



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de  
toxina de Shiga aisladas de bovinos en la zona norte del valle  
de México**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:  
PATRICIA REGINA ARANGURÉ PERAZA**

**ASESOR: DR GUILLERMO VALDIVIA ANDA  
COASESOR: M EN C. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

**2007**



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.

**Este trabajo fue financiado por los proyectos:**

**Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e  
Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM No. IN216005**  
Efectos sobre el sistema inmune de cepas de *Escherichia coli*

**Cátedra de Investigación FESC No. IN. 2.14**

**Alumna becaria del PAPIIT IN216005**

Período Enero 2005 a Junio 2006

**El trabajo fue realizado con el equipo e instalación de la  
Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal,  
de la FESC campo IV.**

**AGRADECIMIENTOS**

***A Dios***

*Gracias por darme la oportunidad de vivir rodeada de amor y amistad, por permitirme cumplir mis metas y por permitirme tener lo más importante para el hombre la fe.*



**A mi Papito**

**Juan Manuel Aranguré Lizárraga**

*Todos mis logros y éxitos que obtenga durante toda mi vida personal y profesional te pertenecen a ti, por todos tus desvelos, esfuerzo y amor, por ser un hombre ejemplar que también es madre y amigo. Tu eres mi gran orgullo ya que sin ti nada de esto sería posible te amo y admiro profundamente.*

**A mi Mami**

**Elideé Peraza Gamboa**

*El día que Dios te separo de mi, fue para convertirte en mi ángel guardián, en la luz que siempre ilumina en la oscuridad, no te extraño ya que cada paso que doy tu estas.*

**A mis hermanos**

**Elideé, Gabriela y Juan**

*Por su apoyo, preocupación y amor, por ustedes me supero cada día, son un gran equipo, gracias por su apoyo, por toda la ayuda que me han dado y todas las experiencia bonitas que me hacen vivir, los llevo en mis venas, los quiero mucho*

**A Raymundo**

*Gracias por estar en mi vida en el momento preciso, por apoyarme en mis decisiones, por crecer conmigo tanto personal como profesionalmente, por ser mi compañero, amigo, y por todo el mundo que llenas en mi corazón y lo que me haces vivir te amo.*

**A mis Sobrinos**

*Cris, Mafer y los 2 que están por llegar, gracias por ser el impulso para yo querer ser un buen ejemplo a seguir para ustedes los quiero inmensamente.*

**A mi Asesor**

**Dr. Guillermo Valdivia Anda**

*Le agradezco por permitirme colaborar con usted en este gran proyecto, por sus consejos y gran paciencia, por transmitirme sus conocimientos, lo admiro tanto profesionalmente como personalmente gracias por su apoyo.*

**A mi Coasesor**

**M en C Juan Carlos Del Río García**

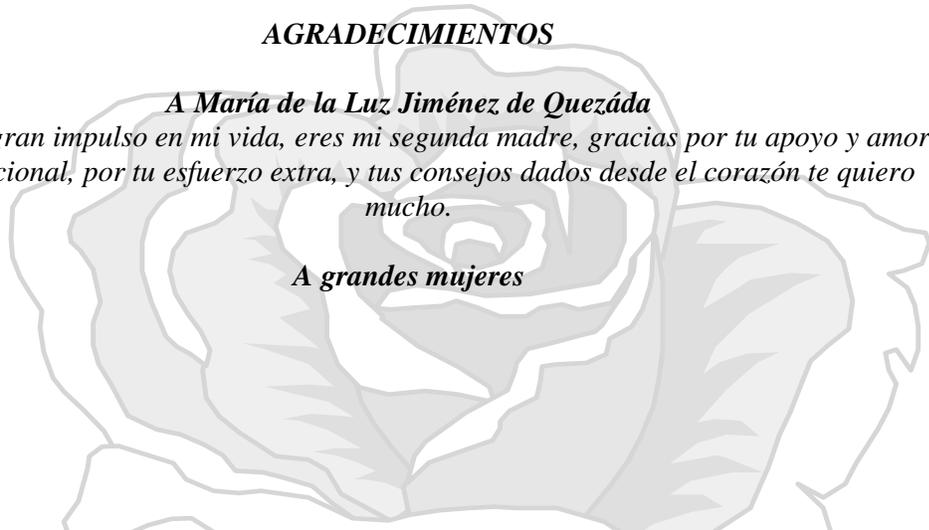
*Gracias por todos su apoyo, tiempo y opiniones para la elaboración y mejora de este trabajo.*

**AGRADECIMIENTOS**

**A María de la Luz Jiménez de Quezáda**

*Eres un gran impulso en mi vida, eres mi segunda madre, gracias por tu apoyo y amor incondicional, por tu esfuerzo extra, y tus consejos dados desde el corazón te quiero mucho.*

**A grandes mujeres**



*Clementina Lizárraga, Elpidia Valdéz, Lesvia Valencia, María Adoración Rojas, Patricia Peraza, MVZ Martha Pérez, Virginia Cid del Prado, Lidia San Roman, son grandes mujeres que me ofrecieron su amistad, amor y apoyo gracias por todo.*

***A Verónica Fuentes y Rocío Izaguirre***

*No se necesita ser de sangre para ser hermanas, puesto que con ustedes lo se, gracias por su amistad y por ser una parte importante en mi vida.*

***A las familias***

*Aranguré Lizárraga, Quezáda Jiménez, Peraza Gamboa, Flores Valencia, Izaguirre Chaparro, Moreno González, Ariza Cid del Prado, gracias por su apoyo.*

***A mis amigos***

*Agustín, Tabata, Ivan, Paola, Richard, Karla, Alan, Eric, Edson, Selene, Edna, Mario, Felipe, Jesús, Isaac, Fernando, Rogelio, Sr. Raymundo, Jimena, Diego, Yarisel, Angel, Sr. Román, Joss, Ame, Rod, Cris, Luis, Claudia, Iker, Fabián, Adrián a todos ustedes y los que faltan gracias por compartir este hermoso camino conmigo.*

***A mis compañeros***

*Néstor Cuenca, Angeles Romero, Claudia Vázquez, Laksmi Sosa y Elena Estrada, por su apoyo, por formar un buen equipo, una amistad y por su aportación a este trabajo gracias.*

***A los académicos***

*Por su apoyo en la elaboración de este trabajo  
MVZ Juan Monroy, MVZ María R. Pichardo, Dr. Marco Antonio Muñoz, M en C Armando Navarro, y a todos pertenecientes a la Unidad de Investigación Disciplinaria en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.*

***A mis sinodales***

*MVZ Miguel A. Pérez Ortega, MVZ Heriberto Contreras Angeles, Dr. Marco A. Muñoz, MVZ Arturo Sandoval Romero, gracias por sus opiniones acertadas y su orientación hacia este trabajo.*

***Agradezco a todo el plantel académico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que colaboraron en mi formación personal y profesional muchas gracias a todos.***

***“Por mi raza, hablará en espíritu”***

## ÍNDICE

<b>I RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>III ANTECEDENTES .....</b>	<b>10</b>
<b>IV OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>V MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>VI RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>VII DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>VIII CONCLUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>IX BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de <i>Enterobacteriea</i> .....	2
Tabla 2	Propiedades bioquímicas.....	3
Tabla 3	Cepas de referencia utilizadas.....	14
Tabla 4	Secuencia utilizada para técnica de PCR.....	14
Tabla 5	Reactivos empleados para técnica de PCR.....	15
Tabla 6	Parámetros del termociclador para prueba de PCR múltiplex.....	15
Tabla 7	Sueros polivalentes.....	19
Tabla 8	Resultado de identificación bioquímica de las cepas aisladas.....	21
Tabla 9	Frecuencia de biotipos encontrados en cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	28
Tabla 10	Grupos de cepas de <i>Escherichia coli</i> formados para la técnica de PCR múltiplex.....	29
Tabla 11	Resultados en la técnica de PCR múltiplex de los grupos de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	29
Tabla 12	Genotipos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> trabajadas.....	30
Tabla 13	Genotipos encontrados en la técnica de PCR múltiplex.....	30
Tabla 14	Efecto de cepas de <i>Escherichia coli</i> en línea celular Vero.....	32
Tabla 15	Efecto citopático de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	32
Tabla 16	Cuantificación de Stx producidas por las cepas de <i>Escherichia coli</i> trabajadas.....	33
Tabla 17	Frecuencia de Stx producida por las cepas de <i>Escherichia coli</i> trabajadas.....	33
Tabla 18	Prueba de serología a las cepas de <i>Escherichia coli</i> trabajadas.....	34
Tabla 19	Frecuencia de serogrupos de <i>Escherichia coli</i> aisladas.....	35
Tabla 20	Cepas de <i>Escherichia coli</i> trabajadas.....	35
Tabla 21	Principales serotipos patógenos de EHEC/ STEC en bovinos y humanos.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Pediatra Alemán Theodor Escherich.....	2
Figura 2	Esquema de la bacteria de <i>Escherichia coli</i> .....	4
Figura 3	Mecanismos de patogénesis de las 6 categorías diarreogénica de <i>Escherichia coli</i> .....	5
Figura 4	Ciclo de Transmisión de <i>Escherichia coli</i> .....	6
Figura 5	Cambios en línea celular Vero a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de Stx.....	31

## ABREVIATURAS

<b>STEC</b>	<b><i>Escherichia coli</i> productora de toxina de Shiga</b>
<b>EHEC</b>	<b><i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica</b>
<b>SUH</b>	<b>Síndrome urémico hemolítico</b>
<b>CH</b>	<b>Colitis hemorrágica</b>
<b>Stx</b>	<b>Toxina de Shiga</b>
<i>stx</i>	<b>Gen toxina de Shiga</b>
<i>eae</i>	<b>Gen codificador de la intimina</b>
<b>UCCC</b>	<b>Unidad citotóxica en cultivo celular</b>
<b>TAE 1X</b>	<b>Tris, acetato, EDTA</b>
<b>MEM</b>	<b>Medio esencial mínimo</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>

## I RESUMEN

El presente trabajo, consistió en el aislamiento y caracterización de cepas de *Escherichia coli*, productoras de toxina de Shiga, a partir de muestras de 40 bovinos de la zona norte del valle de México y se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIMSA).

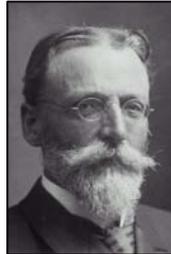
Se realizó identificación bioquímica de las 114 cepas obtenidas de los aislamientos donde se obtuvo una frecuencia del 86% de cepas de 98 cepas *Escherichia coli*, las cuales fueron sometidas a la técnica de PCR múltiplex, para la determinación de genes *stx1*, *stx2*, y/o *eae*, se obtuvo una frecuencia de 38 cepas positivas (52.5%), las cuales posteriormente se sometieron a evaluación sobre la línea celular Vero de forma cualitativa, se obtuvo una frecuencia de 27 cepas (71%) de efecto citolítico sobre la monocapa celular; y también se realizó el ensayo sobre células Vero de manera cuantitativa se seleccionaron 18 cepas de *Escherichia coli* al azar presentándose una frecuencia de 8 cepas (44.5%) de *Escherichia coli* altas productoras de toxina de Shiga. Posteriormente se realizó la prueba de serología (aglutinación directa) con sueros polivalentes donados por la Facultad de Medicina de la UNAM, de las 38 cepas positivas en la técnica de PCR múltiplex a cualquiera de los genes, se obtuvo una frecuencia de 16 cepas positivas a la aglutinación en la prueba de serología que representaron a 13 bovinos portadores de cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a los serogrupos STEC y EHEC.

## II INTRODUCCIÓN

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich, durante su investigación sobre las bacterias en las deposiciones de los niños, lo denominó inicialmente *Bacterium coli commune*.

**Figura 1** Pediatra Alemán Theodor Escherich



Durante algunos años el término genérico *Bacterium* fue utilizado para describir el amplio grupo de bacilos asporógenos Gram negativos que se encuentran en el tracto intestinal del hombre, animales, en las plantas y en la tierra que pueden llevar una existencia saprófita, comensal o patógena.

En 1964 el género *Escherichia* fue definido en la obra “Topley and Wilson’s Principles of Bacteriology and Immunity” de Wilson y Miles que se ajusta a la siguiente clasificación:

**Tabla 1** Clasificación de *Enterobacteria*

Bacilos asporógenos , Gram- negativos	Fermentan la glucosa con formación de ácido y gas
Móviles e inmóviles	Reductores de nitratos a nitritos
Flagelados Peritricos	Oxidasa negativos
Aeróbicos y facultativamente anaerobios	Catalasa positivos

(Bell y col., 1998)

### **Género *Escherichia***

El género *Escherichia* comprende cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, y *Escherichia vulneris*.

De las cinco especies solamente *Escherichia coli* tiene significación clínica. No obstante, *Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris* se han aislado raramente de infecciones extraintestinales especialmente de herida (Blanco y col., 2000).

### Principales características de *Escherichia coli*

Formador de colonias lisas, circulares, convexas con bordes bien definidos, crece en medios diferenciales.

**Tabla 2 Propiedades bioquímicas**

Motilidad	(+)
Citrato	-
Gas a partir de glucosa	+
MR	+
VP	-
Indol	+
Urea	-
H <sub>2</sub> S a partir de TSI	-
Descarboxilación de la lisina	(+)
Descarboxilación de la ornitina	D
Sorbitol	-

\*Símbolo + cepas positivas 99 a 100%

\*Símbolo - cepas negativas 75 a 89%

\*Símbolo (+) cepas positivas 76 a 89%

\*Símbolo D cepas positivas 26 a 75%

\*(Bergey, 1984).

### Clasificación serológica de *Escherichia coli*

En 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli* en base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares), H (flagelares) y F (fimbriales) (Figura 2).

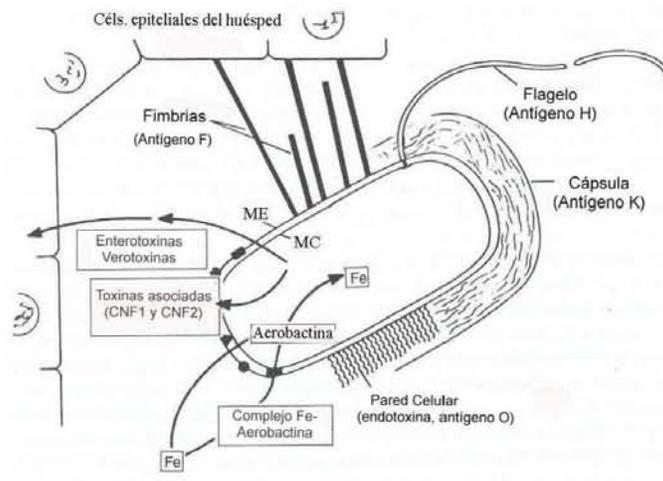
El antígeno O es un polisacárido termoestable (estable tras calentarlo a 121°C/2 h) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular.

El antígeno K corresponde con el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O inhibiendo su aglutinación.

Los antígenos flagelares H poseen naturaleza proteica y son termolábiles, de forma que se inactivan al calentarlos a 100°C/30 min.

Actualmente se reconocen 173 antígenos O (O1 a O181), 72 antígenos K (K1 a K103) y 53 antígenos H (H1 a H56), y alrededor de 12 antígenos F y aunque existen numerosas combinaciones o serotipos O:K:H, tan solo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas (Blanco y col., 2000).

**Figura 2.** Esquema de la bacteria *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia.



(Johnson, 1991).

### **Clasificación de *Escherichia coli***

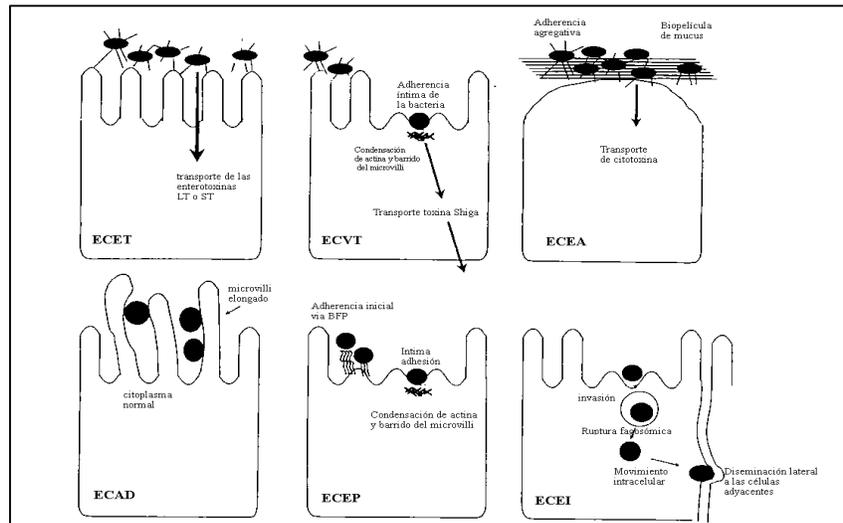
Este microorganismo fue el primer germen implicado como causa de síndrome diarréico, están involucrados por lo menos en seis formas de enteritis inflamatoria aguda en el hombre.

Su diagnóstico como agente responsable del cuadro diarréico es difícil, ya que suele encontrarse como parte de la microbiota normal intestinal, por lo que es difícil establecer una información exacta de la frecuencia de diarrea por *Escherichia coli* en el ser humano.

Actualmente existen más de 150 serotipos de *Escherichia coli* capaces de producir diarrea, la clasificación de cepas basadas en las características patológicas de las bacterias actualmente comprenden 6 grupos.

Grupos de *Escherichia coli*, que causan enfermedad intestinal en humanos (patotipos): enteroagregativas (EAEC), enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), difusamente adherida (DAEC) y las productoras de toxina de Shiga (STEC O EHEC) (Torres y col., 2005) Figura 3.

**Figura 3** Mecanismos de patogénesis de los seis patotipos reconocidos de *Escherichia coli* diarregénicos.



(Nataro & Kaper, 1998).

### ***Escherichia coli* STEC O EHEC.**

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), también llamada *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), se identificó en 1982, cuando surgió un brote de colitis hemorrágica en los Estados Unidos y se demostró que había sido causado por un serotipo específico de *Escherichia coli* O157:H7 intestinal.

Los microorganismos productores de toxina de Shiga, se identifican al demostrar la presencia de toxinas similares a las de Shiga, por serotipificación (es decir identificación de los serotipos característicos) o por sondas de ADN que identifican los genes de toxina o la presencia del plásmido de virulencia de EHEC (Benenson, 1997). Las cepas pertenecientes al grupo STEC o EHEC producen una o ambas citotoxinas, también se les conoce como verotoxinas 1y 2 por su efecto citotóxico sobre células Vero, Shiga like toxin (SLT) I y II, toxina de Shiga (Stx) 1 y 2 (Valdivia, 1995).

Estas cepas pueden producir diarrea acuosa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en los seres humanos. Las STEC zoonóticas comprenden las cepas O157:H7 y, con una frecuencia cada vez mayor, otras cepas distintas. A todas estas se les clasificó como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), ya que son aisladas de casos clínicos. También se han aislado en animales otro importante subconjunto de cepas de STEC, pero hasta el momento no se lo ha asociado con la aparición de enfermedades animales o humanas (Fairbrother y col., 2006).



## **Factores de virulencia de STEC/ EHEC**

Se han definido varios factores de virulencia, de los cuales la producción de citotoxinas tipo Shiga es la más importante.

Estas citotoxinas codificadas por fagos, llamadas Shiga like toxin (*Stx1* y *Stx2*) por su similitud con la toxina de *Shigella dysenteriae* 1 o bacilo de Shiga, también son denominadas verotoxinas. (Notario y col., 2000)

Las toxinas de Shiga son potentes citotoxinas que destruyen las células Vero y están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Estos dos tipos de toxinas de Shiga, *Stx1* y *Stx2*. Están constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 32.000 d y 5 subunidades B que tienen un peso molecular de unos 7.700 d y fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (globotriaosilceramida, Gb3).

La subunidad A es translocada al citoplasma e inhibe la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. Todas las *Stx* se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano.

Además de producir *Stx*, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno.

También se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias codificadas en el plásmido pO157 (60 MDa) y posteriormente barren la microvellosidad intestinal por la acción de unas proteínas presentes en su membrana externa que están controladas por el gen cromosómico *eae* y reciben el nombre de *intiminas*, codificado este gen por la isla de patogenicidad denominada LEE (*locus enterocyte effacement*) (Blanco y col., 2000)

## **PATOGENESIS DE LA INFECCIÓN EN BOVINOS**

En animales infectados natural o experimentalmente las lesiones producidas por las cepas de *Escherichia coli*, productoras de citotoxinas, ocurren principalmente en ciego y colon distal; con presencia de erosiones y úlceras, histológicamente los enterocitos se presentan cuboidales y no parece existir la predisposición particular por algún tipo de célula en la mucosa .

También se puede observar edema extenso, erosiones, úlceras y hemorragias en otro sitio del tracto gastrointestinal sin que demuestre colonización bacteriana, el aspecto de la diarrea ha sido definido como " disenteriforme ".

Los cuadros clínicos- patológicos que se presentan en el bovino por estas cepas de *Escherichia coli* son: septicémico enterotóxico y enterotoxémico (enfermedad edematosa bovina). A pesar de que se aíslan frecuentemente cepas EHEC productoras de Stx, en bovinos son pocas las comunicaciones en los que se les ha podido asociar con cuadros clínicos entéricos.

La patogenia y patología en el bovino no ha sido completamente esclarecida, el problema se ha estudiado fundamentalmente considerando al bovino como un reservorio y fuente de infección para el humano, dado que se han identificado los mismos serotipos bacterianos y tipos de Stx en ambas especies (Valdivia y col., 2000)

# **PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN EN HUMANOS**

## **Síndrome uremico hemolítico**

### **Definición**

Es una enfermedad que se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia (deficiencia plaquetaria), defectos de la coagulación y signos neurológicos variables.

### **Causas, incidencia y factores de riesgo**

Esta enfermedad es más común en los niños y se presenta frecuentemente después de una infección gastrointestinal, usualmente causada por un serotipo específico de la bacteria *Escherichia coli* O157:H7. El síndrome urémico hemolítico era raro, pero recientemente su incidencia en niños se ha elevado y en la actualidad constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda en este grupo de población. Varios brotes epidémicos en los años de 1992 y 1993 se atribuyeron a hamburguesas contaminadas con *Escherichia coli* que no estaban bien cocidas; razón por la cual las hamburguesas de los supermercados tienen nuevas etiquetas y se han publicado guías con las temperaturas necesarias para su cocción en las cadenas de comidas rápidas y restaurantes.

Este síndrome es menos común en adultos y en este grupo de población se presenta principalmente en pacientes con cáncer que han recibido quimioterapia con 5 fluoracilo (5-FU).

Los factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad se desconocen, pero se ha informado de su asociación ocasional con otras enfermedades e infecciones. El síndrome urémico hemolítico (SUH), generalmente comienza con síntomas como vómito y diarrea, la cual puede ser sanguinolenta. En un período de una semana el paciente desarrolla debilidad e irritabilidad y el gasto urinario disminuye significativamente, llegando casi a suspenderse. Además, el paciente rápidamente se torna pálido y anémico, dado que los glóbulos rojos sufren un proceso de destrucción (Shihabi., 2005).

### III ANTECEDENTES

Las infecciones en humanos por *Escherichia coli* se han clasificado en diversas formas, las de origen intestinal como colibacilosis y estas a su vez en patotipos involucrados, uno de ellos como infecciones por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) o como productora de toxina de Shiga (STEC).(Torres y col., 2005)

Entre los factores auxiliares de virulencia de estas cepas se encuentran la producción de citotoxinas (Verotoxinas, Toxina semejante a Shiga o Toxina de Shiga), la producción de la lesión de *attaching and effacement* (EAF) y la presencia de algunas *adhesinas* como los *pilis Bfp* (Blanco y col., 2000).

Los bovinos se han relacionado como reservorios de las cepas que a su vez infectan a los humanos produciendo el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la colitis hemorrágica; sin embargo han existido algunos reportes de alteraciones clínicas en los bovinos, principalmente en terneros, produciendo lesiones que generan un edema generalizado “enfermedad edematosa bovina”

En un estudio realizado en 1994 en la FESC, se lograron aislar varias cepas de un brote de diarreas y edema en becerros, las cuales correspondieron con la descripción de cepas del grupo EHEC, entre los aislamientos se distinguió una cepa del serotipo O157:H-, la cual contiene los genes *stx1*, *stx2*, *eae*. Esta cepa fue inoculada en un modelo animal en conejo y desarrollo las mismas lesiones, pero de menor intensidad, que la cepa testigo EDL933med (O157:H7, patógena para humanos).

Actualmente han sido publicadas diversas alteraciones in vitro de células linfoides de bovino, principalmente relacionadas a las toxinas Stx, tanto de cepas aisladas de bovinos como de cepas de otros orígenes (Valdivia y col., 1995).

En un modelo animal desarrollado en conejos en la FESC (Valdivia y col., 1995) se ha logrado demostrar el efecto sobre el sistema inmune de los conejos provocado por la cepa de referencia EDL933med y algunas mutantes de ella. Estos hallazgos soportan la hipótesis de que las cepas del grupo EHEC contienen los mismos factores de virulencia, pero la diferencia de susceptibilidad de las diversas especies animales radica fundamentalmente en las *adhesinas* y los receptores celulares para ellas (Valdivia y col., 1995).

## **IV OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES**

Determinar los factores auxiliares de virulencia de *Escherichia coli* , (toxinas *stx1*, *stx2* y adherencia *eae*) en aislamientos de becerros y animales adultos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.- Aislar cepas de *Escherichia coli* a partir de bovinos de la zona de influencia de la FESC (área norte de la zona metropolitana).
- 2.- Detectar la presencia de los genes *stx* y *eae* en las cepas de *Escherichia coli* aisladas mediante PCR multiplex.
- 3.- Identificar cepas productoras de toxina Stx , previamente positivas a algunos de los genes *stx1*, *stx2* en la técnica de PCR, a partir de ensayos sobre la línea celular Vero.
- 4.- Identificar el serotipo de las cepas que contienen genes *stx1* y/o *stx2*.

## **V MATERIAL Y MÉTODOS**

### **OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se estudiaron 40 animales en la zona norte del valle de México, de los cuales 23 de ellos se encontraban sanos y 17 enfermos

#### **Obtención de cepas**

Se obtuvieron cepas de 13 casos de bovinos proporcionados por el Dr. Guillermo Valdivia Anda, del cepario del Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario, de los cuales se aislaron cepas pertenecientes a 7 bovinos en el año 1994 procedentes de un hato de producción láctea y de engorda de manera intensiva, en el municipio de Tepotzotlán, Méx.(Valdivia, 1995), las cepas se encontraban en medio agar soya tripticaseína inclinado, en diferentes fechas de resiembra, se les determino la viabilidad en agar Eosina azul de metileno y una vez obtenida se escogieron las cepas.

Las otras cepas pertenecientes de 6 bovinos se aislaron en el año 2005, de lo cual, uno de ellos corresponde a una necropsia de un bovino sexo hembra de una edad de 5 años, dedicada a la producción láctea el cual presentaba signos de emaciación severa, las mucosas se presentaban pálidas y de una tonalidad amarillenta, el diagnóstico morfológico fue de ictericia severa, emaciación severa, anemia severa, hepatomegalia, focos de necrosis moderada, esplenomegalia moderada y pericarditis, tomándose de varios órganos muestras para permitir un aislamiento bacteriano, los otros 5 casos pertenecen a bovinos sexo hembras de 2 meses de edad pertenecientes al mismo hato que el bovino anterior, presentando diarrea, de las cuales se les tomo una muestra por hisopo rectal

#### **Aislamientos**

Los aislamientos se obtuvieron a partir de animales del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en Carretera Cuautitlán- Teoloyucan Km. 2.5, colonia San Sebastián Xala municipio Cuautitlán Izcalli Estado de México, dedicada a la producción láctea de tipo intensivo Se recolectaron muestras de heces mediante hisopo rectal en 20 bovinos sanos con una edad promedio de 5 a 7 meses, se manejaron con el medio de Caldo de Soya tripticaseína como transporte y fueron sembradas dentro de las 2 horas siguientes en agar Eosina azul de metileno.

También se obtuvieron aislamientos procedentes del Rancho El Peral, ubicado en la Carretera Cuautitlán- Teoloyucan Km. 5.5 San Lorenzo municipio Cuautitlán Izcalli Estado de México, dedicada, a la producción láctea de tipo intensivo Se recolectaron muestras de heces mediante hisopo rectal en 7 bovinos con una edad promedio de 40 días (4 animales) y de 8 meses (3 animales), presentando cuatro de ellos diarrea recurrente, se manejaron con el medio de Caldo de Soya tripticaseína y fueron sembradas dentro de las 2 horas siguientes en agar Eosina azul de metileno.

Todas las pruebas fueron realizadas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. En la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA).

#### **AISLAMIENTO DE *Escherichia coli***

Todas las muestras una vez sembradas en agar Eosina azul de metileno (EMB) (Bioxon) fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, se seleccionaron 5 colonias al azar de cada placa se sembraron en agar soya tripticaseína (Bioxon) con la misma constante de incubación, una vez obtenidas colonias aisladas, se efectuó identificación bioquímica. En total se obtuvieron 5 cepas de cada caso.

A las cepas se les codificó para un manejo adecuado con las siglas PRAP (Patricia Regina Aranguré Peraza) seguidas de un número que va indicando el orden en que se obtuvieron y trabajaron.

#### **IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

Se realizaron las siguientes pruebas: Tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa

Pruebas secundarias: Citrato de Simmons (Merck), Urea (Bioxon), Sorbitol (Se utilizó Base caldo rojo de fenol (Bioxon) adicionado con 3% de D-sorbitol (Sigma), Rojo de metilo y Voges Proskauer (MR-VP) (Bioxon).

Pruebas múltiples: Triple Hierro Azúcar (TSI) (Bioxon), Lisina Hierro Agar (LIA)(Bioxon) y Movilidad, Indol y Ornitina (MIO) (Bioxon)

**Tabla 3 CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS**

<b>Cepas de Referencia</b>	<b>Factores de virulencia</b>	<b>Obtención</b>
EDL933med (O157:H7)	Productora de Stx1 y Stx2	Facultad de Medicina de la UNAM

933J	Productora de Stx1	Dr. Guillermo Valdivia Anda
933W	Productora de Stx2	Dr. Guillermo Valdivia Anda
EDL933Δ-LER	Productora de Stx1 y Stx2	Instituto de Biotecnología de la UNAM
K12 C600	Apatógena	Dr. Guillermo Valdivia Anda

### **CARACTERIZACIÓN DE FACTORES AUXILIARES DE VIRULENCIA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Se sembraron las cepas en agar soya tripticaseína en caja de Petri con estría continua, se incubó a 37 °C, se procedió a tomar de la siembra una asada considerable del cultivo y se colocó en un tubo Eppendorf el cual contenía un 1ml de agua destilada estéril.

Los tubos Eppendorf se colocaron en baño María a ebullición por 10 minutos para promover la lisis celular, después se colocaron en hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 14000rpm por 2 minutos. Como iniciadores se utilizaron las siguientes secuencias (López y col., 2003).

**Tabla 4** Secuencia utilizada para la técnica de PCR

GENES	Primers	Bases	Pares de bases amplificados (pb)
stx1	F:5 CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3 R:5 AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3	22 21	150
stx2	F:5 GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3 R:5 TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3	21 22	255
Eae	F:5 GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3 R:5 CCA CCT GCA ACA AGA GG3	20 20	384

**Tabla 5** Reactivos empleados para una reacción total de 25µl.

	Concentración	Cantidad
Buffer	10x	2.5µl
MgCl <sub>2</sub>	50Mm	1µl

DNTPS	200µM	2µl
Primers	3 genes	3.5µl
Agua bidestilada		13.8µl
Taq polimerasa		0.2µl
DNA		2µl
		25µl

En un tubo Eppendorf se mezclaron los reactivos de la tabla 5. Teniendo presente que la Taq polimerasa se manejó en frío, en ultimo lugar se agregó el lisado y se homogeneizó. Siempre acompañado con un testigo positivo y negativo, en este caso se utilizó como testigo negativo la cepa K12 y como testigo positivo una cepa O157:H7, ambos se manejaron en las mismas condiciones que las cepas problemas.

Se colocó las muestras en un termociclador PTC-100™ Programmable Thermal controller (MJ Research Inc.), con los parámetros que se muestran en la tabla 6:

**Tabla 6** Parámetros del termociclador para PCR múltiplex

Ciclos	1	2	3	4	5	6
Temperatura	94°C	50°C	72°C	94°C	50°C	72°C
Tiempo	5min	2min	0.45seg	0.45seg	0.45seg	10min
Repeticiones	Una sola vez	Una sola vez	Se repite 35 veces			Una sola vez

Parámetros utilizados para genes de Toxina de Shiga 1 y 2 y gen eae.

## TÉCNICA DE ELECTROFORESIS

Se preparo TAE 1X de la siguiente forma; se tomo 100ml de TAE 10X el cual se mezcló en 100ml de agua destilada estéril, posteriormente se preparó el gel de agarosa al 2% el cual consta de 30ml de TAE 1X mas 0.6g de agarosa, se clarificó hasta que el medio quedó reconstituido.

Se vació el gel de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis un poco antes de que solidifique se le colocó el peine, una vez gelificado completamente se procedió a retirar el peine y las bases que contienen al gel.

Se montó el sistema en una cámara para electroforesis y se le agregó TAE 1X, hasta que cubriera a el gel de agarosa solidificado, posteriormente se colocaron las muestras:

Se colocó 2µl de buffer de corrida y 10µl de muestra previamente mezclados sobre plástico parafin, dejándose 40 minutos en la cámara de electroforesis con un voltaje de 87 miliamper.

Se preparó el bromuro de etidio de la siguiente forma: 5µl de bromuro de etidio en 200ml de TAE 1X bien mezclados.

Posteriormente se sumergió el gel en la mezcla de bromuro de etidio aproximadamente 40 minutos para el revelado del mismo.

Se procedió a tomar la lectura del gel en el transluminador ultravioleta.

## **ENSAYOS SOBRE LINEA CELULAR VERO**

### **Obtención de la línea celular Vero**

Células Vero ( células de riñón de mono verde africano)

La línea celular Vero fue donada por el laboratorio de Citología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

### **Conservación de línea celular Vero.**

Las cajas de Petri con una monocapa de 24 a 48h de crecimiento les fue retirado el MEM y se procedió a realizar un lavado con 2ml de EDTA posteriormente se mezcló se le vertieron 2ml de tripsina al 5% para provocar el desprendimiento de la monocapa y se dejó reposar 10 minutos.

A las cajas triptinizadas se les vertió 2ml de MEM al 5%, lavando tres veces y se le vertió de 3 a 5 gotas del MEM en las caja nuevas desechando el resto, se rellenó con 10ml de MEM, posteriormente se le colocó 5ml de MEM a las cajas triptinizadas, todas ellas se incubaron a 37°C con una inyección de CO<sub>2</sub> al 5% por 24 a 48 horas.

El MEM al 5% es para mantener la línea celular y al 10% adicionado con aminoácidos no esenciales es para crecimiento rápido.

**Preparación de microplacas para la detección de toxina de Shiga (Stx)** (Zamora y col., 2000).

Se utilizaron microplacas de 12 pocillos en las cual se inoculo cultivo celular Vero en MEM, suplementado con 5% de suero fetal bovino en una cantidad de 2ml por pocillo,

se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas con una inyección de CO<sub>2</sub> al 5%, hasta la formación de la monocapa celular.

Posteriormente a la incubación se observó al microscopio invertido para confirmar la confluencia del cultivo celular adecuada, confirmada la confluencia al 100%, se procedió a preparar las microplacas para el sembrado bacteriano.

Se preparo el agar purificado al 1%, se utilizo un baño María a una temperatura constante de 45°C en el cual se colocó una solución de MEM y suero fetal bovino al 10%, se procedió también a colocar el agar purificado al 1% en el baño María, ya establecido que los dos medios se encontraban a la temperatura de 45°C se mezclaron perfectamente, posteriormente en la campana se procedió a colocar el medio en las microplacas, pero anteriormente se retiró el medio contenido en las microplacas, y posteriormente con una pipeta estéril se vertió 2ml en cada pozo del medio realizado posteriormente, se esperó a la solidificación.

Obtenida la solidificación y enfriado a temperatura ambiente se revisó en un microscopio invertido el contenido celular, se sembró en cada pozo una colonia de *Escherichia coli* problema positiva anteriormente a los genes en la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando un testigo negativo en el cual este caso se utilizó la cepa K12, y un testigo positivo el cual fue la Delta-ler, una ves sembrado se colocó en tensión parcial de CO<sub>2</sub> incubado a 37°C por 72h, procediendo a realizar lectura en un microscopio invertido de la siguiente forma: 24, 48 y 72 horas.

### **Cuantificación de la toxina Stx de cepas de *Escherichia coli* problema**

Se realizó inicialmente un filtrado de las cepas problemas.

Se cultivo una colonia de las cepas problemas y como testigo positivo la cepa EDL933med en 5ml de CST (Bioxon) las cuales se incubaron por 18h a 37°C, posteriormente se centrifugo a 6000rpm por 15 minutos a una temperatura de 6°C los 5ml del cultivo realizado .

Se tomó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.2µ de poro (Millipore) en condiciones de esterilidad, los filtrados se guardaron hasta su uso a -20°C.

El sobrenadante de los cultivos previamente filtrados fueron diluidos decimalmente en un amortiguador de fosfato (PBS) , en 4.5ml de PBS se le agregó 5ml del sobrenadante del filtrado hasta la dilución  $10^{-6}$

Se preparó en microplacas de 96 pozos cultivo celular Vero más MEM al 5%, las cuales se incubaron en una atmósfera húmeda con una inyección de CO<sub>2</sub> , hasta tener una confluencia de cultivo celular de al menos del 80% , en ese momento se le retiró el medio y de le agregó 100µl del filtrado, y de sus diluciones decimales obtenidos del sobrenadante de las cepas problemas y como testigo negativo se utilizó PBS posteriormente se les colocó una gota del MEM al 3% .

Se incubaron a 37°C con una inyección de CO<sub>2</sub> al 5% por 96h realizando observaciones diarias de la posible aparición del efecto citopático

### **Serología**

Se realizó la serología con la técnica de aglutinación directa. Una vez obtenido el resultado de PCR se seleccionaron de las cepas positivas a los genes y se cultivo una colonia de las cepas problemas y como testigo positivo se utilizó la cepa EDL933med en 5ml de CST (Bioxon) las cuales se incubaron por 18h a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 6000rpm por 15 minutos a una temperatura de 6°C .

Posteriormente se utilizaron placas de aglutinación en las cuales se les agregó 20 µl del antisuero y 20µl del antígeno se mezcló con un palillo y se realizó por 3 minutos movimientos oscilatorios manualmente a la placa .

Se revisó la aglutinación la cual se observó a contraluz al microscopio.

**TABLA 7** Sueros polivalentes utilizados:

Suero anti- <i>Escherichia coli</i> STEC-EPEC	Suero anti- <i>Escherichia coli</i> EHEC	Suero anti- <i>Escherichia coli</i> O157:H 7
O26, O103, O111, O145, O157	O2, O5, O26, O103, O111, O145, O157	O157

Donados por el Dr. Alejandro Cravioto y el M en C Armando Navarro del Laboratorio de Serología de Medicina de la UNAM.

## VI RESULTADOS

De los 40 animales evaluados en este estudio se obtuvieron un total de 114 cepas, a las cuales se les realizó la identificación bioquímica, obteniendo 98 (86%) cepas de *Escherichia coli* y 16 (14%) cepas pertenecientes a otros géneros distribuidos de la siguiente forma; 2 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 4 cepas de *Proteus vulgaris*, 5 cepas de *Edwardsiella ictaluri*, 3 cepas de *Kluyvera ascorbata*, 1 cepa de *Providencia stuartii* y 1 cepa de *Escherichia adecarboxylata* que representan un porcentaje bajo de aislamiento respecto a las *Escherichia coli* obtenidas (Tabla 8).

Quedando el mismo número de casos (40 bovinos) los cuales eran portadores de *Escherichia coli*.

**TABLA 8** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la ornitina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la Ornitina	*Identificación
PRAP 01	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 02	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 03	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 04	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 05	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 06	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 07	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 08	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 09	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 10	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 11	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 12	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 13	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
 + Positivo, - Negativo  
 \* Se tomo como referencia Bergey's, 1984 para la identificación bioquímica

**TABLA 8A** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
PRAP 16 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 16 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 18	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 18 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 18B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 19	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 19 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 19 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 19 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 19 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 20	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 20 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 20 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 21	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 21 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 21 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 22 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 23	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
PRAP 23 A	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer  
 Sor- Sorbitol  
 +Positivo, - Negativo.

**TABLA 8B** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
PRAP 23 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 23 C	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
PRAP 23 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 24	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 24 A	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 24 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 24 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 24 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 25	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 25 A	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
PRAP 25 B	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
PRAP 25 C	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
PRAP 25 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 26	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 26 A	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 26 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 26 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 26 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
+Positivo, - Negativo

\*Se tomo como referencia el Bergey's 1984 para la identificación bioquímica

**TABLA 8C** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
PRAP 27	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 27 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 27 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 27 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 27 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 28	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 28 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 28 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 28 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 29	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 29 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 29 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 29 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 30 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 30 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 31	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 31 A	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 31 B	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
 + Positivo, - Negativo  
 \*Se tomo como referencia el Bergey's 1984 para la identificación bioquímica

**TABLA 8D** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
PRAP 31C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 31 D	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>
PRAP 33	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 33 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 33 B	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
PRAP 33 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 34	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 34 A	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
PRAP 34 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 34 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 34 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 36	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Kluyvera ascorbata</i>
PRAP 36 A	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>
PRAP 36 B	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Kluyvera ascorbata</i>
PRAP 36 C	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	<i>Kluyvera ascorbata</i>
PRAP 36 D	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Providencia stuartii</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
 + Positivo, - Negativo,

\*Se tomo como referencia el Bergey's 1984 para la identificación bioquímica

**TABLA 8E** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
PRAP 37	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 37 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 37 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 37 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 37 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 38	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 38 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 38 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 38 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 38 D	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Escherichia adecarboxylata</i>
PRAP 39	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 39 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 39 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 39 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 39 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 40	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
 + Positivo, - Negativo  
 \*Se tomo como referencia el Bergey's 1984 para la identificación bioquímica

**TABLA 8F** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico.	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Desaminación de la ornitina	*Identificación
PRAP 40 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 40 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 40 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 40 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 41	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	<i>Proteus vulgaris</i>
PRAP 41 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 41 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 41 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 42 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 42 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 43 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 43 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 43 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
PRAP 43 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT- Catalasa OXI- Oxidasa CIT- Citrato UR- Urea MR- Rojo de metilo VP- Vogues Proskauer Sor- Sorbitol  
 + Positivo, - Negativo

\*Se tomo como referencia el Bergey's1984 para la identificación bioquímica

Las cepas de *Escherichia coli* obtenidas se distribuyeron en 4 diferentes biotipos, encontrando que el mas frecuente fue el de sorbitol positivo, con movilidad positiva representando el 79% de todos los biotipos aislados como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9** Frecuencia de biotipos encontrados en cepas de *Escherichia coli*:

SORBITOL	MOVILIDAD	TOTAL (cepas)	TOTAL (%)
+	+	77	79
+	-	4	4
-	+	16	16
-	-	1	1
	<b>TOTAL</b>	98	100

Símbolo + cepas positivas, - cepas negativas

Para la identificación fue tomado de referencia (Bergey 1984)

Determinación del Sorbitol, se utilizó Base caldo rojo de fenol adicionado con 3% de D-sorbitol , y para determinar la motilidad se utilizó el medio MIO.

Posteriormente a las 98 cepas positivas a *Escherichia coli* se les realizó la técnica de PCR multiplex, fueron organizadas en 11 grupos distribuyéndolas para determinar si contenían algunos de los genes, *stx1*, *stx2* o *eae* en forma simultánea, los grupos formados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10** Grupos de cepas de *Escherichia coli* formados para la técnica de PCR múltiplex

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11
PRAP 13	PRAP 20 D	PRAP 1	PRAP 24	PRAP 26	PRAP 28	PRAP 30 C	PRAP 34 D	PRAP 38 A	PRAP 41 A	PRAP 20
PRAP 16 A	PRAP 21	PRAP 2	PRAP 24 A	PRAP 26 A	PRAP 28 A	PRAP 31	PRAP 37	PRAP 38 B	PRAP 42 A	PRAP 20 A
PRAP 16 B	PRAP 21 A	PRAP 3	PRAP 24 B	PRAP 26 B	PRAP 28 B	PRAP 31 A	PRAP 37 A	PRAP 38 C	PRAP 42 C	PRAP 40
PRAP 18 A	PRAP 21 D	PRAP 4	PRAP 24 C	PRAP 26 C	PRAP 28 C	PRAP 31 B	PRAP 37B	PRAP 39 A	PRAP 43 A	PRAP 40 A
PRAP 18 B	PRAP 22 B	PRAP 5	PRAP 24 D	PRAP 26 D	PRAP 28 D	PRAP 31 C	PRAP 37 C	PRAP 39	PRAP 43 B	PRAP 40 B
PRAP 19	PRAP 23 A	PRAP 6	PRAP 25	PRAP 27	PRAP 29	PRAP 31 D	PRAP 37 D	PRAP 39 D	PRAP 43 C	PRAP 40 C
PRAP 19 A	PRAP 23 B	PRAP 7	PRAP 25 A	PRAP 27 A	PRAP 29 A	PRAP 33	PRAP 38	PRAP 39 C	PRAP 43 D	PRAP 40 D
PRAP 19 B	PRAP 23 C	PRAP 8	PRAP 25 B	PRAP 27 B	PRAP 29 B	PRAP 33 C				
PRAP 19 C	PRAP 23 D	PRAP 9	PRAP 25C	PRAP 27 C	PRAP 29 C	PRAP 34				
PRAP 19 D	PRAP 24	PRAP 39 B	PRAP 25 D	PRAP 27 D	PRAP 29 D	PRAP 34 B				

Los grupos positivos en la técnica de PCR múltiplex fueron 7 los cuales constaban de 67 cepas de *Escherichia coli*, y 4 grupos dieron negativos a cualquiera de los genes quedando integrados por 31 cepas como se observa en la tabla 11.

**Tabla 11** Resultados en la técnica de PCR múltiplex de los grupos de *Escherichia coli*

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11
<i>Genes Encontrados</i>	<i>stx1</i> <i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i> <i>stx2</i> <i>eae</i>	<i>stx1</i> <i>eae</i>	Negativo	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	Negativo	Negativo	Negativo	<i>stx1</i> <i>stx2</i>

*stx1*: toxina de Shiga tipo 1, *stx2*: toxina de Shiga tipo 2, *eae*:

Posteriormente se realizó la técnica de PCR multiplex de manera individual para cada cepa obteniendo 29 cepas negativas para cualquier gen y obteniendo 38 cepas positivas a algún gen *stx1*, *stx2* o *eae* como se muestra en la tabla 5, constando de 21 bovinos representando el 52.5% de 40 bovinos previamente aislados, como se muestra en la tabla 12.

**TABLA 12** Genotipos de las cepas de *Escherichia coli* trabajadas

<i>stx1</i>	<i>stx1, eae</i>	<i>stx2, eae</i>	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>
PRAP 04	PRAP 13	PRAP 23 A	PRAP 01	PRAP 05
PRAP18B	PRAP 16 A	PRAP 23 B	PRAP 06	PRAP 09
PRAP 19 B	PRAP 19	PRAP 24	PRAP 07	
PRAP 19 C	PRAP 19 A		PRAP 12	
PRAP 19 D	PRAP 22 B		PRAP 20	
PRAP 23 D	PRAP 24 C		PRAP 20 A	
PRAP 28 C	PRAP 25			
PRAP 28 D	PRAP 39 B			
PRAP 29				
PRAP 29 A				
PRAP 29 B				
PRAP 29 D				
PRAP 30 C				
PRAP 31 A				
PRAP 33				
PRAP 40				
PRAP 40 A				
PRAP 40 B				
PRAP 40 C				

*stx*: toxina de Shiga, *stx1*: toxina de Shiga tipo 1, *stx2*: toxina de Shiga tipo 2, *eae*: gen que codifica para la intimina

Se observó que el genotipo más frecuente fue *stx1*, respecto al genotipo *stx1* con *eae* que fue ubicado como el segundo en frecuencia, también encontrando una baja frecuencia para el genotipo *stx1, stx2* y *eae* como se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13** Genotipos encontrados en la técnica de PCR multiplex

<b>Genes</b> ( <i>stx1- stx2- eae</i> )	<b>Número de</b> <i>Escherichia coli</i> (cepas)	<b>Porcentaje de</b> <i>Escherichia coli</i> (%)
<i>stx1</i>	<b>19</b>	<b>50</b>
<i>stx2</i>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>stx1, stx2</i>	<b>6</b>	<b>15.8</b>
<i>stx1, eae</i>	<b>8</b>	<b>21</b>
<i>stx2,eae</i>	<b>3</b>	<b>7.9</b>
<i>stx1,stx2,eae</i>	<b>2</b>	<b>25.2</b>
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100</b>

*stx1*: toxina de Shiga tipo 1

*stx2*: toxina de Shiga tipo 2

*eae*: gen que codifica para la intimina

## Detección del daño citopático a partir de línea celular Vero desafiadas con diferentes cepas de *Escherichia coli*

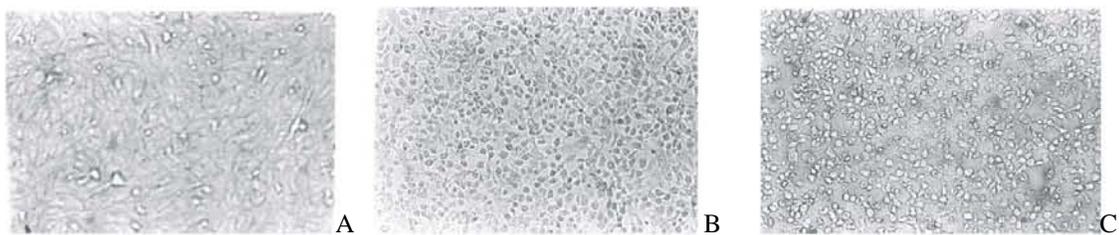
### Prueba cualitativa

Las cepas de *Escherichia coli* trabajadas en este experimento fueron 38, siendo previamente detectadas como positiva a alguno de los genes de la toxina de Shiga con la técnica de PCR múltiple, los resultados de la identificación de la citotoxinas se muestran en la Tabla 14.

El efecto citolítico observado sobre el monoestrato celular de las células Vero, fue igual que el testigo positivo en este caso la cepa  $\Delta$ -ler productora de Stx1 y Stx2, este efecto se presentó a las 24h de incubación produciéndose la destrucción del monoestrato celular, y con algunas cepas se observó citotonicidad (redondeamiento sin lisis) en lugar de daño citolítico sobre las células Vero, aunque cabe destacar que la mayoría presentaron posteriormente daño citolítico (lisis celular).

Los efectos de las cepas de *Escherichia coli* observadas sobre la línea celular Vero de este experimento se muestran en la figura 5.

**Figura 5** Cambios en línea celular Vero a partir de cepas de *Escherichia coli* productoras de *Stx*



A: No se observa cambio en la morfología de la monocapa celular, B se observa redondeamiento celular (efecto citotónico), C: Se observa destrucción completa de la monocapa celular (efecto citolítico)

**Tabla 14** Efecto de cepas de *Escherichia coli* en línea celular Vero

Efecto tóxico	Número de <i>Escherichia coli</i> (cepas)	Porcentaje de <i>Escherichia coli</i> (%)
<b>Citolítico</b>	<b>27</b>	<b>71</b>
<b>Citotónico</b>	<b>6</b>	<b>16</b>
<b>Sin efecto</b>	<b>5</b>	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100</b>

Citotóxico: redondeamiento y lisis celular

Citotónico: redondeamiento sin lisis celular

La técnica utilizada fue la descrita por Zamora y col (2003) con alguna variantes.

La frecuencia de presentación del efecto citolítico fue del 72%, causado por 27 cepas de *Escherichia coli*, seguido del efecto citotónico con el 16% al desafío con 6 cepas y no se observó daño sobre las células Vero en el 13% de los casos al estar presente en 5 cepas.

En la Tabla 15 se muestra por cepa de *Escherichia coli* el daño citopático sobre la línea celular Vero.

**TABLA 15** Efecto citopático de cepas de *Escherichia coli*

CITOLÍTICO	CITOLÍTICO	CITOTÓNICO	SIN EFECTO
PRAP 01	PRAP 23 A	PRAP 04	PRAP 23 D
PRAP 05	PRAP 23 B	PRAP 13	PRAP 24
PRAP 06	PRAP 28 C	PRAP 19 C	PRAP 24 C
PRAP 07	PRAP 28 D	PRAP 22 B	PRAP 33
PRAP 09	PRAP 29	PRAP 25	PRAP 40 C
PRAP 12	PRAP 29 A	PRAP 39 B	
PRAP 16 A	PRAP 29 B		
PRAP 18B	PRAP 29 D		
PRAP 19	PRAP 30 C		
PRAP 19 A	PRAP 31 A		
PRAP 19 B	PRAP 40		
PRAP 19 D	PRAP 40 A		
PRAP 20	PRAP 40 B		
PRAP 20 A			

Posteriormente se seleccionaron 18 cepas de casos representativos al azar que presentan diferentes características genotípicas, para la cuantificación de Stx, en la Tabla 16 y 17 se presentan los resultados, en este experimento se utilizó como testigo positivo la cepa EDL933med productora de Stx1 y Stx2 la cual tubo un efecto sobre las células Vero de  $10^6$  UCCC/100 $\mu$ l a las 72h con un efecto citolítico total (lisis celular).

**Tabla 16** Cuantificación de Stx producidas por las cepas de *Escherichia coli* trabajadas

Cepas de <i>Escherichia coli</i> Trabajadas	Efecto sobre células Vero UCCC/100µl
PRAP 01	10 <sup>6</sup>
PRAP 04	10 <sup>6</sup>
PRAP 05	10 <sup>6</sup>
PRAP 22 B	10 <sup>6</sup>
PRAP 28 C	10 <sup>6</sup>
PRAP 06	10 <sup>5</sup>
PRAP 40	10 <sup>5</sup>
PRAP 09	10 <sup>4</sup>
PRAP 19	10 <sup>4</sup>
PRAP 20	10 <sup>4</sup>
PRAP 23 A	10 <sup>4</sup>
PRAP 16 A	10 <sup>3</sup>
PRAP 07	10 <sup>1</sup>
PRAP 13	10 <sup>1</sup>
PRAP 24	SIN CAMBIOS
PRAP 24 C	SIN CAMBIOS
PRAP 25	SIN CAMBIOS
PRAP 39 B	SIN CAMBIOS

UCCC -Unidad citotóxica en cultivo celular  
Experimento realizado sobre línea celular vero.

**Tabla 17** Frecuencia de Stx producidas por las cepas de *Escherichia coli* trabajadas

Efecto sobre células Vero UCCC/100µl	Número de <i>Escherichia coli</i> (cepas)	Porcentaje de <i>Escherichia coli</i> (%)
Sin efecto	4	22.2
10 <sup>1</sup>	2	11.1
10 <sup>2</sup>	0	0
10 <sup>3</sup>	0	0
10 <sup>4</sup>	4	22.2
10 <sup>5</sup>	2	11.1
10 <sup>6</sup>	6	33.4
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>100</b>

UCCC -Unidad citotóxica en cultivo celular  
Experimento realizado sobre línea celular Vero.

A las 38 cepas de *Escherichia coli* se les realizó serología para determinar si pertenecen a los grupos serológicos EHEC o STEC los resultados se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18** Prueba de serología a las cepas de *Escherichia coli*

Cepas de <i>Escherichia coli</i> Trabajadas	Serogrupo STEC	Serogrupo EHEC	Serotipo O157:H7
PRAP 01	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 04	Positiva	Positiva	Negativa
PRAP 05	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 06	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 07	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 09	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 12	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 13	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 16 A	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 18 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 19	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 19 A	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 19 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 19 C	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 19 D	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 20	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 20 A	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 22 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 23 A	Positiva	Positiva	Negativa
PRAP 23 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 23 D	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 24	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 24 C	Negativa	Positiva	Negativa
PRAP 25	Positiva	Positiva	Negativa
PRAP 28 C	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 28 D	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 29	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 29 A	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 29 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 29 D	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 30 C	Positiva	Negativa	Negativa
PRAP 31 A	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 33	Positiva	Negativa	Negativa
PRAP 39 B	Positiva	Negativa	Negativa
PRAP 40	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 40 A	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 40 B	Negativa	Negativa	No realizada
PRAP 40 C	Negativa	Negativa	No realizada

STEC- *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga  
EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

**Tabla 19** Frecuencia de serogrupos de *Escherichia coli* aisladas

Serología	Número de <i>Escherichia coli</i> (cepas)	<i>Escherichia coli</i> (%)
STEC	3	7.9
EHEC	10	26.3
STEC- EHEC	3	7.9
O157:H7	0	0
Negativas	22	57.9
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100</b>

STEC- *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga

EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

Las 16 cepas de *Escherichia coli* a las cuales se les determino la serología y resultaron positivas a los serogrupos EHEC Y STEC, las características mas importantes se muestran en la tabla en la Tabla 20.

**Tabla 20** Cepas de *Escherichia coli* trabajadas

CEPAS	Identificación del bovino	Genes identificados en la técnica de PCR	Efecto sobre línea celular Vero	Efecto sobre línea celular Vero (UCCC/100µl)	Serogrupo EHEC	Serogrupo STEC	Serogrupo EHEC- STEC
PRAP 01	EDI 28 523 bho 4C	<i>stx1, stx2</i>	Citolítico	10 <sup>6</sup>	Positivo		
PRAP 04	EDI40H-30-B	<i>stx1</i>	Citotónico	10 <sup>6</sup>			Positivo
PRAP 05	EDI 120 527 RPS 1	<i>stx1, stx2, eae</i>	Citolítico	10 <sup>6</sup>	Positivo		
PRAP 06	375RPS1	<i>stx1 y stx2</i>	Citolítico	10 <sup>5</sup>	Positivo		
PRAP 07	EDI527RPS2	<i>stx1 y stx2</i>	Citolítico	10 <sup>1</sup>	Positivo		
PRAP 09	EDI 127 527 RPS 4	<i>stx1, stx2, eae</i>	Citolítico	10 <sup>4</sup>	Positivo		
PRAP 13	V917- enteriva	<i>stx1, eae</i>	Citotónico	10 <sup>1</sup>	Positivo		
PRAP 16 A	872 A	<i>stx1, eae</i>	Citolítico	10 <sup>3</sup>	Positivo		
PRAP 20	877	<i>stx1 y stx2</i>	Citolítico	10 <sup>4</sup>	Positivo		
PRAP 23 A	881 A	<i>stx2 y eae</i>	Citolítico	10 <sup>4</sup>			Positivo
PRAP 24	883	<i>stx2 y eae</i>	Sin cambio	Sin cambio	Positivo		
PRAP 24 C	883 C	<i>stx1 y eae</i>	Sin cambio	Sin cambio	Positivo		
PRAP 25	885	<i>stx1 y eae</i>	Citotónico	Sin cambio			Positivo
PRAP 30 C	6969IVC	<i>stx1</i>	Citolítico	No realizado		Positivo	
PRAP 33	2226	<i>stx1</i>	Sin efecto	No realizado		Positivo	
PRAP 39 B	INQUIRIER B	<i>stx1, eae</i>	Citotónico	Sin efecto		Positivo	

*stx*: toxina de Shiga, *stx1*: toxina de Shiga tipo 1, *stx2*: toxina de Shiga tipo 2

*eae*: gen productor del daño Attachment and effacement (A/E).

Citolítico: redondeamiento y lisis celular , Citotónico: redondeamiento sin lisis celular

STEC- *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga, EHEC- *Escherichia coli* Enterohemorrágicas

De 98 cepas de *Escherichia coli* obtenidas originalmente, 16 cepas fueron positivas a algún serogrupo STEC O EHEC con una frecuencia del 16.32%. De 38 cepas de *Escherichia coli* portadoras de algún genotipo stx1, stx2, eae las 16 cepas representaron una frecuencia del 42.1%

De 40 bovinos 13 de ellos fueron positivos a algún patotipo su frecuencia fue del 32.5% y de los 21 bovinos portadores de 38 cepas positivas a alguno de los genes los 13 bovinos representaron una frecuencia del 61.9%.

## VIII DISCUSIÓN

A las colonias previamente aisladas de bovinos, se les seleccionó por la característica del color verde metálico sobre agar eosina azul de metileno, lo cual fue sugerente de que pertenecían al género *Escherichia*, posteriormente se les realizó la identificación bioquímica, se obtuvo una frecuencia de *Escherichia coli* del 86%, el otro 14% representó a otras bacterias, esto es sugerente de que el brillo verde metálico no es una característica al 100% para la identificación presuntiva de *Escherichia coli*

De las cepas de *Escherichia coli* aisladas, el 79% resultaron positivas en la fermentación del sorbitol y movilidad, y solo 1% resultó con el biotipo sorbitol y movilidad negativa como se muestra en la tabla 9. La literatura (Huguet y col., 2001) sugiere que el fenotipo sorbitol negativo es característico del serotipo O157:H7, pero existen reportes en Chile (Borie y col., 1997) en donde se encontró un 50% de las cepas EHEC O157 aisladas de bovinos que fueron sorbitol positivas, lo que sugiere que este fenotipo, sorbitol negativo, no es común al 100% de EHEC y se deben investigar tanto las colonias fermentadoras como no fermentadoras de sorbitol (Borie y col., 1997). También se han descrito aislamientos del serotipo O157:H7 a partir de alimentos que contienen sorbitol que fueron capaces de mutar de un fenotipo no fermentador a otro que sí posee dicha capacidad, esta posibilidad puede tener importantes consecuencias sobre la utilización del fenotipo sorbitol negativo como método para detectar estos patógenos en las muestras clínicas (Usera, 2005).

Las 98 cepas de *Escherichia coli* aisladas de los 40 bovinos se caracterizaron por medio de la técnica de PCR, esta se ha planteado como una herramienta molecular muy útil en el diagnóstico de enfermedades producidas por patógenos bacterianos (Vidal, 2002). En este caso se utilizaron cebadores que amplifican las secuencias para la identificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*, se obtuvo una frecuencia del 38.8% (38 cepas) positivas a cualquiera de los genes como se muestra en la tabla 12 y resultando 21 bovinos portadores de cepas de *Escherichia coli* positivas a algún gen con una frecuencia del 52.5% .

De los genotipos encontrados el *stx1*, con o sin presencia del gen *eae* fue el más aislado con una frecuencia del 27.5% del total de los 40 bovinos, lo cual coincide con estudios

realizados en Chile (Borie y col., 1997) en donde el genotipo mas frecuentemente aislado fue el *stx1* en bovinos con una frecuencia del 72.5%, a diferencia con el genotipo encontrado en estudios realizados sobre bovinos en Argentina (Notario y col., 2000) que fue la presencia de cepas portadoras de genes para ambas toxinas, *stx1* y *stx2*, con una frecuencia del 44.1% y lo que se encontró en Estados Unidos donde el genotipo más frecuentemente observado fue *stx2* (Beutin y col., 1993).

Las 38 cepas de *Escherichia coli* a las cuales se les determinó la producción de toxina de Shiga de manera cualitativa sobre cultivo celular Vero, en donde se considero como positivas a Stx aquéllas con actividad citotóxica manifestada por retracción del citoplasma, redondeamiento celular, condensación y lateralización del núcleo; se obtuvo una frecuencia de cepas positivas a la producción de citotoxina del 71% como se muestra en la tabla 14, comparando con un experimento realizado en 1995 (Valdivia, 1995) que fue del 63% se obtuvo una frecuencia similar, y comparada con estudios realizados sobre cepas O157:H7 productoras de Stx procedentes de casos diarreicos de niños, en la Habana Cuba donde se muestran resultados más elevados en los cuales se obtuvo 94 %de frecuencia. (Ramírez y col., 1999).

En el presente estudio el 80% de las cepas presento efecto citolítico a las 24 h de incubación y las restantes fueron positivas entre las 48 h y 72 h. Esto corresponde con lo hallado por otros autores que detectaron un 78% del efecto citolítico las primeras 24 horas. (Ramírez y col., 1999). En algunos cultivos se observó solo daño citotónico de las cepas de *Escherichia coli* positivas a los genes *stx1*, o *stx2*, posiblemente este efecto se debe a que no son productoras de la toxina de Shiga, también dicho efecto pudiera deberse al factor de necrosis celular (CFN) o a la misma toxina LT la cual produce este efecto citopático (Valdivia, 1995).

Las cepas que contienen los genes *stx1*, o *stx2*, *eae* no produjeron ningún efecto citopático puede ser debido a que no se expresen sus genes para la producción de la toxina.

En la prueba cuantitativa sobre la línea celular Vero se seleccionaron 18 cepas al azar de *Escherichia coli* positivas a alguno de los genes de la toxina, se obtuvo un 44.5%, como se muestra en la tabla 17, de cepas altas productoras de la toxina de Shiga, este efecto es parecido a la cepa de referencia EDL933med la cual es alta productora de toxina de Shiga, se puede asumir que un alto porcentaje de las cepas seleccionadas también son altas productoras, esto concuerda con el estudio realizado por Valdivia (1995).

La frecuencia de EHEC observada en este estudio es de 26.3% equivalente a 10 cepas y 7 bovinos, la frecuencia de STEC equivalente a 3 cepas en 3 bovinos con una frecuencia del 7.9%, reacción positiva con el serogrupo EHEC-STEC fue equivalente a 3 cepas en 3 bovinos con una frecuencia del 7.9% ello indica una frecuencia total de 13 bovinos (32.5%) respecto de los 40 bovinos como se muestra en la tabla 19, lo que indica una similitud en frecuencia comparado con el 44.1% de 68 bovinos encontrados por Notario en el 2000 y una alta frecuencia donde Wells y col, en 1991 encontró menos del 3% en terneros y vacas lecheras en el estado de Washington, USA, donde habían ocurrido brotes de gastroenteritis y SUH.

En otros estudios no se ha encontrado predominio de las cepas EHEC con relación al sexo ni a la raza y aparentemente se aísla con mayor frecuencia en animales jóvenes (Wells y col., 1991; Wilson y col., 1992). En los resultados de este trabajo se encontraron 12 animales portadores de patotipos con una edad de menos de 5 meses y un animal adulto.

De los 13 bovinos, 8 de ellos presentaban diarrea sanguinolenta todos ellos menores de 3 meses a excepción del adulto de 5 años de edad y los otros 5 restantes también menores de 5 meses se encontraban en buen estado de salud.

Esto demuestra la frecuencia sobre animales jóvenes, en nuestro estudio del 93.2%, y la frecuencia de enfermedad del 61.5% respecto al aislamiento de estos serogrupos.

A pesar de que no se encontró el serotipo O157:H7 y que generalmente se ha pensado que los serogrupos no correspondientes a O157 son menos capaces de causar enfermedad severa en humanos, cabe destacar que últimamente ha habido un aumento en la incidencia de enfermedades severas atribuidas a serogrupos no O157 lo que indica que no necesariamente el serogrupo tiene correlación con la virulencia, siendo este un factor asociado a una mayor frecuencia de aislamiento de cepas con serogrupos particulares (Donnenberg, 2002), (Valdivia, 1995). Aunque la mayoría de los brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica y SUH en el mundo han sido provocados por

EHEC del serotipo O157:H7, eso no quiere decir que la producción de toxina de Shiga (Stx1 y Stx2) se restrinja a las cepas del citado serotipo. Las EHEC causantes de infecciones en seres humanos pertenecen a un amplísimo abanico de serotipos, habiéndose detectado la producción de toxinas de Shiga en cepas pertenecientes a 130 serogrupos O y 251 serotipos (Blanco y col., 2000).

La proporción de portadores de STEC y EHEC en los hatos vacunos varia enormemente desde un 1 hasta un 80%. (Donnenberg, 2002), en nuestro proyecto se encontró un 32.5% positivos del total de los 40 bovinos trabajados.

La mayoría de los estudios epidemiológicos se han enfocado al ganado vacuno en el que se han encontrado mas de 100 diferentes serotipos O:H de los grupos STEC y EHEC distribuidos en locaciones geográficas muy diversas(Donnenberg, 2002), cabe destacar que en México se muestreo a 12, 654 personas para la detección de categoría de *Escherichia coli* diarreogénica y solo el 2% perteneció a el serogrupo EHEC no O157:H7(LNR, 2001), por esto no se deben descartar las 22 cepas que contienen los genes y que dieron negativos a la técnica de serología ya que se utilizaron sueros polivalentes con serotipos que afectan principalmente a humanos y descartando otros más comunes en el ganado vacuno como se muestra en la tabla 21, a pesar de ello se debe de tomar en cuenta el alto porcentaje, de 42.1%, de EHEC Y STEC encontrado en este trabajo.

**TABLA 21** Principales serotipos patógenos de EHEC en bovinos y humanos

Serotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreogénicos para bovinos.	Serotipos de <i>Escherichia coli</i> causantes de infecciones extraintestinales para bovinos. (septicemia)	Serotipos de <i>Escherichia coli</i> causantes de infecciones extraintestinales para bovinos. (mastitis)	Serotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreogénicos humanos
*O5:H- O8:H8,H9 O20:H19 *O26:H11 *O103:H2 *O111:H8,H11,H- O118:H16 *O145	O8 O9:K30 O11 O15 O20 O21 *O26 O35 O45 O55 O78:K80 O86 O115 O117 O137:K79 O153	O1:H55 *O2:H- O4 *O5:H- O6:H48 O8 O13 O40:H32 O40:H55 O40:H- O65:H30 O65:H- O74 O104 O107:H- O109 O113:H- O117:H- O120:H- O130:H- O138:H8 O146:H21 O150 O151:H10 O151:H- O154:H- *O157	O1:H7,H- *O2:H5 O8:H2,H- O9:H21 O15:H- O22:H8 O25:H- *O26:H11,H- O55:H- O76:H19 O77:H41 O84:H2 O91:H14,H21,H- O98:H- *O103:H2,H7,H25 O104:H21 *O111:H2,H8,H- O113:H4,H21,H32 O117:H4,H7 O118:H2,H12,H16 O121:H19 O128:H2,H- O129:H- *O145:H28,H- O146:H21,H28 O150:H- O153:H21,H33,H- *O157:H7,H- O165:H25 O166:H28 O174:H- ONT:H8,H19, H21,H-

(Blanco y col., 2000)

\* Serotipos utilizados para la identificación serológica

## IX CONCLUSIONES

En este estudio se pudo determinar que los bovinos en la zona norte del valle de México son portadores de cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina de Shiga, esto se determinó por la estandarización de PCR múltiplex, en el cual se observó la presencia de genes stx1, stx2 y eae, por otra parte la producción de la toxina de Shiga 1 y 2, se determinó por medio de la estandarización sobre ensayos en línea celular Vero de forma cualitativa y cuantitativa, y por medio de serología se encontraron serogrupos con posibilidad de ser patógenos en el hombre, todo esto se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Esto demuestra que a pesar que no se existen reportes de casos en humanos por EHEC en México, se debe de tener en cuenta al ganado vacuno como reservorio importante de este patógeno, ya que son portadores de cepas de *Escherichia coli* con todos los factores de virulencia para la presentación en el ser humano.

## X BIBLIOGRAFÍA

- 1 Benenson A.S. 1997. Manual para el control de las enfermedades transmisibles, Décimo sexta edición, edit Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública, publicación Científica, edit Organización Panamericana de la Salud.
- 2 Bell C., Kyriakides A. 1998. *E. coli* Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos, edit Acribia. Primera Edición. pág. 2-12.
- 3 Berguey D. 1984. Manual of sistematic Bacteriology Edit Board , Vol. 1 pág. 414-416
- 4 Berche P. 2002. L'émergence de nouveaux risques infectieux d'origine alimentaire. Annales de Biologie Clinique. Volume 59, Numéro 5, 585-91.
- 5 Blanco J., Blanco M., Blanco J., Mora A., Alonso M., González E., y Bernárdez H. 2000. Serotipos y genes de virulencia de *Escherichia coli* verotoxigénicos Tipado por PCR de los genes de la isla de patogenicidad LEE de *E. coli* verotoxigénicos y *E. coli* enteropatógenicos edit. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. Pág. 1-15
- 6 Blanco J., Blanco M., Blanco J., Mora A., Alonso M., González E., Bernárdez H., 2000 *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Edit. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. pág 1-22.
- 7 Beutin L., Geier D., Seinruck H., Zimmermann S., Scheutz F 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven diferent species of healthy domestic animals. J EDIT. Clin Microbiol. 31: 2483-8.
- 8 Bono J., Keen J., Miller L., Fox J., Chitko-McKown C., Heaton P. and Laegreid William W. 2004. Evaluation of a Real-Time PCR Kit for Detecting *Escherichia coli* O157 in Bovine Fecal Samples edit. Appl. Envir. Microbiol. 70: 1855-1857.
- 9 Borie C; Monreal Z., Guerrero P., Sánchez M., Martínez., Arellano., Prado. 1997 Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, edit. Arch. med. Vet., vol.29, no.2, p.205-212.
- 10 Brett K., Hornitzky M., Bettelheim K., Walker M. and Djordjevic S. 2003. Bovine Non-O157 Shiga Toxin 2-Containing *Escherich coli* Isolates Commonly Possess *stx2*-EDL933 and/or *stx2v*hb Subtypes J. Edit. Clin. Microbiol. 41: 2716-2722.
- 11 Cicuta M., Deza N., Roibón W., Pereyra D., Benitez M., Arzú R., Boehringer S. 2006. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina *Shiga* en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. Rev.vet.17:1, pág. 20 –25.

- 12 Cowan S. T. 1974 Manual for the identification of medical bacteria, Edit. Cambridge University, USA. Pág. 106-110.
- 13 Donnernberg M. 2002 Virulence mechanisms of versatile pathogen, edit. Elsevier science USA.
- 14 Fairbrother J. M., Nadeau E. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 25 (2), 555-569
- 15 [Huguet J., Huapaya B., Salazar E. 2002](#) Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001 edit. Rev. Perú Med Salud Pública pág. 63-67
- 16 Hurley P., Jacewicz M., Thorpe C., Lincicome L., King A., Keusch G. and Acheson D. 1999 Shiga Toxins 1 and 2 Translocate Differently across Polarized Intestinal Epithelial Cells, infect. Immun. 67 (1): 197-202
- 17 Konowalchuk J., Speire J., Stavric S. 1977 Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*; 18: 775-9.
- 18 Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la vigilancia de la resistencia a los antibióticos en relación con cólera y diarreas es el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), Secretaría de la Salud, Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos 2001 Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos, pág. 65-67.
- 19 McNally., Roe A., Simpson S., Thomson-Carter F., Hoey E., Currie C., Chakraborty T., Smith D., Gally D. 2001, Differences in Levels of Secreted Locus of Enterocyte Effacement Proteins between Human Disease-Associated and Bovine *Escherichia coli* O157 *Infect. Immun.* 69: 5107-5114.
- 20 Mac Faddin Jean F. 1993 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Edit. Panamericana. Pág. 227-299.
- 21 Marzocca M., Marucci P., Sica M., Álvarez E. 2006 Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas Revista Argentina Microbiología. vol.38 no.1, pág 1-3.
- 22 Menge, C., Blessenohl M., Eisenberg T., Stamm I., Baljer G. 2004. Bovine Ileal Intraepithelial Lymphocytes Represent Target Cells for Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72: 1896-1905.
- 23 Menge C., Wieler L., Schlapp T., Baljer G. 1999. Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli* Blocks Activation and Proliferation of Bovine Lymphocyte Subpopulations *In Vitro Infect. Immun.* 67: 2209-2217

- 24 Naylor S., Low C., Besser T., Mahajan A., Gunn G., Pearce M., McKendrick I., Smith D., Gally D. 2003. Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host infect. 71:1505-1512
- 25 Notario R., Fain J., Prado J., Ríos V., Borda O., Gambandé G Telma. 2000 Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágico en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal Revista médica Chile vol. 128 n. 12 .pág 2- 20
- 26 OMS ( Organización Mundial de la Salud). 2001, IV reunión de la red de vigilancia de enfermedades emergentes del cono sur Asunción , Paraguay 30 Mayo- 1 de junio Tema El síndrome urémico Hemolítico(SUH), y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)
- 27 [Ramírez M., Morier L., Alonso J., Bravo L., Cabrera R., Fernández A.](#) 1999 Determinación de verotoxinas en cepas de *Escherichia coli* 0157:H7, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Rev Cubana Med Trop v.51 n.3. pág. 2-6.
- 28 Rashid R., Tami A., Oatley M., Besser T., Tarr P I., Moseley S. 2006 Expression of Putative Virulence Factors of *Escherichia coli* O157:H7 Differs in Bovine and Human Infections infection and immunity, July, p. Copyright ©, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 74, No. 7, 4142-4146.
- 29 Ritchie J., Waldor M. 2005. The Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Effector Proteins All Promote Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenicity in Infant Rabbits Infect. Immun. 73: 1466-1474.
- 30 Rivas M., Balbi L., Miliwebsky E., García B., Tous M., Leardini N., Prieto N., Chillemil G., Principi M. 1998 Síndrome Urémico Hemolítico en niños de Mendoza Argentina, Asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Medicina - Volumen 58 - Nº 1. Pág 7-14.
- 31 Rivero m., Padola N., Etcheverría A, Parma A. 2004. *Escherichia coli* Enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico , Medicina (Buenos Aires), Volumen 64, pág 352-356.
- 32 [Rodríguez F.](#), *Escherichia coli* 0157:H7 ¿Un emergente para el Siglo XXI?" conferencia pronunciada Fecha: 08-06-2000
- 33 Satz L., Kornbliht A. 1993 la Reacción en Cadena de la Polimerasa, el método y sus aplicaciones, Revista de divulgación científica Ciencia hoy, vol4 numero 23 .
- 34 Shiabi Samer. 2005. Síndrome urémico hemolítico, Copyrihgt Walgreen. Pág. 510
- 35 Stevens M., Roe A., Vlisidou I., Pauline M., La Ragione R, Angus B., Woodward., Gally D., Wallis T. 2004 Mutation of *tox B* and a Truncated Version of the *efa-* Gene in *Escherichia coli* O157:H7 Influences the Expression and Secretion of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Proteins but not Intestinal Colonization in Calves or Sheep, infection and immunity,

- 36 Stockbine N., Marques L., Newland J., Smith H., Holmes R., O'Brien A. 1986 Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect Immun*; 53: 135-40.
- 37 Torres A., Zhou X., Kaper J. 2005. Adherence of diarrheogenic *Escherichia coli* O157:H7 strings to epithelial cells infect. *Immunu*.
- 38 Usera Miguel A 2005 *Escherichia coli* O157 productor de verotoxina: un resumen práctico EDIT. Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.
- 39 Valdivia A.G. 1992 *Escherichia coli* Citotóxicas aisladas de Terneros. Memorias del XXII Congreso Nacional de Microbiología, Junio, Acapulco Gro.
- 40 Valdivia A. G. 1997. Aislamiento de una cepa de *Escherichia coli* O157:H- Verocitotóxica a partir de un cuadro de diarreas en terneros. Memorias del XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz.
- 41 Valdivia A.G. 1997 Técnica quirúrgica de apendicetomía, con mantenimiento "in situ" como modelo de cirugía experimental en conejos. Memorias del XI Foro de Investigación Multidisciplinaria, FESC, Noviembre, Cuautitlán Izc. Méx.
- 42 Valdivia A.G. Modelo animal en el conejo para el estudio de cepas citotóxicas de *Escherichia coli*. 1995 Tesis de Maestría Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
- 43 Valdivia Anda G. 2002. Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en el apéndice cecal del conejo. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 44 Valdivia G., Tortora P., Eslava C.A., Navarro A., León L.A., Hernández J., Cravioto A., Montaraz C. 1999 Characterization of *Escherichia coli* O157 Isolated from Calves During an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea In Mexico . 99 th General Meeting of American Society for Microbiology , may 30- June 3 1999. Chicago Illinois USA.
- 45 Valdivia A., Cervantes R., Soriano B., Alba H., Montaraz C., Tortora P. 2000 Interacción de cepas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros, *Revista Veterinaria México*, pág 1- 10.
- 46 Vidal O., Carreño C., Vidal A., Arellano C., Solari G., Prado J. 2002. Evaluación de técnicas moleculares e inmunoenzimáticas para la detección de *E coli* enterohemorrágico en brotes de toxi-infecciones alimentarias *Rev Méd Chile*; 130: pág 603-609

- 47** Wells J., Shipman L., Greene K., Sowers E., Green J., Cameron D. 1991 Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E coli* from dairy cattle. *JClinMicrobiol*;29:985-9.
- 48** Wilson J., McEwen., Clarke K, Wilson D., Waltner-Toews C., Gyles. 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle, *Epidemiol Infect.* 108: 423-439.
- 49** Witthan T., Kaye W., Wilson R. 1988 Genetic evidence of clone descendent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*;157(6):1124-33.
- 50** Zamora J., Reinhardt G., Polette M., Macías P. 2000 Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT Y VT, Instituto de microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, casilla 167, V32n.1\_pág. 3 -9.