



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EFECTO DE LOS FACTORES AUXILIARES DE VIRULENCIA
DE Escherichia coli O157:H7 SOBRE LOS LINFOCITOS TISULARES
EN UN MODELO EN CONEJOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
PRESENTAN:**

**DOLORES ADRIANA BRAMBILA GONZÁLEZ
MARIANA MARTÍNEZ RIVAS**

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA



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.

ÍNDICE

	PÁGIN
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVO PARTICULAR	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

En 1964 el género *Escherichia* fue definido como organismos sin esporas, gram negativos, con frecuencia móviles, con flagelos peritricos, fácilmente cultivables en los medios ordinarios de laboratorio; aeróbicos y facultativamente anaeróbicos. Todas las especies fermentan la glucosa con formación de ácido o de ácido y gas tanto en aerobiosis como en anaerobiosis; todos reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativos, catalasa positivos. Típicamente parásitos intestinales del hombre y de los animales, aunque algunas especies se pueden encontrar en otras partes del organismo, en las plantas y en la tierra (Bell, C., 1998).

Los sitios más frecuentes de infección clínicamente importantes son el aparato urinario, vías biliares y otros sitios en la cavidad abdominal. Esta enterobacteria posee una compleja estructura antigénica. Se han clasificado más de 150 diferentes antígenos somáticos O termoestables (Lipopolisacáridos), más de 100 antígenos K termolábiles (Capsulares) y más de 50 antígenos H (Flagelares). La mayor parte de las infecciones de las vía urinarias se deben a un pequeño número de tipos de antígeno O. *Escherichia coli* es causante de diarreas y es muy común en todo el mundo, ésta bacteria se clasifica por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente (Jawetz, 1997).

CLASIFICACIÓN:

Existen cinco diferentes grupos de *Escherichia coli* que causan enfermedad intestinal en humanos (patotipos); enteroagregativa (EAEC), enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) y las productoras de toxina Shiga o enterohemorrágica (STEC o EHEC) (Nataro and Kaper, 1998; Hurley y col., 1999; Lai y col., 1999).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) produce una verotoxina, así denominada por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales del mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina, también llamada "Shiga Like Toxin" (SLT) I y II (Puente and Finlay, 2001)

De los serotipos de *E. coli* que producen verotoxina, el más común y más frecuentemente aislado es O157:H7. Esta cepa no fermenta el sorbitol, a diferencia de la mayor parte de las otras *E. coli* (Jawetz, 1997).

En humanos, *Escherichia coli* O157:H7 ha sido implicada en casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis Hemorrágica (CH) en diferentes partes del mundo. La severidad de la enfermedad, la falta de un tratamiento efectivo y la posibilidad de una epidemia provocada por la ingestión de alimentos contaminados han impulsado los estudios sobre la patogénesis y la detección de la bacteria (Paton and Paton, 1998; Perna y col., 2001).

SINDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Es una enfermedad caracterizada por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia (deficiencia plaquetaria), defectos de la coagulación y signos neurológicos variables. Esta enfermedad es más común en los niños y se presenta frecuentemente después de una infección gastrointestinal usualmente causada por un tipo específico de la bacteria (*Escherichia coli* O157:H7). Anteriormente el SUH era raro, pero recientemente su incidencia en niños se ha elevado y en la actualidad constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda en éste grupo de población. Varios brotes se han atribuido al consumo de hamburguesas mal cocidas contaminadas con *E. coli*. (Enciclopedia Médica de la Salud, 2001).

CLASIFICACIÓN DEL SUH

En la actualidad existen varias clasificaciones, pero la de Kaplan (1992) es considerada una de las más prácticas, la cual se muestra a continuación:

1.- Idiopático

2.- Secundario, en dónde se mencionan los factores secundarios de la siguiente manera:

- a) Infecciones asociadas con SUH: *E.coli* 0157:H7, *Shigella dysenteriae* tipo I, *Streptococcus pneumoniae*.
- b) Infecciones circunstanciales: *Salmonella typhi*, *Campylobacter fetus jejuni*, *Yersenia pseudotuberculosis*, Bacterioides , ECHO virus, influenza, rotavirus, VIH, Microtapiotes, etc.
- c) Forma genética: herencia autosómica recesiva y formas dominantes.
- d) Asociado con drogas: anticonceptivos orales, ciclosporina A, mitomicina.
- e) Durante el embarazo, postrasplante de médula y riñón, asociado con glomerulopatías y procesos malignos (Jaime y col., 2003).

EPIDEMIOLOGÍA

Aunque siempre se relaciona la presencia de SUH con el antecedente de diarreas tipo invasivas, no es así en todos los casos, pues existe una división importante en SUH típico o D+, que presenta como antecedente enfermedades diarreicas agudas, y el atípico o D-, que no tiene este antecedente. Basados en cultivos de heces fecales, hay evidencias que relacionan a la infección por la ECEH con el clásico SUH posdiarreico debido a la presencia de citotoxina fecal o de anticuerpos en el paciente, aunque una gran variedad de organismos han sido implicados en la patogénesis del SUH. Actualmente se conoce que ésta enfermedad puede aparecer en cualquier parte del mundo y que su frecuencia está aumentando. Existen zonas endémicas en Argentina con alta incidencia, debido posiblemente a la elevada frecuencia de enfermedades diarreicas agudas producidas por toxinas tipo Shiga demostradas mediante serología, neutralización de citotoxinas fecales, cultivo de heces e hibridación del DNA. Existen otras zonas endémicas en África meridional, el oeste de los Estados Unidos de Norteamérica, Holanda, etc. Debido a que la cepa bacteriana O157:H7 habita el intestino de estos animales, la mayoría de los brotes están relacionados con la contaminación de productos cárnicos. La hamburguesa es el vehículo que favorece más de la mitad de los casos epidémicos reportados. El agua y otros productos contaminados con las heces del ganado vacuno, son vehículos adicionales de la infección, así como la leche y el yogurt sin pasteurizar (Jaime y col., 2003).

PATOGENIA

La *E. coli* 0157:H7 productora de la verotoxina o la SLT, se ingiere con los alimentos contaminados poco cocidos (carne, leche no pasteurizada, etc.), colonizan el intestino grueso y se adhieren a las células epiteliales de la mucosa del colon. Después de invadir y destruir dichas células, el tejido subyacente y su vascularización, se produce la diarrea (Jaime y col., 2003)

El SUH generalmente comienza con síntomas como vómito y diarrea, la cual puede ser sanguinolenta. En un periodo de una semana el paciente desarrolla debilidad e irritabilidad y el gasto urinario disminuye significativamente, llegando incluso a suspenderse. El paciente se torna pálido y anémico; dado que los glóbulos rojos están sufriendo un proceso de destrucción (hemólisis). Tanto en niños como en adultos, el SUH es una enfermedad grave que trae muchas complicaciones y puede ocasionar la muerte (Enciclopedia Médica de la Salud, 2001).

El trastorno subyacente básico consiste en una lesión del endotelio vascular, que provoca una activación local de la coagulación, con la formación de trombosis en los vasos pequeños. El daño de las células endoteliales glomerulares produce una disminución de la luz glomerular, que es favorecida por la liberación de citocinas de potente acción vasoconstrictora, lo cual aumenta la resistencia vascular y disminuye el flujo sanguíneo renal, que trae como resultado la disminución de dicho flujo, y lleva de esta forma a la insuficiencia renal. Por otro lado, la anemia hemolítica es secundaria a la disminución de la luz de los pequeños vasos. De esta manera, cuando los eritrocitos pasan por estos vasos con la luz disminuida, se dañan y se

fragmentan, y adquieren forma abigarrada (fragmentocitos). Sin embargo, también se describen alteraciones de la membrana eritrocitaria que los llevan a unirse con los multímeros del Factor von Willebrand (FvW) y trombospondina, de tal forma que se adhieren a la pared vascular y se rompen por la presión alta existente debido a la disminución de la luz capilar (Jaime y col., 2003).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Las alteraciones en el SUH se caracterizan por la presencia de un material hialino (eosinofílico) en la luz de pequeñas arteriolas y capilares, inicialmente compuesto por plaquetas con algunos depósitos de fibrina. También son frecuentes los depósitos subendoteliales hialinos. El estudio inmunohistoquímico del trombo ha demostrado la presencia del FvW con una pequeña cantidad de fibrinógeno-fibrina, lo contrario de lo que sucede en las lesiones trombóticas de la coagulación intravascular diseminada (CID), hallazgo que confirma la teoría de agregación plaquetaria mediada por multímeros del FvW. Las arteriolas renales presentan un engrosamiento de la íntima e hipertrofia de las células de la capa muscular. La presencia de trombos fibrinoides intraluminales es muy llamativa, y a menudo se acompaña de necrosis de la pared vascular. Las arterias interlobulillares también se encuentran afectadas, y presentan un engrosamiento de la íntima, de aspecto mucinoso, que contribuye a reducir el calibre de la luz vascular. En los glomérulos puede observarse un engrosamiento uniforme de las paredes capilares, con posible formación de doble contorno, y a veces trombosis y focos de necrosis (Jaime y col., 2003).

DIAGNÓSTICO

Los criterios diagnósticos tradicionales incluyen: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y la insuficiencia renal aguda. El diagnóstico es simple y fácil si esta tríada ocurre en un niño después de un episodio de diarrea, y sobre todo si es sanguinolenta. Se debe considerar el diagnóstico de infección por *E.coli* 0157:H7 en todo paciente con diarrea sanguinolenta o el SUH. El diagnóstico debe considerarse también en personas con diarreas no sanguinolentas que pueden haber estado expuestos al microorganismo, por lo tanto se deben realizar coprocultivos en búsqueda de *E.coli* 0157:H7. (Jaime y col., 2003)

TRATAMIENTO Y CONTROL

En general, todos los procesos diarreicos requieren, como base fundamental del tratamiento, una adecuada reposición de líquidos y electrolitos. Esta reposición puede ser oral en casos leves, pero en situaciones de grave deshidratación la rehidratación parenteral no debe demorarse. Normalmente las infecciones extraintestinales requieren una antibioterapia; sin embargo el tratamiento con antibióticos de las enteritis está muy cuestionado, y en algunos casos, totalmente contraindicado ya que se ha demostrado que algunos antibióticos potencian la liberación de las verotoxinas de tal forma que pueden agravar el estado del enfermo y favorecer la aparición del SUH (Vadillo, 2002)

La indicación y el tratamiento específico destinados a prevenir o limitar la cascada de eventos que terminan en la trombosis intravascular e injuria tisular, difieren sustancialmente de los niños con SUH a los adultos con el síndrome hemolítico urémico y la púrpura trombocitopénica trombótica (SUH/PTT). Los niños con SUH asociados a la Shiga-toxina de la *E.coli*, generalmente se recuperan espontáneamente y no requieren terapia con plasma. Por el contrario, existe un consenso general en los casos de SUH/PTT del adulto, que plantea que el recambio o la infusión de plasma deben ser siempre intentados para minimizar el riesgo de muerte o secuelas a largo plazo. La mortalidad de esta enfermedad se ha reducido significativamente en los últimos 40 años de un 40 al 50 % a un actual 3 al 5 %, probablemente como resultado de un mejor manejo de las medidas de soporte, control de la anemia, insuficiencia renal, hipertensión arterial y desbalance del agua y electrolitos. No obstante, no

existe ninguna terapia que se haya mostrado eficaz para prevenir o limitar el proceso microangiopático y consecuentemente, afectar el curso de la enfermedad. Los agentes antidiarreicos pueden incrementar el riesgo de megacolon tóxico (Jaime, J.C., 2003).

Considerando todo lo anterior se sugiere el siguiente manejo del paciente con SUH:

- 1.- Control estricto del equilibrio hidromineral con restricción de los líquidos a 400 mL/m² y manejo de la hiponatremia.
- 2.- Manejo de la anemia. Sólo se tratará si existen signos o síntomas de hipovolemia o Hb inferior a 70 g/L.
- 3.- No uso de antibióticos de forma rutinaria. Estudios actuales revelan la liberación de toxinas (*Shiga-like*) después de la administración de antibióticos.
- 4.- Si el ritmo diurético es inferior a 1mL/kg/h, utilizar infusión de furosemida.
- 5.- Dopamina a dosis renales, con el objetivo de mejorar la perfusión a este nivel.
- 6.- Control estricto de la tensión arterial.
- 7.- Diálisis peritoneal en los siguientes casos:

- * Oliguria que no responde a dosis alta de furosemida.

- * Sobrecarga hídrica.

- * Acidosis que no responde a la administración de bicarbonato.

- * Hipertensión arterial refractaria a las medidas farmacológicas.

En casos que sea difícil o esté contraindicada la diálisis peritoneal, se recomienda el uso de hemodiálisis. En casos extremos se ha llegado al trasplante renal, cuando el paciente evoluciona a insuficiencia renal crónica. El tratamiento debe continuarse hasta la completa remisión de la enfermedad. No obstante, no existen parámetros clínicos que puedan predecir de modo preciso la duración del tratamiento (Jaime, J.C., 2003).

El tratamiento es solo de soporte. La enfermedad se puede prevenir por medio de una cocción adecuada de la carne (Enciclopedia Médica de la Salud, 2001).

ANTECEDENTES:

La cepa EHEC O157:H7 ha despertado mucho interés por presentar dos características especiales: ocasiona un cuadro clínico de colitis hemorrágica afebril, asociada con frecuencia a dos graves complicaciones, el SUH y la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) y es causante de brotes epidémicos importantes (Griffin, 1991). Los mecanismos por los cuales se produce el SUH y PTT no se conocen con precisión aunque han sido objeto de diversas revisiones (Boyce, 1995., Griffin, 1991., Kaplan, 1992).

Los bóvidos parecen constituir el principal reservorio de *E. coli* O157:H7, encontrando diferentes prevalencias, que oscilan en los animales sanos entre el 7 y el 30% de los estudiados (Blanco, 1996). Parece que estas cepas no son patogénicas para los animales, aunque se pueden encontrar en aquellos que presentan diarrea (Frias, 1996).

Se sabe que la cepa O157:H7 presenta dos verotoxinas diferentes; la VT1 y la VT2 e incluso algunas variantes de la VT2 (VT2, VT2a, VT2d y VT2e) (Kaper and O'Brien, 1998). Estas toxinas están codificadas por genes lisogénicos, es decir, genes que están situados en bacteriofagos que se integran al genoma bacteriano de forma estable (Strockbine, 1986). Estas citotoxinas codificadas por fagos, llamadas "Shiga like toxin" (SLT1 y SLT2) por su similitud con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo1 o bacilo de Shiga, también son denominadas verocitotoxinas (VT) o toxinas de Shiga (Stx1 y Stx2) (Taylor, 1999; Wadolkowski, 1990).

Las Stxs son miembros de una familia de toxinas que comparten características genéticas, estructurales y funcionales; son citotóxicas para las células Vero, HeLa y células endoteliales; así como enterotóxicas para los conejos y letales para algunos animales. El prototipo de Stx tiene una subunidad estructural; 1A:5B, el polipéptido B forma un pentámero que es responsable de la unión a un receptor glicolípidico eucariótico el cual es el típico Globotriosilceramida o Gb3. Entonces la subunidad A es cortada y reducida a una sección A1 y

un péptido A2. El polipéptido A1 contiene N-glicosidasa activada que causa depurinación en la porción RNAr y por lo tanto la inhibición de síntesis de proteínas. El péptido A2 es requerido para unir con un enlace no covalente al péptido A1 al pentámero B. Por lo tanto, el modo de acción de estas toxinas es la inhibición de síntesis de proteínas en células eucariotas por la depurinación de adenina en 28s RNAr (Kaper, J., 1998).

La forma por la cual la SLT intoxica las células blanco es la siguiente:

- * El pentámero B de la toxina se une al Gb3.
- * El complejo receptor – toxina es introducido por endocitosis.
- * El complejo se mueve por transporte retrógrado hacia el aparato de Golgi y después al retículo endoplásmico.
- * La subunidad A1 es liberada dentro del citoplasma; el objetivo es el ribosoma (Kaper, J., 1998).

Curiosamente se ha observado que las cepas de EHEC O157:H7 se adhieren a los enterocitos y eliminan las microvellosidades de éstas células. Más tarde se comprobó que contenían el gen “eae”. Por otro lado se detectó la presencia de un plásmido que codifica una fimbria que actúa como adhesina inicial. La secuencia del proceso patogénico según los conocimientos actuales sería: adherencia laxa del enterocito por la fimbria, seguida de la adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína “intimina”, codificada por el gen eae, y posteriormente la liberación de la verotoxina (Orskov, 1990).

Integrando las observaciones de lesiones, posición de la bacteria y la presencia de los receptores para las toxinas, es posible proponer el siguiente mecanismo de infección:

- 1.- La bacteria se adhiere a la mucosa de las vellosidades lanceoladas (Domo) del apéndice cecal.
- 2.- La toxina presente se une a los receptores Gb3 de éstas mismas células, provocando alteraciones que permiten que la bacteria sea trasladada a la submucosa.
- 3.- La bacteria se replica en la submucosa, es fagocitada en las áreas linfoides y también se observa libre en el estroma.
- 4.- La presencia de la bacteria y de sus productos de degradación, incluyendo el LPS, inician el proceso inflamatorio supurativo de la región; la toxina liberada localmente y absorbida de la luz del órgano inicia sus efectos en el tracto gastrointestinal.
- 5.- El LPS y la bacteria inducen la expresión de receptores en la microvasculatura y macrovasculatura renales. Esto explica el efecto marcado de la insuficiencia renal como consecuencia de un fenómeno vascular que involucra ambas irrigaciones renales.
- 6.- El efecto sobre el Sistema Nervioso Central es aparente en los últimos estadios de la enfermedad en los conejos de dos meses de edad, siendo predominante en los animales más grandes; por ello es probable que los receptores en la vasculatura o en las neuronas del encéfalo se expresen por efecto del LPS en los animales pequeños y en los mayores estén presentes previamente (Valdivia, 2002).

Anteriormente se reportó un efecto de destrucción de linfocitos locales y en el bazo, proponiéndose que dicho efecto pudo ser mediado por una lisis de linfocitos portadores de receptores Gb3 o bien por un fenómeno indirecto vía citocinas (Valdivia y col., 1997).

Con datos anteriormente presentados se deduce que la toxina con mayores efectos sobre las células del sistema es la VT2 (Sugatani y col., 2000); sin embargo se describen datos contradictorios en los efectos, los cuales dependen del sistema de prueba.

Otra probable explicación a la disminución de linfocitos puede estar relacionada a una modulación alterada de la respuesta inmune vía interleucinas, en cuyo caso una buena candidata sería la IL-10, puesto que ésta se ha involucrado con los fenómenos de tolerancia intestinal, los cuales a su vez abaten la respuesta de los Th1 y Th2. La IL-10 es producida por los macrófagos en respuesta a una estimulación directa por el LPS, el que proviene de una lisis de bacterias gram negativas como *E. coli*. Se ha demostrado que cuando la toxina se une a

células mononucleares periféricas o bien a monocitos “*in vitro*”, dichas células aumentaron la síntesis de IL-1 y de TNF, que a su vez aumentan el daño mediado por las Stx; sin embargo, a la fecha no es posible diferenciar si el efecto de las toxinas es directo sobre los linfocitos o se requiere de una cadena de eventos que conducen a la destrucción de los linfocitos (Valdivia, 2002).

En la etapa inicial de la infección por EHEC intervienen factores dependientes de la isla de patogenicidad denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*), fragmento cromosomal que codifica varias funciones entre ellas un sistema de secreción tipo III y varias proteínas necesarias para la unión íntima al enterocito, como los genes *espA* y *espl*, que codifican para proteínas secretadas que inician señales intracelulares. El gen *eae* presente también en este locus, codifica para la proteína de membrana externa de 94 kDa denominada intimina, responsable de establecer un estrecho contacto con las células epiteliales del colon. Esta interacción con las microvellosidades da lugar a la lesión característica de adherencia íntima con formación de un cáliz, elongación y borramiento de las microvellosidades conocida como “*attaching and effacing*” (A/E) con pérdida del ribete estriado (Barret, 1989; Francis, 1989; Wadolkowski, 1990). Otros factores adicionales de virulencia están asociados a un plásmido de virulencia de 60 Mda como la hemolisina codificada por el operón *hlyCABD*, que se requiere para la expresión de una fimbria de adherencia y la proteína *espP*. (Notario R. y col. 2000).

La isla de patogenicidad del *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) se compone de 5 genes LEE 1,2,3,4 y 5, correspondiendo al LEE-1 a la codificación para un regulador de la expresión (Ler) de los otros 4 genes, por lo que la falta del regulador impide la expresión de toda la isla de patogenicidad (Sircili y col 2004).

EL GEN “*eae*”

El gen que codifica la intimina fue descubierto por Jerse y colaboradores en 1990. Este gen es llamado así por *E. coli*-adherencia y borrado (por la lesión A/E). La intimina es una proteína de la membrana externa de 94 a 97 kDa, producida por todos los patógenos A/E incluyendo a las productoras de Stx (STEC O157:H7), enteropatógenos humanos (EPEC), *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* y EPEC de conejos, bovinos, ratones y caninos. La intimina es el único factor de adherencia bacteriana identificado de *Escherichia coli* O157:H7. La importancia de la intimina en la colonización intestinal ha sido demostrada en modelos animales con *E. coli* O157:H7 mutada (sin el gen *eae* expresado), la cual no produce la lesión A/E en cerdos y no hay colonización en ningún lugar del intestino. El gen se presenta en bacterias entéricas que inducen la histopatología de la lesión A/E. El locus *eae* no se encuentra en la microbiota normal de *E. coli*, ni en las ECET, ni en otras especies bacterianas que no presentan o producen lesiones A/E. Todas las *E. coli* O157:H7 poseen el gen *eae* y el resto del locus de esfecelamiento enterocítico (LEE) (Kaper, J.C., 1998).

Rosenshine y col. en 1996 presentaron evidencia de que el receptor en las células para la intimina es una proteína en la membrana de las células epiteliales de 90 kDa, la cuál tiene que ser fosforilada para servir como receptor; esta proteína es llamada *Tir* (Receptor de translocación de intimina).

El *Tir* es codificado en el LEE, localizado hacia arriba del gen *eae*, el cual codifica para intimina. El *Tir* es producido en la bacteria como una proteína de 78 kDa pero no es fosforilada en la bacteria. La proteína es translocada vía “secreción Tipo III” dentro de la célula eucariótica, dónde es fosforilada y asociada al citoesqueleto de la célula. Este escenario representa una novedosa forma de adherencia mediante la cual una bacteria inyecta una proteína dentro de la célula del huésped, dónde es fosforilada y puede entonces servir como un receptor para el anclaje de la bacteria (Kaper y col., 1998).

Jerse y col. (1990) demostraron que la sola expresión del gen *eae* no es suficiente para permitir la adherencia de la bacteria a las células epiteliales.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconoce el mecanismo completo de patogenicidad que emplean las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas en el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico. El conocimiento de tal mecanismo puede ayudar al establecimiento de medios de control y prevención eficaces. Por tal motivo es necesario contar con modelos animales en donde se desarrollen lesiones y se produzcan signos parecidos a los observados en humanos con tal síndrome.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los factores de virulencia de *E coli* O157:H7 en un modelo de inoculación en el apéndice cecal del conejo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto del gen *eae* sobre la modificación del tipo de linfocitos presentes en el apéndice cecal del conejo.

Evaluar el efecto de las toxinas Stx I y Stx II sobre la modificación del tipo de linfocitos presentes en el apéndice cecal del conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración de éste trabajo se utilizaron 21 conejos de la raza Nueva Zelanda, con un peso aproximado de 1.8 a 2.0 Kg. y se seleccionaron aleatoriamente sin discriminar por el sexo; éstos animales fueron obtenidos en el módulo de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los conejos se mantuvieron en observación durante 7 días, periodo durante el cual se les alimentó con un concentrado comercial (conejina, purina) y agua a libre acceso. Pasado éste periodo se les sometió a un ayuno de sólidos durante 24 h.; después de las cuales, se procedió a la cirugía e inoculación de las cepas.

1.- CEPAS UTILIZADAS:

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron la EDL 933-IBT, la cepa 933 Δ -ler, EDL933 FM, la cepa 933 J, la cepa 933 W, y la cepa K12; las cuales cuentan con las características mencionadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Factores auxiliares de virulencia de las diferentes cepas utilizadas en los experimentos.

CEPA	SEROTIPO	STx 1	STx	Gen eae	Ag O	LPS
933 IBT	O157:H7	+	+	+	+	+
933 FM	O157:H7	+	+	+	+	+
933 Δ Ler	O157:H7	+	+	-	+	+
K-12	C-600	-	-	-	-	+
933 W	ND	-	+	-	-	+
933 J	ND	+	-	-	-	+

Las cepas de *Escherichia coli* 933 Δ -ler y 933 IBT, fueron proporcionadas por el Dr. José Luis Puente del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM; y las cepas K12, 933 W, 933 J, y 933 FM, por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La pureza e identidad de las cepas se determinó mediante el sembrado en cajas de agar Mac Conkey (Merck), agar Eosina Azul de Metileno y agar soya tripticaseína (Becton Dickinson); posteriormente se les sometió a las siguientes pruebas bioquímicas:

1. Urea (Bioxon)
2. Prueba de Motilidad, Indol y descarboxilación de la ornitina (Bioxon)
3. Citrato (Merck)
4. Reducción de nitratos (Difco)
5. Rojo de metilo – Voges Proskauer (Bioxon)
6. Lisina Hierro Agar (Bioxon)
7. Triple Azúcar Hierro (Bioxon)

Con los resultados de estas pruebas se determinó el género y especie mediante la ubicación en las tablas de clasificación de Enterobacterias (Cowan, S., 1979; Holt, J. 1994).

Los inóculos utilizados fueron preparados un día antes de la intervención, mediante el sembrado de una colonia de cada cepa en 3 ml. de caldo soya tripticaseína (CST, Becton Dickinson); se dejó incubar aproximadamente 18 horas a 37°C. De éste cultivo solo se tomo 1ml. para la inoculación en el apéndice cecal (AC); esta cantidad corresponde a una dosis aproximada de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) / ml de toxina (Valdivia, 1995).

Cuadro 2.- DISEÑO EXPERIMENTAL CON LAS CEPAS DE Escherichia coli

INOCULO	No. de animales
Caldo Soya Tripticaseína	3
K12	3
933 W	3
933 J	3
933 Δ -ler	3
933 IBT	3
933 FM	3

2.- INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

APENDICECTOMÍA:

Inicialmente se rasuró la región abdominal, se procedió a tranquilizar por vía intramuscular con 0.2 ml. de propionilpromazina 1% (Combelen). La anestesia general se indujo con 0.4 ml. de clorhidrato de ketamina (Anesket) por vía intramuscular. Se colocó al animal en decúbito dorsal y se procedió a la antisepsia del área quirúrgica con cloruro de benzalconio en concentración 1:100 colocándose los campos respectivos.

PRIMER TIEMPO: Incisión de la piel por la línea media, aproximadamente 2 cm. debajo del esternón; abarcando piel y línea alba. Una vez en cavidad abdominal se localizó el apéndice cecal, el cual se expuso sobre gasas humedecidas con solución salina fisiológica estéril (SSFE).

SEGUNDO TIEMPO: Se seleccionó el segmento de aproximadamente 3 cm. del saco ciego del órgano para la inoculación y se identificó la irrigación local para posteriormente proceder a la hemostasis de las ramas arteriales involucradas con sutura monocryl de 3-0.

TERCER TIEMPO: Una vez que fue ocluida la irrigación hacia el ciego y mantenida hacia el peritoneo, se realizó un corte transversal del órgano para seccionarlo en dos partes, una queda unida al ciego y la otra queda aislada como saco ciego, manteniendo la luz cerrada con ayuda de dos pinzas, una en ambos lados. Se cerró el lado cecal por medio de una sutura Conell-Cushing con monocryl 3-0, de acuerdo a la técnica descrita (Valdivia, 1995).

CUARTO TIEMPO: El paso siguiente fue abrir la pinza del lado del saco ciego del apéndice cecal y sosteniendo con otras pinzas se lavó utilizando una sonda y solución salina estéril hasta que el contenido del saco se obtuviera sin residuos y enseguida se procedió a la infiltración de 1 ml. (con jeringa estéril) del inóculo de la cepa correspondiente incubada 18 hrs antes, poniendo especial cuidado en este paso y retirando todo el material que pudo estar en contacto con el inóculo.

QUINTO TIEMPO: Se procedió al cierre de este muñón de igual forma que el anterior. Durante este tiempo, se procuró la hidratación constante del órgano expuesto, con SSFE a temperatura ambiente.

SEXTO TIEMPO: Por último se reincorporó el órgano a la cavidad abdominal y se procedió al cierre de la pared abdominal (peritoneo y músculo) por medio de una sutura de súrgete continuo anclado con sutura catgut crómico de 2-0 y de la piel con una sutura de Nylon de 2-0 con puntos separados; y finalmente, se le aplicó en la herida coumaphos 3%, propoxur 2% y prortalbin 5% (Negasunt).

3.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS:

Durante los siete días postoperatorios, se les instaló en jaulas con alimento y agua a libre acceso. Se les monitoreo antes y después de la cirugía por medio de la obtención periódica de aproximadamente 2 ml. de sangre por cada conejo, tomada de la vena yugular; de los cuales 1 ml. fue depositado en un tubo con anticoagulante venoject y 1 ml. en un tubo con gel activador de coagulo venoject. Las muestras sanguíneas fueron remitidas al laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET) para la realización de las siguientes pruebas:

- * Biometría Hemática
- * Determinación de Urea
- * Determinación de Creatinina

SACRIFICIO Y NECROPSIA:

A los animales que murieron antes de los 7 días se les practicó la necropsia para obtener el AC y bazo. A los animales que continuaron con vida después de éste periodo, se les practicó la eutanasia con cloroformo; y se obtuvieron los mismos órganos; los cuales fueron fijados con paraformaldehído al 4 % y fijador de Zenker.

4.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

HISTOPATOLOGÍA

Después de fijar el tejido, se realizaron cortes en zonas específicas de cada muestra y se colocaron en cápsulas para proceder a enjuagarlas y someterlas a un tren de deshidratación en alcoholes en concentraciones crecientes durante una hora en cada uno (OH 60°, OH 70°, OH 80°, OH 96°, Absoluto) hasta llegar a xilol (dos cambios) y por ultimo se infiltraron en parafina (Estrada,1982 y Gaete,1996).

Los cortes se realizaron en microtomo a 5 micras (µm) de grosor. A las muestras fijadas con paraformaldehído se les realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y la técnica de inmunoperoxidasa. Las muestras fijadas con Zenker, fueron teñidas con Verde rápido (Estrada,1982 y Gaete,1996).

5.- PRUEBAS EN SANGRE:

BIOMETRÍA HEMATICA

Se realizó la determinación de cuenta de eritrocitos, hemoglobina total, hematocrito, índices de Wintrobe, recuento de plaquetas, recuento de leucocitos y conteo diferencial de leucocitos; de acuerdo a la metodología rutinaria del laboratorio DIVET.

UREA SÉRICA

Se utilizó la metodología de Diacetil Monoxima (Bioxon) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- 1.- Diluir el suero 1:5
- 2.- Diluir estándar concentrado 1:5

	BLANCO	MUESTRA	ESTANDAR
REACTIVO DE COLOR	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
REACTIVO ÁCIDO	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
AGUA DESTILADA	20 µl	-----	-----
SUERO DILUIDO	-----	20 µl	-----
ESTANDAR DILUIDO	-----	-----	20 µl

- 3.- Mezclar y colocar en agua hirviendo durante 10 min.
- 4.- Cambiar a un recipiente de agua fría durante 3 min.
- 5.- Leer a 520 nanómetros ajustando a cero con el blanco.

CÁLCULO: Absorvancia de la muestra / Absorvancia del estándar x 80 = mg/ml de urea.

CREATININA SÉRICA

Se realizó mediante la determinación colorimétrica Folin-Wu.

FILTRADO:

- Muestra.....75 µl
- Acido Sulfúrico.....0.6 ml
- Tungstato de Sodio....75µl

Centrifugar 5 minutos y separar el sobrenadante.

	BLANCO	ESTANDAR	MUESTRA
Agua destilada	0.5 ml	0.45 ml	-----
Sobrenadante	-----	-----	0.5 ml
Estándar	-----	50 µl	-----
Hidróxido de sodio 1:4	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Ácido Pírico	100 µl	100 µl	100 µl

Mezclar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente y leer a 490 nanómetros ajustando a cero con el blanco.

CÁLCULO: Absorvancia de la muestra / Absorvancia estándar x 2 = mg/dl de creatinina.

6.- TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA:

Esta técnica se realizó en las laminillas obtenidas del apéndice cecal y bazo fijados en paraformaldehído. Las laminillas se sometieron a los pasos de desparafinación de rutina y se procedió a la técnica de Inmunoperoxidasa. Primero se delimitó cada muestra con un crayón de cera y se sumergieron las laminillas en una solución buffer tris (TBS) con pH 7.6 durante 5 minutos, pasado éste tiempo se incubó con unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 0.6 % en metanol al 80 % durante 7 minutos en cámara húmeda a 37°C para inhibir la peroxidasa endógena propia del tejido. Posteriormente se lavaron y se sumergieron en la misma solución de TBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se procedió a incubar durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C con suero normal de conejo a una dilución de 1:5. Pasado éste tiempo se decantó el suero restante, se lavó nuevamente con la solución de TBS pH 7.6, se le agregó a cada laminilla el anticuerpo monoclonal correspondiente anti-CD4, CD5, CD25 y CD43 de conejo (todos ellos de la marca Serotec), a una dilución 1:200 y se procedió a incubar nuevamente en cámara húmeda a 37°C durante 60 minutos. Se decantó y se lavó cada muestra con TBS para después agregar Inmunoglobulina anti-ratón biotinilada (DAKO) diluida 1:200 y se incubó durante 60 minutos en cámara húmeda a 37°C, transcurrido el tiempo se procedió al lavado acostumbrado y se agregó a las muestras el reactivo StreptABComplex/HRP preparado una hora antes como lo indica el instructivo (DAKO) y se incubó durante 45 minutos en cámara húmeda a 37°C enseguida se decantó y lavó nuevamente del mismo modo y se les colocó diaminobenzidina (DAB) diluida (una tableta de 10 mg en 12.5 ml de TRIS-Cl pH 7.5), incubándose por 5 minutos en las condiciones antes mencionadas. Finalmente se lavó con TBS pH 7.6 y se contrastó con hematoxilina de Harris por 10 segundos, se lavó el exceso de colorante con agua destilada y después con agua corriente. Se procedió a la deshidratación rutinaria pasando las laminillas por alcohol de 96°, absoluto y por xilol, se colocó resina sintética y por último el cubreobjetos.

7.- TINCIÓN VERDE RÁPIDO – PIRONINA “Y”

En ésta tinción se utilizaron los colorantes de verde rápido a una dilución 1:25 en alcohol de 96° y pironina “Y” a una concentración de 0.5 %. Los órganos utilizados en ésta técnica fueron la porción de AC y bazo fijados en Zenker.

Después de la desparafinación de rutina, se procedió a hidratar con agua destilada y se sumergieron las laminillas en una solución de lugol concentrado durante 15 minutos para eliminar los precipitados de mercurio que pudieron quedar en la fijación con Zenker, se enjuagó con agua destilada y se sumergieron nuevamente en tiosulfato de sodio (solución acuosa 2.5%) por 15 minutos, ésta vez para eliminar los precipitados de lugol. Se enjuagó nuevamente con agua destilada y se agregó el colorante pironina “Y” durante 30 minutos, enseguida se deshidrató por algunos segundos agregando acetona decantando rápidamente y enjuagando con metanol, posteriormente se dejó reposar con el colorante verde rápido durante 5 minutos y se enjuagó por

último con alcohol de 96°. Las laminillas se montaron de la manera acostumbrada con resina sintética y cubreobjetos (Estrada,1982; Gaete, 1996).

8.- TINCIÓN HEMATOXILINA EOSINA

La tinción de hematoxilina–eosina (H-E) se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por Estrada (1982) y Gaete (1996).

Para la observación al microscopio de las tres técnicas se tomaron en cuenta, en el caso del apéndice cecal; la vellosidad y nódulo (base, intermedio y punta para ambos casos) y en el caso del bazo se consideró en 2 regiones; pulpa blanca y pulpa roja.

Una vez procesadas las laminillas, ya sea por medio de la técnica de inmunoperoxidasa o por la tinción de Verde Rápido Pironina "Y", se procedió a un conteo manual de 5 campos por conejo por cada anticuerpo monoclonal (CD4, CD5, CD25, CD43), considerando el número de células totales en el campo, entre las cuales solamente se consideraron los linfocitos francamente marcados, de color ocre en el caso de la técnica de inmunoperoxidasa y de color rojo brillante en el caso de la tinción de Verde Rápido Pironina "Y" de acuerdo a las figura N° 3.

Para calcular los datos de Media, Desviación Estándar y Diferencias significativas entre los valores obtenidos de los conteos realizados de acuerdo a los diferentes marcadores utilizados en cada conejo inoculado se utilizó el programa "Statistica", el cual calcula de manera automática de acuerdo a la T de Student la diferencia significativa de los datos proporcionados.

Las imágenes presentadas (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6) fueron obtenidas por medio del programa analizador de imágenes Image-pro Plus.

RESULTADOS

Los datos que se muestran las gráficas 1,2 y 3 son los resultados más sobresalientes obtenidos mediante las pruebas de hematología y química sanguínea realizadas a los conejos inoculados con cada una de las cepas durante todo el experimento.

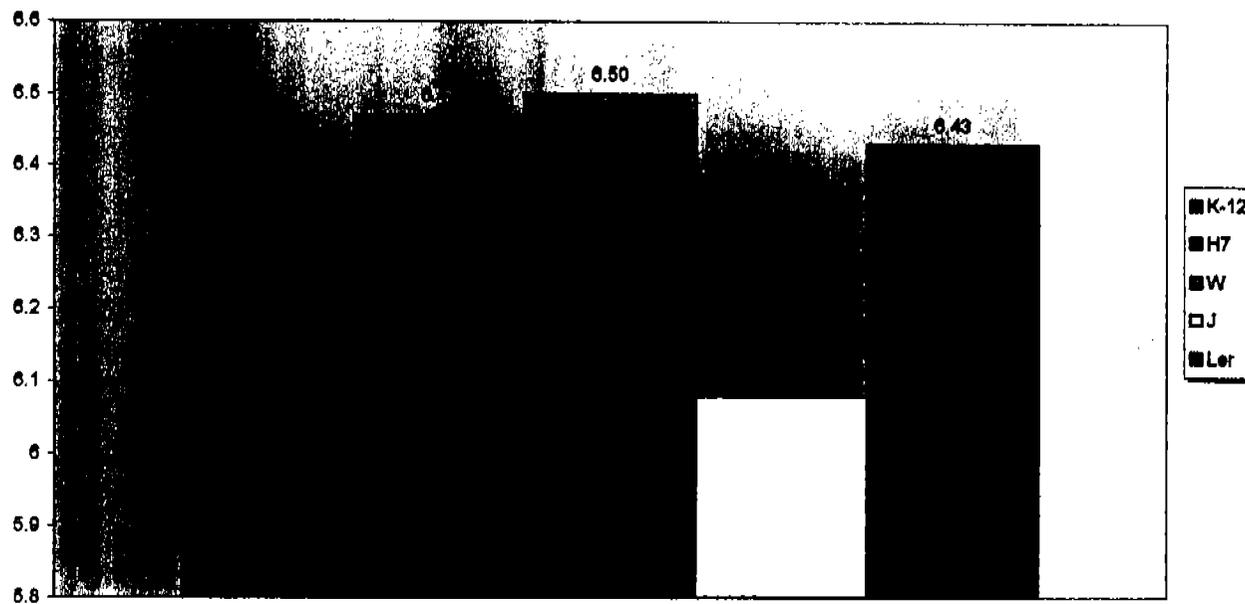
La tabla No.1 nos muestra los rangos de valores normales referentes a las pruebas realizadas en nuestro experimento.

CUADRO 3.- RANGOS NORMALES EN CONEJOS PARA LAS PRUEBAS DETERMINADAS EN EL LABORATORIO.

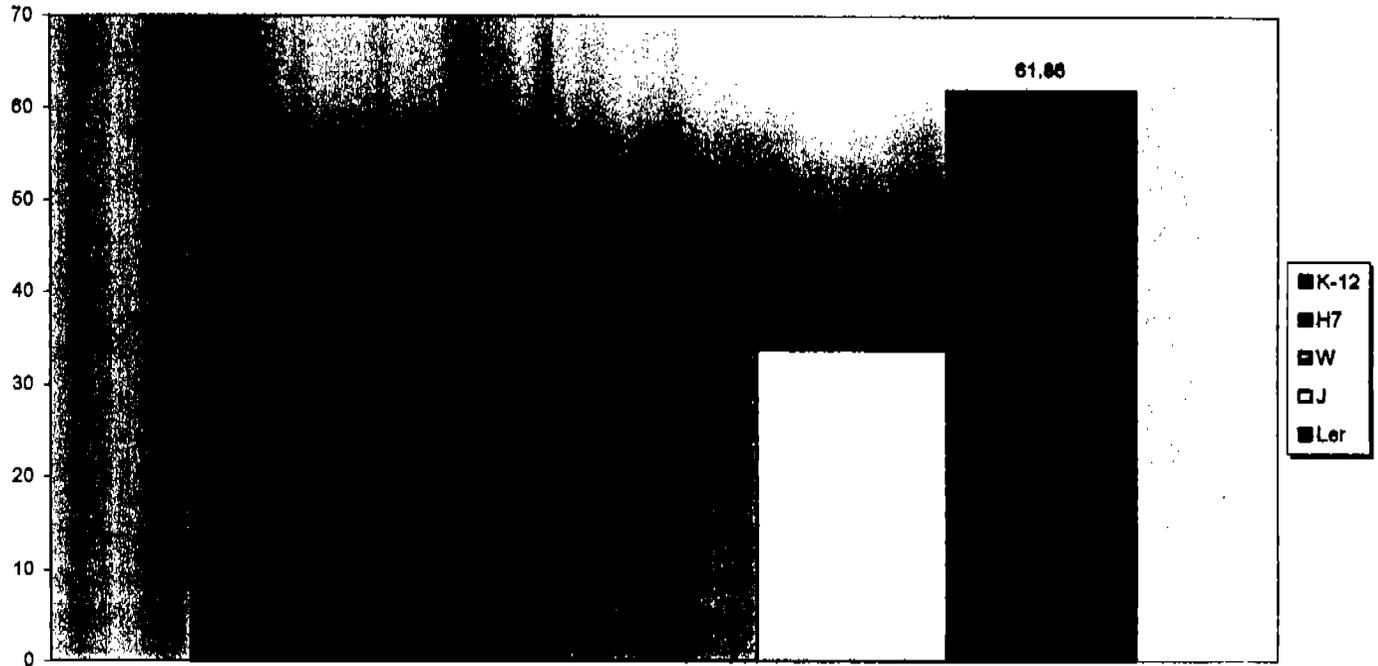
DETERMINACIÓN	RANGO NORMAL	UNIDADES
Eritrocitos	5.12 - 6.27	Millones/mm ³
Hematocrito	25.6 - 31.9	%
Plaquetas	225 - 598	Miles/mm ³
Urea	22.0 - 32.3	mg/dl
Creatinina	0.30 - 0.73	mg/dl

***Tomado de Valdívia, 2002.

GRÁFICA N° 1.- DETERMINACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS
*** LOS DATOS MOSTRADOS SON LA MEDIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE CADA CEPA



GRÁFICA N° 2.- DETERMINACIÓN DE UREA BÉRICA EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS
*** LOS DATOS MOSTRADOS SON LA MEDIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE CADA CEPA



GRÁFICA N°3.- DETERMINACIÓN DE CREATININA SÉRICA EN LOS CONEJOS INOCULADOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS
*** LOS DATOS MOSTRADOS SON LA MEDIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE CADA CEPA

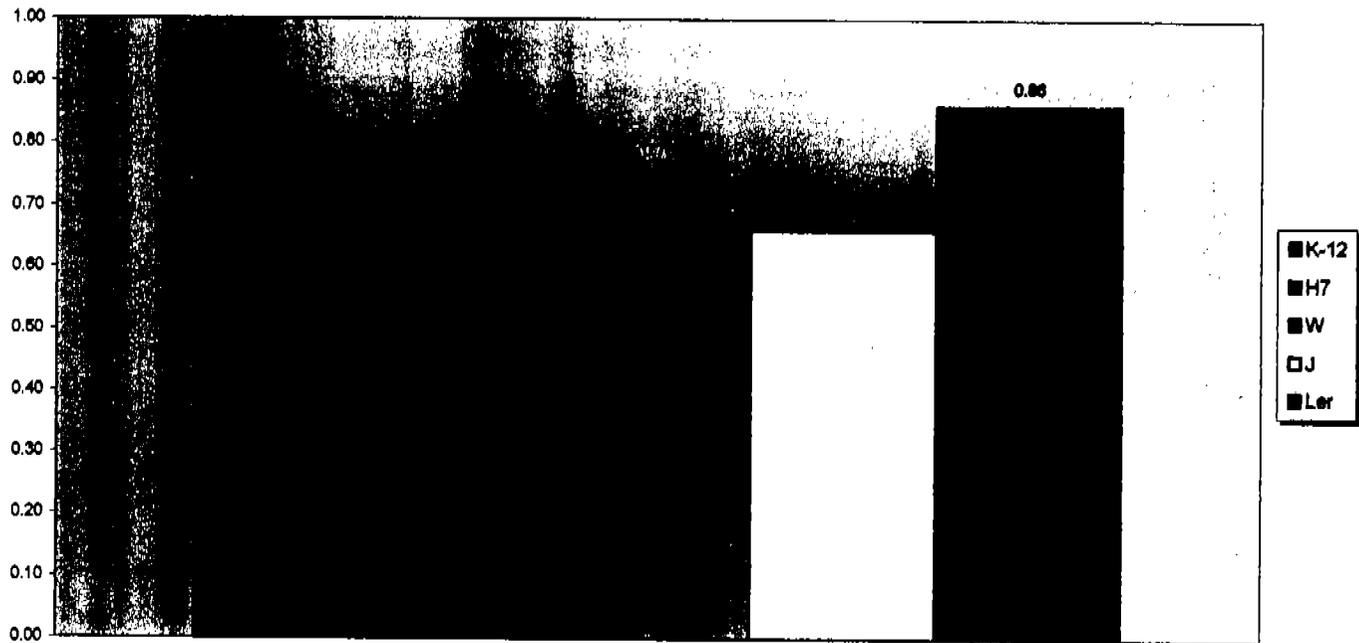
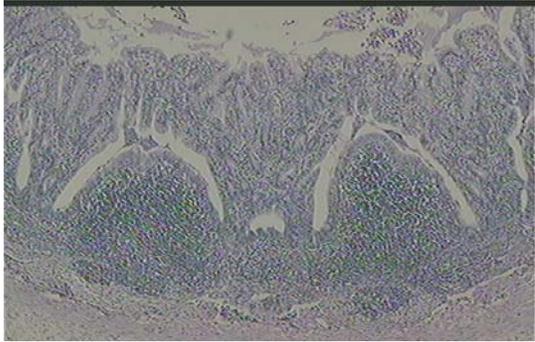


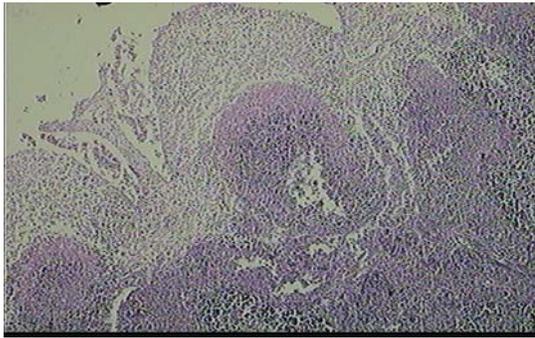
FIGURA 1.- Imágenes del Apéndice cecal de conejo inoculados con Caldo Soya Trypticaseína., las cepas K 12, EDL 933, 933 – Delta Ler, 933 – J y 933 – W.



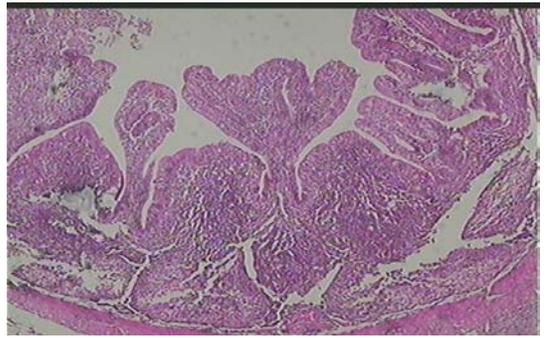
CST



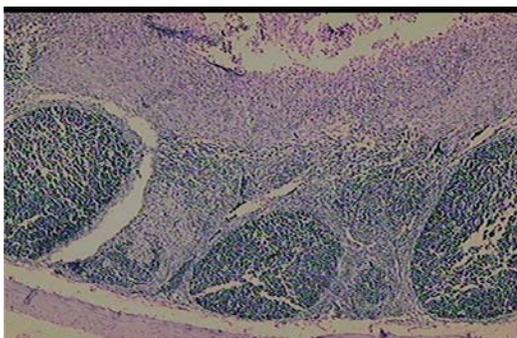
K 12



EDL 933



933 Δ Ler



933 J

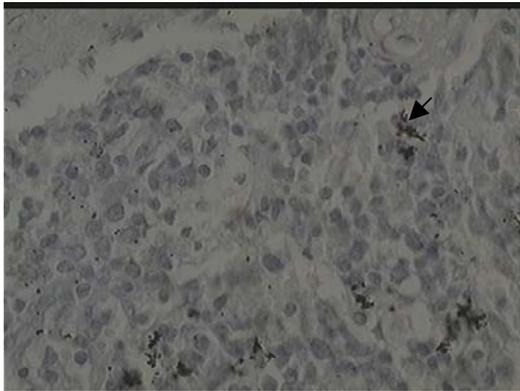


933 W

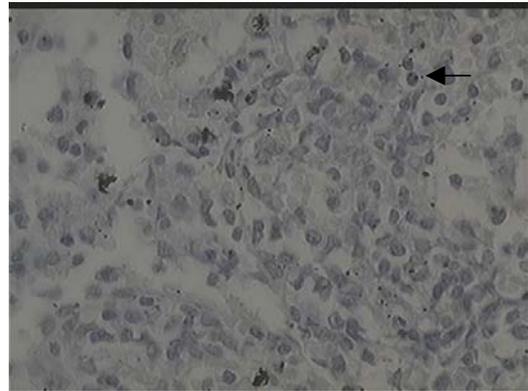
** Los órganos fueron fijados en paraformaldehído al 4%, incluidos en parafina y teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Estrada, 1982; Gaete, 1996).

** Las laminillas fueron observadas con el objetivo 40x.

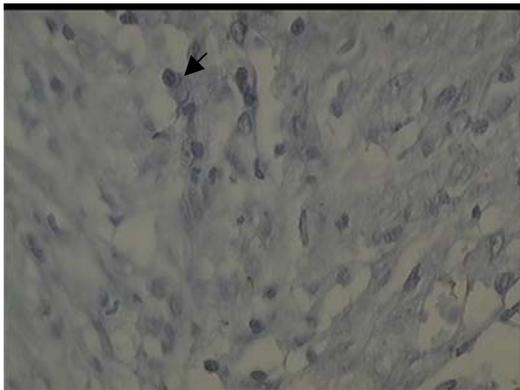
FIGURA 2 .- Imágenes demostrativas de la prueba de inmunoperoxidasa realizada con los marcadores CD 4 y CD 5 en cortes del apéndice cecal de conejo inoculados con CST, la cepa K 12 y EDL 933.



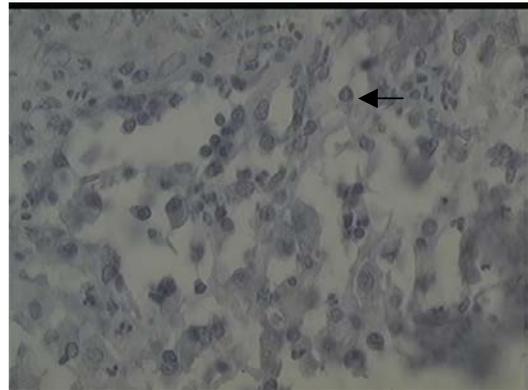
CST CD 4



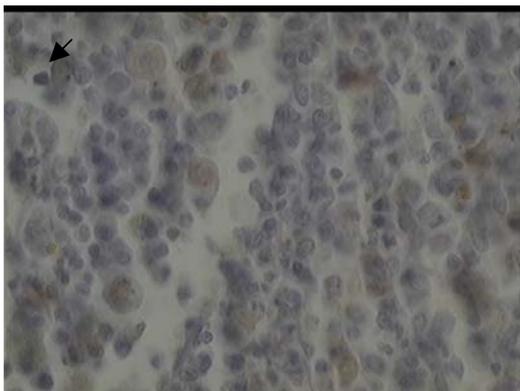
CST CD 5



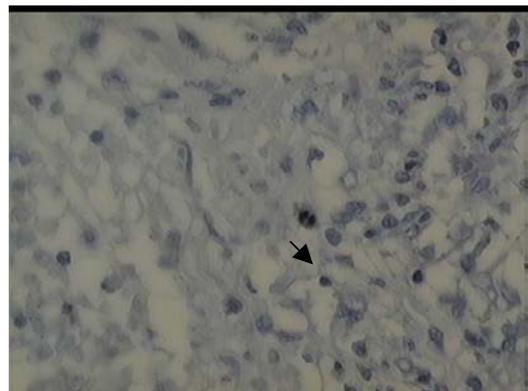
K 12 CD 4



K 12 CD 5



EDL 933 CD 4



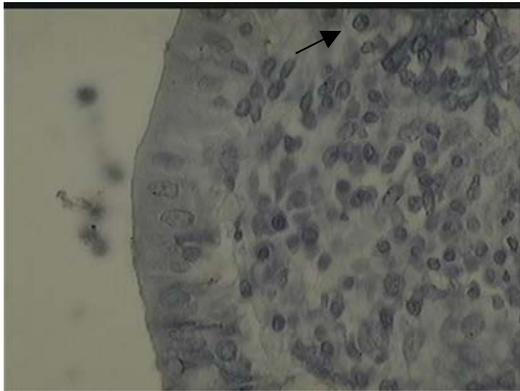
EDL 933 CD 5

* El apéndice cecal fue fijado con paraformaldehído al 4%, incluido en parafina y procesado por la técnica de inmunoperoxidasa como se mencionó con los correspondientes anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25 Y CD43 (DAKO). Se utilizó el objetivo 400x.

** La flecha indica las células positivas.

*** Las laminillas fueron observadas con el objetivo 100 x.

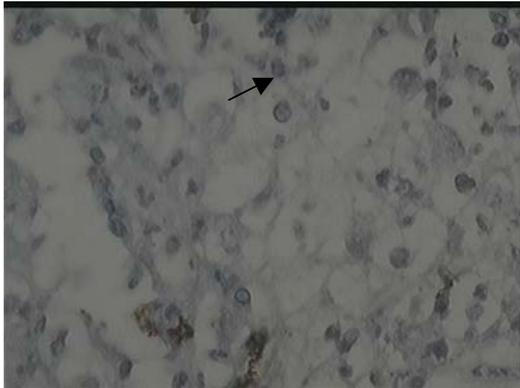
FIGURA 2 .- Imágenes demostrativas de la prueba de inmunoperoxidasa realizada con los marcadores CD 4 y CD 5 en cortes del apéndice cecal de conejo inoculados con la cepa 933-Δ Ler, 933-J y 933-W.



933 Δ Ler CD 4



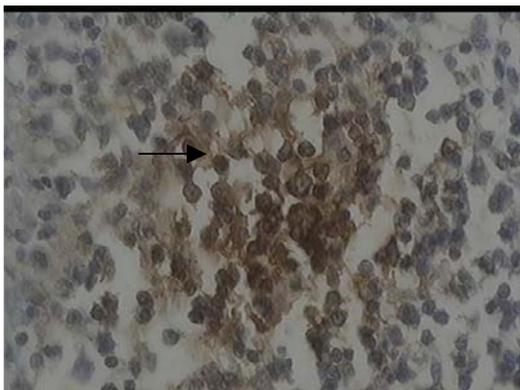
933 Δ Ler CD 5



933 - J CD 4



933 - J CD 5



933 - W CD 4



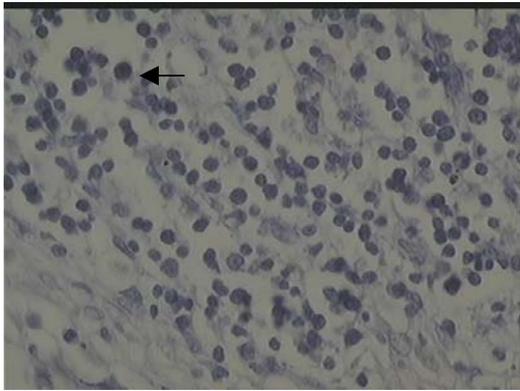
933 - W CD 5

* El apéndice cecal fue fijado con paraformaldehído al 4%, incluido en parafina y procesado por la técnica de inmunoperoxidasa como se mencionó con los correspondientes anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25 Y CD43 (DAKO). Se utilizó el objetivo 400x.

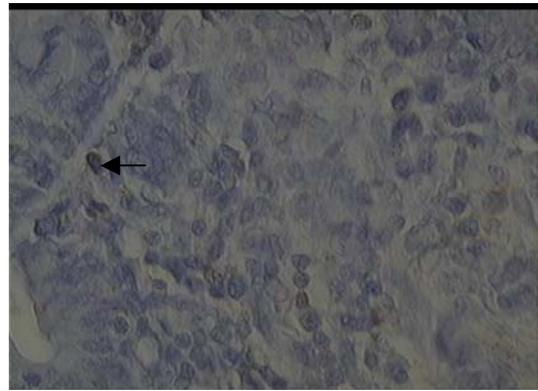
** La flecha indica las células positivas.

*** Las laminillas fueron observadas con el objetivo 100 x.

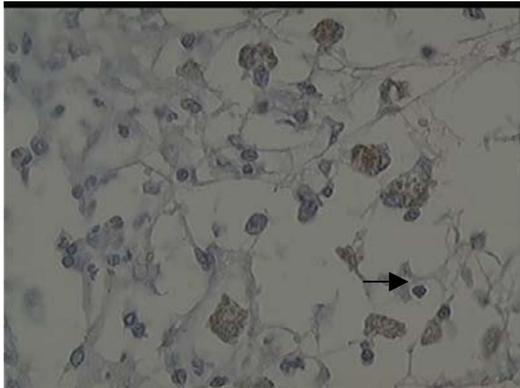
FIGURA 3 .- Imágenes demostrativas de la prueba de inmunoperoxidasa realizada con los marcadores CD 25 y CD 43 en cortes del apéndice cecal de conejo inoculados con CST, la cepa K 12 y EDL 933.



CST CD 25



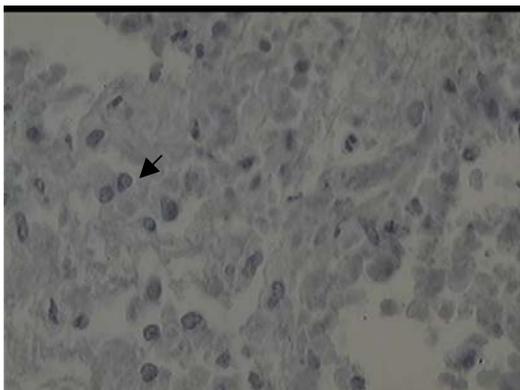
CST CD 43



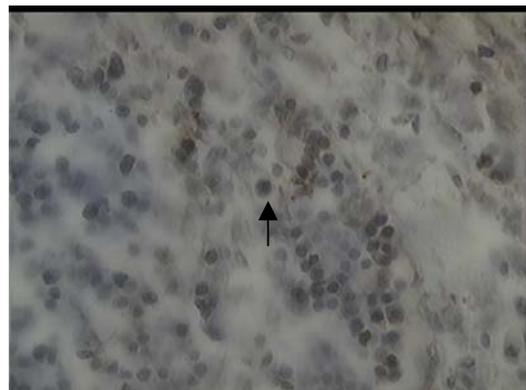
K 12 CD 25



K 12 CD 43



EDL 933 CD 25



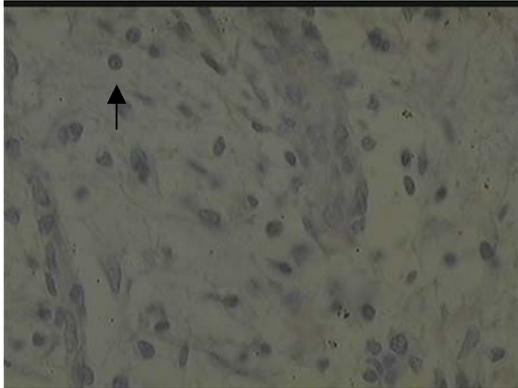
EDL 933 CD 43

* El apéndice cecal fue fijado con paraformaldehído al 4%, incluido en parafina y procesado por la técnica de inmunoperoxidasa como se mencionó con los correspondientes anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25 Y CD43 (DAKO). Se utilizó el objetivo 400x.

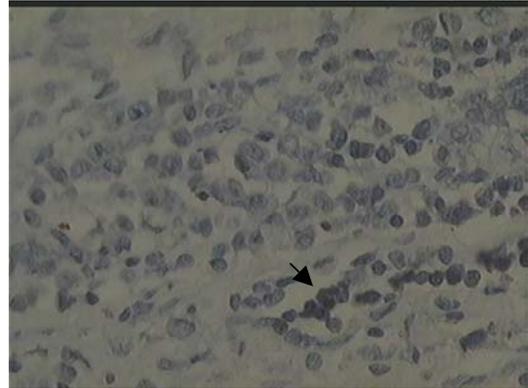
** La flecha indica las células positivas.

*** Las laminillas fueron observadas con el objetivo 100 x.

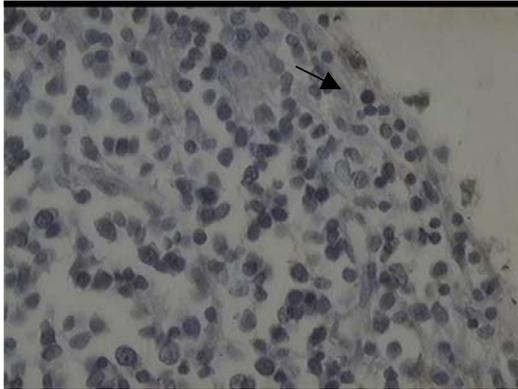
FIGURA 3 .- Imágenes demostrativas de la prueba de inmunoperoxidasa realizada con los marcadores CD 25 y CD 43 en cortes del apéndice cecal de conejo inoculado con la cepa 933-Δ Ler, 933-J y 933-W.



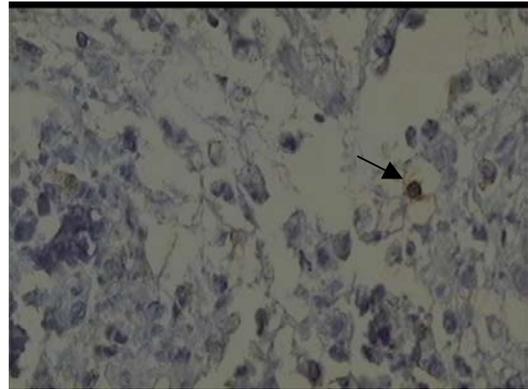
933 Δ Ler CD 25



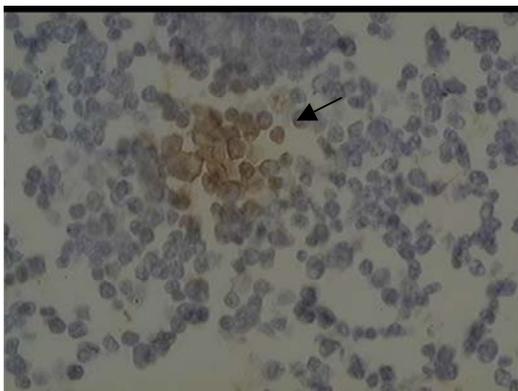
933 Δ Ler CD 43



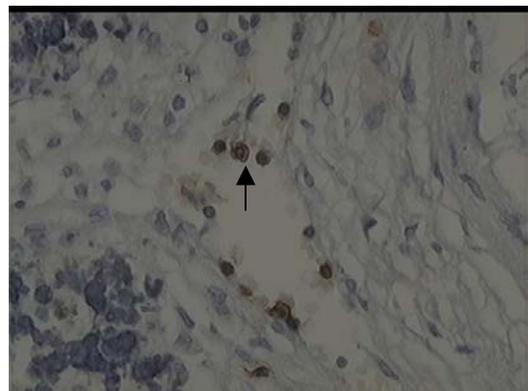
933 - J CD 25



933 - J CD 43



933 - W CD 25



933 - W CD 43

* El apéndice cecal fue fijado con paraformaldehído al 4%, incluido en parafina y procesado por la técnica de inmunoperoxidasa como se mencionó con los correspondientes anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25 Y CD43 (DAKO). Se utilizó el objetivo 400x.

** La flecha indica las células positivas.

*** Las laminillas fueron observadas con el objetivo 100 x.

Cuadro 4 -Conteo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos inoculados con Caldo Soya Trypticaseína.

CONTROL CST

ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 4	DOMO	Punta	28	11	18	14	46	42	41	46	38	50	55	39	35.7	14.5
		Intermedio	20	29	42	36	52	39	55	50	46	54	59	41	43.6	11.5
		Base	21	38	30	28	39	30	50	43	49	42	47	38	37.9	9.1
	VELLOSIDAD	Punta	3	17	12	23	39	27	40	20	20	18	19	28	22.2	10.4
		Intermedio	5	10	16	19	38	25	33	21	14	23	15	12	19.3	9.5
		Base	6	6	8	11	27	26	36	11	19	15	11	17	16.1	9.4
	BAZO	Pulpa blanca	24	41	39	42	13	20	15	22	10	7	11	14	21.5	12.6
		Pulpa roja	34	26	39	36	56	36	42	39	18	17	12	18	31.1	13.0
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 5	DOMO	Punta	17	26	26	13	39	40	31	68	27	30	41	49	33.9	14.8
		Intermedio	36	41	34	32	37	48	30	62	33	49	44	58	42.0	10.4
		Base	24	31	28	19	31	44	34	59	36	42	54	32	36.2	11.8
	VELLOSIDAD	Punta	13	10	13	7	29	25	33	31	31	16	39	16	21.9	10.6
		Intermedio	8	7	12	8	19	20	27	18	22	32	22	30	18.8	8.6
		Base	7	13	7	17	25	28	28	19	31	33	35	26	22.4	9.7
	BAZO	Pulpa blanca	16	32	33	39	31	24	20	27	15	20	13	10	23.3	9.1
		Pulpa roja	29	32	38	30	32	37	45	30	14	28	30	30	31.3	7.3
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 25	DOMO	Punta	29	17	30	17	46	76	74	47	33	55	38	41	41.9	19.2
		Intermedio	31	23	28	36	38	50	60	50	43	63	28	39	40.8	12.8
		Base	33	28	34	38	49	64	70	48	28	51	45	38	43.8	13.4
	VELLOSIDAD	Punta	17	16	12	14	37	38	36	40	19	25	27	32	26.1	10.3
		Intermedio	9	15	13	24	27	23	31	38	20	20	18	29	22.3	8.2
		Base	24	19	26	41	28	28	30	26	31	33	16	29	27.6	6.4
	BAZO	Pulpa blanca	18	26	27	28	18	24	30	29	13	12	26	19	22.5	6.2
		Pulpa roja	46	38	39	34	37	31	40	30	14	15	16	18	29.8	11.2
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 43	DOMO	Punta	25	17	25	18	36	35	39	33	52	37	30	39	32.2	9.9
		Intermedio	30	27	36	30	40	30	43	50	65	49	45	52	41.4	11.5
		Base	38	23	41	28	38	33	40	54	30	29	38	44	36.3	8.3
	VELLOSIDAD	Punta	17	10	11	18	22	29	33	26	17	26	27	21	21.4	7.1
		Intermedio	16	7	13	11	27	17	20	29	28	34	21	17	20.0	8.1
		Base	16	27	12	13	24	26	22	32	30	33	27	31	24.4	7.3
	BAZO	Pulpa blanca	27	24	21	26	32	30	35	26	33	30	27	33	28.7	4.2
		Pulpa roja	35	27	21	35	59	58	63	53	50	44	39	28	42.7	13.9

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta tres campos de observación por región y por conejo.

CEPA K-12 C600

	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 4	DOMO	Punta	27	29	32	28	17	17	15	17	22	34	30	21	24.1	6.7
		Intermedio	25	66	32	43	33	30	28	29	60	55	36	41	39.8	13.6
		Base	36	55	39	26	25	26	36	26	48	45	40	35	36.4	9.7
	VELLOSIDAD	Punta	32	38	31	37	4	8	12	11	32	31	34	31	25.1	12.4
		Intermedio	19	20	16	16	10	11	14	10	22	41	27	24	19.2	8.8
	BAZO	Base	10	17	16	15	11	13	11	13	27	34	34	23	18.7	8.7
		Pulpa blanca	13	25	30	25	36	27	20	30	48	36	46	46	31.8	10.9
		Pulpa roja	19	11	27	28	44	28	31	41	41	40	50	54	34.5	12.7
CD 5	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
	DOMO	Punta	30	31	31	26	20	22	26	12	39	40	37	32	28.8	8.2
		Intermedio	8	34	49	33	31	36	20	33	44	58	47	58	37.6	14.7
		Base	37	23	45	43	32	38	43	38	58	48	52	69	43.8	12.1
	VELLOSIDAD	Punta	42	39	40	42	12	13	9	10	50	31	26	52	30.5	16.0
		Intermedio	21	21	21	30	20	11	20	15	25	35	22	29	22.5	6.5
	BAZO	Base	19	21	34	20	13	19	16	18	64	36	25	28	26.1	13.8
		Pulpa blanca	37	54	26	42	27	38	39	32	40	49	46	47	39.8	8.6
			Pulpa roja	39	31	37	30	46	45	39	55	41	43	49	38	41.1
CD 25	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
	DOMO	Punta	34	38	25	46	22	32	16	16	20	28	14	15	25.5	10.3
		Intermedio	47	45	54	37	11	36	21	33	55	40	41	23	36.9	13.3
		Base	51	46	44	58	26	48	30	25	38	53	29	50	41.5	11.5
	VELLOSIDAD	Punta	23	15	26	29	8	12	16	14	24	28	34	28	21.4	8.1
		Intermedio	21	27	18	13	11	10	11	13	28	20	21	23	18.0	6.3
	BAZO	Base	16	24	30	30	10	11	16	18	33	42	23	34	23.9	10.0
		Pulpa blanca	22	27	27	25	36	41	33	29	36	41	42	40	33.3	7.1
		Pulpa roja	25	36	48	46	37	38	42	55	37	53	59	52	44.0	9.9
CD 43	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
	DOMO	Punta	35	22	29	41	12	18	27	17	30	42	37	32	28.5	9.7
		Intermedio	38	60	58	35	43	25	23	22	69	70	40	46	44.1	17.0
		Base	26	53	49	34	47	20	43	32	49	52	57	49	42.6	11.8
	VELLOSIDAD	Punta	20	40	33	41	8	13	11	23	21	22	28	25	23.8	10.5
		Intermedio	15	29	28	28	14	12	13	25	19	17	18	15	19.4	6.3
	BAZO	Base	20	51	18	29	10	24	15	38	27	18	29	37	26.3	11.5
Pulpa blanca		32	39	40	44	33	23	42	35	46	47	56	50	40.6	9.0	
		Pulpa roja	53	52	52	57	60	47	58	63	35	54	41	55	52.3	7.9

* X se refiere a la media y S a la desviación estándar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta cuatro campos de observación por región y por conejo.

Cuadro 6 -Conteo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos inoculados con la cepa 933-FM

CEPA 933 - FM

ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 4	DOMO	Punta	14	18	16	14	23	21	26	20	38	24	19	21	21.2	6.5
		Intermedio	25	18	26	30	60	58	49	40	25	33	22	25	34.3	14.3
		Base	37	38	33	42	42	39	38	29	39	31	33	35	36.3	4.2
	VELLOSIDAD	Punta	18	11	26	19	29	15	30	27	12	19	15	17	19.8	6.6
		Intermedio	17	22	33	21	25	19	36	28	11	16	13	38	23.3	8.9
		Base	25	17	22	16	21	19	18	31	9	13	20	31	20.2	6.5
	BAZO	Pulpa blanca	24	14	11	12	26	24	17	54	33	37	30	32	26.2	12.3
		Pulpa roja	22	21	30	43	29	39	30	41	22	23	27	26	29.4	7.7
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 5	DOMO	Punta	18	36	27	44	29	22	25	29	18	23	21	34	27.2	7.8
		Intermedio	34	16	39	16	31	58	59	48	25	21	38	36	35.1	14.6
		Base	47	43	40	49	40	50	33	38	26	46	54	40	42.2	7.8
	VELLOSIDAD	Punta	21	15	20	16	13	20	13	19	34	31	21	34	21.4	7.6
		Intermedio	25	23	36	22	23	22	28	25	22	23	37	19	25.4	5.6
		Base	14	14	24	22	28	23	33	18	28	15	38	23	23.3	7.5
	BAZO	Pulpa blanca	19	27	21	23	29	19	31	33	39	37	29	27	27.8	6.6
		Pulpa roja	41	30	39	28	37	20	32	32	33	41	37	36	33.8	6.0
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 25	DOMO	Punta	27	34	53	34	14	28	27	27	14	28	23	23	27.7	10.2
		Intermedio	26	31	31	28	42	39	37	30	42	38	24	30	33.2	6.2
		Base	36	39	47	41	35	38	43	31	45	31	44	48	39.8	5.8
	VELLOSIDAD	Punta	28	25	28	36	23	20	17	10	27	23	24	17	23.2	6.7
		Intermedio	39	38	36	26	20	17	14	19	20	33	12	23	24.8	9.5
		Base	30	19	29	17	19	19	17	18	9	18	17	18	19.2	5.5
	BAZO	Pulpa blanca	32	33	26	54	17	23	22	16	22	24	26	21	26.3	10.1
		Pulpa roja	51	59	47	41	21	13	34	27	29	27	17	18	32.0	14.7
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 43	DOMO	Punta	39	34	34	36	43	20	23	22	6	12	25	23	26.4	11.1
		Intermedio	45	26	24	35	62	35	57	45	26	23	57	47	40.2	14.0
		Base	43	58	50	48	33	36	36	44	34	47	25	32	40.5	9.4
	VELLOSIDAD	Punta	21	21	22	22	23	15	29	12	14	17	11	15	18.5	5.3
		Intermedio	37	30	20	29	33	22	25	23	18	21	13	31	25.2	7.0
		Base	18	15	19	21	20	26	24	30	20	32	13	27	22.1	5.8
	BAZO	Pulpa blanca	21	36	25	38	14	29	32	46	41	26	46	34	32.3	9.8
		Pulpa roja	32	43	39	49	44	31	41	38	33	43	40	60	41.1	8.0

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta tres campos de observación por región y por conejo.

Cuadro 7 -Conteo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos inoculados con la cepa 933-IBT

CEPA 933 - IBT

ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 4	DOMO	Punta	17	44	24	38	34	31	23	34	38	32	35	25	31.3	7.7
		Intermedio	19	35	18	35	45	27	42	39	18	18	17	20	27.8	10.7
		Base	23	55	34	26	56	49	51	55	37	29	24	67	42.2	15.0
	VELLOSIDAD	Punta	20	33	24	62	30	34	32	31	47	24	18	17	31.0	12.8
		Intermedio	22	24	18	27	25	24	24	33	43	22	20	21	25.3	6.8
		Base	51	20	29	36	32	25	33	30	45	12	52	13	31.5	13.2
	BAZO	Pulpa blanca	49	28	30	34	43	55	52	58	3	15	20	10	33.1	18.5
		Pulpa roja	39	54	57	56	58	37	50	46	4	2	8	9	35.0	22.6
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 5	DOMO	Punta	38	57	33	47	12	23	7	23	27	23	18	37	28.8	14.4
		Intermedio	54	33	39	40	19	12	22	27	26	39	23	35	30.8	11.5
		Base	40	38	56	47	32	20	19	30	39	38	30	29	34.8	10.5
	VELLOSIDAD	Punta	50	47	49	36	22	38	56	40	18	34	32	25	37.3	11.9
		Intermedio	41	41	40	33	45	37	41	43	20	26	18	24	34.1	9.6
		Base	34	36	61	42	15	26	31	18	12	21	22	15	27.8	14.1
	BAZO	Pulpa blanca	50	36	51	55	10	1	6	4	71	28	39	37	32.3	22.9
		Pulpa roja	56	43	46	45	3	0	1	1	41	36	35	29	28.0	20.8
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 25	DOMO	Punta	45	19	32	28	19	10	17	20	40	48	37	16	27.6	12.6
		Intermedio	34	31	28	45	40	17	25	12	23	22	10	19	25.5	10.7
		Base	52	55	36	57	29	15	24	41	23	37	25	20	34.5	14.3
	VELLOSIDAD	Punta	37	25	27	23	19	34	26	44	26	16	18	21	26.3	8.3
		Intermedio	37	28	22	20	15	35	26	27	24	28	12	32	25.5	7.5
		Base	42	24	25	27	14	12	23	38	29	9	17	18	23.2	10.0
	BAZO	Pulpa blanca	37	36	37	39	5	9	11	3	25	47	30	45	27.0	16.0
		Pulpa roja	63	58	54	70	7	2	0	9	24	53	50	45	36.3	26.0
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 43	DOMO	Punta	37	42	46	45	17	28	33	15	34	24	41	18	31.7	11.1
		Intermedio	45	54	28	38	42	16	36	24	14	16	20	25	29.8	13.0
		Base	50	49	51	38	37	45	39	41	39	38	34	40	41.8	5.6
	VELLOSIDAD	Punta	40	31	42	38	28	56	25	49	26	25	30	26	34.7	10.3
		Intermedio	44	42	33	40	38	20	30	35	18	8	16	26	29.2	11.6
		Base	37	44	48	48	28	24	20	38	19	18	18	13	29.6	12.8
	BAZO	Pulpa blanca	35	46	47	24	9	19	13	7	53	37	41	54	32.1	17.1
		Pulpa roja	48	47	65	32	19	12	20	53	59	48	65	62	44.2	18.9

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta tres campos de observación por región y por conejo.

CEPA 933 "W"

	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**												X*	S*
CD 4	DOMO	Punta	19	8	12	13	14	8	9	18	13	23	15	29	15.1	6.3
		Intermedio	6	13	8	15	8	10	12	9	8	14	32	10	12.1	6.8
		Base	12	10	30	0	20	19	36	31	5	4	6	12	15.4	11.8
	VELLOSIDAD	Punta	8	6	7	14	3	2	10	4	10	21	20	7	9.3	6.2
		Intermedio	10	5	12	12	4	5	1	3	4	11	6	11	7.0	3.9
		Base	10	2	9	4	8	5	4	5	5	3	4	9	5.7	2.6
	BAZO	Pulpa blanca	5	12	25	11	1	7	3	4	6	3	7	6	7.5	6.4
		Pulpa roja	33	25	4	6	0	1	0	0	3	0	1	0	6.1	11.0
	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**												X*	S*
CD 5	DOMO	Punta	7	7	5	4	9	26	52	13	26	27	22	12	17.5	13.9
		Intermedio	10	25	6	8	18	20	8	9	25	20	21	21	15.9	7.1
		Base	9	39	15	33	26	7	15	12	7	15	18	16	17.7	10.1
	VELLOSIDAD	Punta	8	6	1	6	5	4	1	3	15	9	30	24	9.3	9.2
		Intermedio	10	4	5	3	3	10	4	3	5	3	12	10	6.0	3.4
		Base	6	4	16	7	7	28	19	12	5	4	5	12	10.4	7.4
	BAZO	Pulpa blanca	9	6	13	7	8	2	3	3	7	19	25	24	10.5	8.0
		Pulpa roja	17	19	33	15	2	0	1	0	5	0	8	0	8.3	10.6
	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**												X*	S*
CD 25	DOMO	Punta	7	29	23	30	27	23	12	18	20	24	21	30	22.0	7.1
		Intermedio	48	23	26	24	16	15	11	27	21	23	12	21	22.3	9.7
		Base	24	27	30	32	14	8	19	25	19	13	9	14	19.5	8.1
	VELLOSIDAD	Punta	3	1	4	9	13	8	10	12	33	17	12	21	11.9	8.8
		Intermedio	13	15	11	3	14	9	4	5	13	16	10	14	10.6	4.5
		Base	5	9	6	9	18	10	22	24	6	9	11	7	11.3	6.4
	BAZO	Pulpa blanca	30	45	9	21	17	14	12	5	5	12	12	5	15.6	11.8
		Pulpa roja	31	4	17	29	40	37	33	56	0	21	7	8	23.6	17.0
	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVOS (%)**												X*	S*
CD 43	DOMO	Punta	12	8	14	15	12	48	45	12	36	40	38	26	25.5	15.0
		Intermedio	16	32	2	15	27	38	10	18	21	23	32	16	20.8	10.2
		Base	22	12	14	12	10	9	17	18	22	15	11	17	14.9	4.4
	VELLOSIDAD	Punta	12	8	7	6	23	16	7	5	11	23	36	16	14.2	9.3
		Intermedio	17	7	10	15	15	9	8	6	14	15	20	22	13.2	5.2
		Base	16	5	7	9	23	15	22	36	9	13	14	21	15.8	8.7
	BAZO	Pulpa blanca	13	11	9	6	50	38	47	32	13	13	12	20	22.0	15.5
		Pulpa roja	48	53	35	22	15	9	18	39	7	1	22	3	22.7	17.5

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta cuatro campos de observación por región y por conejo.

Cuadro 9 -Conteo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos inoculados con la cepa J

CEPA "J"

ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**										X*	S*		
CD 4	DOMO	Punta	28	33	36	38	18	24	29	23	21	39	22	18	27.4	7.6
		Intermedio	29	27	62	30	64	22	21	39	29	31	40	31	35.4	14.0
		Base	23	28	46	35	50	31	33	38	28	28	32	38	34.2	7.8
	VELLOSIDAD	Punta	28	20	31	20	14	18	15	15	14	16	22	9	18.5	6.2
		Intermedio	21	17	22	17	20	16	20	24	19	13	15	13	18.1	3.5
		Base	17	22	27	33	9	17	25	12	15	22	21	13	19.4	6.9
	BAZO	Pulpa blanca	15	35	27	37	31	37	30	46	40	23	33	31	32.1	8.1
		Pulpa roja	37	43	30	28	35	37	40	40	57	41	31	41	38.3	7.6
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**										X*	S*		
CD 5	DOMO	Punta	24	15	44	25	29	23	31	39	41	24	36	41	31.0	9.1
		Intermedio	34	30	31	32	30	53	52	42	47	33	49	35	39.0	9.0
		Base	30	41	31	34	56	50	54	37	34	30	37	26	38.3	9.9
	VELLOSIDAD	Punta	14	21	16	24	17	21	10	37	27	25	24	25	21.8	7.0
		Intermedio	9	10	17	11	12	16	14	24	27	14	21	10	15.4	5.9
		Base	16	8	16	9	50	16	17	29	17	21	20	15	19.5	11.0
	BAZO	Pulpa blanca	32	50	29	44	30	39	34	45	19	20	24	17	31.9	10.9
		Pulpa roja	36	34	45	40	31	40	21	44	20	32	30	33	33.8	7.9
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**										X*	S*		
CD 25	DOMO	Punta	28	8	26	26	16	19	23	23	41	44	34	31	26.6	10.1
		Intermedio	23	21	45	22	25	27	22	23	25	21	28	29	25.9	6.6
		Base	14	26	38	34	27	21	35	60	26	22	38	24	30.4	11.9
	VELLOSIDAD	Punta	21	22	19	22	14	19	14	18	20	17	12	19	18.1	3.3
		Intermedio	13	21	10	12	11	21	16	20	15	11	13	11	14.5	4.1
		Base	24	13	18	14	15	16	31	18	25	16	16	12	18.2	5.7
	BAZO	Pulpa blanca	35	36	54	36	35	41	47	34	28	27	31	34	36.5	7.7
		Pulpa roja	19	9	16	36	41	33	53	42	36	40	47	39	34.3	13.1
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**										X*	S*		
CD 43	DOMO	Punta	28	12	17	19	23	19	22	28	28	49	34	34	26.1	9.9
		Intermedio	24	26	24	28	27	17	36	37	35	51	27	34	30.5	8.8
		Base	40	29	16	27	40	47	61	37	33	39	32	31	36.0	11.2
	VELLOSIDAD	Punta	20	31	17	21	10	14	14	9	14	27	24	26	18.9	7.1
		Intermedio	10	21	14	10	15	14	16	21	10	15	20	8	14.5	4.5
		Base	13	10	13	8	13	18	16	19	39	21	26	15	17.6	8.3
	BAZO	Pulpa blanca	24	22	21	23	34	38	27	39	43	43	33	30	31.4	8.1
		Pulpa roja	42	20	23	30	63	62	78	71	27	42	36	42	44.7	19.4

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta tres campos de observación por región y por conejo.

Cuadro 10 -Conteo de linfocitos en el apéndice cecal y bazo de conejos inoculados con la cepa Δ Ler**CEPA ΔLer**

ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 4	DOMO	Punta	19	24	21	31	40	38	32	37	22	52	20	27	30.3	10.1
		Intermedio	24	16	38	20	33	53	42	44	24	25	27	48	32.8	12.0
		Base	62	25	37	42	37	21	65	42	29	33	47	36	39.7	13.3
	VELLOSIDAD	Punta	17	20	19	13	27	27	35	26	31	24	28	22	24.1	6.2
		Intermedio	25	31	31	23	31	35	34	48	15	17	33	21	28.7	9.1
		Base	13	23	26	25	23	41	27	48	19	18	19	25	25.6	9.8
	BAZO	Pulpa blanca	30	18	28	20	53	41	42	33	34	38	36	25	33.2	9.9
		Pulpa roja	21	28	24	32	50	19	49	51	19	34	23	41	32.6	12.3
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 5	DOMO	Punta	17	11	14	16	25	29	29	21	38	34	39	40	26.1	10.3
		Intermedio	12	37	33	23	64	40	47	73	34	31	29	32	37.9	16.8
		Base	27	50	32	48	25	34	30	26	37	30	41	46	35.5	8.8
	VELLOSIDAD	Punta	18	12	16	8	41	34	33	33	22	16	21	13	22.3	10.5
		Intermedio	18	14	17	15	30	48	47	46	20	14	17	25	25.9	13.5
		Base	13	12	9	14	34	24	33	43	17	16	13	14	20.2	10.8
	BAZO	Pulpa blanca	39	24	33	33	38	32	46	39	33	23	38	40	34.8	6.6
		Pulpa roja	44	42	51	57	48	45	50	51	39	31	41	37	44.7	7.2
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 25	DOMO	Punta	50	36	53	24	37	39	31	22	32	21	23	30	33.2	10.5
		Intermedio	40	26	25	26	60	43	36	26	39	29	23	47	35.0	11.3
		Base	45	49	50	52	33	32	40	35	30	28	25	50	39.1	9.8
	VELLOSIDAD	Punta	23	20	24	35	27	20	27	24	13	9	38	17	23.1	8.3
		Intermedio	14	39	20	43	25	26	21	31	15	13	40	21	25.7	10.4
		Base	23	20	14	22	29	27	35	38	16	17	21	11	22.8	8.2
	BAZO	Pulpa blanca	37	33	28	31	40	37	41	40	39	35	33	37	35.9	4.0
		Pulpa roja	62	38	47	63	49	42	58	40	20	23	17	21	40.0	16.7
ESTRUCTURA		REGIÓN	POSITIVOS (%)**											X*	S*	
CD 43	DOMO	Punta	28	17	20	33	27	27	32	29	34	32	35	30	28.7	5.5
		Intermedio	37	40	29	43	33	32	60	51	41	39	36	35	39.7	8.6
		Base	41	38	42	48	38	43	45	34	36	37	40	40	40.2	4.0
	VELLOSIDAD	Punta	15	14	24	23	28	31	29	27	34	38	31	30	27.0	7.1
		Intermedio	27	15	32	27	21	36	28	21	47	30	36	27	28.9	8.4
		Base	26	27	20	28	19	25	20	21	39	29	46	30	27.5	8.1
	BAZO	Pulpa blanca	27	16	29	31	41	45	47	48	30	36	40	32	35.2	9.5
		Pulpa roja	58	40	37	38	48	33	38	56	33	37	39	30	40.6	8.9

* X se refiere a la media y S a la desviación estandar.

** Para los datos obtenidos se tomaron en cuenta tres campos de observación por región y por conejo.

Cuadro 11.- Proporción de células plasmáticas en el apéndice cecal y bazo en los conejos inoculados con las diferentes cepas de *Escherichia coli*.

CÉLULAS PLASMÁTICAS

	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVAS (%)															X	S
K-12 C 600	DOMO	Punta	2	6	8	7	2	4	3	1	2	1	4	0	1	0	5	3.1	2.4
		Intermedio	2	4	3	8	9	2	1	1	4	6	5	2	3	1	2	3.5	2.4
		Base	2	0	8	4	9	9	4	0	2	5	0	2	1	3	1	3.3	3.0
	VELLOSIDAD	Punta	7	8	4	1	2	3	2	11	0	5	3	2	7	9	10	4.9	3.4
		Intermedio	0	4	4	5	1	1	0	0	2	2	2	1	1	1	2	1.7	1.5
		Base	0	2	4	5	0	0	3	9	8	7	1	1	1	1	1	2.9	2.9
	BAZO	Pulpa blanca	0	1	3	1	1	3	1	7	1	1	3	4	5	2	6	2.6	2.0
		Pulpa roja	7	2	2	0	8	5	0	4	3	0	2	2	2	1	3	2.7	2.3
	933 " J "	DOMO	Punta	4	3	0	1	2	2	4	5	6	1	1	1	1	1	0	2.1
Intermedio			0	2	5	5	0	3	2	2	1	0	1	3	0	4	0	1.9	1.7
Base			1	1	1	0	1	2	0	0	2	1	0	2	0	2	0	0.9	0.8
VELLOSIDAD		Punta	1	2	3	0	1	2	2	0	3	4	0	0	5	1	1	1.7	1.5
		Intermedio	2	0	3	1	4	0	1	2	0	1	3	1	0	4	1	1.5	1.4
		Base	2	2	1	0	2	2	1	0	5	1	1	3	0	1	0	1.4	1.3
BAZO		Pulpa blanca	5	0	3	1	2	0	1	2	1	1	2	1	0	2	1	1.5	1.3
		Pulpa roja	0	2	1	3	0	3	1	1	4	0	0	6	0	1	1	1.5	1.7
933 " W "		DOMO	Punta	0	4	5	2	2	1	6	9	7	1	5	4	8	9	0	4.2
	Intermedio		1	2	5	3	3	7	9	11	4	5	4	9	2	1	0	4.4	3.2
	Base		4	5	5	6	9	7	5	2	3	5	2	1	0	1	3	3.9	2.4
	VELLOSIDAD	Punta	4	5	5	1	0	9	0	7	0	4	3	1	2	6	2	3.3	2.7
		Intermedio	2	2	0	3	1	3	2	9	5	0	5	7	8	9	4	4.0	3.0
		Base	1	1	2	3	5	8	10	0	4	9	6	2	1	3	3	3.9	3.0
	BAZO	Pulpa blanca	5	2	3	2	0	1	4	0	5	6	9	5	2	3	0	3.1	2.5
		Pulpa roja	5	0	0	2	0	4	0	1	3	0	0	5	0	2	1	1.5	1.8
	EDL 933 ΔLer	DOMO	Punta	1	0	5	2	0	1	4	1	0	3	0	2	1	8	1	1.9
Intermedio			7	1	5	1	3	1	0	2	3	3	2	1	2	5	1	2.5	1.9
Base			5	2	0	8	0	1	6	3	1	1	2	1	2	2	0	2.3	2.3
VELLOSIDAD		Punta	4	1	0	3	1	0	2	2	1	1	0	2	0	1	3	1.4	1.2
		Intermedio	0	4	1	5	1	6	3	0	1	0	5	0	1	2	7	2.4	2.3
		Base	1	2	3	3	2	0	2	0	1	5	1	9	1	5	2	2.5	2.3
BAZO		Pulpa blanca	2	0	3	1	2	6	1	5	0	1	2	1	2	2	1	1.9	1.6
		pulpa roja	2	1	0	5	1	8	2	4	1	0	3	2	5	4	1	2.6	2.2
EDL 933 FM		DOMO	Punta	11	10	0	4	3	2	0	1	6	5	3	1	0	4	2	3.5
	Intermedio		9	6	5	4	3	1	2	1	0	7	5	6	4	9	3	4.3	2.7
	Base		12	10	9	9	7	15	6	9	7	6	8	9	11	12	7	9.1	2.4
	VELLOSIDAD	Punta	11	5	13	0	8	9	7	6	5	4	2	1	0	6	9	5.7	3.8
		Intermedio	2	8	7	5	6	7	7	4	2	0	11	1	3	5	4	4.8	2.9
		Base	4	6	8	4	10	5	9	8	5	4	8	3	7	11	4	6.4	2.4
	BAZO	Pulpa blanca	4	4	7	8	2	1	9	3	7	1	4	2	2	3	1	3.9	2.6
		Pulpa roja	11	5	9	9	8	7	9	9	5	2	2	3	4	1	2	5.7	3.2

Cuadro 11.- Continuación

	ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVAS (%)														X	S	
EDL 933 IBT	NÓDULO	Punta	7	5	2	5	0	4	3	5	6	9	7	3	3	4	2	4.3	2.2
		Intermedio	8	9	7	6	3	2	6	4	3	8	7	5	3	2	2	5.0	2.4
		Base	10	1	2	5	3	6	4	9	7	9	8	6	8	9	2	5.9	2.9
	VELLOSIDAD	Punta	5	3	6	9	9	5	4	3	3	5	8	7	4	2	1	4.9	2.4
		Intermedio	2	2	3	5	7	8	6	4	3	9	5	6	6	8	7	5.4	2.2
		Base	5	4	2	0	1	2	3	5	8	9	5	6	9	7	2	4.5	2.8
	BAZO	Pulpa blanca	4	5	8	6	0	5	4	1	2	3	3	2	8	1	9	4.1	2.7
		Pulpa roja	0	2	1	4	2	2	1	1	3	5	6	9	8	4	5	3.5	2.6
		ESTRUCTURA	REGIÓN	POSITIVAS (%)														X	S
CST	NÓDULO	Punta	0	0	2	1	3	4	1	5	3	5	1	2	0	1	2	2.0	1.6
		Intermedio	3	6	0	1	0	2	1	0	0	3	2	0	2	0	1	1.4	1.6
		Base	3	2	1	0	5	3	1	4	3	1	2	1	1	0	0	1.8	1.5
	VELLOSIDAD	Punta	1	2	0	1	1	2	2	3	1	0	1	1	4	0	0	1.3	1.1
		Intermedio	2	5	0	4	2	0	2	2	0	3	0	1	0	2	1	1.6	1.5
		Base	1	2	1	2	1	3	2	0	1	0	5	1	6	2	1	1.9	1.6
	BAZO	Pulpa blanca	2	3	1	2	3	0	3	2	2	4	3	5	0	2	0	2.1	1.4
		Pulpa roja	2	6	1	2	5	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1.3	1.8

Cuadro 12.- Diferencia significativa entre los conejos inoculados con la cepa K12 C 600 contra los demás tratamientos respecto a los diferentes marcadores reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

MARCADOR CD 4

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO										
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA						
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.
CST	22.2	10.417	0.5393		19.25	9.5	0.9823		16.083	9.4	0.4926		35.7	14.5	0.0200	↑	43.6	11.5	0.4729		37.9	9.1	0.699		21.5	12.573	0.0429	↓	31.083	12.979	0.5211				
EDL933-IBT	31.0	12.8	0.2636		25.3	6.8	0.0706		31.5	13.2	0.0101	↑	31.3	7.7	0.0231	↑	27.8	10.7	0.0244	↓	42.2	15.0	0.2774		33.1	18.5	0.8424		35.0	22.6	0.9473				
EDL933-FM	19.8	6.6	0.2088		23.3	8.9	0.2706		20.2	6.5	0.6387		21.2	6.5	0.2898		34.3	14.3	0.3367		36.3	4.2	0.9783		26.2	12.3	0.2453		29.4	7.7	0.2479				
933 W	9.3	6.2	0.0007	↓	7.0	3.9	0.0002	↓	5.7	2.6	0.0000	↓	15.1	6.3	0.0026	↓	12.1	6.8	0.0000	↓	15.4	11.8	0.0000	↓	7.5	6.4	0.0000	↓	6.1	11.0	0.0000	↓			
933 J	18.5	6.2	0.1146		18.1	3.5	0.6957		19.4	6.9	0.8176		27.4	7.6	0.2655		35.4	14.0	0.4417		34.2	7.8	0.5379		32.1	8.1	0.9498		38.3	7.6	0.3789				
EDL 933 Δ Ler	24.1	6.2	0.8051		28.7	9.1	0.0161	↑	25.6	9.8	0.0817		30.3	10.1	0.0906		32.8	12.0	0.1938		39.7	13.3	0.5015		33.2	9.9	0.7568		33.2	9.9	0.7111				

MARCADOR CD 5

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO							
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA			
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P
CST	21.9	10.6	0.1356		18.8	8.6	0.2408		22.4	9.7	0.4598		33.9	14.8	0.3103		42.0	10.4	0.4051		36.2	11.8	0.1296		23.3	9.1	0.0001	↓	31.3	7.3	0.0029	↓
EDL933-IBT	37.3	11.9	0.2532		34.1	9.6	0.0022	↑	27.8	14.1	0.7725		28.8	14.4	0.9862		30.8	11.5	0.2176		34.8	10.5	0.0647		32.3	22.9	0.3504		28.0	20.8	0.0515	
EDL933-FM	21.4	7.6	0.0895		25.4	5.6	0.2532		23.3	7.5	0.5516		27.2	7.8	0.0186	↓	35.1	14.6	0.6797		42.2	7.8	0.6918		27.8	6.6	0.0009	↓	33.8	6.0	0.0134	↓
933 W	9.3	9.2	0.0006	↓	6.0	3.4	0.0000	↓	10.4	7.4	0.0022	↓	17.5	13.9	0.0236	↓	15.9	7.1	0.0001	↓	17.7	10.1	0.0000	↓	10.5	8.0	0.0000	↓	8.3	10.6	0.0000	↓
933 J	21.8	7.0	0.0971		15.4	5.9	0.0104	↓	19.5	11.0	0.2105		31.0	9.1	0.5469		39.0	9.0	0.7785		38.3	9.9	0.2365		31.9	10.9	0.0630		33.8	7.9	0.0278	↓
EDL 933 Δ Ler	22.3	10.5	0.1497		25.9	13.5	0.4391		20.2	10.8	0.2558		26.1	10.3	0.4769		37.9	16.8	0.9591		35.5	8.8	0.0668		34.8	6.6	0.1300		44.7	7.2	0.2335	

MARCADOR CD 25

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO							
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA			
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P
CST	26.1	10.3	0.2311		22.3	8.2	0.1689		27.6	6.4	0.2980		41.9	19.2	0.0159	↑	40.8	12.8	0.4800		43.8	13.4	0.6511		22.5	6.2	0.0006	↓	29.8	11.2	0.0034	↓
EDL933-IBT	26.3	8.3	0.1566		25.5	7.5	0.0146	↑	23.2	10.0	0.8561		27.6	12.6	0.6613		25.5	10.7	0.0301	↓	34.5	14.3	0.1988		27.0	16.0	0.2278		36.3	26.0	0.3446	
EDL933-FM	23.2	6.7	0.5701		24.8	9.5	0.0527		19.2	5.5	0.1648		27.7	10.2	0.6091		33.2	6.2	0.3853		39.8	5.8	0.6579		26.3	10.1	0.0644		32.0	14.7	0.0280	↓
933 W	11.9	8.8	0.0115	↓	10.6	4.5	0.0031	↓	11.3	6.4	0.0013	↓	22.0	7.1	0.3423		22.3	9.7	0.0053	↓	19.5	8.1	0.0000	↓	15.6	11.8	0.0001	↓	23.6	17.0	0.0016	↓
933 J	18.1	3.3	0.2009		14.5	4.1	0.1219		18.2	5.7	0.0976		26.6	10.1	0.7972		25.9	6.6	0.0175	↓	30.4	11.9	0.0295	↓	36.5	7.7	0.2918		34.3	13.1	0.0515	
EDL 933 Δ Ler	23.1	8.3	0.6235		25.7	10.4	0.0405	↑	22.8	8.2	0.7583		33.2	10.5	0.0842		35.0	11.3	0.7070		39.1	9.8	0.5839		35.9	4.0	0.2674		40.0	16.7	0.4819	

MARCADOR CD 43

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO							
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA			
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P
CST	21.4	7.1	0.5309		20.0	8.1	0.8462		24.4	7.3	0.6303		32.2	9.9	0.3677		41.4	11.5	0.6566		36.3	8.3	0.1473		28.7	4.2	0.0003	↓	42.7	13.9	0.0505	
EDL933-IBT	34.7	10.3	0.0176	↑	29.2	11.6	0.0178	↑	29.6	12.8	0.5189		31.7	11.1	0.4647		29.8	13.0	0.0308	↓	41.8	5.6	0.8266		32.1	17.1	0.1411		32.1	17.1	0.1854	
EDL933-FM	18.5	5.3	0.1374		25.2	7.0	0.0458		22.1	5.8	0.2654		26.4	11.1	0.6283		40.2	14.0	0.5437		40.5	9.4	0.6357		32.3	9.8	0.0431	↓	41.1	8.0	0.0023	↓
933 W	14.2	9.3	0.0271	↓	13.2	5.2	0.0147	↓	15.8	8.7	0.0191	↓	25.5	15.0	0.5653		20.8	10.2	0.0005	↓	14.9	4.4	0.0000	↓	22.0	15.5	0.0016	↓	22.0	15.5	0.0000	↓
933 J	18.9	7.1	0.1998		14.5	4.5	0.0392	↓	17.6	8.3	0.0441	↓	26.1	9.9	0.5504		30.5	8.8	0.0221	↓	36.0	11.2	0.1731		31.4	8.1	0.0154	↓	44.7	19.4	0.2234	
EDL 933 Δ Ler	27.0	7.1	0.3846		28.9	8.4	0.0048	↑	27.5	8.1	0.7763		28.7	5.5	0.9589		39.7	8.6	0.4304		40.2	4.0	0.5065		40.2	4.0	0.1642		40.6	8.9	0.0026	↓

* P Indica la diferencia significativa (p<0.05)

** ↑ ↓ Indican si los valores aumentaron o disminuyeron en relación a los observados en los conejos inoculados con CST utilizando la T de Student

*** X indica la media y S la desviación estandar.

Cuadro 13.- Diferencia significativa entre los conejos inoculados con la cepa EDL 933 IBT contra los tratamientos con respecto a los diferentes marcadores reconocidos por los diferentes anticuerpos monoclonales

MARCADOR CD 4

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO								BAZO														
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA						
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.
CST	22.2	10.417	0.0778		19.25	9.5	0.0879		16.083	9.4	0.0032	↓	35.7	14.5	0.3621		43.6	11.5	0.0020	↑	37.9	9.1	0.4108		21.5	12.573	0.0870		31.083	13.0	0.6082				
K-12C600	25.083	12.413	0.2636		19.167	8.8	0.0706		18.667	8.7	0.0101	↓	24.083	6.7	0.0231	↓	39.833	13.584	0.0244	↑	36.417	9.7	0.2774		31.833	10.9	0.8424		34.5	12.689	0.9473				
EDL933-FM	19.8	6.6	0.0136	↓	23.3	8.9	0.5417		20.2	6.5	0.0140	↓	21.2	6.5	0.0021	↓	34.3	14.3	0.2204		36.3	4.2	0.2087		26.2	12.3	0.2930		29.4	7.7	0.4271				
933 W	9.3	6.2	0.0000	↓	7.0	3.9	0.0000	↓	5.7	2.6	0.0000	↓	15.1	6.3	0.0000	↓	12.1	6.8	0.0003	↓	15.4	11.8	0.0000	↓	7.5	6.4	0.0001	↓	6.1	11.0	0.0006	↓			
933 J	18.5	6.2	0.0060	↓	18.1	3.5	0.0035	↓	19.4	6.9	0.0101	↓	27.4	7.6	0.2311		35.4	14.0	0.1472		34.2	7.8	0.1164		32.1	8.1	0.8656		38.3	7.6	0.6334				
EDL 933 Δ Ler	24.1	6.2	0.1072		28.7	9.1	0.3066		25.6	9.8	0.2253		30.3	10.1	0.7866		32.8	12.0	0.2851		39.7	13.3	0.6707		33.2	9.9	0.9891		33.2	9.9	0.7484				

MARCADOR CD 5

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO								BAZO														
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA						
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.
CST	21.9	10.6	0.0029	↓	18.8	8.6	0.0004	↓	22.4	9.7	0.2909		33.9	14.8	0.3957		42.0	10.4	0.0197	↑	36.2	11.8	0.7725		23.3	9.1	0.2184		31.3	7.3	0.6151				
K-12 C600	30.5	16.0	0.2532		22.5	6.5	0.0022	↓	26.1	13.8	0.7725		28.8	8.2	0.9862		37.6	14.7	0.2176		43.8	12.1	0.6647		39.8	8.6	0.3504		41.1	7.1	0.0515				
EDL933-FM	21.4	7.6	0.0007	↓	25.4	5.6	0.0130	↓	23.3	7.5	0.3482		27.2	7.8	0.7405		35.1	14.6	0.4269		42.2	7.8	0.0651		27.8	6.6	0.5189		33.8	6.0	0.3615				
933 W	9.3	9.2	0.0000	↓	6.0	3.4	0.0000	↓	10.4	7.4	0.0010	↓	17.5	13.9	0.0642		15.9	7.1	0.0009	↓	17.7	10.1	0.0004	↓	10.5	8.0	0.0049	↓	8.3	10.6	0.0079	↓			
933 J	21.8	7.0	0.0007	↓	15.4	5.9	0.0000	↓	19.5	11.0	0.1239		31.0	9.1	0.6516		39.0	9.0	0.0627		38.3	9.9	0.4114		31.9	10.9	0.9550		33.8	7.9	0.3743				
EDL Δ Ler	22.3	10.5	0.0034	↓	25.9	13.5	0.1020		20.2	10.8	0.1530		26.1	10.3	0.6066		37.9	16.8	0.2347		35.5	8.8	0.8680		34.8	6.6	0.7193		44.7	7.2	0.0156	↑			

MARCADOR CD 25

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO								BAZO														
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA						
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.
CST	26.1	10.3	0.9484		22.3	8.2	0.3214		27.6	6.4	0.2117		41.9	19.2	0.0416	↑	40.8	12.8	0.0044	↑	43.8	13.4	0.1125		22.5	6.2	0.3729		29.8	11.2	0.4406				
K-12 C 600	21.4	8.1	0.1566		18.0	6.3	0.0146	↓	23.9	10.0	0.8561		25.5	10.3	0.6613		36.9	13.3	0.0301	↑	41.5	11.5	0.1988		33.3	7.1	0.2278		44.0	9.9	0.3446				
EDL933-FM	23.2	6.7	0.3139		24.8	9.5	0.8320		19.2	5.5	0.2383		27.7	10.2	0.9859		33.2	6.2	0.0425	↑	39.8	5.8	0.2430		26.3	10.1	0.9037		32.0	14.7	0.6264				
933 W	11.9	8.8	0.0004	↓	10.6	4.5	0.0000	↓	11.3	6.4	0.0022	↓	22.0	7.1	0.1944		22.3	9.7	0.4430		19.5	8.1	0.0044	↓	15.6	11.8	0.0586		23.6	17.0	0.1716				
933 J	18.1	3.3	0.0040	↓	14.5	4.1	0.0001	↓	18.2	5.7	0.1460		26.6	10.1	0.8322		25.9	6.6	0.9094		30.4	11.9	0.4536		36.5	7.7	0.0765		34.3	13.1	0.8139				
EDL Δ Ler	23.1	8.3	0.3469		25.7	10.4	0.9645		22.8	8.2	0.9122		33.2	10.5	0.2503		35.0	11.3	0.0456	↑	39.1	9.8	0.3681		35.9	4.0	0.0738		40.0	16.7	0.6779				

MARCADOR CD 43

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO								BAZO														
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA						
	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.	P	X	S	DIF.SIG.
CST	21.4	7.1	0.0013	↓	20.0	8.1	0.0348	↓	24.4	7.3	0.2361		32.2	9.9	0.9084		41.4	11.5	0.0302	↑	36.3	8.3	0.0755		28.7	4.2	0.5879		42.7	13.9	0.8268				
K-12C 600	23.8	10.5	0.0176	↓	19.4	6.3	0.0178	↓	26.3	11.5	0.5189		29	9.7	0.4647		44.1	17.0	0.0308	↑	42.6	11.8	0.8266		40.6	9.0	0.1411		52.3	7.9	0.1854				
EDL933-FM	18.5	5.3	0.0000	↓	25.2	7.0	0.3154		22.1	5.8	0.0775		26.4	11.1	0.2594		40.2	14.0	0.0740		40.5	9.4	0.6954		32.3	9.8	0.9653		41.1	8.0	0.6075				
933 W	14.2	9.3	0.0000	↓	13.2	5.2	0.0002	↓	15.8	8.7	0.0053	↓	26	15	0.2642		20.8	10.2	0.0725		14.9	4.4	0.0000	↓	22.0	15.5	0.1446		22.0	15.5	0.0083	↓			
933 J	18.9	7.1	0.0002	↓	14.5	4.5	0.0004	↓	17.6	8.3	0.0123	↓	26	9.9	0.2069		30.5	8.8	0.8841		36.0	11.2	0.1248		31.4	8.1	0.9038		44.7	19.4	0.9495				
EDL Δ Ler	27.0	7.1	0.0454	↓	28.9	8.4	0.9521		27.5	8.1	0.6376		28.7	5.5	0.4112		39.7	8.6	0.0397	↑	40.2	4.0	0.4326		40.2	4.0	0.5899		40.6	8.9	0.5578				

* P Indica la diferencia significativa (p<0.05)

** ↑ ↓ Indican si los valores aumentaron o disminuyeron respecto a los observados en los conejos inoculados con CST utilizando la T de Student

*** X Indica la media y S la desviación estandar.

Cuadro 14.- Diferencia significativa entre los conejos inoculados con la cepa EDL 933- FM contra los demas tratamientos con respecto a los diferentes marcadores reconocidos por los anticuerpos monoclonales

MARCADOR CD 4

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO											
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA							
	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p
CST	22.2	10.417	0.5185		19.25	9.5	0.2982		16.083	9.4	0.2297		35.7	14.5	0.0046	↑	43.6	11.5	0.0912		37.9	9.1	0.5881		21.5	12.573	0.3677		31.083	12.979	0.7056					
K-12 C600	25.083	12.413	0.2088		19.167	8.7991	0.2706		18.667	8.7	0.6387		24.083	6.7	0.2898		39.833	13.584	0.3367		36.417	9.6809	0.9783		31.833	10.9	0.2453		34.5	12.689	0.2479					
EDL933-IBT	31.0	12.8	0.0136	↑	25.3	6.8	0.5417		31.5	13.2	0.0140	↑	31.3	7.7	0.0021	↑	27.8	10.7	0.2204		42.2	15.0	0.2087		33.1	18.5	0.2930		35.0	22.6	0.4271					
933 W	9.3	6.2	0.0005	↓	7.0	3.9	0.0000	↓	5.7	2.6	0.0000	↓	15.1	6.3	0.0294	↓	12.1	6.8	0.0000	↓	15.4	11.8	0.0000	↓	7.5	6.4	0.0001	↓	6.1	11.0	0.0000	↓				
933 J	18.5	6.2	0.6148		18.1	3.5	0.0747		19.4	6.9	0.7874		27.4	7.6	0.0412	↑	35.4	14.0	0.8417		34.2	7.8	0.4068		32.1	8.1	0.1774		38.3	7.6	0.0091	↓				
Δ Ler	24.1	6.2	0.1175		28.7	9.1	0.1540		25.6	9.8	0.1259		30.3	10.1	0.0153	↑	32.8	12.0	0.7944		39.7	13.3	0.4172		33.2	9.9	0.1381		33.2	9.9	0.4586					

MARCADOR CD 5

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO											
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA							
	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p
CST	21.9	10.6	0.8953		18.8	8.6	0.0345	↓	22.4	9.7	0.7982		33.9	14.8	0.1770		42.0	10.4	0.0006	↑	36.2	11.8	0.1543		23.3	9.1	0.1797		31.3	7.3	0.3557					
K-12C 600	30.5	16.0	0.0895		22.5	6.5	0.2532		26.1	13.8	0.5516		28.8	8.2	0.0186	↑	37.6	14.7	0.6797		43.8	12.1	0.6918		39.8	8.6	0.0009	↑	41.1	7.1	0.0134	↑				
EDL933-IBT	37.3	11.9	0.0007	↑	34.1	9.6	0.0130	↑	27.8	14.1	0.3482		28.8	14.4	0.7405		30.8	11.5	0.4269		34.8	10.5	0.0651		32.3	22.9	0.5189		28.0	20.8	0.3615					
933 W	9.3	9.2	0.0019	↓	6.0	3.4	0.0000	↓	10.4	7.4	0.0003	↓	17.5	13.9	0.0474	↓	15.9	7.1	0.0004	↓	17.7	10.1	0.0000	↓	10.5	8.0	0.0000	↓	8.3	10.6	0.0000	↓				
933 J	21.8	7.0	0.9121		15.4	5.9	0.0003	↓	19.5	11.0	0.3308		31.0	9.1	0.2806		39.0	9.0	0.4365		38.3	9.9	0.3039		31.9	10.9	0.2782		33.8	7.9	1.0000					
EDL 933 Δ Ler	22.3	10.5	0.8255		25.9	13.5	0.9069		20.2	10.8	0.4148		26.1	10.3	0.7742		37.9	16.8	0.6629		35.5	8.8	0.0622		34.8	6.6	0.0163	↑	44.7	7.2	0.0006	↑				

MARCADOR CD 25

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO											
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA							
	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p
CST	26.1	10.3	0.4194		22.3	8.2	0.4973		27.6	6.4	0.0023	↑	41.9	19.2	0.0331	↑	40.8	12.8	0.0785		43.8	13.4	0.3527		22.5	6.2	0.2750		29.8	11.2	0.6882					
K-12C600	21.4	8.1	0.5701		18.0	6.3	0.0527		23.9	10.0	0.1648		25.5	10.3	0.6091		36.9	13.3	0.3853		41.5	11.5	0.6579		33.3	7.1	0.0644		44.0	9.9	0.0280	↑				
EDL933-IBT	26.3	8.3	0.3139		25.5	7.5	0.8320		23.2	10.0	0.2383		27.6	12.6	0.9859		25.5	10.7	0.0425	↓	34.5	14.3	0.2430		27.0	16.0	0.9037		36.3	26.0	0.6264					
933 W	11.9	8.8	0.0018	↓	10.6	4.5	0.0001	↓	11.3	6.4	0.0048	↓	22.0	7.1	0.1280		22.3	9.7	0.0033	↓	19.5	8.1	0.0000	↓	15.6	11.8	0.0251	↓	23.6	17.0	0.2074					
933 J	18.1	3.3	0.0269	↓	14.5	4.1	0.0023	↓	18.2	5.7	0.6654		26.6	10.1	0.7963		25.9	6.6	0.0108	↓	30.4	11.9	0.0216	↓	36.5	7.7	0.0109	↑	34.3	13.1	0.6954					
EDL 933 Δ Ler	23.1	8.3	0.9785		25.7	10.4	0.8241		22.8	8.2	0.2234		33.2	10.5	0.2059		35.0	11.3	0.6261		39.1	9.8	0.8211		35.9	4.0	0.0057	↑	40.0	16.7	0.2248					

MARCADOR CD 43

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD												DOMO												BAZO											
	PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PUNTA				INTERMEDIO				BASE				PULPA BLANCA				PULPA ROJA							
	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p	X	S	DIF.SIG.	p
CST	21.4	7.1	0.2675		20.0	8.1	0.1080		24.4	7.3	0.3952		32.2	9.9	0.1932		41.4	11.5	0.8128		36.3	8.3	0.2623		28.7	4.2	0.2478		42.7	13.9	0.7360					
K-12C 600	23.8	10.5	0.1374		19.4	6.3	0.0458	↓	26.3	11.5	0.2654		28.5	9.7	0.6283		44.1	17.0	0.5437		42.6	11.8	0.6357		40.6	9.0	0.0431	↑	52.3	7.9	0.0023	↑				
EDL933-IBT	34.7	10.3	0.0000	↑	29.2	11.6	0.3154		29.6	12.8	0.0775		31.7	11.1	0.2594		29.8	13.0	0.0740		41.8	5.6	0.6954		32.1	17.1	0.9653		32.1	17.1	0.6075					
933 W	14.2	9.3	0.1744		13.2	5.2	0.0000	↓	15.8	8.7	0.0498	↓	25.5	15.0	0.8660		20.8	10.2	0.0008	↓	14.9	4.4	0.0000	↓	22.0	15.5	0.0046	↓	22.0	15.5	0.0030	↓				
933 J	18.9	7.1	0.8718		14.5	4.5	0.0001	↓	17.6	8.3	0.1396		26.1	9.9	0.9386		30.5	8.8	0.0545		36.0	11.2	0.2960		31.4	8.1	0.8057		44.7	19.4	0.5601					
EDL 933 Δ Ler	27.0	7.1	0.0031	↑	28.9	8.4	0.2449		27.5	8.1	0.0729		28.7	5.5	0.5346		39.7	8.6	0.9168		40.2	4.0	0.9105		40.2	4.0	0.4799		40.6	8.9	0.8858					

* P Indica la diferencia significativa (p<0.05)

** ↑ ↓ Indican si los valores aumentaron o disminuyeron respecto a los observados en los conejos inoculados con CST utilizando la T de Student

*** X indica la media y S la desviación estandar.

Cuadro 15.- T de Student realizada para las células plasmáticas marcadas en los conejos inoculados con CST respecto a los demás tratamientos

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD									DOMO						BAZO								
	PUNTA			INTER			BASE			PUNTA			INTER			BASE			P.BLANCA			P. ROJA		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P
K-12 C 600	5.0	3.5	0.000617	1.7	1.5	0.814474	2.8	3.0	0.275094	3.0	2.5	0.184272	3.7	2.4	0.005535	3.2	3.1	0.119688	2.6	2.0	0.485028	2.7	2.4	0.08405
EDL933-IBT	5.0	3.5	0.000015	1.7	1.5	0.00009	2.8	3.0	0.004388	3.0	2.5	0.003877	3.7	2.4	0.000064	3.2	3.1	0.000047	2.6	2.0	0.023472	2.7	2.4	0.01375
EDL933-FM	5.7	3.9	0.000225	4.3	2.7	0.002405	6.4	2.5	0.000003	3.4	3.3	0.145733	4.3	2.7	0.001549	9.1	2.5	0.0000	2.1	2.6	0.035637	5.7	3.3	0.00011
933 W	3.2	2.7	0.015299	4.0	3.0	0.0116	3.8	3.1	0.037179	4.2	3.1	0.023986	4.4	3.2	0.0039	3.8	2.4	0.010189	3.1	2.5	0.199223	1.5	1.8	0.7708
933 J	1.6	1.5	0.429431	1.5	1.4	0.902704	1.4	1.3	0.4099	2.1	1.8	0.838062	1.8	1.8	0.470205	0.9	0.8	0.046434	0.9	0.8	0.006809	1.5	1.7	0.76359
EDL 933 Δ Ler	1.4	1.2	0.763761	2.4	2.4	0.289304	2.4	2.3	0.429172	1.9	2.2	0.92757	2.4	1.9	0.116999	2.2	2.3	0.523057	1.9	1.6	0.729138	2.6	2.2	0.10068

* P indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los conejos inoculados con la cepa con CST y los demás grupos en el conteo de células plasmáticas encontradas por estructura y regiones.

** ↓ ↑ Indican si las células plasmáticas disminuyeron o aumentaron en cantidad

*** X indica la media y S la desviación estandar.

Cuadro 16.- I de Student realizada para las células plasmáticas marcadas en los conejos inoculados con la cepa K12 C600 con respecto a los demás tratamientos

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD									DOMO						BAZO								
	PUNTA			INTER			BASE			PUNTA			INTER			BASE			P.BLANCA			P. ROJA		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P
CST	1.3	1.1	0.000617	1.6	1.5	0.814474	1.8	1.7	0.275094	2.0	3.0	0.184272	1.4	1.6	0.005535	1.8	1.5	0.119688	2.1	1.4	0.485028	1.3	1.8	0.08405
EDL933-IBT	4.9	2.4	1	5.4	2.2	0.000014	4.5	2.8	0.134406	4.3	2.3	0.163163	5.0	2.4	0.171322	5.9	2.4	0.0249	4.0	2.7	0.112783	3.5	2.6	0.39574
EDL933-FM	5.7	3.9	0.559806	4.3	2.7	0.001338	6.4	2.5	0.00169	3.4	3.3	0.717029	4.3	2.7	0.5779	9.1	2.5	0.0000	2.1	2.6	0.159518	5.7	3.3	0.00826
933 W	3.2	2.7	0.158472	4.0	3.0	0.0162	3.8	3.1	0.381358	4.2	3.1	0.285321	4.4	3.2	0.5367	3.8	2.4	0.569891	3.1	2.5	0.537581	1.5	1.8	0.1394
933 J	1.6	1.5	0.002559	1.5	1.4	0.712617	1.4	1.3	0.0992	2.1	1.8	0.257068	1.8	1.8	0.026139	0.9	0.8	0.008834	0.9	0.8	0.086783	1.5	1.7	0.1306
EDL 933 Δ Ler	1.4	1.2	0.000958	2.4	2.4	0.374376	2.4	2.3	0.69642	1.9	2.2	0.204561	2.4	1.9	0.13028	2.2	2.3	0.336787	1.9	1.6	0.343532	2.6	2.2	0.876

* P indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los conejos inoculados con la cepa K12C 600, con CST y los demás grupos en el conteo de células plasmáticas encontradas por estructura y regiones.

** ↓ ↑ indican si las células plasmáticas disminuyeron o aumentaron en cantidad

*** X indica la media y S la desviación estandar.

Cuadro 17 .-I de Student realizada para las células plasmáticas marcadas en los conejos inoculados con la cepa EDL 933 IB I respecto a los demás tratamientos

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD									D O M O									B A Z O					
	PUNTA			INTER			BASE			PUNTA			INTER			BASE			P.BLANCA			P. ROJA		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P
CST	1.3	1.1	0.000015	1.6	1.5	0.000009	1.8	1.7	0.004388	2	3	0.003877	1.4	1.6	0.000064	1.8	1.5	0.000047	2.1	1.4	0.023472	1.3	1.8	0.013753
K-12 C600	5	3.5	1	1.7	1.5	0.000014	2.8	3	0.134406	3	2.5	0.163163	3.7	2.4	0.171322	3.2	3.1	0.024914	2.6	2	0.112783	2.7	2.4	0.395738
EDL 933-FM	5.7	3.9	0.508675	4.3	2.7	0.535419	6.4	2.5	0.068184	3.4	3.3	0.421561	4.3	2.7	0.490669	9.1	2.5	0.003583	2.1	2.6	0.841682	5.7	3.3	0.054642
933 W	3.2	2.7	0.092193	4	3	0.1641	3.8	3.1	0.547287	4.2	3.1	0.8958	4.4	3.2	0.5756	3.8	2.4	0.047464	3.1	2.5	0.345477	1.5	1.8	0.024877
933 J	1.6	1.5	0.000162	1.5	1.4	0.000004	1.4	1.3	0.000681	2.1	1.8	0.007656	1.8	1.8	0.000435	0.9	0.8	0.000001	0.9	0.8	0.002657	1.5	1.7	0.022276
EDL Δ Ler	1.4	1.2	0.00031	2.4	2.4	0.001437	2.4	2.3	0.040066	1.9	2.2	0.007621	2.4	1.9	0.003853	2.2	2.3	0.0008	1.9	1.6	0.016163	2.6	2.2	0.30752

* P indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los conejos inoculados con la cepa EDL 933-IBT y EDL 933 -FM Y los demás grupos en el conteo de células plasmáticas encontradas por estructura y regiones.

** ↓ / ↑ indican si las células plasmáticas disminuyeron o aumentaron en cantidad

*** X Indica la media y S la desviación estándar.

Cuadro 18.- T de Student realizada para las células plasmáticas marcadas en los conejos inoculados con la cepa EDL 933 FM respecto a los demás tratamientos

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD									D O M O									B A Z O					
	PUNTA			INTER			BASE			PUNTA			INTER			BASE			P.BLANCA			P. ROJA		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P	X	S	P
CST	1.3	1.1	0.000225	1.6	1.5	0.002405	1.8	1.7	0.000003	2.0	3.0	0.145733	1.4	1.6	0.001549	1.8	1.5	0	2.1	1.4	0.035637	1.3	1.8	0.000107
K-12C600	5.0	3.5	1	1.7	1.5	0.000014	2.8	3.0	0.00169	3.0	2.5	0.717029	3.7	2.4	0.537793	3.2	3.1	0.000006	2.6	2.0	0.159518	2.7	2.4	0.008256
EDL933-IBT	4.9	2.4	0.508675	5.4	2.2	0.535419	4.5	2.8	0.068184	4.3	2.3	0.421561	5.0	2.4	0.490669	5.9	2.4	0.00035	4.0	2.7	0.841682	3.5	2.6	0.054642
933 W	3.2	2.7	0.056155	4.0	3.0	0.4734	3.8	3.1	0.020498	4.2	3.1	0.544554	4.4	3.2	0.9526	3.8	2.4	0.000003	3.1	2.5	0.448913	1.5	1.8	0.0002
933 J	1.6	1.5	0.00084	1.5	1.4	0.000605	1.4	1.3	0.0000	2.1	1.8	0.19262	1.8	1.8	0.007375	0.9	0.8	0	0.9	0.8	0.004062	1.5	1.7	0.000168
EDL Δ Ler	1.4	1.2	0.000336	2.4	2.4	0.021516	2.4	2.3	0.00013	1.9	2.2	0.156315	2.4	1.9	0.040789	2.2	2.3	0	1.9	1.6	0.024405	2.6	2.2	0.005039

* P indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los conejos inoculados con la cepa EDL 933-IBT y EDL 933 -FM Y los demás grupos en el conteo de células plasmáticas encontradas por estructura y regiones.

** ↓ / ↑ indican si las células plasmáticas disminuyeron o aumentaron en cantidad

*** X Indica la media y S la desviación estándar.

Cuadro 19.- Resumen de los efectos del control positivo en los diferentes anticuerpos monoclonales y las células plasmáticas.

CONTROL POSITIVO

EDL - 933								
MARCADOR	VELLOSIDAD			DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	-	-	↑	↑	↓	-	-	-
CD 5	-	↑	-	↓	-	-	↓	↓
CD 25	-	↑	-	-	↓	-	↓	-
CD 43	↑	↑	-	-	↓	-	↓	↓
CEL.PLASM.	-	↑	↑	-	-	↑	↑	-

* Se consideró como control positivo a la suma de los efectos de las cepas EDL 9833 IBT y EDL 933 FM.

** ↑/↓ indican aumento o disminución de acuerdo a las diferencias significativas observadas en los cuadros 12 al 18

Cuadro 20.- Efectos del control negativo en los diferentes anticuerpos monoclonales y células plasmáticas.

CONTROL NEGATIVO

MARCADOR	VELLOSIDAD			DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	-	-	-	↓	-	-	-	↑
CD 5	-	-	-	-	-	-	↑	↑
CD 25	-	-	-	↓	-	-	↑	↑
CD 43	-	-	-	-	-	-	-	↑
CEL.PLASM.	↑	-	-	-	↑	-	-	-

* Se consideró como control negativo los efectos de la cepa K12 C600

** En el intermedio y la base de la vellosidad no se encontró efecto.

*** ↑ ↓ indican aumento o disminución de acuerdo a las diferencias significativas observadas en los cuadros 12 al 18

Cuadro 21.- Efecto sobre los marcadores celulares de las diferentes cepas en el ápndice cecal y el bazo.

CONTROL POSITIVO

MARCADOR	DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	↑	↓	-	-	-
CD 5	↓	-	-	↓	↓
CD 25	-	↓	-	↓	-
CD 43	-	↓	-	↓	↓
CEL.PLASM.	-	-	↑	↑	-

EDL 933 Δ LER

MARCADOR	DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	↑	-	-	-	-
CD 5	-	-	-	↑	↑
CD 25	-	↑	-	-	↑
CD 43	-	↑	-	-	-
CEL.PLASM.	↓	↓	↓	↓	↓

933 W

MARCADOR	DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	↓	↓	↓	↓	↓
CD 5	↓	↓	↓	↓	↓
CD 25	-	↓	↓	-	↓
CD 43	-	↓	↓	↓	↓
CEL.PLASM.	-	-	↓	↓	-

933 J

MARCADOR	DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	P.ROJA	P.BLANCA
CD 4	↑	-	-	↓	-
CD 5	-	-	-	-	-
CD 25	-	↓	↓	-	↑
CD 43	-	-	-	-	-
CEL.PLASM.	↓	↓	↓	↓	↓

* Se consideró como control positivo la suma de los efectos de las cepas EDL933 IBT y EDL 933 FM

** ↑ ↓ Las flechas indican aumento o disminución estadísticamente significativo ($p < 0.05$)

** - Indica que no hay efecto estadísticamente significativo

*** La zonas sombreadas indican las regiones donde se apreciaron las diferencias más importantes.

Cuadro 22.- Resumen del análisis estadístico relativo al conteo de células plasmáticas entre los conejos inoculados con la cepa K12 C600 y los demás tratamientos.

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD			DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	PUNTA	INTER	BASE	P. BCA	P. ROJA
CST	↓				↓			
EDL 933-IBT		↑				↑		
EDL 933-FM		↑	↑			↑		↑
933 W		↑						
933 J	↓				↓	↓		
EDL 933 Δ Ler	↓				↓			

*   Indican aumento o disminución estadísticamente significativo. .

** Los resultados fueron resumidos de lo mostrado en el cuadro 16

Cuadro 23.- Resumen del análisis estadístico relativo al conteo de células plasmáticas entre los conejos inoculados con la cepa EDL 933 y los demás tratamientos.

TRATAMIENTO	VELLOSIDAD			DOMO			BAZO	
	PUNTA	INTER	BASE	PUNTA	INTER	BASE	P. BLACA	P. ROJA
CST	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
K12 C 600		↓	↓	↓		↓		
EDL933- IBT						↓		
933 W	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓
933 J	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓
EDL 933 Δ Ler	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓

*   Indican aumento o disminución estadísticamente significativo. .

** Los resultados fueron resumidos de lo mostrado en el cuadro 18

DISCUSIÓN

Los resultados de laboratorio de las pruebas de hematología y determinación de urea y de creatinina obtenidos en el presente trabajo, así como la signología clínica fueron muy similares a los rangos obtenidos de acuerdo a lo previamente reportado (Cortés, 2003), en éste estudio solo se confirmaron éstos datos (Gráficas 1, 2 y 3).

De acuerdo a lo reportado por el fabricante de los anticuerpos monoclonales empleados (Serotec) y a lo encontrado en la bibliografía (Abbas, 2000; Goldsby, 2000; Janeway, 1999 y Roitt, 2000) se construyó el Cuadro N° 24 y las Figuras N° 7 y 8 respecto a las células probablemente marcadas con los anticuerpos anti CD4, CD5, CD25 Y CD43 usados en el presente trabajo.

Cuadro 24.- Tipo de células del sistema inmune marcadas con los anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25, CD43 y con la tinción verde rápido pironina “Y”.

MARCADOR	CD 4	CD 5	CD 25	CD 43	VRP
Linfocito T		+	+	+	
Linfocito PreT		+	+		
Timocito	+	+	+	+	
T cooperador	+	+		+	
T citotóxicos / T nul		+			
Linfocito B		+	+		
Linf. B de méd. ósea				+	
Linf. B inmaduro				+	+/-
Linf. B maduro (B1)		+			+
Células B activas			+		+
Célula plasmática					+
Monocito/macrófago	+		+	+	

Analizando el Cuadro 21 en el que se observan los diferentes efectos provocados por las cepas inoculadas en los conejos, es posible comentar las diferencias más significativas desde el punto de vista de la alteración en las proporciones linfocitarias del apéndice cecal (AC) y del bazo.

Claramente se demuestra en nuestra investigación que la ausencia o inexpressión de un gen en la isla de patogenicidad puede afectar en gran manera la actitud de una cepa, situación que se demuestra en la cepa EDL933 Δ LER; ya que en ésta se encuentra deletado el gen LEE-1 y por lo tanto no expresa el resto de los genes de la isla. Si comparamos esta cepa con los efectos causados por la cepa paterna, EDL933, claramente se observa que los productos de los genes eae causaron una disminución de todos los marcadores empleados, observándose diferencias en las zonas analizadas, siendo más notorio en el Domo y en la pulpa blanca del bazo.

Utilizando los datos de la bibliografía (Abbas, 2000; Janeway, 1999; Roitt, 2000) con respecto al tipo celular marcado con los anticuerpos monoclonales CD4, CD5, CD25 y CD43 en

el conejo, podemos inferir que el factor auxiliar de virulencia (FAV) constituido por los productos de la isla de patogenicidad *eae* presente en las cepas enterohemorrágicas afectaron a los linfocitos T y B, así como los monocitos / macrófagos en alguna de las siguientes formas: modulando la respuesta de interleucinas, afectando la expresión de linfocitos o modulando la expresión de los receptores para interleucinas, como se demostró previamente (Ceporis PJM y col 2003) para los factores *eae* de las O157 que suprimieron la señalización en células epiteliales del IFN gama-Stat1. Además, se encontró que la intimina no se requiere para la patogénesis en cepas EHEC no-O157, las cuales tienen otros mecanismos de adherencia (Dean N y col 2003). Otra posibilidad contrastante surgió de lo encontrado en cerdos, en donde la enfermedad provocada por la inoculación por vía oral fue independiente de la intimina, pero altamente dependiente de la Stx, después de 50 a 60 horas (Dean N y col 2003). En nuestros experimentos las dos cepas producen ambas citotoxinas, teniendo como única diferencia la expresión del fenotipo *eae*.

Datos aparentemente contradictorios a nuestros resultados son los encontrados por Ramírez y col. en el 2005, quienes utilizando un modelo en conejos e inoculando cepas EPEC, encontraron que la intimina es capaz de inducir la expresión de IL-1B, TNF alfa, IL-6 por el enterocito y los linfocitos de las Placas de Peyer, aunado al efecto de represión de la secreción de IL-10, por lo que el efecto de la intimina en particular parece ser un fuerte efecto proinflamatorio. Estos mismos autores encontraron que el LPS causa producción de IL-8 y disminución de IL-10, reforzando lo encontrado anteriormente; sin embargo, es necesario considerar que ellos estudiaron el papel proinflamatorio hacia la inflamación en el intestino, el cual es invadido por polimorfonucleares (PMN), pero no evaluaron los efectos sobre las células linfocíticas. En el presente modelo en conejos que hemos venido estudiando para las cepas EHEC (Valdivia, 1995; Valdivia, 2002; Pérez, 2002) también se observó una infiltración de PMN en la lámina propia y la luz del AC, efecto posiblemente debido a los productos del locus LEE de la isla de patogenicidad de las EHEC, sin embargo predomina el efecto de depleción local y sistémica de linfocitos; el cual se estudió en el presente trabajo.

Los resultados encontrados y los estudios previos sugieren que la interacción de efectos entre las toxinas Stx y los genes del LEE, parecen actuar simultáneamente en ambos sentidos, o bien lo hacen en forma secuencial, posiblemente presentándose primero el efecto de disminución y destrucción de linfocitos por las toxinas asociados al receptor Gb3 sobre su membrana y posteriormente el papel proinflamatorio de la intimina y el LPS. Esta última apreciación, se refuerza con lo encontrado en trabajos previos en donde se observó que el LPS (representado en éste trabajo por la cepa K-12) y la cepa EDL933 fueron capaces de inducir la expresión de receptores Gb3 sobre células del riñón, enterocitos, y linfocitos del AC (Valdivia G 2002). Similar a lo reportado en un cultivo celular para las toxinas Stx y el LPS (Harrison L.M. 2005).

Los anteriores hechos pueden explicar lo encontrado en cerdos al inocularlos con cepas O157:H7 que fueron protegidos de enfermarse por la administración previa de un anticuerpo monoclonal contra la toxina Stx. De esta manera se protegieron de toda la patogénesis inducida por tal toxina (Sheoran A. y col 2005).

La forma de deducir estos mecanismos es el marcaje del receptor Gb3 en los tejidos estudiados en el presente trabajo y la evaluación de su expresión, en presencia de las cepas empleadas en nuestro estudio.

El receptor Gb3 es equivalente al CD77 y la unión a las toxinas Stx está condicionada por el isotipo expresado en una célula (Gb3 y Gb3-Gal), además existen dos isoformas del Gb3,

una que sólo une y otra que además trasloca a la fracción “A” de las toxinas; sin embargo se ha determinado que la sola unión al receptor puede modular la respuesta inmune (Stamm I y col. 2002).

Previamente se ha identificado que en el bovino los linfocitos T (CD8+/CD4+) y los B expresan el Gb3 por lo que son afectados en forma directa, a diferencia de los linfocitos T del humano que no expresan el Gb3 (Stamm I y col. 2002), aunado a la observación de que las toxinas afectan a los linfocitos intraepiteliales del ileon bovino (Menge y col 2004) y a que la toxina Stx1 actuó como modulador de la respuesta inmune en bovinos (Stamm I y col 2002) se puede explicar el efecto in vivo observado en el presente trabajo en el que se manifestó la baja de los linfocitos T y B y otras subpoblaciones en el AC. En un estudio previo realizado por Valdivia (1995) se detectó una disminución de los linfocitos de la región del Domo y la llegada de linfocitos desde la profundidad hacia la vellosidad tal y como fue observado en éste trabajo y como se representa en el cuadro N° 21.

En la década de 1960 se sugirió que el AC del conejo es el equivalente de la Bursa de Fabricio y las Placas de Peyer. Estudios realizados previamente por Dasso y col en 1997, indican que la apendicectomía del conejo indujo una disminución de anticuerpos en el intestino de la clase IgM, IgA e IgG, sin alterar las concentraciones circulantes, fenómeno que es debido posiblemente a que el AC del conejo es un precursor de células plasmáticas intestinales; por lo que puede actuar como un órgano linfóide primario en la diversificación y maduración de las células B, por lo tanto; en el AC es difícil encontrar células linfoides de tipo Pre B.

Considerando lo reportado previamente para el AC en donde se considera estructural y funcionalmente parecido a la Bolsa de Fabricio de las aves se tomó el esquema de la Figura N° 9 para correlacionar las zonas de alteración y el probable tipo de función alterada.

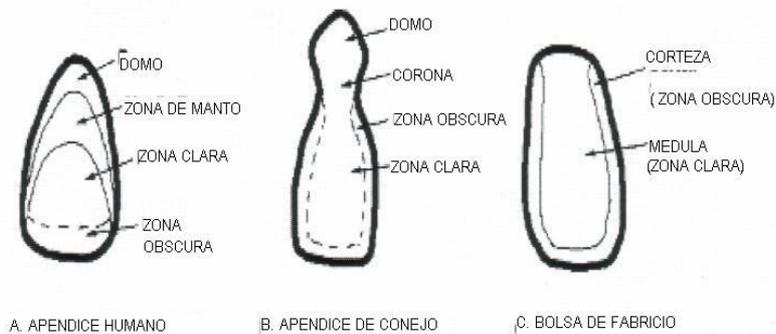


Figura N° 6. Comparación anatómica entre el apéndice cecal del humano, el apéndice cecal del conejo y la Bursa de Fabricio (Tomado de Dasso y col. 200)

Figura N° 9 .- Comparación anatómica entre el apéndice cecal del humano, el apéndice cecal del conejo y la Bursa de Fabricio en aves (tomado de Dasso y col 2000).

Como se puede apreciar en la Figura N° 9, la diferencia en la distribución de las zonas del apéndice cecal (AC) entre el humano y el conejo sugiere que las funciones del Domo y la corona pueden ser diferentes en ambos (Rajesh y col 2004).

En un análisis realizado recientemente por Valdivia y col (2005, en prensa) se determinó que el AC inicia como órgano linfoide primario, después cambia a órgano secundario en la región del nódulo externo y mantienen las características primarias en la región del nódulo profundo (submucosa), los efectos fueron previamente sugeridos por Pospisil y col en 1998 , mencionando al AC como un centro germinal de proliferación de células B persistiendo el fenómeno durante toda la vida del animal, transformación que puede ser gradual o por maduración mas que espontánea (Rajesh y col 2004). Al respecto, Valdivia y col. (1997) encontraron que la inoculación de los conejos con la cepa EDL933 a dosis subletales, abatió la capacidad de respuesta inmune de tipo celular y humoral, demostrando que bajo las condiciones del modelo empleadas, el efecto claramente es a nivel sistémico y no sólo local (Valdivia, 2003).

El AC del conejo comprende la mitad del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), proporción superior al AC del humano, por lo que en ambas especies estas zona es rica en células B precursoras de IgA; además en el conejo este porcentaje se complementa con el saculus rotundus y las placas de Peyer, todos ellos dentro del tracto digestivo por lo que cualquier agente que lesione estas áreas puede tener un impacto alto sobre el sistema de defensa a nivel de mucosas (Dasso y col 2000).

EFFECTOS SOBRE EL DOMO DEL APÉNDICE CECAL

Los conejos inoculados con la cepa K-12 C600 mostraron una disminución del CD4 y del CD 5 y un aumento de las células teñidas con Verde Rápido Pironina "Y" (VRP). Los datos sugieren que la sola presencia del soma bacteriano es capaz de disminuir a los linfocitos T cooperadores y a sus precursores (timocitos), efecto que puede deberse a la presencia del LPS.

Las dos cepas EDL933 empleadas (IBT y FM) presentaron leves diferencias en el efecto, que pueden deberse a una menor producción de toxina (EDL933 FM) y/o a una variación debida a las condiciones de mantenimiento dentro de los laboratorios que las donaron (Facultad de Medicina CU y el Instituto de Biotecnología UNAM). Para fines de comparación se sumaron los efectos mostrados por ambas cepas (Cuadro No. 19), esto es, disminuyeron todas las células marcadas con los anticuerpos monoclonales empleados en alguna o algunas de las regiones estudiadas para el Domo, comparando estos resultados con los efectos para la cepa K12, sugiere que el LPS afecta a las células que tienen CD4 y CD5 y los factores de virulencia de las EHEC utilizadas, afectaron al CD25 y CD43 principalmente. A su vez, al comparar con los efectos provocados por la cepa EDL933 Δ LER los efectos se debieron más al factor eae que a las toxinas (Cuadro N° 21).

Por el tipo celular que marca cada anticuerpo monoclonal empleado se observó que el efecto del factor **eae** no diferenció entre linfocitos T y B pero fueron principalmente células T y B inmaduras.

Como un resumen de los efectos causados por los factores auxiliares de virulencia en el Domo, producidos por las cepas empleadas se construyo el Cuadro N° 25.

Cuadro 25.- Efecto causado por los Factores Auxiliares de Virulencia (FAV) sobre las células marcadas con los anticuerpos monoclonales empleados en el experimento así como la tinción VRP en el Domo del AC.

FAV	MARCADORES UTILIZADOS				
	CD4	CD5	CD25	CD43	VRP
Stx1+ eae+ Stx2+	↓	↓	↓	↓	↑
Stx1 + Stx2+	↑	---	↑	↑	↓
Stx2	↓	↓	↓	↓	↓
Stx 1	↑	---	↓	---	↓

* Las flechas indican aumento o disminución de la cantidad de células marcadas.

** --- Indica que no hubo efecto.

En éste aspecto es importante considerar que una disminución (↓) verdaderamente implica la baja del número de linfocitos en el tejido analizado como se demuestra en los cortes teñidos con H-E que muestran una depleción de linfocitos.

Por el contrario, un aumento (↑) implica que sobre ése marcador no se tuvo efecto, de tal forma, que el aumento es relativo a la baja absoluta de otro linfocito no marcado.

Como se aprecia en el Cuadro N° 25 la expresión del gen *eae* indujo la disminución de todos los marcadores empleados. Así mismo las toxinas Stx 1 y Stx 2 afectaron a las células plasmáticas directamente, tanto en forma simultanea como por separado.

En éste estudio realizado se observó que la cepa 933 W presentó prácticamente los mismos efectos que la cepa silvestre EDL 933; éstos resultados son complejos de analizar debido a que, para obtener ésta cepa, fue necesario lisogenizar la cepa K12 C600 con el fago W, sin embargo no se le reporta si presenta el gen *eae* y en nuestro estudio parece que sí lo contiene.

Las posibilidades para éste resultado pueden ser :

- Una contaminación (anterior a la donación) de la cepa 933 W con la cepa silvestre.
- Que en el proceso de lisogenización hayan pasado por el mecanismo de transducción genes que puedan activar la isla de patogenicidad LEE en la cepa K12 C600 receptora.
- Que la inserción del fago 933 W se haya realizado en un locus diferente al sorbitol y la recombinación provocó la activación de los genes *eae*.
- Una sobreproducción de Stx2 por la cepa 933 W comparada con la cepa EDL 933.

Para trabajos posteriores se están realizando ensayos para diferenciar las posibilidades.

El efecto en el Domo por las toxinas se puede resumir en que ambas causaron la disminución de las células plasmáticas y del marcador CD25; marcador más importante presente en los linfocitos T inmaduros. De igual manera, la toxina Stx2 disminuyó los marcadores CD4, CD5 y CD43 en el Domo, todos ellos asociados a bajas en las células B inmaduras y a las células T maduras. La diferencia entre ambas toxinas puede explicar los efectos clínicos mostrados en el modelo en conejos y en el humano, en donde la toxina Stx2 es la más virulenta, debido a que los signos clínicos se presentaron más rápido con la Stx2 que con la Stx1 (Valdivia, 1995).

Las células plasmáticas en el AC fueron disminuidas por la inoculación de las cepas 933 J, 933 J y 933 W; pero fueron aumentadas por la cepa silvestre EDL 933 (cuadro N° 31), el efecto por lo tanto, parece estar relacionado a la expresión de los genes de la isla de patogenicidad LEE y claramente se observa que en la expresión del fenotipo *eae* se induce una respuesta proinflamatoria que activa la maduración hacia células plasmáticas en forma independiente o sobre el efecto inmunodepresor de las toxinas Stx1 y Stx2.

EFECTO EN EL BAZO

La inoculación con la cepa K12 C600, estimuló en la pulpa blanca del bazo la presencia de células marcadas con todos los anticuerpos monoclonales utilizados y sólo se vio aumentada la cantidad de células marcadas con CD 5 y CD 25 en la pulpa roja (Cuadro N° 20).

Si consideramos al Bazo como un órgano accesorio al hígado para el filtrado de los elementos que entran a partir del intestino, pero con una mayor capacidad de respuesta inmunológica y se identifica la estimulación de células con los marcadores trabajados, se sugiere entonces que la entrada del LPS a través del intestino es capaz de realizar estas acciones.

Las cepas EDL933 provocaron en el bazo la disminución de los marcadores CD 5 y CD 43 en la pulpa blanca, además del CD 25 en la pulpa roja. El efecto fue absoluto, ya que la inoculación con la cepa provocó una disminución severa del tamaño del bazo a la necropsia y una depleción linfocítica al estudio histológico, además de la disminución observada en el AC. Los hallazgos sugieren fuertemente que el efecto de disminución de células T y B inmaduras fue sistémico.

Los efectos de la toxina Stx2 (efecto de la cepa 933" W") fueron iguales tanto en el Domo como en el Bazo, a diferencia de la cepa 933" J" (efecto de la Stx1); la que sólo causó una disminución en las células marcadas con el CD 25 en el Domo y de las células marcadas con el CD 4 en el Bazo. La explicación de éstas diferencias pueden ser las mismas que lo referido para el AC.

También se pudo identificar un efecto de aumento leve de las células plasmáticas; con respecto a éste tema, creemos que éste efecto fue relativo a la disminución de otras poblaciones celulares.

CONCLUSIONES

- 1.- Después de la inoculación de las cepas EDL 933 en el apéndice cecal del conejo, el efecto sobre los linfocitos fué sistémico.
- 2.- La cepa EDL 933 afectó principalmente los linfocitos de la serie B y T inmaduros en el Apéndice Cecal (AC) y el Bazo.
- 3.- El efecto inmunodepresor observado previamente en el mismo modelo, se debe a la disminución de los linfocitos T y B localmente (AC) y en forma sistémica.
- 4.- Las células plasmáticas, efectoras de la respuesta tipo B, no fueron afectadas por los factores auxiliares de virulencia de la cepa EDL 933, pero sí por las toxinas Stx1 y Stx2.
- 3.- Es necesario definir si los linfocitos afectados por la cepa EDL 933, lo fueron por un efecto directo presentando receptor Gb3, o lo hacen en forma indirecta modulando la respuesta.
- 4.- La cepa EDL933 disminuyó las células que presentan el marcador CD 5, 43 y 25 en el bazo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Abbas K.A., Lichtman H.A., Pober S.J.** Inmunología celular y molecular. Ed. McGraw Hill Interamericana. España. 2000;150,156.
- 2.- **Barret TJ, Potter ME, Wachsmuth K.** Bacterial endotoxin both enhances and inhibits the toxicity of Shiga-like toxin II in rabbits and mice. *Infect Immun.* 1989; 57:3434-3437.
- 3.- **Bell C., Kyriakides A.** *E. coli*, una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Editorial Acribia. 1998; 1-6.
- 4.- **Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., González E.A., Alonso M.P., Maas H. et al.** Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolate in Galicia. *Eur J. Epidemiol.* 1996; 12:13-19.
- 5.- **Boyce T.G., Swerdlow D.L., Griffin P.M.** *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N.Engl. J. Med.* 1995; 333:364-368.
- 6.- **Calderwood S.B.** In recent advances in verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections, Proceedings of the 2° International Symposium and Workshop on verocytotoxin (Shiga Like Toxin) producing *Escherichia coli* infections., M.A. Karmali and A.G. Goglio editors. ELSEVIER, Bergamo, Italy. 1994.
- 7.- **Ceporis P.J., McKay D.M., Ching J.C., Pereira P., Sherman P.M.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Disrupts Stat1-Mediated Gamma Interferon Signal Transduction in Epithelial Cells. *Infection and Immunity. American Society for Microbiology.* 2003; 71(3):1396-1404.
- 8.- **Cortés, F.N.** Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Tesis de Licenciatura. FES-C, UNAM. México, 2003.
- 9.- **Cowan S.T.** Manual para la identificación de bacterias de importancia médica Ed. Continental, segunda edición. 1979; 103-107.
- 10.- **Dasso Joe F. , Howell Mark D.** Neonatal Appendectomy Impairs Mucosal Immunity in Rabbits. *Cellular Immunology.* 1997; 182:29-37.
- 11.- **Dassoa Joseph F, Obiahora Harold, Bacha Hanh, Andersonb Arthur, Magea Rose.** A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Developmental and Comparative Immunology.* 2000; 24:797-814.
- 12.- **Dean-Nystrom E. A., Melton-Celsa A. R., Pohlenz J. F. L., Moon H. W., O'Brien A. D.** Comparative Pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and Intimin-Negative Non-O157 Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains in Neonatal Pigs. *Infect. Immun.* 2003; 71(11):6526-6533.
- 13.- **Enciclopedia Médica de la Salud** en español actualizada. National library of Medicine. National institutes of Health, Medline Plus, U.S.A., 2001.

- 14.- Estrada F.E. Manual de técnicas histológicas. AGT Editor. México. 1982; 27-70.
- 15.- Francis DH, Moxley RA, Andraos CY. Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7. Infect Immun. 1989; 57:1339-1342.
- 16.- Frías, C., Estudio de los factores de patogenicidad en *Escherichia coli* enterohemorrágica (Tesis doctoral), Barcelona; Universidad Autónoma de Barcelona, 1996.
- 17.- Gaete B.A. Manual de técnicas histológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas. Tesis de Licenciatura. FES-C, UNAM. México. 1996.
- 18.- Goldsby R., Kindt T., Osborne B. Immunology. Cuarta Edición. Freeman and Company, New York, 2000; 239-297.
- 19.- Griffin P.M., Tauxe R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. 1991; 13:60-98.
- 20.- Harrison L. M., Van den Hoogen C., Van Haften W. C. , Tesh Vernon L. Chemokine Expression in the Monocytic Cell Line THP-1 in Response to Purified Shiga Toxin 1 and/or Lipopolysaccharides. Infection and Immunity. 2005; 73(1):403-412.
- 21.- Holt J.G. Bergey's Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins. Novena edición. Maryland, U.S.A. 1994; 179,180,203-221,233,234.
- 22.- Hurley, P.B., M. Jacewicz, C.M. Thorpe, L.L. Lincicome, A.J. King, G.T. Keusch, and D.W.K. Acheson. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells, Infect.Immun. 1999; 67(12).
- 22.- Jaime F.J.C., Delgado G.Y., Castillo G.D. Síndrome Hemolítico Urémico. Rev. Cubana Hematol Inmunol. Hemerot. 2003; 19:2-3.
- 23.- Janeway C., Travers P., Walport M. Immunobiology. The immune system in health and disease. Cuarta Edición. Current Biology Publications, Elsevier Science Ltd. 1999; 195-234.
- 24.- Jawetz M., Adelberg. Microbiología médica, 15° Ed. Brooks Butel Ornston. 1997; 225-229.
- 25.- Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. Kaper J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990; 87:7839-7843.
- 26.- Kaper J.B., Gansheroff L., O'Brien A. D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1998; 121-177.
- 27.- Kaplan B.S. Hemolytic-uremic syndrome and thrombotic purpura. New York; Marcel Dekker, 1992.
- 28.- Lai Xin-He J.G., Xu S., Melgar and B.E. Uhlin. An apoptotic response by macrophage cells is common upon infection with diarrhegenic *Escherichia coli*, FEMS Microbiology letters. 1999; 17:29-34.

- 29.- Marcelo P., Sircili, Walters Mathew, Trabulsi Luis R., Sperandio Vanessa.** Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence by Quorum Sensing. Infection and Immunity. American Society for Microbiology. 2004; 72(4).
- 30.- Menge C., Blessenohl M., Eisenberg T., Stamm I., Baljer G.** Bovine Ileal Intraepithelial Lymphocytes Represent Target Cells for Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli* . Infection and Immunity. American Society for Microbiology. 2004; 72(4):1896-1905.
- 31.- Nataro J.P. , Kaper J.B.** Diarrhegenic *Escherichia coli*. Clin.Microbiol.Rev.1998; 11:142-201.
- 32.- Notario R, Fain JC, Prado V, Ríos M, Borda M, Gambandé T.** Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal. Rev. méd. Chile. 2000; 128(12).
- 33.- Orskov F., Whittam T.S., Cravioto A., Orskov I.** Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* EPEC belong to different O groups. J. Infect. Dis. 1990; 162:76-81.
- 34.- Paton J.C. and Paton A.W.** Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11:450-479.
- 35.- Pérez M.I.,** Efecto sobre la respuesta inmune provocado por *Escherichia coli* O157:H7 verocitotóxica inoculada en el apéndice cecal del conejo. Tesis de Licenciatura. FES-C, UNAM. México. 2002.
- 36.- Perna y col.** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature. PubMed. 2001; 409:529-533.
- 37.- Pospisil R., Mage R.G.** Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 1998; 229:59-70.
- 38.- Puente J.L., Finlay B.B.** Pathogenic *Escherichia coli*. In principles of bacterial pathogenesis; ed. E.A. Groisman, academic.Press. 2001.
- 39.- Rajesh K. Sinha, Rose G. Mage.** Developing neonatal rabbit appendix, a primary lymphoid organ is seeded by immature blood-borne B cells: evidence for roles for CD62L/PNAd, CCR7/CCL21, a4b1 and LFA-1 Developmental and Comparative Immunology. 2004; 28:829-841.
- 40.- Ramirez K., Huerta R., Oswald, E., Garcia-Tovar C., Hernandez J. M., Navarro-Garcia F.** Role of EspA and Intimin in Expression of Proinflammatory Cytokines from Enterocytes and Lymphocytes by Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*-Infected Rabbits. Infection and Immunity. 2005; 73(1):103-113.
- 41.- Roitt I., Brostoff J., Male D.** Inmunología. Quinta Edición. Edit. Harcourt Internacional. Madrid, España. 2000; 13-22.
- 42.- Rosenshine I., Ruschkowski S., Stein M.** A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. EMBO. 1996; 15:2613-2624.

- 43.- Sheoran A.S. , Chapman-Bonofiglio S., Harvey B.R. , Mukherjee J., Georgiou G., Donohue-Rolfe A., Tzipori S. Human Antibody against Shiga Toxin 2 Administered to Piglets after the Onset of Diarrhea Due to *Escherichia coli* O157:H7 Prevents Fatal Systemic Complications. *Infection and Immunity*. 2005; 73(8):4607-4613.
- 44.- Stamm I., Wuhrerb M., Geyerb R., Baljera G. , Mengea Ch. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Microbial Pathogenesis*. 2002; 33:251-264.
- 45.- Strockbine N.A., Marques L.R.M., Newland J.W., Smith H.W., Holmes R.K., O Briend A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*. 1986; 53:135-140.
- 46.- Sugatani J., Igarashi T., Shimura M., Yamanaka T., Takeda T., Miwa M. Disorders in the immune response of T and B cells in mice administered intravenous verotoxin 2. *Life Sciences*. 2000; 67:1059-1072.
- 47.- Taylor FB Jr, Tesh VL, DeBault L. *et al*. Characterization of the baboon responses to Shiga-like toxin: descriptive study of a new primate model of toxic responses to Stx-1. *Am J Pathol*. 1999.
- 49.- Vadillo S., Píriz S., Mateos E. Manual de microbiología veterinaria. Mc. Graw-Hill Interamericana. España. 2002; 319, 320, 325.
- 50.- Valdivia G. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de verotoxinas (VT) de *Escherichia coli*. Tesis, FES-C. UNAM. México.1995.
- 51.- Valdivia G., Montaráz J.A. Tórtora-Péres J.L. Lymphotoxic effects of verocytotoxin producing *E. coli* in rabbit caecum. 3° International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin). Producing *Escherichia coli* infections. Baltimore, Maryland. U.S.A. 1997.
- 52.- Valdivia G. Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en el apéndice cecal. Tesis, FES-C. UNAM. México, 2002.
- 53.- Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1990; 58:2438-2445.