios que muestran la adherencia de Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae, esta adherencia fue significativa a las células epiteliales de conductos de la glándula mamaria bovina, mientras que no fue significativa para E.coli, St.faecalis y C.bovis (14).

Este descubrimiento ha tomado importancia en el conocimiento de la patogenia de la mastitis bovina, porque estas dos bac-

terias son las más comunes en la mastitis bovina, reconociéndose que hay una estrecha relación entre la adherencia de S. aureus, S. agalactiae y la iniciación de infecciones mamarias (14,15,16).

En 1977, Anderson y col. compararon cepas de E.coli que poseían el antígeno K 88 con otras cepas que no lo tenían, para observar su capacidad de adherencia a las células epiteliales de ductos de glándulas mamarias de vacas y ratones lactantes, y los resultados fueron negativos a la prueba de adherencia en las dos cepas de E.coli, por lo que concluyeron que el antígeno K 88 no fue virulento al epitelio de la glándula mamaria (2). Este mismo investigador en 1978 demostró que S. aureus, S. epidermis y E.coli no se adhieren al epitelio ductular y alveolar de ratones lactantes, inoculando estos germen in vivo lo que puede sugerir que la adherencia de los microorganismos causantes de mastitis sólo sucede en ciertas especies (1).

Sánchez y col.(39) concluyen que las adhesinas en forma de pili tales como K 99 no tienen importancia en la adherencia al epitelio mamario, además encontró en su trabajos que las E.coli aisladas no poseían los factores de virulencia que presentan en otras enfermedades. La seroresistencia fue el único factor que pudo relacionarse con la virulencia de estas cepas a la glándula mamaria ya que todas las cepas aisladas de mastitis tuvieron esta resistencia.

Harper y col. (21) obtuvieron resultados que contrastan con los obtenidos por Frost y col. y Anderson y col. ya que estos últimos encontraron que no existe adherencia en las E.coli a las células epiteliales de la glándula mamaria y Harper observó una estrecha relación entre dos cepas fimbriadas de E.coli con la adherencia a las células epiteliales de vacas en lactación, hallando un alto porcentaje de adherencia a las células epiteliales de la glándula mamaria bovina. Esto sugiere que la presencia de fimbria en las cepas de E.coli es importante en la adherencia y en la patogenia de la mastitis.

Se ha tratado de determinar el mecanismo por el cual se lleva a cabo la adherencia en la glándula mamaria bovina, pero no se tienen resultados concluyentes (9,45).

A pesar de existir trabajos sobre adherencia de E.coli a las células epiteliales de ductos de glándula mamaria éstos sólo han utilizado una sola cepa de E.coli y han usado sólo una o dos vacas para sus experimentos; no se han realizado trabajos donde se comparen con esta técnica cepas de E.coli aisladas de mastitis, con cepas de diferente fuente.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la capacidad de adherencia de las cepas de E.coli aisladas de mastitis, con cepas de E.coli de otra fuente a las células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las técnicas son una variación de las descritas por Frost, Frost y col. Bramley, Harper y col., Wanasinghe, Martínez y Rubio, sobre adherencia bacteriana a células epiteliales de ductos de glándula mamaria (9,14,15,16,21,30,37,45,46).

CÉLULAS

30 glándulas mamarias de vacas que no estaban en producción y clínicamente sanas recién sacrificadas en el rastro de Ferrería. Dentro de las primeras 4 h. después del sacrificio se disecan las glándulas para exponer los senos de la teta (ST) y senos lactíferos (SL) y se lavan con 50 ml. de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.4 a 7.6 al 0.1 M. Posteriormente se realizó un cepillado enérgico de los senos, con un cepillo dental fino (10 veces en forma unidireccional) para obtener las células epiteliales.

Suspensión de las células en 10 ml de SAF lavándolas 3 veces por centrifugación a 551 X g durante 10' a 4°C.

Se toma 100 mcl. y se resuspenden en 1 ml. de SFB, formando 7 lotes celulares por cada vaca.

PRUEBA DE ADHERENCIA

MICROORGANISMOS

Se utilizaron / cepas de Escherichia coli de las cuales 5 fueron aisladas de mastitis, identificadas por el Departamento de Bacteriología como: B85-29, B85-113, B85-239, B85-240, y B85- 465. Las dos E. coli de otro origen fueron B85-538 aislada de osteomielitis en un nato y la B85-599 aislada del intestino de un perro con gastroenteritis. Se utilizo como control la cepa de S. aureus B82-195 cuya adherencia fue probada previamente (37).

Las cepas de E. coli se sembraron en agar MacConkey, de donde tomó aproximadamente media colonia y se suspendió en SAF pH 7.2, 0.1M., estéril, con el fin de estandarizar el número de bacterias en comparación con el 0.5 del nefelometro de MacFarland. 100 microlitros de esta suspensión se depositaron en 3 ml de caldo tripticosa soya (TSB) por 24 h. a 37°C en baño maría con agitación constante.

50 mcl. de este cultivo se depositaron en 3 ml de TSB contenidos en tubos para el espectrofotómetro, se incuban en baño maría a 37°C con agitación constante, se midieron cada 30 min. con el espectrofotómetro a 620 nanómetros hasta obtener la fase logaritmica de cada cepa, repitiendo el proceso por 3 veces.

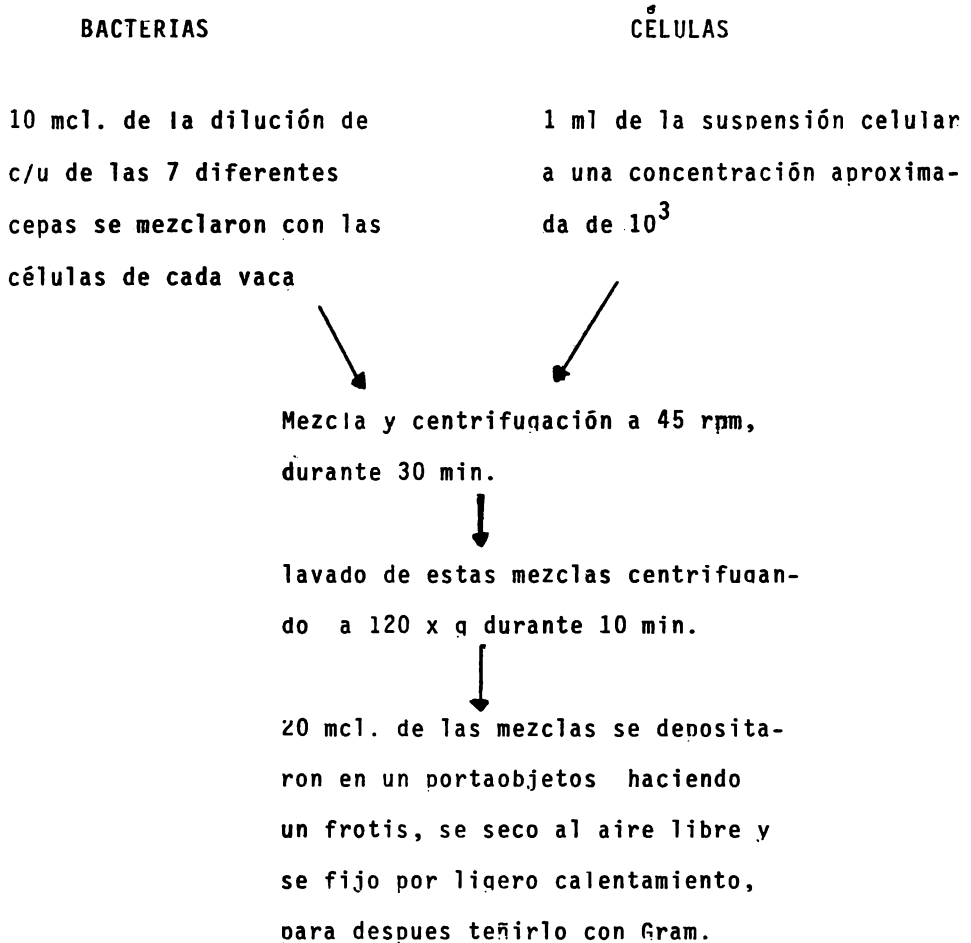
- 16 -

Con el valor a la mitad de la fase logarítmica de cada cepa bacteriana se hacen diluciones decimales (figura 1,3 y 4), depositando 4 gotas (20 mcl. c/u.) en agar MacConkey, se incubaron por 24'h. a 37°C para determinar las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) de cada dilución.

Se ajustaron las 7 cepas obteniendo aproximadamente 10^4 u.f.c. de cada cepa.

PRUEBA DE ADHERENCIA.

PRUEBA DE ADHERENCIA



Las observaciones de las preparaciones se hicieron en el microscopio con el objetivo 100x, contando al azar el numero de microorganismos adheridos a 50 células.

RESULTADOS

Los resultados se muestran en los cuadros 1,2, y 3 y en la figura 2, donde se puede observar el bajo porcentaje de adherencia al azar que presentan las cepas de Escherichia coli a 50 células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina.

El cuadro 1 está basado en promedio de microorganismos adheridos a 50 células epiteliales por cada vaca; las 5 primeras cepas de E. coli fueron aisladas de mastitis bovina, en las cuales resalta la cepa B85-240 que presenta el promedio más alto de adherencia (0.14) y la cepa B-85-29 con el promedio más bajo (0.02); de las dos últimas cepas de E.coli que servirían como testigos, la cepa B85 -599 presentó un bajo promedio de adherencia (0.02) y la cepa B85-538 no presentó adherencia. También se puede observar que la cepa B85-465 se adhirió al mayor número de vacas. Para una mejor visión de estos resultados se puede observar la figura 2.

En el cuadro 2 se presenta la comparación individual entre vacas a la prueba de adherencia, observando el porcentaje de células que presentaron adherencia por cada vaca y cada cepa, se observa que hubo vacas a las cuales se le adhirieron 2 cepas y a otras sólo una cepa, además, de 30 vacas probadas sólo en 9 vacas hubo adherencia.

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la prueba de

adherencia, enlistando todas las cepas que presentaron adherencia.

En el cuadro 4 se muestra el porcentaje de adherencia que presentaron las diferentes cepas de E. coli probadas, donde los resultados fueron analizados por medio de la prueba de hipótesis (Z), se encontro que no existió diferencia significativa entre estas cepas.

DISCUSIÓN

Es importante mencionar que hasta donde se sabe éste es el primer trabajo de adherencia de Escherichia coli a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina in vitro, donde se prueban 7 cepas de E. coli con 30 vacas, (comparando 5 cepas aisladas de mastitis bovina con 2 cepas de otro origen a la prueba de adherencia); porque investigadores como Frost y col., Anderson y col., Harper y col., y Wanasinghe han trabajado con E.coli a la prueba de adherencia a estas células epiteliales y han utilizado un número más reducido de microorganismos (1,2, ó 3) y de vacas (4-6), (1,2,15,16,21,46).

Los resultados encontrados sugieren descartar una mayor adherencia de las E.coli provenientes de mastitis en relación con las de otro origen y apoyan lo resultados obtenidos por Frost, Frost y col., Wanasinghe y Anderson los dos primeros con vacas in vitro y el último con ratones lactantes in vivo, encontrando un bajo índice de adherencia de las E.coli (7 microorganismos en promedio) y concluyeron que las E.coli no tienen adherencia para las células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina, como sí la poseen Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae que presentan un alto índice de adherencia a estas células epiteliales (1,15,46). Esto coincide con los hallazgos de Winberg, al suponer que ciertos microorganismos presentan tropismo a ciertos tejidos, como es el caso de las E.coli, que para causar infección

en el intestino delgado de lechones y al tracto urinario en humanos se vale por el mecanismo de adherencia. Parece ser que en el caso de la glándula mamaria en la infección por E.coli la adherencia no juega un papel importante (47).

Es importante mencionar que estos resultados contrastan con los obtenidos por Harper y col. los cuales mencionan haber encontrado un alto índice de adherencia de dos cepas de E.coli fimbrias y probablemente la presencia de fimbrias en estas cepas sea la responsable de este índice de adherencia, sin embargo no se menciona la procedencia de las cepas (21).

El bajo promedio de adherencia, tanto en las cepas aisladas de mastitis como de las cepas de otro origen se puede considerar como ocasional, si se compara con el presentado por S. aureus aquí probado (figura 2), por lo que se supone que posiblemente en las E.coli el fenómeno de adherencia no tenga importancia en la patogenia de la mastitis.

Debe aclararse que este experimento se llevó a cabo bajo limitaciones, tales como: trabajar con glándulas provenientes de vacas secas ya que son animales para al matadero; no se pudo determinar la presencia de fimbrias de las cepas probadas; cuando se realizó la mezcla de bacterias y células para centrifugarse lo ideal era hacerlo a 45 rpm y a 37°C, pero no fue posible tener un control total de esto por carencia del equipo apropiado.

Puesto que el análisis estadístico de los resultados (cuadro 4) muestra bajo porcentaje de adherencia se rechaza la hipótesis que en este trabajo se plantea, ya que se esperaba encontrar mayor adherencia en las cepas de E. coli aisladas de mastitis en relación a las de otro origen.

LITERATURA CITADA

- (1) Anderson, J.C.: Absence of bacterial adherence in the establishment of experimental mastitis in mice. Vet. Pathol. 15:770-775 (1978).
- (2) Anderson, J.C., Borrows, M.R. and Bramley, A.J.: Bacterial adherence in mastitis caused by Escherichia coli. Vet. Pathol, 14; 618-628 (1977).
- (3) Ávila, T.S.: Mastitis bovina. Apuntes Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. Depto. Zoot. Rumiantes.
- (4) Ávila, T.S.: Producción intensiva de ganado lechero CECSA, México, D.F. 1984.
- (5) Beachey, E.H.: Bacterial adherence: adhering receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. J. Infect. Dis., 143: 325-345 (1981).
- (6) Berenguer, I.F.: Características anatómicas, fisiológicas y hereditarias que incrementan la susceptibilidad de los bovinos a la mastitis. Memorias del curso de actualización sobre mastitis bovina México, D.F. 1982, 32-36. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, (1982)
- (7) Blood, D.C., Henderson, J.A. y Radostits, O.M.; Medicina Veterinaria. 5a. ed. Interamericana, México, D.F. 1983.

- (8) Boedekerc, C.E.: Mechanism of adherence of E. coli to enterocytes: their possible role in intractable infant diarrhea. 329-345. In: Lebenthal, E. Chronic Diarrhea in Children, Vevey/Raven Press, New York, 1984.

- (9) Bramley, A.J. and Hogben, E.M.: The adhesion of human and bovine isolated of Streptococcus agalactiae (group B) to bovine mammary gland epithelial cells. J. Comp. Pathol., 92: 131-137 (1982).

- (10) Buxton, A. and Fraser, G.: Animal Microbiology. Black well Scientific, Oxford. 1977.

- (11) Carter, G.R.: Bacteriología y micología veterinarias. A spec-
tos esenciales. Manual Moderno, México, D.F. 1985.

- (12) Davies, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H. S.,
Wood, W.D. and Carty, M.: Microbiology. 2a. ed. Harper &
Row, New York, 1973.

- (13) Eberhart, et. al.: Coliform mastitis-A review. J. Dairy
Sci., 62: 1-22 (1979).

- (14) Frost. A.J.: Selective adhesion of microorganism to the
ductular epithelium of the mammary gland. Infect. Immun.,
13: 1154-1156 (1975).

- (15) Frost, A.J.: Bacterial adherence and bovine mastitis. Vict. Vet. Proc. 135: 7-10 (1977).

- (16) Frost, A.J., Wanasinghe, D.D. and Woolcock, J.B.: some factors affecting selective adherence of microorganisms in bovine mammary gland. Infect. Immun., 15: 245-253 (1977).

- (17) García, D.G.: Microorganismos causantes de mastitis. Memorias del curso de actualización sobre mastitis bovina, México, D.F. 1982. 3-17. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1982).

- (18) Gibbons, R.J.: Attachment of oral streptococci to mucosal surface, in: Schlessinger, microbiology. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 1975.

- (19) Gillespie, J.M., Timoney, J.F.: Hagan y Brunner. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4a. ed. Prensa Médica Mexicana, México, D.F. 1983.

- (20) Guidry, A.J., Person, R.E., Paape, M.J. and Williams, W.F.: Relationship among leucocytes, phagocytes, milk, immunoglobulins and susceptibility to intramammary infection. Am. J. Vet. Res., 41: 997-1001 (1980).

- (21) Harper, M., Turvey, A. and Bramley, A.J.: Adhesion of fimbriate Escherichia coli to bovine mammary gland epithelial cells in vitro. J. Med. Microbiol., 11: 117-123 (1978).

- (22) Hill, A.W., Frost, A.J. and Brooker, B.E.: Progressive pathology of sever Escherichia coli mastitis in diary cow Res. Vet. Sci., 37 (2): 179-187 (1984).

- (23) Isaacson, R.E., Fusco, P.C., Brinton, C.C. and Moon, H.W.: In vitro adhesion of Escherichia coli to porcine small intestinal epithelial cells: pili as adhesive factors. Infect. Immun., 21: 392-397 (1978).

- (24) Jain, N.C.: Common mammary pathogens and factors in infection an mastitis. J. Dairy Sci., 62: 128-134 (1979).

- (25) Jasper, D.E., Dellinger, J.D. and Boshell, R.B.: Herd studies on coliform mastitis. J. Am. Vet. Med. Ass., 166 (8); 778-780

- (26) Jawets, E., Melvidk, J.C. y Winsberg, J.: Manual de microbiología médica. 7a. ed. El manual moderno. México, D.F. 1977

- (27) Källenius, G.R. and Winsberg, J.: In vitro adhesion of uropathogenesis Escherichia coli to human periurethral cells. Infect. Immun., 28: 295-299 (1979).

- (28) Lascelles, A.K.: The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. J. Dairy Sci. 62: 154-160 (1979).

- (29) Madariaga, A.O.E. y López, A.J.: Bacterias asociadas con mastitis bovina y su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. Vet. Méx., 10: 213-219 (1979).

- (30) Martínez, P.C.: Efecto de la variación individual sobre la prueba de adherencia in vitro entre una cepa de Streptococcus agalactiae y células epiteliales del seno lactífero de la glándula mamaria bovina. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet.y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1984.

- (31) Mims, C.A.: The pathogenesis of infectious disease. Academic Press., London, 1976.

- (32) Natzke, R.P.: Elements of mastitis control. J. Dairy Sci., 64 1431-1442 (1980).

- (33) Norcross, N.L.: Immune response of the mammary gland and role of immunization in mastitis control. J. Am. Vet. Med. Ass., 170: 1228-1231 (1977).

- (34) Paape, M.J. and Wergin, W.P.: The leukocytes as a defense mechanism. J. Am. Vet. Med. Ass., 170 (10): 1214-1223 (1977)
- (35) Paape, M.J., Wergin, W.P. and Guidry, A.J.: Leukocytes: second line of defense against invading mastitis pathogens. J. Dairy Sci., 62: 135-153 (1979).
- (36) Pankey, J.W.: Comments on the immune response of the mammary gland and the role of immunization in mastitis control. J. Am. Vet. Med. Ass., 170: 1231-1233 (1979).
- (37) Rubio, V.B.: Adherencia in vitro de Staphylococcus aureus a células epiteliales del seno lactífero y seno de la teta de la glándula mamaria caprina. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1985.
- (38) Ruiz, S.H.: Introducción. Memorias del curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1982. 1-2 Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. (1985.)
- (39) Sánchez, V.C., McDonald, J.S. and Packer, R.A.: Virulence factors of Escherichia coli isolated from cows with acute mastitis. Am. J. Vet. Res., 45(9): 1775-1777 (1984).

- (40) Schalm, O.W., Carrol, E.J. and Jain, N.C.; Bovine mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia. 1971.

- (41) Schalm, O.W.: Pathology changes in the milk and udder of cows with mastitis. J. Am. Vet. Ass., 170: 1137-1140 (1977).

- (42) Smith, H.: Microbial surface in relation to pathogenity. Rev. Bacteriol., 41: 475-500 (1977).

- (43) Smith, K.L. and Schawbacher, E.L.: Lactoferrin as a factor of resistance to infection of bovine mammary gland J. Am. Vet. Med. Ass., 170: 1224-1227 (1977).

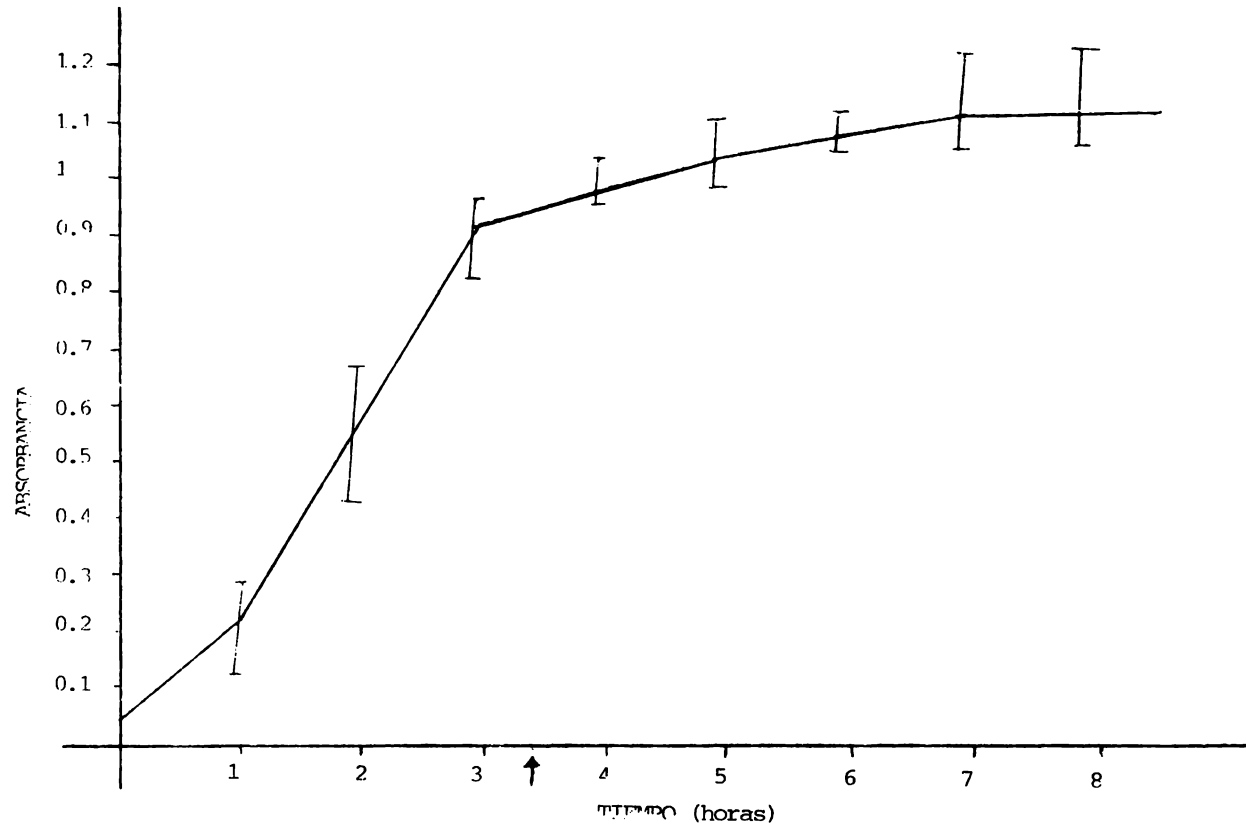
- (44) Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. Interamericana. México, D.F. 1982.

- (45) Wanasinghe, D.F.: In vitro adherence of Staphylococcus aureus to bovine mammary gland epithelial cells. Acta. Vet. Scand., 22: 95-108 (1981).

- (46) Wanasinghe, D.D.: Adherence as a prerequisite for infection of the mammary gland by bacteria, Acta. Vet. Scand., 22: 109-117 (1981).

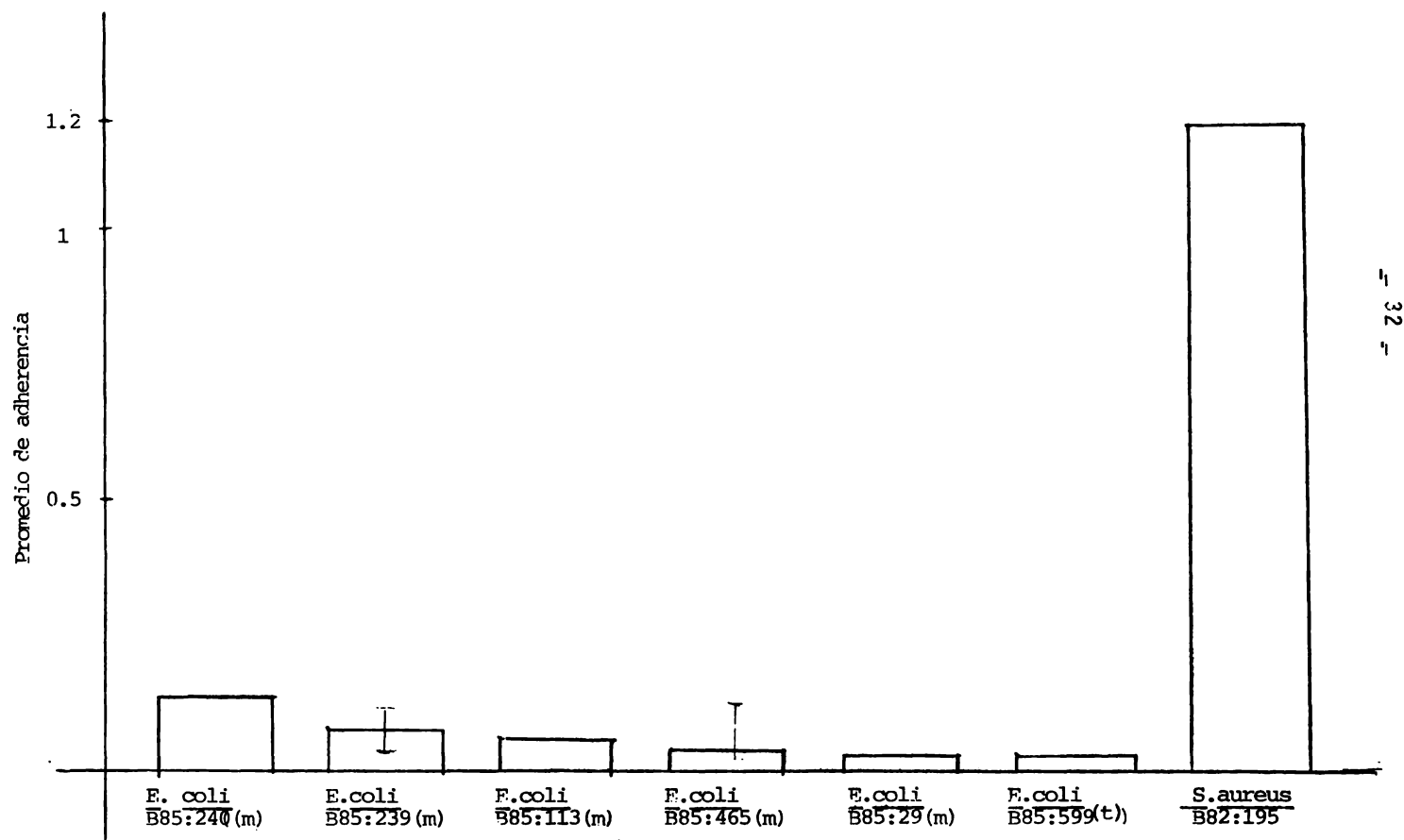
- (47) Winberg, J.: P- fimbriae, bacterial adhesion and pyelonephritis. Arch. Dis. Child., 59: 180-184 (1984).

Figura 1. Promedio de las curvas de crecimiento de las 7 cenas de E. coli



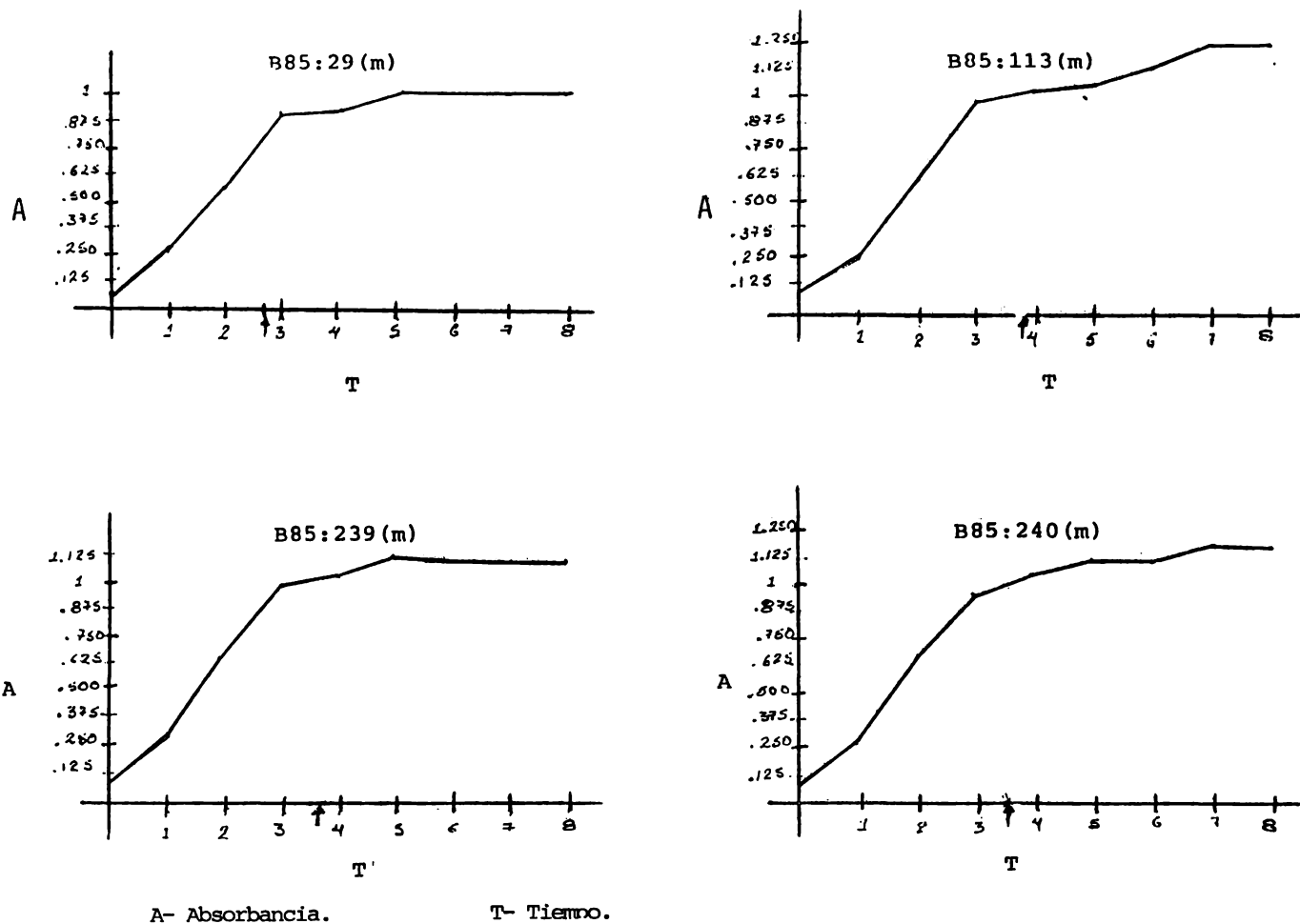
(↑) Promedio de tiempo de crecimiento en que se tomó la cena para la prueba de adherencia.

Figura 2. Promedio de adherencia de E. coli aisladas de mastitis(m), testigos(t) y S. aureus a células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina.



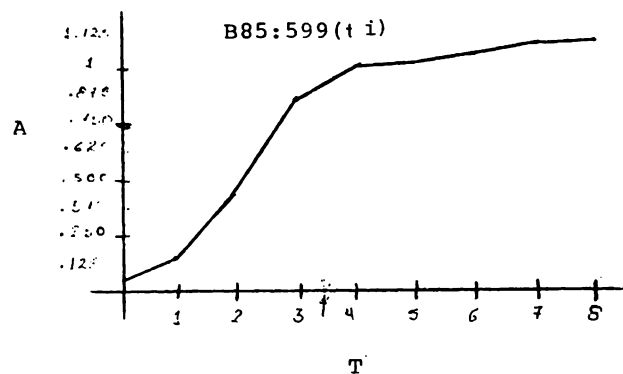
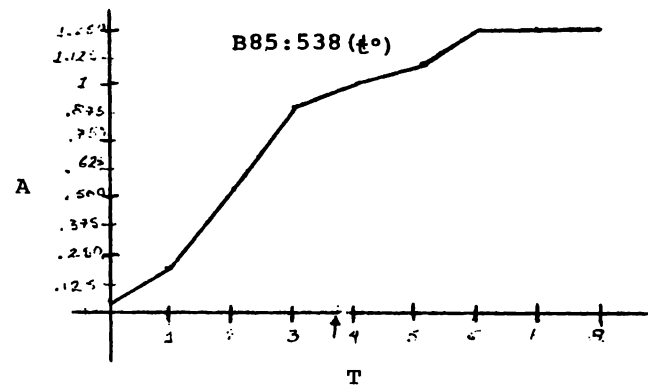
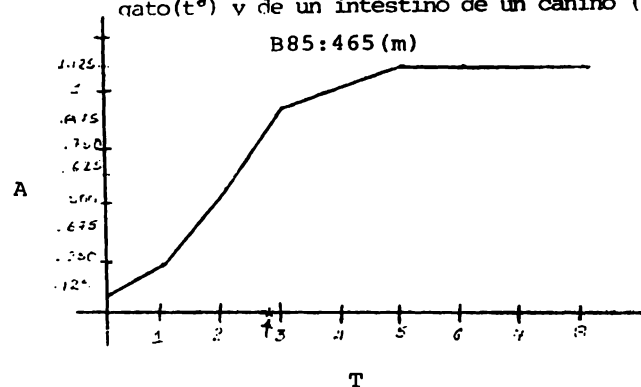
- La cepa de F. coli B85:538 no presentó adherencia.
- S. aureus solo se probó con células de seis vacas.

Figura 3. Curvas de crecimiento de E. coli aisladas de mastitis bovina (m).



↑ Tiempo promedio en que se tomó la cepa para la prueba de adherencia.

Figura 4. Curvas de crecimiento de cepas de *F. coli* aisladas de mastitis bovina(m), osteomilitis en un gato(t^o) y de un intestino de un canino (ti).



A- Absorbancia.

T- Tiempo (h).

↑ Tiempo promedio en que se tomó la cepa para la prueba de adherencia.

Cuadro 1: Cepas de E.coli y S.aureus que presentaron adherencia a 50 células epiteliales de ductos de glándula mamaria bovina in vitro

Cepas de <u>E.coli</u>	No. de microorganismos adheridos a 50 células.	% de células a las que hubo adherencia	Promedio de adherencia	No. de la vaca a la que hubo adherencia
B85:239	6	12	0.12	19
	5	10	0.10	12
	3	6	0.06	26
	2	4	0.04	3
B85:465	6	12	0.12	12
	2	4	0.04	11
	1	2	0.02	26
	1	2	0.02	18
	1	2	0.02	27
B85:240	7	14	0.14	9
B85:113	3	6	0.06	18
B85: 29	1	2	0.02	9
B85:599	1	2	0.02	6
<u>S. aureus</u>				
B82:195	60	120	1.2	*

* Este microorganismo se probó con un total de 6 vacas
La cepa B85:538 de E.coli no presentó adherencia.

Cuadro 2: Comparación individual de vacas a las que existió adherencia de E. coli

Vaca	No. de microorganismos adheridos a 50 células	% de células en las que existió adherencia	Cepas adheridas
12	6	12	B85:465
	5	10	B85:239
9	7	14	B85:240
	1	2	B85: 29
19	6	12	B85:239
26	3	6	B85:239
	1	2	B85:465
18	3	6	B85:113
	1	2	B85:465
11	1	2	B85:465
3	2	4	B85:239
27	1	2	B85:265
6	1	2	B85:599
otras 21 vacas	0	0	ninguna

Cuadro 3. Adherencia de E. coli aisladas de mastitis(m),
testigos(t) v de S. aureus a células epiteliales de ductos
de glándula mamaria bovina in vitro.

Vaca	<u>Escherichia coli</u>												<u>S. aureus</u> <u>B82:195</u>	
	B85:465 (m)		B85:239 (m)		B85:240 (m)		B85:113 (m)		B85:29 (m)		B85:599 (t)		N ^a	$\bar{X}$
	N ^o	$\bar{X}$	N ^a	$\bar{X}$	N ^a	$\bar{X}$	N ^a	$\bar{X}$	N ^a	$\bar{X}$	N ^a	$\bar{X}$		
3			2	0.04										
6											1	0.02		
9					7	0.14			1	0.02				
11	2	0.04												
12	6	0.12	5	0.10										
18	1	0.02					3	0.06						
19	1	0.02	6	0.12										
26	1	0.02	3	0.06										
27	1	0.02												
*														
1													60	1.2
2													65	1.3
3													55	.91
4													70	1.4
5													45	.90
6													65	1.3

* Las otras 21 vacas no presentaron adherencia

Nota: -La cepa de E.coli B85:538 no presento adherencia.

- S.aureus fue probado con 6 vacas diferentes a las primeras 30 probadas.

Cuadro 4: Porcentaje de adherencia de
las cepas de E. coli.

Cepas	%
B85:465	20
B85:239	13
B85:240	3
B85:113	3
B85: 29	3
B85:599	3