



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

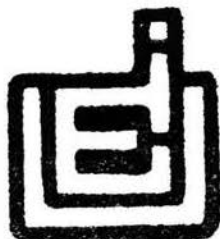
**CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE UNA CITOTOXINA
OBTENIDA DE UNA CEPA DE Escherichia coli
AISLADA DE LECHONES CON DIARREA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A
JULIO TREJO CADENA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HECTOR M. ZEPEDA LOPEZ



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES POR SU TOTAL APOYO Y PACIENCIA.

A MIS HERMANOS CON CARIÑO

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO ACABO EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA VETERINARIA PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N., EL MISMO FORMO PARTE DEL PROYECTO "ESTUDIO DE LOS FAGOS PRODUCTORES DE CITOTOXINAS" CLAVE DEPI: 942316 BAJO LA DIRECCION DEL DR. HECTOR M. ZEPEDA LOPEZ

MI AGRADECIMIENTO POR SU APOYO Y AMISTAD SINCERA A LAS SIGUIENTES PERSONAS:

*M.EN C. ROCIO CERVANTES ROSALES
QBP GRACIELA M. GONZALES LUGO
QBP ANTONIO IBARRA GARCIA
DR. HECTOR M. ZEPEDA LOPEZ*

**CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE UNA
CITOTOXINA OBTENIDA DE UNA CEPA DE
Escherichia coli AISLADA
DE LECHONES CON DIARREA**

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	7
- TABLA 1	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y METODOS	14
- FIGURA 1	20
- FIGURA 2	21
RESULTADOS	22
- TABLA 2	26
- TABLA 3	27
- GRAFICAS 1-5.....	28
- TABLA 4	33
- TABLA 5	34
DISCUSION DE RESULTADOS	35
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad el seleccionar una cepa hiperproductora de citotoxina para semipurificarla y caracterizar sus actividades biológicas; por lo que se utilizaron 40 cepas de *Escherichia coli* citotoxigénica de origen porcino, las cuales se inocularon, en forma de filtrados mediante diluciones seriadas en un rango de 1:25 a 1:3125 en cultivos de células Vero y HeLa, determinándose la actividad citotóxica mediante la cuantificación de la citotoxina, fue así como se seleccionaron 9 cepas con títulos altos de citotóxicidad únicamente en células Vero. De éstas se escogió la cepa hiperproductora que posteriormente sería purificada. Asimismo se probaron las actividades enterotóxica y neurotóxica de los filtrados de cultivo, mediante los modelos de asa ligada en conejo y neurotóxicidad en ratón.

La cepa hiperproductora fué sembrada en caldo Syncase a 37°C por 24h. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm y el sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para concentrar la toxina, a diferentes grados de saturación. Cada una de las fracciones obtenidas se dializó y se inoculó en una columna de sephadex G-75. A las fracciones de elución correspondientes a los picos más altos de absorción se les determinaron sus actividades biológicas.

Se encontró que el filtrado libre de células de la cepa seleccionada como hiperproductora, alcanzó una actividad citotóxica, sobre los cultivos de células Vero, de 1.2×10^5 DC50%/ml y resultó ser positivo, en forma parcial, en la prueba de neurotoxicidad, ya que aunque no causó la muerte al ratón provocó

algunos efectos a nivel de sistema nervioso.

Después de haber semipurificado la citotoxina se obtuvo que la actividad más alta de las fracciones fué de hasta 6.2×10^5 DC 50%/ml y la actividad específica fué de 1.5×10^7 D.C./mg.prot. sin embargo la actividad neurotóxica se perdió a pesar de concentrar la toxina y la actividad enterotóxica nunca se encontró, lo que implica que probablemente las tres actividades no se encuentran presentes en una misma molécula de la citotoxina.

INTRODUCCION

El síndrome diarreico ocupa los primeros lugares como causa de enfermedad y muerte en la población infantil, particularmente en los menores de un año de edad. Junto con las infecciones respiratorias agudas constituyen las enfermedades dominantes en nuestro país y contribuyen con un 45 a 50% de las muertes. A nivel internacional se calcula que el síndrome diarreico es el responsable de por lo menos 5 millones de defunciones anuales en niños menores de 5 años (10).

Se observa que la etiología del síndrome diarreico principalmente es de tipo infecciosa, siendo predominante las infecciones virales en recién nacidos y como agente bacteriano importante tenemos a *Escherichia coli* (11).

Escherichia coli se ha reconocido desde hace varias décadas (Bray 1945) como un patógeno primario en diarreas bacterianas en humanos y posteriormente también en animales, desde entonces se han venido estudiando sus mecanismos de patogenicidad (citado en 35).

Poco a poco se han incrementado las evidencias de que *E. coli* puede ser la causa de diarrea en una gran proporción de recién nacidos tanto en humanos como en animales (4).

Por otra parte *E. coli* es la especie predominante de la flora normal bacteriana aerobia facultativa del intestino en muchos animales y juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostásis intestinal (17).

Este es un microorganismo Gram negativo que se desarrolla con facilidad en todos los medios de cultivo comunes de laboratorio, su temperatura óptima de crecimiento es 37°C; pero crece dentro de amplios límites (8).

E. coli se puede clasificar serológicamente a través del sistema de tipificación de Kauffmann (1945), que se basa en la presencia de tres antígenos; somático "O", capsular "K" y flagelar "H" (citado en 12).

Las cepas de *E. coli* que afectan a humanos se han clasificado en función de su mecanismo de patogenicidad en cuatro grupos:

- A) *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC).
- B) *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC).
- C) *E. coli* Enteropatógena (EPEC).
- C) *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) (17).

Sin embargo las infecciones causadas por *E. coli* en animales se denominan Colibacilosis y se han dividido en cuatro síndromes:

- A) Síndrome Enterotóxico
- B) " Enterotoxémico
- C) " Invasivo-Local
- D) " Septicémico (13).

La Colibacilosis en la porcicultura es la causa de las principales pérdidas económicas debido a su gran morbilidad en estos animales, de tal manera que se calcula que en algunas granjas las pérdidas llegan a ser hasta del 30% (40).

En algunas explotaciones porcinas se ha calculado que la mortalidad por diarreas es del 13.4% (37). Sin embargo no se conocen los índices de morbilidad y mortalidad por colibacilosis en lechones y sólo se sabe que aproximadamente el 50% de las gastroenteropatías son causadas por *E. coli* en el período anterior al destete (3).

Se conoce que la colibacilosis en cerdos se presenta en forma de cuatro síndromes:

- A) Diarrea del recién nacido
- B) " de las tres semanas
- C) " del destete
- D) Enfermedad edematosa porcina (EEP) (41).

Los primeros tres síndromes son causados principalmente por cepas de *E. coli* enterotóxicas, es decir productoras de enterotoxinas LT y ST (13). La enfermedad edematosa es causada por cepas de *E. coli* productoras de citotoxina, a ésta toxina se le conoce como "toxina semejante a Shiga II variante" (SLTIIv) y pertenece a una familia de citotoxinas conocidas como "SLT" ó "VT" (toxina Vero) (24).

La enfermedad del edema también conocida como enfermedad edematosa porcina (EEP) se define como una disfunción neurológica con un curso progresivo y lesiones de edema en localizaciones específicas. Los signos clínicos característicos de ésta enfermedad son: edema en los párpados y tejido subcutáneo frontal, signos neurológicos que se manifiestan al principio con una ataxia y progresan para terminar con postración también se pueden observar

convulsiones y espasmos musculares (5).

Como se puede ver, la EEP ocurre en una forma súbita, tiene un curso breve y por lo regular termina matando al cerdo (13).

Según Timoney y Lamont la presencia de la enfermedad está relacionada a cuatro condiciones constantes; a) la edad, ya que es más común en cerdos destetados. b) al cambio de dieta durante el destete. c) a un crecimiento vigoroso del lechón. d) y a la diarrea que amenudo se presenta uno ó dos días antes del padecimiento (13). A sí mismo, la frecuencia conque se puede encontrar en una camada varía hasta el 50% ó más (3).

Con respecto a la etiología de la enfermedad del edema se ha observado que ésta se asocia con cepas de *E. coli* de origen porcino productoras de una toxina termolábil (SLTIIv) que es capaz de provocar lesiones neurotóxicas en ratón y lesiones citotóxicas en cultivos de células Vero. La mayoría de estas bacterias son hemolíticas y pertenecen a los serotipos: O138:K81, O139:K82 y O141:K85 (23).

Por otra parte, la toxina causante de la enfermedad del edema se ha purificado parcialmente, sin embargo existen algunas controversias respecto a la participación de ésta en el curso clínico de la enfermedad (20).

ANTECEDENTES

Se sabe que los primeros estudios sobre citotóxicas (toxinas capaces de matar células eucariotas) producidas por cepas de *E. coli* fueron hechos por Konowalchuk y col. en 1977. Estos autores inocularon el sobrenadante del cultivo de una cepa de *Escherichia coli* denominada H-30 (O26:H11) aislada de un niño con diarrea, a un cultivo confluyente de células Vero (células de riñón de mono verde africano) y observaron que al final de un período de cinco días las células presentaron un efecto lítico total e irreversible; este efecto citotóxico no se observó en células CHO (células de ovario de hamster chino) inoculadas con el mismo sobrenadante. De esta manera, como la toxina sólo causaba efecto sobre células Vero se le llamó "toxina Vero" (VT) (15).

Por otra parte O'brien y col.(1982) también realizaron estudios sobre la producción de citotoxinas por la cepa H-30 de *E. coli* y observaron que la citotoxina producida por ésta, estaba relacionada inmunológicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (toxina de Shiga) y por lo tanto estos autores la denominaron "toxina semejante a Shiga" (SLT) (26).

En 1983 Smith y col. informaron que la toxina Vero producida por las cepas de *E. coli* de los serogrupos O26 y O128 estaba codificada por un fago. Asimismo estos autores describieron que existían por lo menos tres variedades de la toxina; la producida por cepas de origen humano, la de origen porcino y la obtenida a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (38).

Trabajando con la misma cepa, en la que Konowalchuck describió la citotóxina VT, Zepeda y col. (44) encontraron que la cepa H-30 es capaz de producir 2 citotóxicas antigénicamente diferentes y codificadas en la misma cepa.

Scotland y col. (1985), utilizando la cepa 933 perteneciente al serotipo O157:H7 publicaron que la VT presentaba dos variedades antigénicas; una con la particularidad de ser neutralizada con el antisuero anti-Shiga y la otra que no se neutralizaba por dicho antisuero, de tal manera que a la primera le llamaron "toxina Vero 1" (VT1) y a la segunda "toxina Vero 2" (VT2) respectivamente. En este mismo trabajo se propuso que las dos toxinas pudieran ser producidas por una misma cepa (36). Sin embargo Strockbine y col. (1986) denominaron a las citotoxinas producidas por la cepa 933 (O157:H7) de *E. coli* como "toxina semejante a Shiga 1" (SLT1) a la toxina que es neutralizada con el antisuero anti Shiga y "toxina semejante a Shiga 2" (SLT2) a la que no es neutralizada (39). Como se puede ver la VT y la SLT son sinónimos para una misma toxina.

En otro estudio realizado por Padhye y col. (1987) se aisló una cepa de *E. coli* O157:H7 de un paciente con colitis hemorrágica, la cual producía una toxina VT que no era neutralizada con anticuerpos anti-Shiga y mostró tener características fisicoquímicas diferentes a la toxina VT que si era neutralizada (32).

Se conoce que la toxina SLTI posee tres actividades biológicas: citotoxicidad (en cultivos celulares), enterotoxicidad (en asa ligada de conejo) y neurotoxicidad (en ratón) (27). Estas mismas tres actividades están presentes en la toxina SLTII, sin

embargo, ésta es más letal para ratón y menos citotóxica que la SLTI (39).

Los primeros estudios sobre la producción de citotoxinas por cepas de *E. coli* de origen porcino fueron realizados por Smith y col. (1983), quienes determinaron que un 63.0% de cepas de origen porcino pertenecientes a cuatro serotipos (O138:K81, O139:K82, O141:K85 y O141:K85,88) y asociados con enfermedad postdestete (diarrea y enfermedad edematosa) fueron productoras de citotoxinas Vero (33). Sin embargo, Clugston y col. (1974) ya habían descrito que los sobrenadantes de cultivos de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O138, O139 y O141 producían una toxina que era capaz de reproducir experimentalmente la enfermedad edematosa en cerdos a la cual le llamaron "Principio de la Enfermedad del Edema" (PEE). Estos mismos autores propusieron que a esta toxina también se le podía denominar como vasotoxina, debido a su efecto hipertensivo (5 y 13).

En apoyo a la etiología de la Enfermedad del Edema (EE) se encuentran los estudios de Marquez y col. (1986) quienes dieron a conocer que de un total de 262 cepas productoras de citotoxinas en bajos niveles, 64 fueron de origen porcino pertenecientes a los serogrupos O139 y O141 (25).

Un año mas tarde (1987) Linggod y col. realizaron un estudio con cepas aisladas de cerdos enfermos con EEP pertenecientes a un gran número de serotipos, dichos autores determinaron la capacidad de estas cepas para producir VT y encontraron que todas ellas producían la toxina.

La citotoxina detectada por el ensayo en células Vero parece ser la misma que la referida por Clugston y col. (18).

Marquez y col. (1987) observaron que la citotoxina producida por cepas aisladas de cerdos con EE esta relacionada antigénicamente con la toxina SLTII; ya que su actividad citotóxica es neutralizada por el antisuero dirigido contra la SLTII, sin embargo esta toxina es mucho menos activa en células HeLa que en células Vero y por lo tanto fué designada como "toxina semejante a Shiga II variante (SLTIIv). En este mismo trabajo no fué posible demostrar que la codificación para esta toxina estuviera mediada por un fago como en el caso de las cepas de origen humano, por lo que se sospecha que la información genética para esta toxina se encuentra en el genoma (24). En este mismo estudio se describió que la toxina SLTIIv es producida en gran cantidad, tanto en el sobrenadante de cultivo como en el lisado bacteriano a diferencia de la SLTII que sólo se puede detectar en el lisado bacteriano.

Dentro de los estudios realizados para la purificación de citotoxinas de origen humano se encuentra el de Petric y col. (1987) en donde se publicó un método simple de purificación, el cual consistía en liberar la toxina de las células por exposición a polimixina B, después someterla a una precipitación diferencial con sulfato de amonio y por último pasarla por una columna de cromatografía mediante filtración molecular (33).

Con respecto a la estructura y características fisicoquímicas de las citotoxinas, se ha sugerido que éstas presentan una conformación de su estructura en subunidades A y B y por homología

con la toxina de Shiga la relación entre éstas es de 1:5 respectivamente (28).

Oku y col. (1989) purificaron una citotoxina obtenida de una cepa de *E. coli* (O91:H21), aislada de un paciente con síndrome urémico hemolítico, la cual fué más activa sobre células Vero que sobre células HeLa y neutralizada con el antisuero anti-SLTII de manera muy semejante que la SLTIIv porcina, por lo que a esta nueva toxina se le designó como SLTIIv de origen humano. Esta toxina también está conformada por subunidades A y B con un peso molecular semejante al de la SLTII (35,000), su punto isoeléctrico es de 6.1, el cual difiere del reportado para la SLTI y SLTII que son de 7.0 y 4.1 respectivamente y presenta neurotoxicidad y letalidad en ratón (31).

En la tabla No.1 se muestra un cuadro comparativo de algunas citotoxinas purificadas por diferentes autores.

Hasta el momento casi no existen estudios sobre la purificación de la citotoxina de origen porcino por lo que se ve la necesidad de hacer estos estudios para lograr la caracterización de esta toxina en cuanto a sus actividades biológicas y así poder contribuir al papel que juega ésta en la enfermedad edematosa porcina.

TABLA 1
CARACTERISTICAS DE LAS CITOTOXINAS PRODUCIDAS POR CEPAS
DE E. coli DE ORIGEN HUMANO

CEPA	ORIGEN	TIPO DE TOXINA	NEUTRALIZACION ANTI-SHIGA	PM	PI	SUBUNIDADES	CITOTOXICIDAD		Ref.
							Vero	HeLa	
H-30	D	SLT	+	48000	7.03	A y B	+	+	29
0157:H7	C.H	SLTII	-	35000 10700	4.1	A y B	+	+	42
091:H21	SUH	SLT-IIv	-	33050 7565	6.1	A y B	+	-	31

D : DIARREA
 C.H. : COLITIS HEMORRAGICA
 SUH : SINDROME UREMICO HEMOLITICO
 + : CON EFECTO
 - : SIN EFECTO
 PM : PESO MOLECULAR
 PI : PUNTO ISOELECTRICO
 Ref. : NUMERO DE REFERENCIA

OBJETIVOS

- 1) Seleccionar una cepa de **Escherichia coli** hiperproductora de citotóxina activa en células Vero y no en células HeLa.
- 2) Semipurificar el producto tóxico de la cepa de **E.coli** seleccionada.
- 3) Caracterizar las actividades biológicas de la toxina antes y después de su purificación.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS UTILIZADAS.

Se emplearon 40 cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones con diarrea como cepas de estudio.

Se utilizó la cepa H-30 (O26:H11) de origen humano, capaz de producir citotoxina (VT) como cepa de referencia (15).

MEDIOS DE CULTIVO Y PRODUCCION DE LA TOXINA

Las cepas de estudio se sembraron en medio caldo soya tripticaseína (TSB) (Bioxon, México) y se incubaron a 37'c durante 24h. Los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm por 20 minutos y se filtraron mediante membranas millipore de 0.45µm para obtener los filtrados libres de células. A estos filtrados se les determinó su actividad citotóxica, mediante la cuantificación de la toxina, para así seleccionar una cepa hiperproductora. La toxina producida por esta cepa se purificó posteriormente.

La producción de la toxina se realizó mediante la siembra de la cepa hiperproductora de citotoxina y la cepa de referencia (H-30) en 1000 ml de caldo **Syncase** (medio sintético) con un pH de 8.5 (30,20), éstas se incubaron a 37'c con agitación por 24h y los cultivos resultantes se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se recolectó y el paquete bacteriano se desechó, posteriormente al sobrenadante se le aplicó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio para precipitar las proteínas y obtener de ésta manera la toxina (6).

PURIFICACION

Precipitación con sulfato de amonio.

A partir de los extractos crudos de cultivo que se probaron en las pruebas de citotoxicidad y neurotoxicidad se seleccionó aquel que presentó el mayor efecto, por lo que la cepa perteneciente a éste se sembró en 1000 ml de medio Syncase y se incubó a 37°C por 24 horas en agitación (30). El cultivo resultante se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se recolectó, desechándose el paquete bacteriano. Posteriormente al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio para precipitar las proteínas, en un 50% de saturación y se dejó reposar toda la noche a 4°C, después se centrifugó y al nuevo sobrenadante se le adicionó más sulfato de amonio, hasta alcanzar un 60% de saturación, y así sucesivamente hasta obtener una precipitación al 90% (6) (ver fig.1)

Diálisis

Cada uno de los precipitados resultantes de la precipitación fraccionada se resuspendió en un regulador de fosfatos (ph 7.2) (6) y se dializó contra agua destilada durante una hora en agitación a 4°C, después el agua fue sustituida por el regulador, dejándose una hora para después recambiarlo cada 24 horas durante tres días aproximadamente hasta verificar la ausencia del sulfato de amonio.

Cromatografía.

La toxina contenida en cada uno de los precipitados dializados se concentró con sacarosa y posteriormente se filtró en membranas millipore de 0.45 μ , para ser pasada por una columna de sephadex G-75 equilibrada con un regulador de fosfatos ajustado a un pH de 7.2 (7). El volumen eluido se recolectó en cantidades de un mililitro, obteniéndose 50 fracciones de elución para cada uno de los dializados. A cada fracción se le determinó su absorvancia a una longitud de onda de 280nm, mediante espectrofotometría, posteriormente las lecturas fueron graficadas y se seleccionaron los picos de mayor absorción, por lo que las fracciones fueron agrupadas en pooles para ser inoculadas en células Vero y determinar su actividad citotóxica.

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**Actividad citotóxica**

Para determinar la actividad citotóxica de los filtrados del cultivo se utilizaron las líneas celulares Vero (riñón de mono verde africano) y HeLa (células de carcinoma de cervix) y los medios de crecimiento para éstas fueron M199 y MEM (medio mínimo esencial) respectivamente (15). A cada uno de los medios se les adicionó una solución de antibióticos compuesta por estreptomycin al 0.5% y penicilina (100 unidades), así como de suero fetal de ternera en un 5% para el M 199 y en un 10% para el MEM.

En microplacas de 96 pozos se depositaron 200 μ l de una suspensión de células Vero y HeLa en forma independiente, en cada uno de éstos y se incubaron a 37°C en presencia de dióxido de carbono al 5% durante 24 horas aproximadamente hasta alcanzar un

80-100% de confluencia.

Una vez obtenidas las monocapas del cultivo confluyente, el medio de crecimiento fué sustituido por medio de mantenimiento (sin suero) y entonces el primer pozo de la microplaca se inoculó con 25µl de la muestra a probar, obteniéndose una dilución de la toxina de 1:5, posteriormente se tomaron 25µl del mismo pozo y se inocularon en el siguiente, y así sucesivamente, realizando diluciones seriadas. Una vez inoculadas las microplacas éstas se incubaron por 48 horas a 37°C, observándose cada 12 horas la presencia de lisis celular. Posteriormente se obtuvieron los títulos de citotoxicidad y se detectó, entonces, la cepa hiperproductora. El método se esquematiza en la figura 2.

La actividad citotóxica de las fracciones de la toxina parcialmente purificada fué determinada en cultivos de células Vero, utilizando también diluciones seriadas en la inoculación. Las condiciones de incubación para la microplaca fueron las mismas que las anteriores y la lisis celular se observó también cada 12 horas.

Actividad enterotóxica

La actividad enterotóxica de los filtrados de cultivo y de las fracciones de la toxina purificada, se determinó mediante la técnica de asa ligada en conejo (citado en 29), la cual consistió en realizar una laparotomía a un conejo de aproximadamente 2.5 kg de peso, exponiendo el intestino delgado y ligando segmentos de aproximadamente 10 cm de longitud, en los cuales se inoculó 1 mililitro de la muestra, dejando un segmento sin inocular como testigo del intestino después de cada inoculación.

El testigo positivo que se utilizó fué un filtrado crudo de cultivo de la cepa H-30. Posteriormente el intestino delgado se depositó en su lugar y se cerró el abdomen del conejo, el cual permaneció en condiciones estables durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se sacrificó el conejo y se abrió la herida para observar si había o no acumulación de líquido en los segmentos inoculados del intestino. Fué de esta manera como se dió lectura a la prueba.

Actividad neurotóxica

Esta actividad se determinó mediante la tecnica de letalidad en ratón (citado en 29) y el procedimiento fué el siguiente: los filtrados de cultivo y las fracciones de la toxina se inocularon en dosis de 0.5 a 1ml, vía intraperitoneal en 20 ratones de aproximadamente 20 días de edad. Posteriormente éstos se mantuvieron en condiciones estables y bajo vigilancia en un curso de hasta 72 horas aproximadamente para observar la parálisis de las extremidades anteriores y la muerte.

DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Lowry (19) para los los dializados que se utilizaron en la cromatografía. Asimismo se utilizó la espectrofotometría, a una absorbancia de 280 nm. para cada una de las fracciones obtenidas en la purificación (16).

La purificación de la toxina de referencia (cepa H-30) se llevó a cabo bajo los métodos mencionados anteriormente.

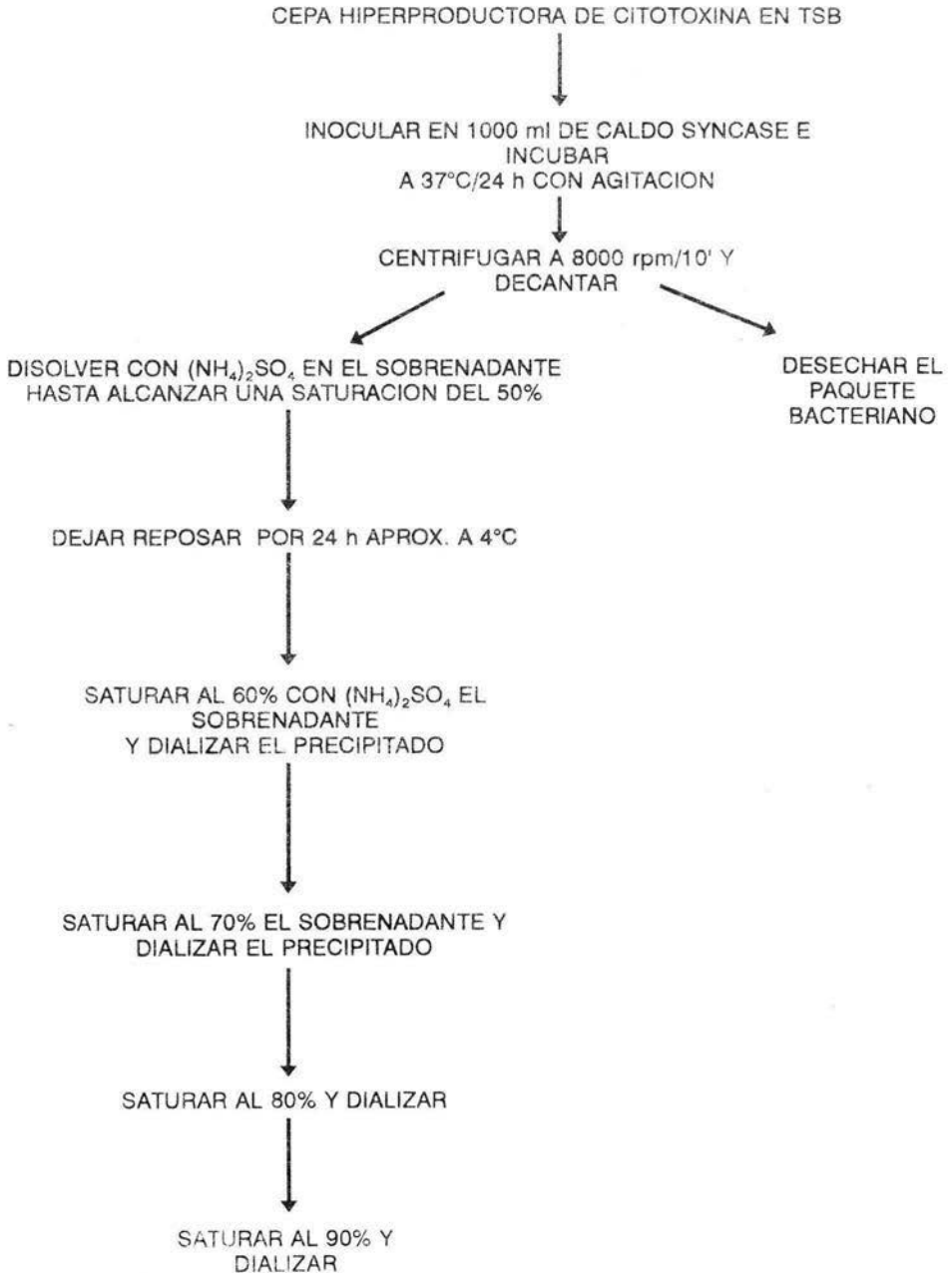
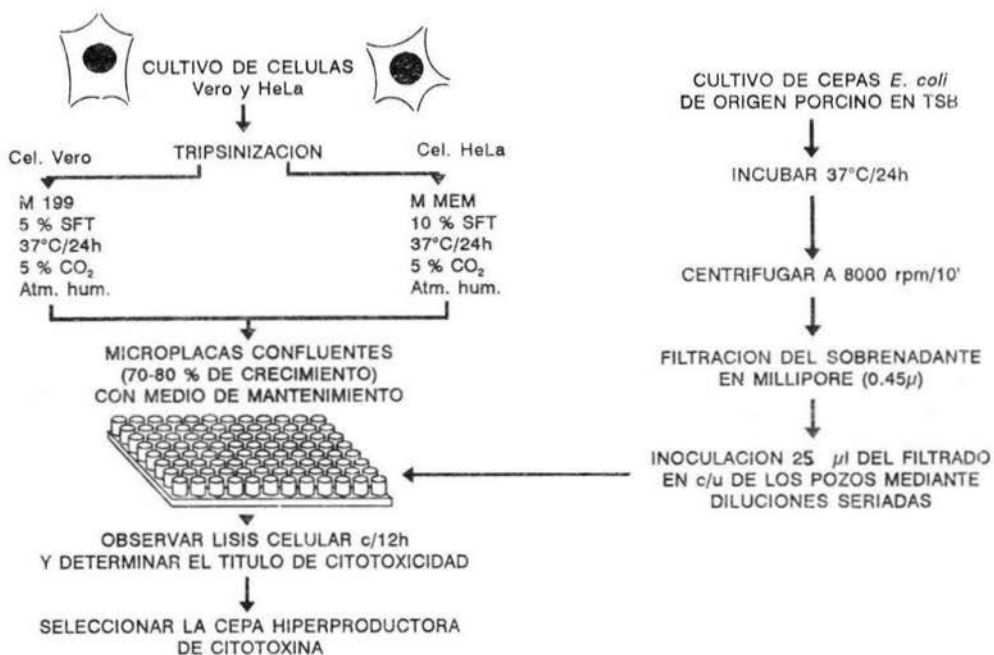
FIGURA 1. PRECIPITACION FRACCIONADA DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO

FIGURA 2. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD PARA LA SELECCION DE LA CEPA HIPERPRODUCTORA DE CITOTOXINA



RESULTADOS

SELECCION DE LA CEPA HIPERPRODUCTORA DE CITOTOXINA

Utilizando los filtrados de cultivo se pudo determinar el efecto citotóxico sobre los cultivos de células HeLa y Vero. De las 40 cepas utilizadas se obtuvieron 9 con títulos altos de citotoxicidad en células Vero, de las cuales se pudo detectar aquella con el título mas alto, que posteriormente sería utilizada en la purificación. Los resultados se resumen en la tabla N°2, en donde se puede observar que el titulo más alto de citotoxicidad fué de 1.2×10^5 D.C.50%/ml.

ACTIVIDADES BIOLOGICAS DE LOS FILTRADOS DE CULTIVO

Mediante la utilización de modelos animales como el de ratón y el de conejo para la prueba de asa ligada (citado en 29), se pudo determinar el efecto de las nueve cepas productoras de citotoxina, en donde se obtuvo que solo cuatro de éstas, incluyendo la cepa hiperproductora fueron parcialmente positivas en la prueba de neurotoxicidad, que aunque sin provocar la muerte causaron daños a nivel de sistema nervioso. Los signos se observaron después de las 48 horas de la inoculación.

En cuanto a la prueba de asa ligada, no se encontró efecto alguno. En la tabla N°3 se muestran los resultados.

PURIFICACION DE LA TOXINA

Apartir de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, se obtuvieron los precipitados, tanto de la cepa hiperproductora de citotoxina (cepa 205) como de la de referencia (cepa H-30). La toxina contenida en los precipitados se dializó, se concentró y se pasó en una columna de sephadex G-75, obteniéndose así las fracciones de elución(7).

En las gráficas 1-5 se muestran las fracciones que presentaron una mayor absorción después de haber medido la concentración de proteínas (por absorbancia), en donde se pueden apreciar los picos más altos pertenecientes a las cepas 205 y H-30.

Dentro de los picos obtenidos para la toxina de la cepa 205, se tiene que aquellos que presentaron la mayor absorción corresponden a la fracción precipitada con sulfato de amonio en un 80% de saturación. En cuanto a los picos pertenecientes a la toxina de referencia, se observa que los de mayor absorción pertenecen a la fracción saturada al 70%.

DETERMINACION DE PROTEINAS Y ACTIVIDAD ESPECIFICA

En la tabla 4 Y 5 se muestran los resultados de la concentración de proteínas antes y después de la purificación de la toxina respectivamente. Comparando éstas se puede observar que las fracciones de la toxina que presentaron la concentración mas alta de proteínas antes y después de la cromatografía fueron aquellas que se saturaron a un 50% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los valores para dichas concentraciones fueron los siguientes: 0.269 y 0.050 mg/ml antes y después de la purificación en el caso de la cepa hiperproductora de citotoxina (cepa 205) y los valores de la cepa H-30 fueron 0.466 y 0.262 mg/ml; esto explica la diferencia en cuanto a la concentración de proteínas de los extractos de cultivo y probablemente los efectos parciales de neurotoxicidad. Sin embargo las fracciones que presentaron la actividad citotóxica y por lo tanto la actividad específica más alta fueron aquellas que se saturaron a un 80 y 70% en el caso de la cepa 205 y H-30 respectivamente.

Para la cepa 205 los titulos con la saturación al 80% fueron 6.2×10^5 DC/ml y 1.5×10^7 mg/prot. de actividad específica, en cambio para la cepa H-30 con la saturación al 70% los titulos fueron 2.5×10^4 DC/ml y 4.9×10^5 mg/prot. de actividad específica. Como se puede ver estos últimos fueron mas bajos que los correspondientes a los de la cepa 205.

La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad citotóxica entre la concentración de proteínas determinada bajo una absorbancia de 280nm.

Con respecto a las pruebas para determinar las actividades neurotóxica y enterotóxica de las fracciones semipurificadas, se encontró que éstas fueron negativas, a excepción de aquellas para la cepa de referencia.

Con la finalidad de determinar la pureza de la toxina se llevó a cabo un corrimiento electroforético de las fracciones obtenidas con ambas precipitaciones en geles de poliacrilamida, sin embargo no se encontraron resultados algunos, ya que no se observaron bandas correspondientes a la toxina. Esto probablemente se debió a que las fracciones se hidrolizaron, ya que se utilizaron tiempo después de haber sido obtenidas.

TABLA 2
SELECCION DE LAS CEPAS CITOTOXICAS PROBANDO LOS EXTRACTOS
CRUDOS DEL CULTIVO SOBRE CELULAS VERO Y HELA

CEPA (@)	DILUCION	CITOTOXICIDAD		Dc 50 %/ml (*)
		Vero	HeLa	
178	1:625	+	-	2.5×10^4
183	1:125	+	-	5.0×10^3
205(**)	1:3125	+	-	1.2×10^5
217	1:125	+	-	5.0×10^3
218	1:125	+	-	5.0×10^3
235	1:625	+	-	2.5×10^4
240	1:25	+	-	1.0×10^3
247	1:25	+	-	1.0×10^3
305	1:25	+	-	1.0×10^3

* La dosis citotóxica al 50 % (Dc 50%) es la que se requiere para matar como mínimo al 50 % de la población

@ Números clave para el manejo de las cepas

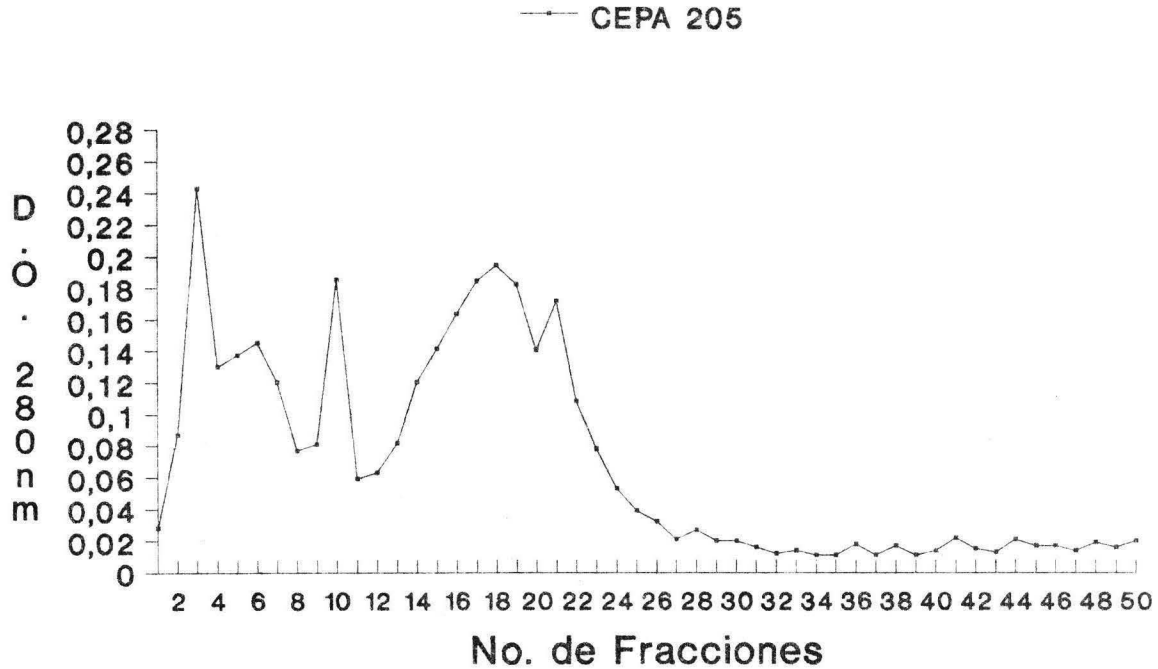
** Cepa seleccionada como hiperproductora de citotoxina

TABLA 3
PRUEBAS DE NEUROTOXICIDAD Y ENTEROTOXICIDAD PARA LOS
EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS CITOTOXICAS

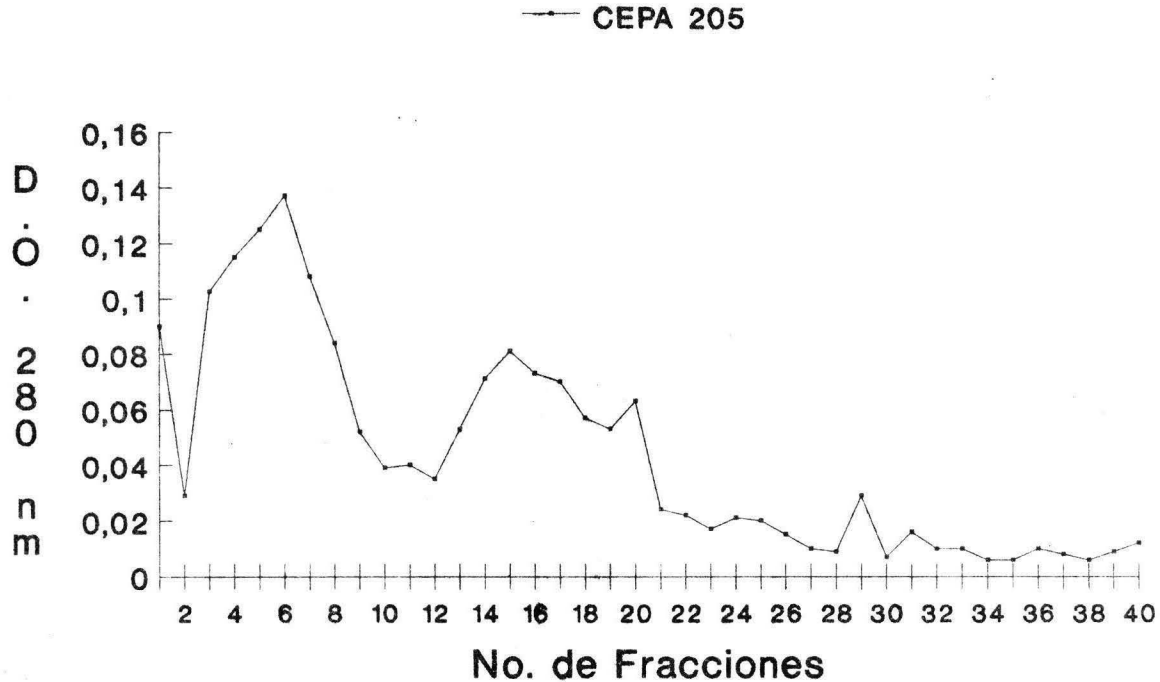
CEPA	NEUROTOXICIDAD		ENTEROTOXICIDAD	
	EFEECTO	SIGNOS	EFEECTO	SIGNOS
178	+	Reflejos anormales y ataxia	-	Ninguno
183	+	"	-	"
205	+	"	-	"
217	+	"	-	"
218	-	-	-	"
235	-	-	-	"
H-30	+	Muerte	+	Acumulación de líquido intestinal

La cepa H-30 se tomo como una cepa de referencia.
 La dosis de inoculación para la prueba enterotóxica fue de 1 ml
 y aquellas para la actividad neurotóxica fueron 0.5 y 1 ml

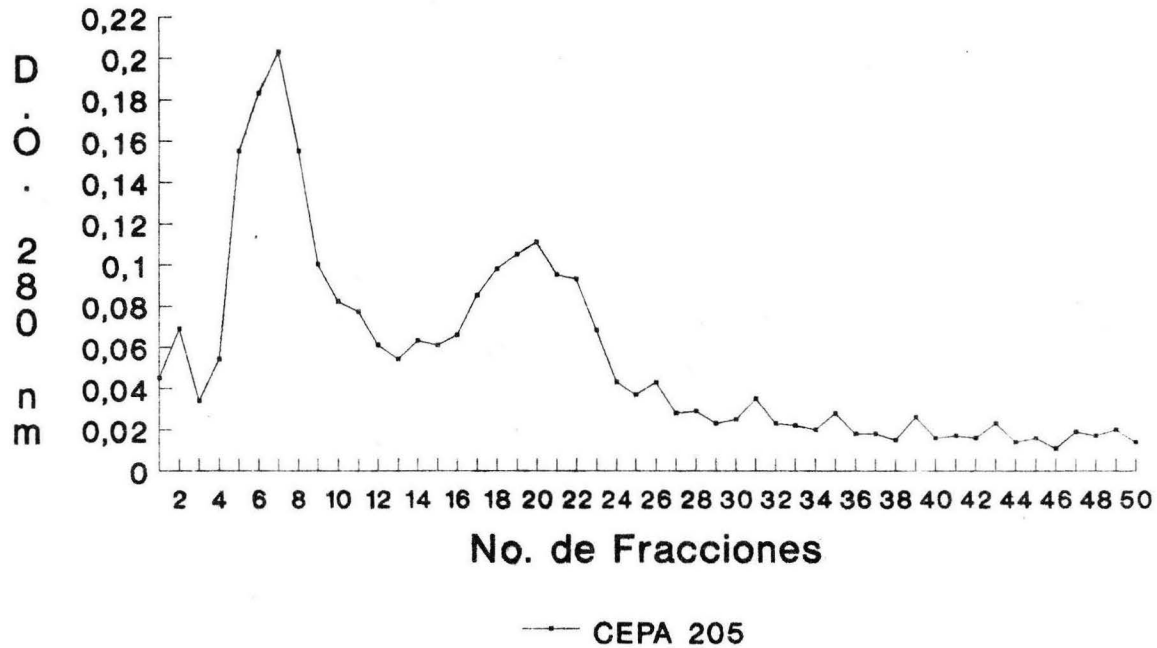
GRAFICA 1 ESPECTRO DE LA FRACCION AL 50%
DE SATURACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ QUE SE ELUYO
EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-75



GRAFICA 2 ESPECTRO DE LA FRACCION AL 70%
DE SATURACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ QUE SE ELUYO
EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-75

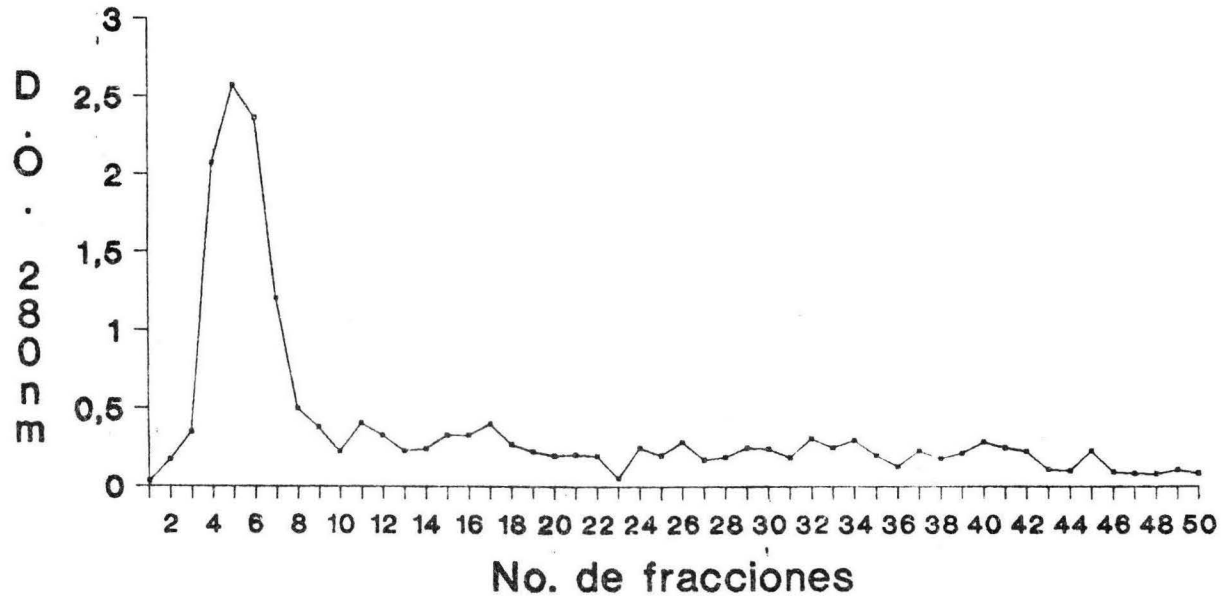


GRAFICA 3 ESPECTRO DE LA FRACCION AL 80%
DE SATURACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ QUE SE ELUYO
EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-75



GRAFICA 4 ESPECTRO DE LA FRACCION AL 50%
DE SATURACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ QUE SE ELUYO
EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-75

CEPA H30



GRAFICA 5 ESPECTRO DE LA FRACCION AL 70% DE SATURACION CON $(NH_4)_2SO_4$ QUE SE ELUYO EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-75

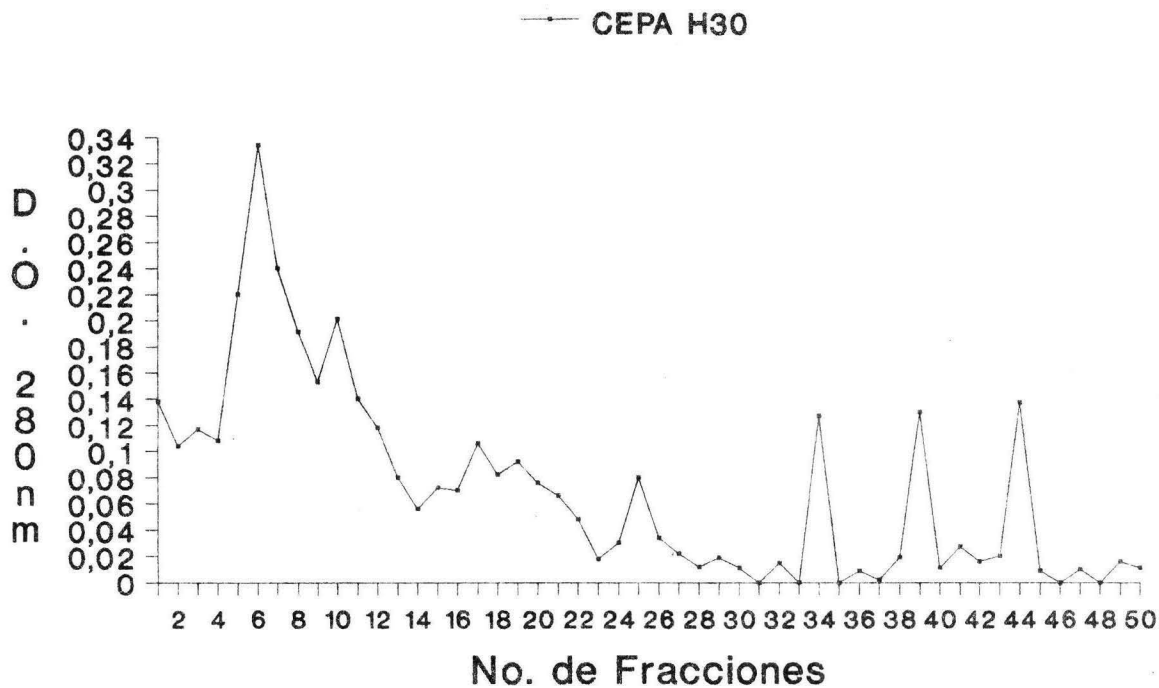


TABLA 4
CONCENTRACION DE PROTEINAS PARA LAS FRACCIONES
PRECIPITADAS CON SULFATO DE AMONIO

% DE SATURACION	CEPA 205		CEPA H-30	
	D.O. (660nm)	[] DE PROTEINAS (mg/ml)	D.O. (660nm)	[] DE PROTEINAS (mg/ml)
50	0.754	0.269	1.305	0.466
60	-----	-----	0.698	0.249
70	0.360	0.128	0.863	0.308
80	0.631	0.225	1.052	0.375
E.C. (*)	0.786	0.280	2.320	0.828

* Extracto crudo de cultivo

La concentración de proteínas se determino mediante la técnica de Lowry

TABLA 5
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS CITOTOXINAS DE LAS
CEPAS 205 Y H-30 DE *E. COLI*

FRACCION SATURADA CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	*CONCENTRACION DE PROTEINA (mg/ml)	AC. CITOTOXICA (Dc.50%/ml)	AC. ESPECIFICA (Dc.50%/mg prot)
50 % (205)	0.050	1.0×10^3	2.0×10^4
70 % (205)	0.043	2.6×10^3	6.0×10^4
80 % (205)	0.039	6.2×10^5	1.5×10^7
80 % (205)	0.039	2.6×10^3	6.6×10^4
50 % (H-30)	0.262	1.3×10^4	4.9×10^4
50 % (H-30)	0.262	5.0×10^3	1.9×10^4
70 % (H-30)	0.051	2.5×10^4	4.9×10^5

* La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría utilizando una absorbancia de 280 nm.

DISCUSION DE RESULTADOS

A partir de la inoculación del filtrado libre de células de las cepas porcinas en los cultivos de células Vero y Hela se pudo determinar el efecto citotóxico de aquellas que lo presentaron solo en células Vero, identificando así, la producción de una citotoxina muy semejante a la reportada como SLTIIv por Marques y col., la cual se cree que es diferente de la SLTII por presentar solo actividad citotóxica en células Vero, por no estar codificada por un fago convertidor y por producirse tanto en el sobrenadante como en el lisado bacteriano (24). Así mismo, se obtuvieron para éstas cepas títulos, en la actividad citotóxica de los filtrados, de hasta 1.2×10^5 Dc. 50%/ml, más altos que los reportados, los cuales son de 1×10^3 Dc. 50%/ml.(24). Esta diferencia probablemente se deba a la presencia del hierro en el medio Syncase, ya que el autor utilizó Chelex (como agente quelante) para la eliminación del mismo, y en el presente trabajo no (20,43). Por otra parte estos datos contribuyen a reafirmar el porqué los cultivos de células Vero son usados como una prueba eficiente en la determinación cualitativa y cuantitativa de citotoxinas.

Una vez que se purificó la toxina de la cepa hiperproductora, se determinó la actividad citotóxica de cada una de las fracciones obtenidas y se observó que los niveles de citotoxicidad se incrementaron en la prueba de cultivos celulares y como consecuencia la actividad específica. Esto lleva a pensar que probablemente el tipo de medio usado, que en este caso fue el medio Syncase, así como la agitación y el pH utilizado en éste pudieron haber influido en la producción de la citotoxina, provocando un incremento en los niveles tóxicos, tal y como lo menciona MacLeod, el cual sugiere que un pH de 8.5 es el óptimo para la producción de la toxina (20).

Tanto las pruebas enterotóxica y neurotóxica para los filtrados y para las fracciones

eluidas derivadas apartir de la toxina purificada no fueron positivas, a diferencia de aquellas para la cepa H-30, la cual como se reporta si presenta las 3 actividades biológicas (citado en 28). Las razones que se pueden tomar en cuenta para tratar de explicar esto pueden relacionarse con lo siguiente:

La prueba de asa ligada fué negativa, ya que no provocó la acumulación de líquido en el intestino del conejo como algunos autores lo reportan, tratando de asociar la diarrea con la enfermedad edematosa porcina causada por la SLTIIv (22), sin embargo en estudios hechos por MacLeod se ha reportado que niveles de citotoxicidad por debajo de 1×10^8 y 1.6×10^8 no son suficientes como para provocar enterotoxicidad en cerdo y en conejo respectivamente. Asimismo de acuerdo a los mismos autores, se requiere por lo menos 0.075 mg de toxina totalmente purificada para inducir la acumulación de líquido intestinal en asa ligada de conejo.

Con respecto a la actividad neurotóxica se puede decir que ésta no se encontró debido a que probablemente las fracciones utilizadas (solo las citotóxicas) en la inoculación del ratón no son las específicas para tal actividad, tal y como lo reporta Keusch (14). Keusch encontró que toxinas como la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1, pueden presentar fracciones en su purificación, que son específicas para provocar efecto neurotóxico y enterotóxico, así como para causar solamente un efecto citotóxico.

Por lo tanto esto sugiere la posibilidad de que se tengan que utilizar métodos específicos, aparte de la electroforesis, como el isoelectroenfoque, ELISA, anticuerpos monoclonales, etc., en apoyo a una purificación total de la citotóxina para que se puedan detectar cuales son en realidad las fracciones que causan dichos efectos.

Otros aspectos que deben considerarse, pueden ser los siguientes: debido a la propiedad termolábil de la citotóxina(18,22), esta puede ser más susceptible de presentar hidrólisis, por lo tanto no se descarta la posibilidad de que en el proceso y manejo de tal, se haya hidrolizado y

no causar los efectos biológicos. Asimismo se pueden tomar en cuenta algunos factores que puedan influir en la producción de la citotoxina, como por ejemplo, la cantidad del medio de cultivo a utilizar, la adición de sustancias liberadoras de toxina tales como polimixina B, o la concentración del hierro en el medio como algunos autores lo reportan (43). El sonicado o lisado bacteriano también puede considerarse como una técnica eficaz en el rendimiento de la producción de citotoxina (24,30).

Por otra parte cabe señalar que son muy pocos los estudios sobre la purificación y caracterización de la SLTIIv de origen porcino, por lo que es necesario la realización de tales, para tratar de explicar cuál es en realidad el papel que desempeña esta toxina en la enfermedad edematosa porcina, así como para conocer más a cerca de los mecanismos de patogenicidad de las citotoxinas producidas por *Escherichia coli*.

CONCLUSIONES

- 1.- Se identificó una cepa hiperproductora de la citotoxina porcina, capaz de producir 1.2×10^5 D.C.50%/ml.
- 2.- La citotoxina porcina es citotóxica para células Vero y no para células HeLa.
- 3.- Se logró purificar la citotoxina hasta una actividad específica de 1.5×10^7 D.C./mg.prot.
- 4.- La actividad citotóxica se mantuvo presente antes y después de la purificación, en cambio las actividades neurotóxica y enterotóxica no se encontraron.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anabalgan, K. and Somasundaram, T. 1981. A Simple Method for Drying and Preserving Polyacrlylamide. Indian. J. Biochem. 18:80.
- 2.- Anthony T. Andrews 1981. Electrophoresis: Theory, tecniques and Clinical Applications. Oxford Press. Oxford-New York.
- 3.- Blood, D.C., O.M. Radostits., S.A. henderson., S. Arrundel., C.C. Gay.: Medicina Veterinaria. 1988. Interamericana. 613-617. México.
- 4.- Broton, J., D. Hinde, C. Langston, R. Gross, B. and M. Gorwith. 1980. Enterotoxigenic **Escherichia coli** in central Canada. J. Clin. Microbiol. 11: 343:348.
- 5.- Clugston, R.E., and O. Nielsen 1974. Experimental edema Disease of swine. I. Detection and preparation of active principle. Can. J. Comp. Med. 38:22-28.
- 6.- Dawson, R.M., D.C. Elliot., and K.M. Jones.: Data for Biochemical Research, 2nd. ed. Oxford Univertsity 1969.
- 7.- Determan, H. Gel Chromatography, a laboratory handbook. Springer Verlag. New York Inc. 1968.

- 8.- Edwards, P.R., and H.W. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 2th. ed. Burguess Publish Co. Minesota Mineapolis. USA.
- 9.- Francis, D.H., J.E. Collins, and j.r. duimstra. 1986. Infection of gnotobiotic pigs with an **Escherichia coli** 0157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. Infect. Immun. 51:953-956.
- 10.- Garrido, F., Borges G, Cárdenas V, Bobadilla J.L, Ibarra J.Ruiz-Matus C. Mortalidad Postneonatal por diarreas: Un estudio de casos y controles. Salud Publica. Mex. 1990; 32:261-268.
- 11.- Gorwith, M., W. Wenman, D. Hinde, S. Feltham, and H.Greenberg. 1981. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. J. Infect. Dis.144:218-224.
- 12.- Gross, R.J., and B. Rowe. 1985. Serotyping of **Escherichia coli**. ed: M. Sussman. Academic Press. P. 345-363.
- 13.- Howard, G.J., and T,J. Francis: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 1983. ed. La Prensa Med. Mex. México. 54-60.

- 14.- Keusch, G.T., and M. Jacewicz. 1975. The pathogenesis of Shigella diarrhea. V. Relationship of Shiga enterotoxin, neurotoxin and cytotoxin. J. infect. Dis. 131:533-539
- 15.- Konowalchuck J., J.I. Speirs, and S. Stauric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 18:775-779.
- 16.- Layne, E. 1957. Spectrophotometric and Turbidimetric methods for measuring proteins. Methods Enzymol. 3:447-454.
- 17.- Levine, M.N. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohaemorrhagic and Enteroadherent. J. Infect. Dis. 155 (3): 377-389.
- 18.- Linggod, M.A., and J.M. Thompson. 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. J. Med. Microbiol. 25: 359-362.
- 19.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

- 20.- MacLeod, D.L., and Gyles, C.L. 1989 Effects of culture conditions on yield of Shiga-Like Toxin IIv from *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **35**:623-629.
- 21.- MacLeod, D.L., and Gyles, C.L. 1990. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect.Immun.***58**:1232-1239.
- 22.- MacLeod, D.L., Gyles, C.L., Garcia, A.V. and R.C. Clarke. 1991. Physicochemical and Biological properties of purified *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect.Immun.***59**:1300-1306.
- 23.- Mainil, J., G. Daube, P. Deprez, A. Kaeckenbeeck. and P.Pohl. 1989. Detection and Identification of pathotypes of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from weaned piglets using gene probes for seven *E. coli* toxins. *FEMS. Microbiol. Lett.* **59**:345-350.
- 24.- Marques, L.R.M., J.S.M. Peiris, S.J. Cryz, and A.D. O'Brien. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol.Lett.***44**:33-38.
- 25.- Marques., L.R.M.,M.A. More, J.G. Wells I.K. Wachsmuth and A.D. O'Brien. 1986. Production of Shiga-Like toxin by *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **154**:338-341.

- 26.- O'Brien, A.D., G.D. Laveck, M.R. Thompson, and S.B. Formal. 1982. Production of Shiga dysenteriae type 1-like cytotoxin by **Escherichia coli** J. Infect. Dis. **146**:763-769.
- 27.- O'Brien, A.D., T.A. Lively, T.W. Chang, S.L. Gorbach. 1983. Purification of **Shigella dysenteriae** 1 (Shiga)-like toxin from **Escherichia coli** 0157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. Lancet. **11**:573.
- 28.- O'Brien, A.D., and R.K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev. **51**:206-220.
- 29.- O'Brien, A.D., and G.D. Laveck. 1983. Purification and characterization of a **Shigella dysenteriae** 1-like toxin produced by **Escherichia coli**. Infect. Immun. **40**:675-683.
- 30.- O'Brien, A.D., G.D. Laveck. 1982. Immunochemical and Citotoxic activities of **Shigella dysenteriae** 1 (Shiga) and Shiga-like toxins. Infect. Immun. **35**:1151-1154.
- 31.- Oku, Y., T. Yutsudo, T. Hirayama, A.D. O'Brien, and Y. Takeda. 1989. Purification and some properties of a Vero toxin from a human strain of **Escherichia coli** that is immunologically related to Shiga-like toxin II (VTII). Microbiol. Pathogenesis. **6**:113-122.

- 32.- Padhye, V.V., J.T. Beery, F.B. Kittell, and M.P. Doyle. 1987. Colonic haemorrhage produced in mice by a unique Vero cell cytotoxin from **Escherichia coli** strain that causes haemorrhagic colitis. *J. Infect. Dis.* 155:1249-1253.
- 33.- Petric, M., M.A. Karmali, S. Richards, and R. Cheung. 1987. Purification and biological properties of **Escherichia coli** Vero cytotoxin FEMS. *Microbiol. Lett.* 41:63-68.
- 34.- Ramírez, N.R.: Diarreas del cerdo producidas por bacterias. En avances de las enfermedades del cerdo. 1985. Ed. por AMVEC, 339-345. México (1985).
- 35.- Robins-Browne, R.M. 1987. Traditional Enteropathogenic **Escherichia coli** of infantile diarrhea. *Rev. Infec. Dis.* 9:28-53.
- 36.- Scotland, S.M., A.R. Smith, and B. Rowe. 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from **Escherichia coli** 0157. *Lancet.* 11:885-886.
- 37.- Segura, J.C. and Ramírez, N.R.: Factores que afectan la mortalidad hasta el destete en el cerdo. *Sintesis Porcina*, 7 (8):48-49. (1988).

- 38.- Smith, H.W., P. Green, and Z. Parsell. 1983. Vero cells toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage on conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. *J. Gen. Microbiol.* **129**:3121-3137.
- 39.- Strockbine, N.A., L.R.M. Marques, J.W. Newland, H.W. Smith, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien. 1986. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* 0157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
- 40.- Sumano, H. and Ocampo, L.: Fisiología de la diarrea. En avances en enfermedades del cerdo, 1985. Ed. por AMVEC, 323-326. México.
- 41.- Taylor, D.J.: Enfermedades del cerdo. 1986. Ed. El manual moderno. 83-88. México.
- 42.- Yutsudo, T., N. Nakahayashi, T. Hirayama, and Y. Takeda. 1987. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* 0157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microbiol. Pathogenesis.* **3**:21-30.

- 43.- Zepeda López H. M., Torres-López S. Eslava-Campos C., Giono S. 1989. Influence of iron on the production of two Cytotoxins by one strain of **Escherichia coli**. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 31(4):317-321.
- 44.- Zepeda López H.M., Torres-López S. y Giono S.1985. Posible producción de dos citotoxinas por una cepa de **Escherichia coli**. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 42(5): 310-313.