

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE CEPAS DE *E. coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SEMEJANTE A SHIGA DE CERDO CON ENFERMEDAD DEL EDEMA**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**  
**CLAUDIA IVONNE VÁZQUEZ BORJA**

**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.

***"No existen suficientes experimentos que puedan demostrar que tengo razón,  
pero basta uno sólo para demostrar que estoy equivocado"***

***Albert Einstein***

***"La mayor sabiduría que existe  
es conocerse a uno mismo"***

***Galileo Galilei***

## **AGRADECIMIENTOS**

Trabajo financiado por los proyectos:

**Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN216005.**

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

**Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)  
en 208304.**

**Proyecto de Mejoramiento de la Enseñanza MII 021.**

**Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).**

**El trabajo fue realizado con el equipo e instalación de la Unidad de Investigación  
Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4**

## **A MIS PADRES**

Los seres más maravillosos y extraordinarios que existen en mi vida, por ser quienes son y lo que son. Por su incondicional amor, cariño, comprensión, apoyo, sacrificios, compañía, aliento, cobijo, entre tantos soportes más. No hay confort más rico que el que se encuentra y te hace sentir tener un techo en el que está presente la familia la que por sabido se tiene que nunca te va a dejar solo ante cualquier circunstancia

**ALICIA BORJA LÓPEZ  
MOISÉS VÁZQUEZ HERNÁNDEZ**

Me vieron nacer, hablar, caminar, correr, tropezarme, levantarme, conocen mis defectos y virtudes, saben todo de mi, por todo lo que me inculcaron, por estar conmigo siempre, en lo bueno y malo, por guiarme por un buen camino, por no darle importancia a mis fallas ante ustedes, por la confianza que han y siguen depositando en mi, por seguir apoyándome en todo, por la vida, por todo, que es demasiado y que no terminaría nunca la lista de todo lo que han hecho y dejado en mi, por los innumerables sacrificios que he visto para conmigo y espero algún día poder compensar algún día, por todo lo que soy, por todo lo que han hecho para que yo esté aquí y para que siga adelante, no hay amor más sincero y tan puro como el que viene de ustedes y como el que eternamente les tendré. Los amo y siempre les estaré agradecida, esto no explica todo lo que pienso y siento de tan grandes personajes que afortunadamente tengo como padres.

## **A MI HERMANO**

**MOISÉS VÁZQUEZ BORJA**

Una de las personas más importantes y valiosas en mi vida. Por haber estado y estar siempre, dispuesto a apoyarme y echarme la mano, por aguantarme estos años, por ser un hermano tan chido y por haber colaborado en que yo esté aquí, por tus consejos, por todo lo que implica la vida a tu lado siempre.

## **A MI FAMILIA**

Por todo lo que he aprendido en la convivencia con ustedes, por el apoyo que me han dado al paso de los años, sin ustedes yo no estaría en donde estoy en este momento gracias por todo.

### **MARÍA DE LOS ANGELES ROMERO MONTES**

Vieja, sabes que importancia tienes en mi vida, así como todo lo que ha pasado en ella, en la que siempre has estado para darme consejos, para ubicarme en lo real, para llorar conmigo, para qué describir todo lo que ya conoces? lo malo, lo bueno, lo excitante y espectacular de nuestras vidas. Ha sido muy chido ver el crecimiento y la evolución que hemos tenido en lo personal y profesional y seguimos al pie del cañón, hay tanto que puedo seguir diciendo, pero es sólo nuestro y con que nosotras lo sepamos basta. Gracias por estos años de amistad y demás sentimientos involucrados. De lo que más agradecida puedo estar es por haber conocido a una persona tan extraordinariamente buena persona y amiga como lo eres. Por todo todo todo lo vivido contigo te digo que eres amada por mí. Siempre y para lo que necesites estoy contigo.

### **M.V.Z. NÉSTOR MARTÍN CUENCA VERDE**

Eres de pocas palabras pero las acciones valen más que mil de ellas, me dejaste lecciones de vida, no imagine que al conocerte ibas a ser tan significativo en mi vida. Te agradezco infinitamente todo lo que dejas en mí, eres mi teacher y por toda la ayuda en este trabajo y por los consejos que en ocasiones necesitaba y me los brindaste. En la vida, hay pocas oportunidades de conocer a alguien aun con defectos y virtudes y que lo puedas considerar verdaderamente como a un amigo. Te voy a extrañar como no tienes idea. Las experiencias de vida, en este caso la vida en cuanto a lo académico que fue lo que hizo que nos conociéramos y que hubo en ello conocimiento de nuestra vida personal, todo lo bueno, lo malo, los contratiempos, todo, aunque hayan sido pocos años confirman que no importa tanto el tiempo sino lo que se comparte, en este tiempo que nos la pasábamos gran parte del día juntos era muy chido, tanto que eras la única persona a la que esperaba ver con tantas ganas y que por actividades diferentes de cada uno luego no era posible en verdad extrañaba verte, por lo que te conocí, sea poco o mucho me permitió ver lo valioso y hermoso que eres del alma y por esto llego a la conclusión de que te amo y de que tienes a una amiga que siempre estará para lo que se pueda ofrecer.

### **VALERIA GREGOR GAONA**

Aunque cada vez nos veamos menos, empezamos juntas en esto. Tanto que vivimos juntas arroz, crecimos juntas, aquel tiempo en el que vivimos lo mejor de nuestras vidas y en el que te conocí, que chido es porque no es sencillo hallar a una persona como tú, con todo lo que traes en tu enferma cabeza y en la que no hay cosa que no conozcas de mi, y con la que se puede ser completamente transparente. Tanto que hay en mi de ti, eres mi amiga casi hermana, por estar conmigo en los momentos difíciles y en los no difíciles, no imagino mi vida sin ti, eres una babosa pero así te quiero y te amo. Gracias por todos los años en los que has estado presente y por los que faltan. No hay palabra que describa cuan importante y necesaria eres para mí. Perdón por el plagio de la frase pero "vales oro".

### **ELFA**

La mascota más hermosa que he tenido.

### **FERNANDO MÉNDEZ RUIZ**

Crecimos juntos por algunos años, tenemos historia en común, los años más preciados de mi vida, contigo pise por primera vez, entre otras, esta facultad, el que sigas formando parte de mi vida ahora como amigo tiene una validez e importancia enorme, por todo el apoyo y cariño que hasta la fecha me muestras te digo que no hay hombre al que pueda querer tanto, te amo, siempre.

### **EMMANUEL, HUMBERTO, CARLOS, TOÑO**

Es muy rico y reconforta el saber que aunque no nos frecuentemos como quisiéramos, cuento con amigos como ustedes, los extraño mucho y los quiero más. Fue poco tiempo el que estuvimos en esta facultad juntos, pero lo importante es que nos conocimos, que están y que seguirán formando parte de mi vida, gracias por compartirse conmigo, los amo.

### **PATRICIA, ELENA, LAKSMI**

A ustedes niñas, por hacer que el tiempo que compartimos fuera tan agradable, son tan distintas que le daban un toque especial a cualquier situación, desde las pláticas más banales hasta las más serias. Por el trabajo en equipo y por todo lo que pasamos juntas. Las voy a extrañar.

### **M.V.Z. LUIS DAVID TAVERA RIVERA**

Por el tiempo que estuviste a mi lado apoyándome en lo personal y profesional. Por todo lo que encierra este tiempo que por siempre quedará en mí como una de las mejores etapas de mi vida. El término de este trabajo es en parte gracias a ti.

### **M. en C. ALEJANDRO BUENDÍA**

Por los momentos agradables que pasaron a lo largo de estos años, de haber hecho caso a tus consejos no te hubiera tratado y conocido como hasta hoy.

### **Dr. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN**

Por la atención, por el apoyo que en ocasiones necesité y amablemente me brindaste.

### **Dr. ALEJANDRO H. MARTÍNEZ**

Por los momentos compartidos, las pláticas y consejos que expresó a lo largo de estos años.

### **Dr. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**

Gracias porque me abrió las puertas al mundo de la investigación, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y por mostrarme la ciencia en el aspecto de los logros y también de sus limitaciones. Gracias por la confianza que depositó en mí.

### **Dr. CARLOS ESLAVA CAMPOS**

Por la disposición, apoyo, amabilidad y consejos que me expresó en la realización de este trabajo, sin dejar a un lado su carácter tan agradable.

### **M. en C. MISAEL R. OLIVER GONZÁLEZ**

Gracias por transmitirme sus conocimientos y experiencia que necesité en algún momento y por los momentos agradables que se dieron durante el desarrollo del trabajo, por la disposición que mostró en la terminación de este trabajo de tesis al momento de la revisión y por los consejos que me expresó. Muchas gracias.

### **M. en C. RAÚL A. MAR CRUZ**

Tuve la oportunidad de tomar clase con usted, por el conocimiento que me transmitió y por la disposición que mostró en la terminación de este trabajo de tesis, por ser una persona tan agradable y por ser un profesor tan admirable.

### **M.V.Z. VÍCTOR QUINTERO RAMÍREZ M.V.Z. MARÍA DE LOURDES JARA RAMÍREZ.**

Por el apoyo y disposición para la terminación de este mismo.

### **ARIADNA CRUZ**

Por la disposición que mostraste para enseñarme las técnicas para realizar los experimentos y por tus conocimientos que están impresos en este trabajo.

### **M.V.Z. ENRIQUE MARTÍNEZ FERREIRA**

Por el apoyo que me has brindado para que terminara esta tesis y por todo lo que me has compartido de tus conocimientos para que sea mejor como profesionista y sobre todo por ser mi amigo.

### **LUIS ARCADIO PÉREZ CUERVO**

Por los momentos agradables que pase contigo y por las lecciones de vida que aprendí a tu lado, por mostrarme una vez más que la vida es muy bella, aprendí mucho contigo, pero sobre todo porque me hiciste ver quién soy y de lo que puedo llegar a ser.

### **VALERIA VARGAS CERÓN**

No tengo mucho tiempo de conocerte, pero eres una persona muy linda y por el apoyo que me has dado en momentos que han sido muy necesarios, por ser una buena amiga.

### **MIS AMIGOS**

Valeria, Angeles, Erika, Fernando, Mario, Víctor, Juan Carlos, Sergio, Marco Antonio, Omar, Wuillian, Humberto, Emmanuel, Carlos, Luis Antonio, Abigail, Néstor, Luis David, David, Patricia, Elena, Luis, César.

A todas las personas que participaron en mi formación profesional, a los profesores, a mis amigos, a los animales, a los que de alguna manera contribuyeron a que aprendiera de ellos en lo personal y profesional.



# Í N D I C E

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE CEPAS DE *E. coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SEMEJANTE A SHIGA DE CERDO CON ENFERMEDAD DEL EDEMA

### C O N T E N I D O

### P Á G I N A S

#### I. INTRODUCCIÓN

<b>Emergencia de nuevos patógenos</b>	1
<b>Características generales de <i>Escherichia coli</i></b>	2
<b><i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)</b>	3
Manifestaciones clínicas	3
<b>Factores de virulencia asociados a enfermedad</b>	4
Las toxinas Shiga	4
Intimina	5
Enterohemolisina	6
<b>Emergencia de las cepas STEC</b>	6
Mecanismos de transmisión	7
Epidemiología	9
<b><i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica</b>	10

#### II. ANTECEDENTES

<b>Animales como reservorios de EHEC</b>	14
<b>Especies no bovinas como reservorios de <i>Escherichia coli</i> O157:H7</b>	15
<b>Enfermedad del Edema</b>	18
Epidemiología	19
Signos clínicos	20
Lesiones	20

<b>III. <u>OBJETIVOS</u></b>	
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
<b>IV. <u>HIPÓTESIS</u></b>	23
<b>V. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	
Aislamiento, identificación y caracterización bacteriana	24
Factores auxiliares de virulencia	26
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
<b>VI. <u>SEROTIPIFICACIÓN</u></b>	31
<b>VII. <u>RESULTADOS</u></b>	
Identificación bacteriana	32
Citotoxicidad en células Vero	36
Reacción en cadena de la polimerasa	39
Serotipificación	40
<b>VIII. <u>DISCUSIÓN</u></b>	44
<b>IX. <u>CONCLUSIONES</u></b>	57
<b>X. <u>PROSPECTIVAS</u></b>	58
<b>XI. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	59

# Í N D I C E

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE CEPAS DE *E. coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SEMEJANTE A SHIGA DE CERDO CON ENFERMEDAD DEL EDEMA

C O N T E N I D O	P Á G I N A S
<b>Esquema No. 1</b> Diferentes vías de transmisión de las cepas STEC	8
<b>Esquema No. 2</b> Desarrollo de la infección por cepas EHEC	11
<b>Cuadro No. 1</b> Cepas de los casos trabajados en el presente trabajo	25
<b>Cuadro No. 2</b> Condiciones del termociclador	30
<b>Cuadro No. 3</b> Antisueros utilizados	31
<b>Cuadro No. 4</b> Identificación bioquímica de <i>E. coli</i>	33
<b>Cuadro No. 4a</b> Variación bioquímica de <i>E. coli</i>	35
<b>Cuadro No. 5</b> Identificación presuntiva de <i>E. coli</i> seleccionando el color verde metálico de la colonia crecida sobre agar EMB	35
<b>Cuadro No. 6</b> Efecto citotóxico por efecto de una colonia completa de <i>E. coli</i> inoculada sobre las células Vero	36
<b>Cuadro No. 7</b> Resultados obtenidos sobre las microplacas con células Vero inoculadas con filtrados de <i>E. coli</i>	37
<b>Cuadro No. 8</b> Determinación cuantitativa de toxina Stx en células Vero inoculadas con filtrados de <i>E. coli</i>	38
<b>Cuadro No. 9</b> Efecto tóxico en cultivo celular de las cepas de <i>E. coli</i> examinadas	
<b>9a</b> Frecuencia de los efectos observados en las 12 cepas probadas	38
<b>9b</b> Frecuencia de los diferentes efectos citotóxicos de las cepas positivas (n=10)	38
<b>Cuadro. No. 10</b> Caracterización genotípica para los factores auxiliares de virulencia ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eaeA</i> ) de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas (n=49)	39
<b>Cuadro No. 11</b> Frecuencia de los factores de virulencia de cepas de <i>E. coli</i>	39
<b>Cuadro No. 12</b> Caracterización de serogrupos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cerdos	40
<b>Cuadro No. 13</b> Frecuencia de cepas de <i>E. coli</i> positivas a diferentes serogrupos	40
<b>Cuadro No. 14</b> Comparación de las cepas O157:H7	41

<b>Cuadro No. 15</b> Características de las cepas no O157:H7	41
<b>Cuadro No. 16</b> Características de las cepas Sorbitol negativo y que no reaccionaron con los antisueros probados	42
<b>Cuadro No. 17</b> Total de casos trabajados en los que se logro aislar cuando menos una cepa de <i>E. coli</i> con los factores de virulencia ensayados	43

## ABREVIATURAS

Células Vero	Células de riñón de mono verde africano
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
LTEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina termolábil
Stx	Toxina Shiga
Stx1	Toxina Shiga tipo 1
Stx2	Toxina Shiga tipo 2
LT	Toxina termolábil
ST	Toxina termoestable
CDT	Toxina de dilatación citoletal (Cytolethal distending toxin)
SUH	Síndrome urémico hemolítico
CH	Colitis hemorrágica
PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica
A/E	<i>Attaching and effacing</i>
ED	Enfermedad del edema
EDP	Principio de la enfermedad del edema
PWD	Diarrea postdestete
CST	Caldo soya tripticaseína
AST	Agar soya tripticaseína
EMB	Eosina azul de metileno
MR-VP	Rojo de Metilo - Voges Proskauer
MIO	Motilidad - indol - ornitina
LIA	Descarboxilación/desaminación de la lisina, producción de gas y ácido sulfhídrico
TSI	Triple azúcar hierro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UCCC	Unidades citotóxicas en cultivo celular
UFC	Unidades formadoras de colonias

## I. INTRODUCCIÓN

### **Emergencia de nuevos patógenos**

La mejora de la nutrición y de las condiciones de vida de la población que se produjo a partir de la primera mitad del siglo XIX (en los países más desarrollados), favoreció la disminución progresiva de la mortalidad y morbilidad debido a enfermedades infecciosas, principalmente diarreas infantiles, enfermedades respiratorias agudas y tuberculosis (55).

Posteriormente, en la segunda mitad del siglo XIX, con la incorporación de medidas de sanidad ambiental relacionadas con el abastecimiento del agua potable y con la mejora de la higiene en general, se redujeron algunas de las infecciones intestinales que por aquella época eran muy frecuentes, como el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería, etc. Posteriormente, el desarrollo de las vacunas en el primer tercio del siglo XX y la difusión del uso de antibióticos a partir de la segunda mitad de siglo, también contribuyeron a disminuir el número de enfermedades infecciosas (41).

Sin embargo, el optimismo provocado por este elevado descenso, se frenó con la emergencia de nuevos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 (127). La emergencia de nuevos patógenos es consecuencia de diferentes fenómenos, algunos que son intrínsecos a los microorganismos y otros que son extrínsecos, entre los que destacan dos:

1) *Introducción del agente infeccioso en la nueva población.* El agente infeccioso puede haberse originado a partir de una cepa no virulenta, por la incorporación de genes que codifican los diversos factores de virulencia o por variación de una cepa virulenta ya existente. Esto es posible gracias a la existencia de elementos genéticos móviles, como los plásmidos, los transposones o los bacteriófagos, que en ocasiones codifican toxinas como es el caso de la verotoxina producida por *Escherichia coli* O157:H7.

2) *Establecimiento y dispersión del patógeno entre sus nuevos huéspedes.* A esta dispersión contribuye el tipo de sociedad en la que vivimos actualmente, los viajes, las relaciones internacionales, la industrialización, etc (104).

### **Características generales de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> UFC/g de heces) y, por sus características es uno de los indicadores de contaminación fecal reciente más utilizados (138). Aunque es flora normal hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (126).

Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (107, 46, 169, 47).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se clasifican en grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica ó productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (87, 107).

Las cepas enteropatógenas son responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales, dentro de este grupo se han realizado clasificaciones según sus factores de virulencia y patogénesis. Con la observación de que algunos serotipos pertenecientes al grupo EPEC (O26 y O111), eran capaces de producir las mismas lesiones y producían las mismas toxinas que los serotipos pertenecientes al grupo EHEC, hubo una reclasificación de dicho grupo, de manera que algunos serotipos clasificados tradicionalmente como EPEC fueron incluidos dentro del grupo EHEC. Asimismo, se propuso la creación de un nuevo grupo que estaría formado por las *Escherichia coli* productoras de verotoxina que producen alteraciones letales en células Vero (VTEC), también conocidas como *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga por estar relacionada en estructura y función con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* (STEC) (113, 61). Este grupo englobaría al grupo de las EHEC y algunos serotipos que no poseen los factores de virulencia necesarios para causar patogénesis, aunque sí que son capaces de producir las toxinas Shiga (113). Se ha detectado *Escherichia coli* productora de toxina termolábil (LTEC) en graves cuadros

humanos y también en porcinos. Esta enterotoxina interactúa con el sistema adenilato ciclasa en el interior de las células intestinales lo que conlleva a un incremento del AMPc y la consecuente eliminación de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, removiendo el agua celular (19, 61).

### ***Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)**

#### **Manifestaciones clínicas**

Es un grupo formado por aquellas cepas capaces de producir potentes citotoxinas conocidas como toxinas Shiga (Stx) (105). Las cepas STEC están asociadas mayoritariamente con la aparición de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), aunque no todas son capaces de producir enfermedad, según los factores de virulencia que presentan.

En 1982 en Estados Unidos la colitis hemorrágica fue atribuida por primera vez a una infección causada por *Escherichia coli* O157:H7, un serotipo aislado con una baja frecuencia en heces humanas en aquella época (122, 164). Posteriormente, se vio que este mismo serotipo también era capaz de provocar el síndrome urémico hemolítico, definido por una insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia microangiopática hemolítica (74). Este síndrome fue descrito por primera vez en los años 50 y fue asociado con *Shigella dysenteriae* tipo I (designada inicialmente como *Shigella shiga*) y, aunque se desconocía el mecanismo de la enfermedad, en la mayoría de casos, estaba precedido por diarrea. Es interesante destacar la observación realizada por Kibel y Barnard en el año 1968 en el que hipotetizaron sobre la posible implicación de una cepa de *Escherichia coli* enteropatógena que habría adquirido un bacteriófago como agente causal del síndrome urémico hemolítico (78). Es más, por aquel entonces ya advertían que el tratamiento con antibióticos podría causar un daño celular elevado, provocando un aumento en la absorción de la toxina, lo que podría ocasionar un efecto adverso en el tratamiento de la infección. No obstante, el tratamiento con fosfomicina en uno de los brotes ocurrido en Japón redujo el número de casos de síndrome urémico hemolítico (173).

En los adultos aparece, más frecuentemente, una patología similar al síndrome urémico hemolítico conocida como púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), en la que además del riñón, se ve afectado el sistema nervioso central, provocando síndromes neurológicos, como irritabilidad, letargia o convulsiones. Asimismo, también se han descrito infecciones asintomáticas entre los individuos de la población, que no presentan ningún síntoma característico a pesar de ser portadores de las mismas cepas que han originado un determinado brote (144).



## **Factores de virulencia asociados a enfermedad**

### **Las toxinas Shiga**

Unos de los principales factores de virulencia de estas cepas lo constituyen las toxinas Shiga. Existen dos tipos principales: la Stx1 y la Stx2, con características similares como su toxicidad sobre las líneas celulares Vero y HeLa y su estructura, formada por 1 subunidad A y 5 subunidades B. Ambos tipos de toxina comparten también el hecho de que se encuentran codificadas en bacteriófagos. Smith y col. en 1983 fueron los primeros en describir la presencia de estos bacteriófagos en una cepa de *Escherichia coli* O26:H19, a los que designó como H19A y H19B. O'Brien y col. en 1983 obtuvieron resultados similares al estudiar una cepa *Escherichia coli* O157:H7. Esta cepa también llevaba integrados dos bacteriófagos portadores de los genes *stx1* y *stx2*, que fueron denominados 933J y 933W, respectivamente.

Los bacteriófagos han tenido un papel importante en la evolución de muchas bacterias. Los bacteriófagos atemperados, cuando se integran en el genoma bacteriano y se establece la lisogenia, pueden modificar las propiedades de la célula huésped, proceso que se conoce como conversión fágica. Además, una vez que un determinado bacteriófago ha infectado una célula y se ha establecido la lisogenia, la bacteria se hace inmune a la infección por otro bacteriófago del mismo tipo. Muchas de las bacterias presentes en el medio ambiente son lisogénicas, lo que podría indicar que la conversión fágica puede conferirles una ventaja selectiva.

La presencia de genes que codifican factores de virulencia en el genoma de estos bacteriófagos constituye un mecanismo eficaz de diseminación de los mismos entre diferentes especies bacterianas. Este mecanismo podría haber provocado la amplia dispersión de los genes *stx* que se ha producido entre las diferentes poblaciones bacterianas. En condiciones normales, estos bacteriófagos se hallan integrados en el cromosoma bacteriano, y cuando se induce el ciclo lítico, se liberan grandes cantidades de bacteriófagos capaces de infectar a otras bacterias (3, 150, 130). La importancia de estos bacteriófagos en la dispersión de los genes *stx* queda de manifiesto con el elevado número de serotipos en los que se han encontrado estos genes, e incluso en otras especies bacterianas diferentes de *Escherichia coli*, como *Citrobacter freundii* (128, 158) y *Enterobacter cloacae* (121).

Entre los dos grandes grupos de Stx se observan algunas diferencias. Mientras que el grupo de la Stx1 es relativamente homogéneo (únicamente se ha descrito una variante, la Stx1c (176) y es prácticamente idéntico a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae tipo I*, el grupo de la Stx2 es un grupo muy heterogéneo del que se han descrito hasta 11 subtipos diferentes (28). No obstante a pesar de esta diversidad se reconocen cinco variantes principales: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y la Stx2g, descrita recientemente (86).

Si bien estas toxinas no son suficientes para provocar enfermedad, se ha demostrado su acción patógena en asas intestinales ligadas (112).

Epidemiológicamente, la Stx2 aparece más frecuentemente asociada con casos severos de SUH que la Stx1 (105) y las cepas más recientemente asociadas con enfermedades en humanos sólo llevan el gen *stx2* (93). Además, según algunos estudios de toxicidad, la Stx2 es 1000 veces más tóxica que la Stx1 (103). Está implicada en diarrea y disentería en becerros y corderos, vasculopatía glomerular renal y cutánea (CRGV) en perros y enfermedad del edema en cerdos. La toxina Shiga en el desarrollo de lesión A/E (*attaching and effacing*: adherencia y barrido de las microvellosidades) y factores de virulencia potenciales son críticos para el entendimiento de enfermedades causadas por STEC (145).

Resulta de particular interés el hecho de que éste gen esté codificado en bacteriófagos, lo que lo convierte en un modelo excelente para el estudio de la movilidad de este tipo de genes entre las diferentes poblaciones y del papel que podrían desempeñar las bacterias lisogenizadas por estos bacteriófagos y los propios bacteriófagos como reservorios de genes que en un determinado momento se podrían movilizar y provocar la emergencia de nuevos patógenos (55).

Las toxinas son liberadas en el intestino, pasan a la sangre, lesionan el endotelio, provocando coagulación intravascular local y acumulación de fibrina en el sistema nervioso central, en el tubo digestivo y en los riñones (19, 145).

### **Intimina**

Otro de los principales factores de virulencia de las STEC es su sistema de adherencia al epitelio intestinal, a través de una proteína de membrana externa conocida como intimina, codificada por el gen *eaeA*, localizado en una región del cromosoma conocida como *LEE* (*locus of enterocyte effacement*). Este gen no es exclusivo de las STEC, ha sido descrito en otras especies que causan lesiones del tipo *attaching and effacing* (A/E) y son responsables de diferentes tipos de diarrea como la causada por las cepas EPEC (55).

## **Enterohemolisina**

Otro factor de virulencia que podría estar implicado en patogénesis es la enterohemolisina hemorrágica (Ehly), conocida también como EHEC-*HlyA*, codificada por el gen *ehxA*. Esta hemolisina es diferente de la clásica hemolisina  $\alpha$ , presente en la mayoría de cepas uropatógenas humanas (129).

## **Emergencia de las cepas STEC**

El serotipo O157:H7 es uno de los patógenos emergentes pertenecientes al grupo STEC y fue asociado por primera vez con la aparición de dos brotes de colitis hemorrágica en los Estados Unidos en el año 1982 (122, 164), que afectó a 47 personas que habían comido en diferentes restaurantes de la misma cadena, al que le siguieron numerosos brotes causados por éste y otros serotipos STEC.

*Escherichia coli* O157:H7 estaría relacionada genéticamente con *Escherichia coli* O55:H7, una cepa enteropatógena que causa diarrea en niños. Al igual que las cepas enteropatógenas, *Escherichia coli* O157:H7 se puede adherir a las células epiteliales y producir lesiones características de A/E. Otros factores de virulencia, y el antígeno O157, parecen haber sido adquiridos por transferencia horizontal y recombinación (167).

Estudios retrospectivos realizados en el Reino Unido, los Estados Unidos y Canadá sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas y serotipadas durante la década de los años 70, sugieren que el serotipo O157:H7 era por aquel entonces poco frecuente (59). Sin embargo, desde su emergencia en 1982 como patógeno humano, se ha producido un aumento notable de brotes originados por este serotipo, así como también de los originados por otros serotipos pertenecientes al grupo STEC como el O26:H11, primer serotipo STEC no O157 aislado (102), el O111:H-, el O113:H21 o el O111:H8, entre otros (13).

No obstante, algunos de los brotes atribuidos a cepas EPEC ocurridos durante los años 60 y 70, podrían haber sido causados por cepas STEC, teniendo en cuenta que el síndrome urémico hemolítico ya había sido descrito en los años 50, como se ha citado anteriormente. Un ejemplo de ello es un brote ocurrido en Estados Unidos atribuido a *Escherichia coli* O111, que podría haber implicado a cepas STEC. De hecho, algunos serotipos EPEC, como el O26:H11, el O111:H- y el O145:H- hoy en día se incluyen dentro de ambos grupos (EPEC y STEC) (55).

## **Mecanismos de transmisión**

El ganado bovino es uno de los mayores reservorios de *Escherichia coli* O157:H7 y otros STEC, aunque también se ha encontrado en ovejas, cabras, ciervos, perros, gatos, caballos, cerdos y pájaros de forma transitoria (63, 48, 157, 14, 9, 22, 161, 134, 95). Las heces de estos animales o del hombre podrían contaminar la comida o el agua y constituir un riesgo de infección. Se han descrito tres vías principales de transmisión de este patógeno:

- *Alimentos y agua contaminados*

La mayoría de brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7 y otras cepas STEC están asociados al consumo de carne de vacuno poco cocinada, como las hamburguesas, por lo que se conoce también como enfermedad de las hamburguesas. No obstante, también se han producido brotes asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados o de vegetales (102), posiblemente contaminados con heces de animales y aguas de riego. La contaminación de la carne ocurre principalmente en el matadero o en el procesamiento de la carne. Es la ruta principal mediante la cual estos patógenos entran en la cadena alimentaria. También se han descrito brotes asociados a la utilización de aguas recreacionales y al consumo de agua contaminada (56, 148), siguiendo la ruta de contaminación fecal-oral. Estudios recientes sobre la presencia de *Escherichia coli* patógenas en medios acuáticos indican que estos lugares podrían ser un reservorio importante (84, 53, 82).

Sin embargo, se desconoce la prevalencia de serotipos STEC en el medio ambiente, lo cual podría servir como indicador de la circulación de estos patógenos en el entorno de la población.

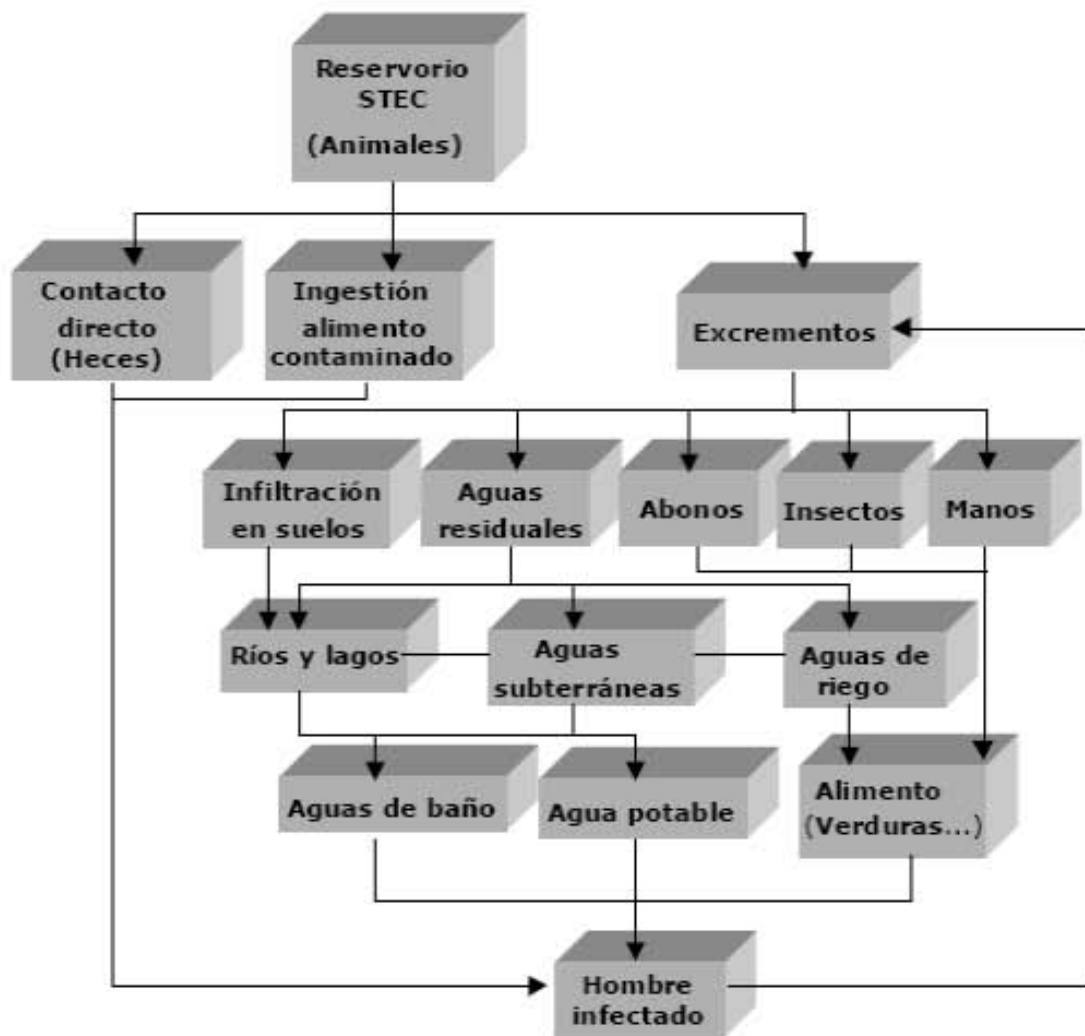
- *Transmisión directa de persona a persona*

Este tipo de transmisión tiene lugar cuando una persona sana tiene contacto con una persona que excreta STEC y se produce contaminación por vía fecal-oral. Es el mecanismo mediante el cual se originan casos secundarios en el transcurso de un brote y se produce mayoritariamente en niños pequeños que aún no han adquirido buenos hábitos de higiene (55).

- *Contactos directos con animales*

Se han descrito casos de transmisión a través del contacto directo con animales durante visitas a granjas. Esto se ve facilitado por la baja dosis infecciosa que presentan estos patógenos, situada entre 10 y 100 células. Existen algunos casos descritos en Inglaterra (73).

Esquema No. 1  
DIFERENTES VÍAS DE TRANSMISIÓN DE LAS CEPAS STEC



## **Epidemiología**

Desde su identificación como patógeno en 1982, *Escherichia coli* O157:H7 ha sido asociado con la aparición de muchos brotes, mayoritariamente en los Estados Unidos, Canadá, Japón y el Reino Unido (30).

En cuanto a los serotipos implicados en los brotes causados por cepas STEC, el serotipo de *Escherichia coli* O157 es uno de los más virulentos aunque, posteriormente, se observó que las cepas no O157 también podían ser una causa importante de SUH en humanos y se propuso la necesidad de detectarlos. Sin embargo, su detección es mucho más compleja que en el caso del serotipo O157, ya que hasta el momento no se ha descrito ninguna característica fenotípica que permita diferenciarlas del resto de cepas de *Escherichia coli* no patógenas, aparte de la producción de las toxinas Shiga (55).

En estudios recientes, se han descrito más de 400 serotipos STEC, de los cuales alrededor de 150 han sido asociados con infecciones humanas (178). Estas cepas son más prevalentes en los animales y como contaminantes de los alimentos, de manera que los hombres estarían más expuestos a ellas.

Los serotipos STEC no O157 más frecuentemente aislados de humanos son el O4:H-, O45:H2, O111:H- y O145:H- en Estados Unidos; O4:H5 y O111:H2 en Australia; O5:H-, O26:H11, O55:H7, O103:H2, O104:H2, O153:H25 y O163:H19 en el Reino Unido (13) y los serogrupos O26, O103, O111, O113, O145 y O128 en Europa continental (29).

Algunos de los factores que podrían haber contribuido a la amplia dispersión mundial de este patógeno podrían ser la crianza masiva de animales, la fertilización de los pastos con heces, el mal manejo higiénico, el aumento del comercio internacional de animales y carnes, entre otros (8).

### ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Riley en 1983 describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida (122). La bacteria aislada de todos los casos fue *Escherichia coli* del serotipo O157:H7.

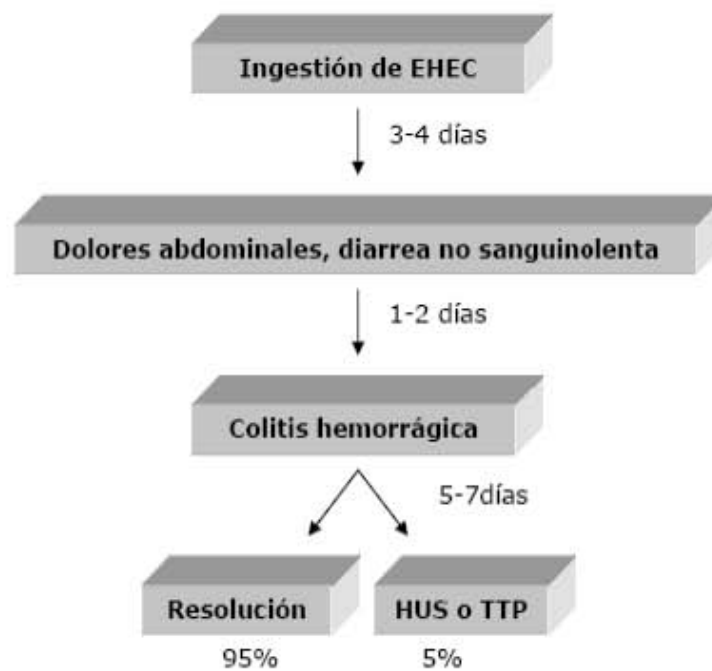
Karmali en 1983 la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *Escherichia coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero (74).

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle CH y diarrea con sangre, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que está insertado en el genoma.

La Stx actúa a nivel de síntesis de proteínas debido a que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero (112). En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes Stx1 y Stx2 inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas (107, 169, 35). Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno A/E, y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gen *eae* también se encuentra en las cepas EPEC. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina (39, 129).

## Esquema No. 2

### DESARROLLO DE LA INFECCIÓN POR CEPAS EHEC



EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; HUS, síndrome urémico hemolítico; TTP, púrpura trombocitopénica trombótica

Fuente. Mead, P. S. y P. M. Griffin. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 (101)



Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC:

1. En función de la presencia de sus factores de patogenicidad:

a) *cepas típicas*. Cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E.

b) *cepas atípicas*. Cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa.

2. En función del serotipo:

a) *cepas Escherichia coli O157:H7*. Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce  $\beta$ -glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH. *Escherichia coli O157:H7* se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino (179). También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos y alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa, jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aún cuando estos alimentos tengan un pH de 3.4, condición en la que puede sobrevivir varios días. La transmisión de *Escherichia coli O157:H7* puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos (1, 74, 75). Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión de *Escherichia coli O157:H7* (76).

b) *cepas no O157:H7*. Cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que la O157:H7. Estas cepas pueden ser sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7. Actualmente hay más de 200 serotipos. El cuadro clínico causado por las cepas no O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y CH. También son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 y de carne de guajolote, ternera, pescado y mariscos (107, 169).

El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC no O157:H7 es la toxina Stx, presentan el fenómeno de A/E y el pO157. El periodo de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta, se intensifica el dolor abdominal, con una duración de 4 a 10 días con heces francamente sanguinolentas. Se recupera o bien llega a desarrollar SUH (126).

En el grupo de las enterohemorrágicas, la producción de Stx con capacidad de destruir células eucarióticas, representa el principal mecanismo de patogenicidad, estas cepas no producen toxina termoestable (ST) ni termolábil (LT) y no son invasivas (83). En animales infectados natural o experimentalmente las lesiones producidas por cepas de *Escherichia coli* productoras de citotoxinas, ocurren principalmente en el ciego y el colon distal; con presencia de erosiones y úlceras, histológicamente los enterocitos se presentan cuboidales y no parece existir predisposición particular por algún tipo de célula en la mucosa. También se puede observar edema extenso, erosiones, úlceras y hemorragias en otros sitios del tracto gastrointestinal, sin que se demuestre colonización bacteriana, el aspecto de la diarrea ha sido definido como disenteriforme (42, 49, 66).

La patogenia y patología de estas cepas citotóxicas de *Escherichia coli* 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, a través de los alimentos contaminados, dado que se han identificado los mismos serotipos bacterianos y tipos de Stx en ambas especies (12, 25, 117).

La mayoría de EHEC humana, puede originarse de fuentes animales al igual que STEC, el cual no está considerado como habitante normal del intestino humano.

## **II. ANTECEDENTES**

### **Animales como reservorios de EHEC**

Los primeros brotes identificados de *Escherichia coli* O157:H7 se asociaron con el consumo de carne de ganado bovino, y la importancia como reservorio para *Escherichia coli* O157:H7 en este, se hizo evidente mientras más brotes se asociaron con carne mal cocida y otros productos como la leche no pasteurizada (25, 122).

El ganado se considera la fuente principal de *Escherichia coli* O157:H7 provocando enfermedades al humano y su transmisión puede ocurrir por diversas rutas, aunado a la contaminación de carne y productos lácteos, las heces bovinas pueden contaminar agua potable y cultivos destinados a consumo humano (5, 88, 171).

Varios brotes se asociaron con productos vegetales, presumiblemente por contaminación de desechos animales (52). La transmisión puede también ocurrir por contacto directo de estos desechos (38), y la electroforesis de campos pulsados (PFGE) ha confirmado el contagio por contacto directo del ganado al humano. Sin embargo, la mayoría de las infecciones humanas son aisladas y esporádicas sin una clara fuente de infección (91).

Muchos reportes han demostrado que la mayoría del ganado es negativa para *Escherichia coli* O157, y la prevalencia de *Escherichia coli* O157 en muestras fecales de ganado individual varía ampliamente de acuerdo al grupo. Como consecuencia de la considerable variación por grupo, es difícil determinar si existen diferencias geográficas o estacionales. Sin embargo, se describe que los rangos de prevalencia más altos se localizan durante el verano (23). El cual esta en desacuerdo con otros estudios con ganado positivo para *Escherichia coli* O157 a finales de verano y principios de otoño. En contraste, se encontró que la prevalencia en el ganado fue alta durante meses fríos, pero esos niveles bacterianos fueron más altos durante el verano. Los rangos varían considerablemente entre los rangos reportados en Japón, Australia, Brasil y Estados Unidos (108).

Altos niveles de prevalencia en los animales como portadores, se ha hipotetizado que son los que diseminan el microorganismo y contaminan a otros individuos. Es importante que estudios de prevalencia distingan entre portadores de alto nivel considerado para ser una consecuencia de colonización y los de bajos niveles que pueden ser el resultado de exposición ambiental y sin colonización (108).

### **Especies no bovinas como reservorios de *Escherichia coli* O157:H7**

El tracto gastrointestinal de rumiantes y humanos parece ser el principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7 (43). Cepas de *Escherichia coli* O157:H7 se han aislado de una variedad de otras especies: cabras, ovinos, alces, cerdos y aves, también en ganado cebú (38). La leche de cabra no pasteurizada también es fuente de brotes infecciosos de *Escherichia coli* O157:H7 y el rastreo de sidra de manzana condujo a un huerto contaminado con heces de alce que contenían a este serotipo (12).

Se sugiere que los cerdos pueden actuar como reservorios, pero ningún brote ha guiado a productos porcinos, comúnmente se han aislado serogrupos de O157, pero ninguno de enfermedades diarreicas en cerdos donde produce Stx (106).

También se ha considerado a los conejos como reservorios del serotipo, pero pocos brotes se han atribuido a conejos, hay poca evidencia de que los hospederos no rumiantes son importantes en el mantenimiento de *Escherichia coli* O157:H7 sin el ambiente de la granja ó para la transmisión al humano.

Muestras ambientales, de animales domésticos y de vida salvaje en granjas con ganado positivo a *Escherichia coli* O157:H7 fueron probados y su prevalencia fue muy baja. Se mostró que *Escherichia coli* O157:H7 puede multiplicarse en las moscas caseras, organismos que pueden diseminarla eficientemente a través del ambiente (24).

*Escherichia coli* es el agente etiológico de un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales, algunas de ellas extraintestinales y otras entéricas, dentro de las cuales se encuentra la diarrea de los lechones (colibacilosis en neonatos y postdestete) y la enfermedad de los edemas (6, 107). Estas se caracterizan por ser endémicas, altamente transmisibles y por presentar un desenlace generalmente fatal, originando considerables pérdidas económicas en lechones entre las cuatro y doce semanas de edad (79). Los signos clínicos y la mortalidad observada son el resultado de la acción de los diferentes tipos de toxinas producidas por *Escherichia coli* (6, 90). En los casos de diarrea, las cepas aisladas elaboran las enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) o sólo esta última, denominándose a esta cepa ETEC o *Escherichia coli* enterotoxigénica. Por su parte las cepas responsables de la enfermedad del edema sintetizan una citotoxina tipo 2 (Stx2e), una variante de la citotoxina Stx2 responsable de CH y del SUH del hombre (149, 159, 160).

Stx2e es típicamente encontrada como la única en enfermedad del edema, además, Stx2f es encontrada en aislamientos de cerdos sanos. Combinaciones de Stx1, Stx2, Stx2c, y Stx2d son encontradas en STEC, presentes en rumiantes sanos las cuales están implicadas en enfermedades en humanos. Las Stx parecen jugar el papel principal en la patogénesis de la CH y en el SUH, la intimina facilita la adherencia a la vellosidad intestinal, borrado y esfacelamiento de la misma (62).

Stx2e esta serológicamente relacionada a la Stx2 pero difiere significativamente en cuanto al receptor que es el Gb4, el cual da un rango de células blanco diferentes. Los genes que codifican para Stx2e son cromosomales y no asociados a fagos. Existe 91% de homología en la secuencia de aminoácidos con Stx2 (151).

Es por ahora algo difícil de afirmar que las cepas se adhieran al epitelio intestinal, lo destruyan y sean la causa de la enfermedad. Se investigan los aislamientos obtenidos de heces en medio selectivo para determinar mediante el sobrenadante de los cultivos la producción de la toxina para comprobar su citotoxicidad en células de cultivos de tejidos (17), donde la producción máxima de Stx in vitro ocurre a 37 °C (62).

Uno de los métodos más ampliamente utilizados en el diagnóstico de STEC/EHEC es la determinación de factores de virulencia como la producción de verotoxinas, pues estas cepas son consideradas como altas productoras de este factor (166). El cultivo de tejidos en células Vero o HeLa es reconocido como la técnica “gold Standard” (4), donde se observa la destrucción de estas células (20). El ensayo se utiliza como una prueba confirmatoria para determinar la potencial patogenicidad de los aislamientos de *Escherichia coli* (79, 125).

Se consideran como positivas a Stx aquéllas cepas en donde se observe actividad citotóxica sobre células Vero manifestada por retracción del citoplasma, redondeamiento celular, condensación y lateralización del núcleo y lisis celular; ésta puede ser cualitativa o cuantitativa y se realiza a partir de filtrados de heces o cepas aisladas (19, 4).

Las alteraciones que se observan por la toxina LT producida por cepas ETEC en cultivos de células Vero se caracterizan por un efecto citotónico; las células están aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se pueden observar prolongaciones filamentosas. Las alteraciones por Stx se caracterizan por un efecto citotóxico, las células se redondean con notables y extensos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente con el tiempo de incubación, produciendo la muerte celular (79, 143, 76, 75).

La toxina de dilatación citoletal (Cytolethal distending toxin, CDT) causa dilatación celular progresiva y finalmente la muerte en cultivos de células Vero. Los cambios morfológicos asociados con la toxicidad de CDT son evidentes después de 48h y progresa hasta que mueren, en un lapso de 72 a 96h. Los cambios celulares son claramente diferentes de aquéllos causados por las toxinas LT, ST, Stx1 y Stx2 (69-71).

## Enfermedad del Edema

La enfermedad del edema (ED) es una toxemia causada por la absorción de una toxina producida por *Escherichia coli*, llamada así porque el edema de la mucosa del estómago y del mesocolon es la lesión más prominente de la enfermedad (152).

Schofield, Davis y Gregory en 1955 fueron los primeros en reportar la ocurrencia de muchos casos de *Escherichia coli* hemolítica en el intestino de cerdos muertos con ED. Relativamente algunos serotipos específicos estaban involucrados. La evidencia más directa del papel etiológico de estas cepas de *Escherichia coli* provino de cultivos de extractos celulares de estos organismos que reproducían la enfermedad después de una inoculación intravascular (45, 154).

ED ocurre continuamente alrededor del mundo donde se practica la crianza de cerdos, también cambios en la incidencia existen con el tiempo y la localización geográfica. Desde que ED es causada por cepas de *Escherichia coli* que son endémicas en la mayoría de los hatos de cerdos, es razonable asumir que la ocurrencia continuará siendo amplia y la erradicación es impráctica. Parece ser que hay una marcada baja en la incidencia de ED en Norteamérica. Por otro lado en el Reino Unido y algunas partes del continente europeo la enfermedad permanece como una causa importante de muerte en cerdos. En Suiza ED se diagnosticó en un 7.3% de un total de 6628 cerdos examinados postmortem. En un grupo de edad entre 4 y 12 semanas la prevalencia fué de 22% (64).

ED es sustancialmente similar a las enfermedades humanas causadas por cepas EHEC productoras de toxina Shiga cercamente relacionadas pero no idénticas (159).

ED es causada por una infección en el intestino delgado con cepas patógenas de *Escherichia coli*. Tempranamente se reconoció que la mayoría de los casos de ED son causados por no más de 4 serotipos reportados en todo el mundo (141).

Las designaciones del serotipo oficial son O138: K81:NM, O139:K12 (formalmente K82):H1, O141:K85a,b:H4 y O141:K85a,c:H4 (116). Otros serotipos se asociaron esporádicamente a la enfermedad, sin embargo, su papel etiológico aún está en duda. Solo una bacteria que presente los factores de virulencia es capaz de ocasionar la ED, como los involucrados en la colonización del intestino delgado con mecanismos para resistir la peristalsis con fimbrias adhesivas (11).

El término “principio de la enfermedad del edema” (EDP) se utilizó para describir a la sustancia responsable de causar ED, antes de que se aclarara que esta sustancia era una toxina (109). Los términos neurotoxina (133) y vasotoxina (32) se propusieron en vista de los efectos funcionales y morfológicos de EDP.

Marques y col. en 1987 propusieron designar a la toxina Stx2 variante (Stx2v/Stx2e) (97). Las diferencias en la citotoxicidad de Stx2 y Stx2e se deben a la estructura del glicolípido, el cual está unido a la subunidad B (163). Stx2e se produce por los serotipos arriba mencionados de *Escherichia coli*, aisladas de ED y diarrea postdestete (PWD) en muchos países. La toxina es una proteína con peso molecular de 70,000 (32, 155, 94), esta toxina administrada intravenosamente a cerdos jóvenes induce enfermedad, con signos clínicos generales y lesiones microscópicas características de ED y así se confirmó que la toxina Stx2e y EDP son idénticas (54). El tiempo de incubación y la severidad de la enfermedad están directamente relacionados a la dosis de toxina.

ED y PWD por *Escherichia coli* tienen una patogenia diferente pero pueden estar causadas por la misma cepa bacteriana (54). Se observó que *Escherichia coli* asociada con ED tiene actividad alfa hemolítica (139) aunque esta atribución no se relaciona a la virulencia (140).

### **Epidemiología**

La ED tiene muchas características en común con PWD, los factores que permiten la infección y colonización del intestino por *Escherichia coli* patógena parecen ser similares en ambas enfermedades. ED usualmente ocurre de 1 a 2 semanas postdestete; sin embargo la edad usual de los animales afectados es de 4 a 12 semanas, habiendo excepciones. Se ha diagnosticado en lechones de 4 días y en cerdas adultas (137, 10). Animales aparentemente saludables y aún los mejores animales son afectados (10, 153, 135). La morbilidad en un hato afectado es variable, de 30 - 40% (153), la mortalidad va de 50 - 90%. El curso varía de 4 a 14 días, con promedio menor a una semana. La enfermedad desaparece tan abruptamente como aparece y la recurrencia es común (153, 136). El ambiente del área de destete parece ser la fuente para las cepas de *Escherichia coli* patógenas. Los cerdos no destetados pueden adquirir la infección posteriormente probablemente de la misma fuente y llevarla al destete (136). El contagio de *Escherichia coli* ocurre por aerosoles, alimentos y otros vehículos, cerdos y otros animales. Los serotipos asociados con ED tienden a ser similares en varias áreas geográficas (147).



## **Signos clínicos**

Anorexia que dura varios días; diarrea usualmente severa pero de corta duración; en la mayoría de los cerdos la diarrea no se presenta por mucho tiempo, también se pueden hacer aparentes signos nerviosos, párpados hinchados, ataxia acompañada con grado variable de confusión mental y progresión, disnea severa, los cerdos se observan moribundos con temperatura en rango normal, edema en oídos, el tejido subcutáneo sobre los huesos frontales, nariz y labios se hincha, edema subcutáneo que se acompaña de prurito que desaparece después de la recuperación. En algunos cerdos con o sin disnea la respiración se acompaña con sonidos de ronquidos. La diarrea es acuosa con coágulos de sangre fresca en algunos cerdos en la etapa terminal (11).

Síntomas tempranos son el edema de los párpados e inapetencia. Signos neurológicos comprometen la incoordinación, existe confusión y ataxia; parálisis, temblores, convulsiones, disnea, movimientos de remo y coma se observan en etapa avanzada o terminal. El cuadro clínico algunas veces varía de días a semanas después de la infección intestinal, el crecimiento se detiene y los cerdos enfermos muestran disturbios nerviosos unilaterales como deambulación en círculo, los animales ladean o giran la cabeza, con atrofia de músculos lumbares y debilidad progresiva. El edema subcutáneo es raro. Los cerdos afectados tienen que ser eliminados. Se pueden encontrar algunos cerdos muertos sin signos clínicos precedentes. Otros presentan ataxia mostrando signología nerviosa. Los cerdos afectados pueden parecer alterados con salivación excesiva (50).

## **Lesiones**

La ED es una enfermedad vascular y mientras el edema aparezca en sitios específicos será una manifestación de esta lesión, su presencia es variable y puede estar ausente en algunos animales. La apariencia externa de los cerdos muertos puede no ser evidente. Un enrojecimiento irregular en las partes ventrales del tronco puede estar presente. El edema en la submucosa del estómago es característico cuando se presenta y se localiza en la región del cardias glandular. Este puede variar de ser ampliamente detectable. El edema usualmente es serogelatinoso. Si es severo, el edema puede extenderse a la submucosa fúndica, pero esto puede aparecer originado desde la región cárdica. El edema de la submucosa gástrica se observa mejor sobre la curvatura mayor iniciando en el cardias. En algunas ocasiones se ve edema de la vesícula biliar. El mesocolon es un sitio común para el edema. Ocasionalmente un segmento de intestino grueso o recto puede tener edema en la

submucosa (137). La cavidad peritoneal puede revelar ocasionalmente fibrina y un aumento en el fluido seroso. Los nódulos mesentéricos y de colon varían en apariencia de normal a ligeramente inflamados, edematosos y congestionados. Típicamente el estómago está lleno de alimento seco y el intestino grueso está relativamente vacío. El contenido del colon puede estar ligeramente disminuido. Esto puede inferir como una manifestación del vaciamiento gástrico; algunos animales tienen un periodo de anorexia antes de la muerte. Los cerdos con ED pueden comer muy poco (48h) antes de morir, a la necropsia tienen el estómago completamente lleno y lo que sugiere es que algunos cerdos con ED son afectados también por constipación de acuerdo con estas observaciones.

La cavidad pleural puede contener exceso de fluido seroso y los pulmones pueden presentar variados grados de edema (130). En algunos casos ésta ha sido la única lesión observable (135). Casos con edema laríngeo también se han observado. La cavidad pericárdica puede contener fluido seroso en exceso en el cual la fibrina puede estar presente y pueden ocurrir algunas petequias epicárdicas y endocárdicas. Esta lesión no debe confundirse con la enfermedad del corazón de mora (153).

Como ya se mencionó, la toxina Stx2 daña los elementos de la pared vascular induciendo a cambios degenerativos irreversibles y necrosis celular (51, 6). Los cerdos infectados con *Escherichia coli* productoras de toxinas LT y Stx2e frecuentemente mueren de diarrea. Si las cepas infectantes son productoras de Stx2e y alguna de las toxinas termoestables o ambas, el animal puede morir con signos de diarrea y/o edema (6, 156).

Los tipos toxigénicos son susceptibles de variar sin modificación del serotipo, especialmente si las cepas provienen de diferentes regiones geográficas (6). Por este motivo, se propuso estudiar la prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénicas y productoras de Stx en cerdos con diarrea, atrasados en el desarrollo y asintomáticos de una explotación.

La diarrea se transformó en una enfermedad de importancia económica en los cerdos como resultado de la difusión del manejo intensivo de los partos. Se ha clasificado principalmente en diarrea neonatal (en los primeros días de nacimiento), diarrea en cerdos jóvenes (de la primera semana de nacimiento hasta el destete) y diarrea postdestete. *Escherichia coli* es el agente etiológico más frecuente de la diarrea neonatal y postdestete. Los agentes etiológicos de la diarrea en cerdos jóvenes son más numerosos e incluyen el virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, coccidias y *Escherichia coli* (18).

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la presencia de cepas de *Escherichia coli* patógenas productoras de toxina semejante a Shiga, a partir de muestras de cerdos enfermos.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar el aislamiento, identificación y caracterización de *Escherichia coli* de muestras de cerdos con diarrea hemorrágica.
- Determinar la presencia en el ADN de los factores de virulencia *stx 1*, *stx 2* y *eaeA*.
- Evaluar la expresión de las toxinas de Shiga en las cepas de *Escherichia coli* aisladas.
- Evaluar los patotipos implicados en la enfermedad hemorrágica en cerdos en relación a los antígenos bacterianos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los cerdos pueden ser afectados por cepas de *Escherichia coli* productoras de Stx causando cuadros diferentes a la Enfermedad del Edema.

Debido a que *Escherichia coli* es el agente etiológico de un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales, en lechones la colibacilosis en neonatos, diarrea postdestete originando considerables pérdidas económicas en lechones entre las cuatro y doce semanas de edad (79), y la enfermedad del edema (6, 107). Las cepas responsables de la enfermedad del edema sintetizan una citotoxina tipo 2, responsable de CH y del SUH del hombre (149, 159, 160).

La enfermedad del edema y diarrea postdestete tienen una patogenia diferente pero pueden estar causadas por la misma cepa bacteriana (54). Los tipos toxigénicos son susceptibles de variar sin modificación del serotipo, especialmente si las cepas provienen de diferentes regiones geográficas (6). Por este motivo, se propuso estudiar la prevalencia de *Escherichia coli* productoras de Stx en cerdos con diarrea, atrasados en el desarrollo y asintomáticos de una explotación.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA**

#### **Aislamiento e identificación bacteriana**

##### **Aislamiento de cepas**

Para el aislamiento de las cepas, se trabajó con 12 casos de animales enfermos, en los que se incluyen 9 aislamientos de cerdos, 1 de la cisterna y 2 de los bebederos, procedentes del Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET) y de muestras proporcionadas por el M.V.Z. Víctor Quintero de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan - UNAM.

Los casos clínicos No. 1 a 7 fueron proporcionados como cepas, en tubos inclinados con Agar Soya Trypticaseína (AST), las muestras fueron tomadas de intestino y heces; del caso No. 6 las muestras fueron de intestino, ciego y colon al realizar la necropsia de un cerdo. Los demás casos fueron aislados de muestras de contenido estomacal e intestino de animales enfermos y de agua (Cuadro No. 1). El caso No. 11 fue por aislamiento de intestinos de lechones remitidos de una granja ubicada en San Juan del Río, Qro.

##### **Aislamiento, recuperación y purificación bacteriana**

De las cepas proporcionadas en tubo, se hizo resiembra con una técnica para aislamiento; dejándose en incubación para su crecimiento y verificar la pureza. De los órganos se hicieron siembras en placas de agar Eosina Azul de Metileno (EMB), McConkey y AST; dejándose en incubación para aislamiento, posteriormente se tomaron 5 colonias de cada aislamiento para obtener cinco clonas de cada una. Se sembraron en AST y se dejaron incubando a 37 °C por 24h en estufa bacteriológica.

De los casos No. 5 a 7 solo se resembraron las cepas proporcionadas para verificar pureza en placas de AST.

De los casos No. 8 a 10 se tomaron 12 colonias obteniendo 12 clonas de cada bacteria.

En los casos que se detectó contaminación por microorganismos de la microbiota normal de donde se obtuvieron las muestras, se hicieron resiembras continuas en Agar Base Sangre, Agar Nutritivo y EMB hasta su purificación.

**Cuadro No. 1**  
**CEPAS DE LOS CASOS TRABAJADOS EN EL PRESENTE TRABAJO**

<b>CASOS</b>	<b>CEPAS CLAVE ORIGINAL</b>	<b>PROCEDENCIA DE LOS CASOS</b>
1	IH-1	Cepario DIVET
2	442-730	Cepario DIVET
3	VQ	Cepario DIVET
4	IS-2	Cepario DIVET
5	VIQ	Cepario DIVET
6	V-316	Intestino, Ciego y Colon
7	5806	Cepario DIVET
8	CE	Contenido estomacal
9	IN-1	Intestino
10	INT	Intestino
11	2240	Intestino
12	VIQUI	Intestino

**Identificación bacteriana**

### Pruebas bioquímicas

De los aislamientos previamente realizados se obtuvieron 119 clonas, las cuales fueron identificadas presuntivamente mediante las pruebas bioquímicas de Rojo de Metilo - Voges Proskauer (MR-VP), motilidad - indol - ornitina (MIO), descarboxilación - desaminación de la lisina, producción de gas y ácido sulfhídrico (LIA), triple azúcar hierro (TSI), sorbitol, citrato y urea.

Los medios para pruebas bioquímicas se prepararon y posteriormente fueron inoculados e interpretados según la bibliografía (92).

### **FACTORES AUXILIARES DE VIRULENCIA**

Para determinar la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA* involucrados con los factores auxiliares de virulencia de las cepas identificadas como *Escherichia coli*, todas ellas fueron sometidas a la técnica de citotoxicidad sobre cultivos de células Vero así como a la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **Citotoxicidad en células Vero**

##### Cepas de referencia

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia pertenecientes al género *Escherichia coli*.

- EDL 933 MED: Productora de Stx1, Stx2, *eae*, empleada como control positivo. (Donada por el Dr. Carlos Eslava C.).
- K12 C-600: Cepa apatógena (174) empleada como control negativo. (Donada por el Dr. Guillermo Valdivia A.).

Para la detección de Stx ó VT se realizó una preparación de microplacas con células Vero según Zamora y col. en 2000, con algunas modificaciones.

- Se obtuvieron cultivos de células Vero del laboratorio de citología de la FESC (Donada por la M.V.Z. Maria Reyes Pichardo M.).
- En microplacas de 12 pozos se adicionaron 2ml del cultivo celular, con medio mínimo esencial (MEM) y suero fetal bovino (BSA) al 5%.
- Se incubó a 37 °C de 24 a 48h con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
- Se preparó agar purificado al 1% en medio MEM (Invitrogen) con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen), se colocaron en baño Maria a una temperatura de 45 °C.
- Se retiró el medio contenido en la microplaca.
- En cada pozo se depositaron 2ml del agar al 10% y se dejaron solidificar.
- Se sembró una colonia problema por pozo, dejando un control positivo y un negativo. Usando las cepas EDL 933 MED y K12 C-600.
- Se dejaron incubar a 37 °C con tensión parcial de CO<sub>2</sub> por 72h.
- Se observaron los resultados a las 24, 48 y 72h; en un microscopio invertido de acuerdo a lo descrito por Zamora, y col.

### **Cuantificación de la toxina en células Vero**

#### **Cepas de referencia**

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia pertenecientes al género de *Escherichia coli*.

- EDL 933 J: Productora de Stx1.
- EDL 933 W: Productora de Stx2.
- EDL 933 TESIS: Productora de Stx1, Stx2, EAE.  
(Donadas por el Dr. Guillermo Valdivia A.).
- EDL 933 MED: Productora de Stx1, Stx2, EAE.
- K 12 C 600: Cepa apatógena (10) como control negativo.  
(Donadas por el Dr. Carlos Eslava C. de la facultad de Medicina de la UNAM).
- EDL 933 IBT: Productora de Stx1, Stx2, EAE.
- EDL 933 Δ LER: Cepa con eliminación del gen *ler* de la isla de patogenicidad.  
Productora de Stx1, Stx2 y es fenotípicamente AE<sup>-</sup>.  
(Donadas por el Dr. José Luis Puente del Instituto de Biotecnología de la UNAM).



### Cepas problema

Se utilizaron 6 cepas de las identificadas previamente como *Escherichia coli* y que resultaron positivas a la prueba cualitativa de citotoxicidad en células Vero. Ellas pertenecieron a 6 de los 12 casos trabajados y fueron las siguientes.

- CIVB 002
- CIVB 007
- CIVB 010
- CIVB 018
- CIVB 029
- CIVB 035

### Línea celular

Células Vero: células de riñón de mono verde africano.

Se evaluaron 7 cepas de referencia y 6 cepas problema.

La técnica realizada fue de acuerdo a la descrita por el Dr. Guillermo Valdivia A. en 1995. Las cepas se inocularon en 5ml de caldo soya tripticaseína (CST) y se incubaron 18h, se centrifugaron a 10 °C a 5000rpm por 20 minutos, en centrifuga refrigerada (Eppendorf-Netheler-HinzGmbH 22331 Hamburg, Centrifuge 5403) y el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0.22µm (Invitrogen).

Con este filtrado se hicieron diluciones decimales  $10^{-0}$ -  $10^{-8}$  y las placas de 96 pozos con células Vero se inocularon con 100µl del filtrado, dejando 3 pozos controles (PBS): en todos los pozos se adicionaron 2 gotas de medio esencial mínimo (MEM) con 2.5% de suero fetal bovino y se incubaron 24h a 37 °C. Se observaron los efectos de la toxina a las 24 y 48h.

## **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Se utilizaron los siguientes iniciadores (primers).

- Secuencia para *stx1*.  
F:5'CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3'  
R:5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3'
- Secuencia para *stx2*.  
F:5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3'  
R:5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3'
- Secuencia para *eaeA*.  
F:5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3'  
R:5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3'

Se utilizaron los siguientes reactivos para la amplificación del DNA bacteriano.

- Buffer (10x) (Invitrogen).
- MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Invitrogen).
- dNTP's (200µM) (Invitrogen).
- Primers: *stx1*, *stx2*, *eaeA* (Invitrogen).
- Agua para PCR (Invitrogen).
- Taq polimerasa (Invitrogen).
- DNA (bacteriano).

Equipo de PCR.

- Termociclador (PTC-10®™ Programmable Termal Controller . MJ Research, Inc.).
- Cámara de electroforesis (Horizon 58 Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus. Life Technologies™).
- Micropipetas (Labsystems).
- Lector de geles, Transiluminador (Syngene).

Material para electroforesis.

- Bromuro de Etidio. (Invitrogen).
- Marcador de tamaño molecular (DNA Leader 123 pb) (Invitrogen).
- Buffer de corrida (leader) (Invitrogen).
- Agua destilada
- Agarosa (Invitrogen).
- Buffer TAE 1x (Invitrogen).

**Técnica de PCR.** Las cepas control y las aisladas durante el trabajo se cultivaron en placas de AST dejándolas en incubación a 37 °C por 24h. Se tomó una muestra considerable de los cultivos y se depositó en tubos Eppendorf con 1ml de agua destilada estéril. El ADN fue extraído por calentamiento (baño María por 10 minutos) y posteriormente se colocaron en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 14000rpm por 2 minutos. **Primers.** Los primers utilizados fueron *stx1* para la verotoxina tipo 1, *stx2* para la verotoxina tipo 2 y *eaeA* que codifica para la expresión de la proteína de membrana externa para la unión íntima de la bacteria al enterocito. **Condiciones de reacción.** La mezcla de reactivos se efectuó en un volumen de 25µl conteniendo 2.5µl de Buffer (10x), 1.0µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.2µl de dNTP's (200µM), 3.5µl de cada primer, 13.8µl de agua para PCR, 0.2µl de Taq polimerasa y 2.0µl de DNA. Las condiciones de termociclado para la amplificación se muestran en el Cuadro No. 2. **Electroforesis.** Los geles estuvieron constituidos por agarosa al 2% (0.6g de agarosa y 30ml de TAE 1x) y 10µl de bromuro de etidio. Alicuotas de 8µl de los amplificados de cada muestra más 2µl de buffer de corrida fueron analizados por corrimiento electroforético a 87 amperes por 40 minutos y transiluminación UV; y se capturó la fotografía con un Software (Image-ProPlus) para su identificación. Técnica empleada según López y col. 2003, con algunas modificaciones (90).

**Cuadro No. 2**  
**CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR**

	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Desnaturalización	Alineación	Extensión
<b>Temperatura</b>	94° C	50° C	72° C	94° C	50° C	72° C
<b>Tiempo</b>	5 min.	2 min.	45 seg.	5 min.	2 min.	45 seg.
<b>Ciclos</b>	35					

## VI. SEROTIPIFICACIÓN

Para la identificación serológica de las cepas aisladas de *Escherichia coli* se utilizaron los siguientes antisueros.

**Cuadro No. 3**

<b>SERUNAM® Polivalente anti <i>E. coli</i> STEC/EPEC</b>	<b>SERUNAM® Polivalente anti <i>E. coli</i> EHEC</b>	<b>SERUNAM® <i>E. coli</i></b>
<b>Serogrupos</b>	<b>Serogrupos</b>	<b>Serotipo</b>
<b>O26, O103, O111, O145, O157</b>	<b>O26, O103, O111, O145, O157 O2, 05</b>	<b>O157:H7</b>

Proporcionados por el Dr. Carlos Eslava C. y el M en C. Armando Navarro de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Para realizar esta técnica se inocularon todas las cepas problema de *Escherichia coli* en 5ml de CST, se incubaron 18h, se centrifugaron a 10 °C a 5000rpm por 20 minutos en centrifuga refrigerada; se desechó el sobrenadante y con el sedimento se procedió a realizar la aglutinación.

Se colocaron 20µl de cada uno de los sueros polivalentes en un portaobjetos, posteriormente se agregaron 20µl de sedimento mezclándolos por 3 minutos y se dio lectura observándose al microscopio aglutinación de las muestras al reaccionar con los sueros anteriormente mencionados.

## **VII. RESULTADOS**

### **IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

De las siembras en las placas de EMB se obtuvo un crecimiento de color verde metálico, en las placas de McConkey se identificaron a las bacterias sugestivas de ser lactosas positivas y en AST solo se identificó la pureza de los diferentes cultivos. De las placas de EMB se tomaron colonias de color verde metálico.

Se aislaron 119 clonas, y por medio de la identificación bioquímica se obtuvieron 49 cepas pertenecientes al género de *Escherichia coli*, como se muestra en el Cuadro No. 4 y 70 pertenecientes a otros géneros. Como se indica en el Cuadro No. 4a, solo se muestran las cepas identificadas como *Escherichia coli* que presentaron reacciones diferentes, pero aún así cubren los criterios de identificación requeridos de acuerdo a la bibliografía (92).

De las pruebas bioquímicas que se realizaron, MR-VP, fermentación de carbohidratos, urea, citrato, indol, producción de gas y ácido sulfhídrico se interpretaron e identificaron de acuerdo a la bibliografía (92).

Cuadro No. 4

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *E. coli*

E. coli	PRUEBAS BIOQUÍMICAS															
	MR	VP	SORBITOL	UREA	CITRATO	MOTILIDAD	INDOL	ORNITINA	DESCARB. DE LISINA *	DESAM. DE LISINA °	PRODUCCIÓN DE GAS	ACIDO SULFÚDRICO	FERM. DE CARB. °	ACIDO SULFÚDRICO	PRODUCCIÓN DE GAS	LACTOSA
CIVB 001	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 002	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 003	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 004	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 005	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 006	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 007	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 008	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 009	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CIVB 010	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 011	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CIVB 012	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 013	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 014	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 015	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 016	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 017	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 018	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 019	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 020	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 021	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
CIVB 022	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 023	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 024	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 025	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 026	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 027	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 028	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 029	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 030	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+

MR-VP: Rojo de Metilo-Voges Proskauer, (\*): Descarboxilación de la lisina, (°): Desaminación de la lisina, (°): Fermentación de carbohidratos, (+): positivo, (-): negativo.

Continúa en la página siguiente.

**Cuadro No. 4**  
**IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *E. coli***

<i>E. coli</i>	PRUEBAS BIOQUÍMICAS															
IDENTIFICACIÓN ASIGNADA	MR	VP	SORBITOL	UREA	CITRATO	MOTILIDAD	INDOL	ORNITINA	DESCARB. DE LISINA	DESAM. DE LISINA	PRODUCCIÓN DE GAS	ACIDO SULFÍDRICO	FERM. DE CARB.	ACIDO SULFÍDRICO	PRODUCCIÓN DE GAS	LACTOSA
CIVB 031	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 032	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 033	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 034	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 035	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CIVB 036	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 037	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 038	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CIVB 039	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 040	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 041	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 042	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 043	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 044	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 045	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
CIVB 046	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 047	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 048	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 049	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 050	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CIVB 051	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 052	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 053	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 054	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
CIVB 055	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-

MR-VP: Rojo de Metilo-Voges Proskauer, (\*): Descarboxilación de la lisina,  
(<sup>a</sup>): Desaminación de la lisina, (°): Fermentación de carbohidratos, (+): positivo, (-): negativo.

**Cuadro No. 4a**  
**VARIACIÓN BIOQUÍMICA DE *E. coli***

<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	<b>No. de Cepas</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<b>Sorbitol (-)</b>	12	24.48
<b>Movilidad (+)</b>	45	91.83
<b>Lactosa (-)</b>	6	12.24

(+): positivo, (-): negativo.

**Cuadro No. 5**  
**IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *E. coli* SELECCIONANDO EL COLOR VERDE METÁLICO DE LA COLONIA CRECIDA SOBRE AGAR EMB**

<b>CASOS</b>	<b>TOTAL DE CLONAS</b>	<b>(%) / <i>E. coli</i>*</b>	<b>(%) / NO <i>E. coli</i>*</b>	<b>AISLAMIENTO DE <i>E. coli</i> POR CASO (%)</b>
1	5	60 /3	40 /2	4.3
2	5	100 /5	0	4.3
3	5	80 /4	20 /1	4.3
4	5	100 /5	0	4.3
5	12	50 /6	50 /6	10.1
6	4	100 /4	0	3.5
7	2	100 /2	0	1.7
8	12	0	0	10.1
9	12	8.3 /1	91.7 /11	10.1
10	12	0	0	10.1
11	20	70 /14	30 /6	16.2
12	25	20 /5	20 /4	21
	<b>119</b>	<b>41.17 /49</b>	<b>58.83 /70</b>	<b>100</b>

(\*): Identificación bioquímica de acuerdo a Mac Faddin, J.F. 1993. (92).

**CITOXICIDAD EN CÉLULAS VERO**



**Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y Stx (reacción cualitativa)**

**Cuadro No. 6**  
**EFFECTO CITOTÓXICO POR EFECTO DE UNA COLONIA COMPLETA DE *E. coli***  
**INOCULADA SOBRE CÉLULAS VERO**

<b>CEPAS</b>	<b>LECTURA 48 h</b>	<b>(%) CEPAS CITOTÓXICAS</b>
<b>CIVB 001 a CIVB 049</b>	Efecto	100

Para la detección de Stx se realizó una preparación de microplacas con células Vero según Zamora y col. en 2000 con algunas modificaciones. En estas microplacas de 12 pozos con células Vero mezcladas previamente con agar purificado al 1% (2ml de cultivo celular) y ya solidificadas se sembró una colonia problema por pozo, dejando un control positivo y un negativo. Se incubaron a 37 °C con tensión parcial de CO<sub>2</sub>.

Se observaron los resultados en un microscopio de luz invertida a las 24, 48 y 72h. El efecto sobre las células Vero a las 24h no fue apreciable, observándose el efecto citotóxico a las 48h postinoculación. La interpretación fue de acuerdo a lo reportado previamente en otros estudios (75, 76, 79, 81, 143).

**Inoculación en microplacas de 96 pozos (reacción cuantitativa)**

Para realizar esta técnica se tomaron 13 cepas: 7 de referencia y 6 de los casos problema, obteniendo los resultados que se muestran en el Cuadro No. 7. La determinación cuantitativa de toxina de las cepas trabajadas se muestra en el Cuadro No. 8. Los diferentes efectos observados sobre las células Vero se muestran en el Cuadro No. 9.

**Cuadro No. 7**  
**RESULTADOS OBTENIDOS SOBRE LAS MICROPLACAS CON CÉLULAS VERO**  
**INOCULADAS CON FILTRADOS DE *E. coli***

CEPAS	LECTURA 24 h.	LECTURA 48 h.
K 12	No hay efecto citolítico.	No hay efecto.
EDL 933 IBT	Efecto citolítico en dilución $10^{-3}$ .	Efecto citolítico en dilución $10^{-5}$ .
EDL 933 MED	Efecto citolítico en dilución $10^{-2}$ .	Efecto citolítico en dilución $10^{-2}$ .
EDL 933 TESIS	Efecto citolítico en dilución $10^{-2}$ .	Efecto citolítico en dilución $10^{-4}$ .
EDL 933 J	Efecto citolítico en dilución $10^{-4}$ .	Efecto citolítico en dilución $10^{-4}$ .
EDL 933 Δ-LER	Efecto citolítico en dilución $10^{-4}$ .	Efecto citolítico en dilución $10^{-5}$ .
CIVB 028	Toxina directa con efecto citotónico.	Toxina directa con efecto citolítico y vacuolizante.
CIVB 026	Toxina directa con efecto citotónico.	Efecto citolítico en dilución $10^{-1}$ y vacuolizante.
CIVB 030	Toxina directa con efecto citotónico y poca vacuolización.	Efecto citolítico en dilución $10^{-1}$ y vacuolizante.
CIVB 010	No hay efecto citolítico. Toxina directa con efecto de vacuolización.	Toxina directa con efecto citotónico y poca vacuolización.
CIVB 007	No hay efecto citolítico. Toxina directa con efecto de vacuolización.	Toxina directa con efecto citotónico y citolítico.
CIVB 002	No hay efecto citolítico. Toxina directa con efecto de vacuolización.	Toxina directa con efecto citotónico y citolítico, dilución $10^{-1}$ con poca vacuolización

Cepas de Referencia: EDL 933 MED, EDL 933 IBT, EDL 933 TESIS, EDL 933 J, EDL 933 W, EDL 933 Δ-LER, y K 12 C-600 cepa empleada como control negativo. Cepas problema: CIVB 002, CIVB 003, CIVB 010, CIVB 026, CIVB 028, CIVB 030.

La técnica realizada fue de acuerdo a la descrita por el Dr. Guillermo Valdivia A. en 1995. Cultivos de *E. coli* en CST se centrifugaron en centrifuga refrigerada y el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0.22μm. De este filtrado se hicieron diluciones decimales  $10^{-0}$  -  $10^{-8}$  y placas de 96 pozos con células Vero se inocularon con 100μl del filtrado, dejando 3 pozos controles (PBS), en cada pozo se adicionaron 2 gotas de MEM con 2.5% de BSA se incubaron 24h a 37 °C. Se dio lectura a los efectos de la toxina a las 24 y 48h.

**Efecto citotóxico:** Las células se redondean con notables y extensivos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente produciendo la muerte celular. **Efecto citotónico:** Células aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se pueden observar prolongaciones filamentosas (75, 76, 79, 81 143).

**Efecto vacuolizante:** CDT toxina de dilatación celular con abundantes vacuolas en el citoplasma, causa dilatación celular progresiva y muerte celular (69-71).

Dilución  $10^{-5}$ : dilución más alta en producción de citotoxina.

**Cuadro No. 8**  
**DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TOXINA Stx EN CÉLULAS VERO**

### INOCULADAS CON FILTRADOS DE *E. coli*

CEPAS	DILUCIÓN	UCCC/100µl ***
CIVB 002, 026, 030 *	$10^{-1}$	$10^1$
EDL 933 MED **	$10^{-2}$	$10^2$
EDL 933 J, EDL 933 TESIS **	$10^{-4}$	$10^4$
EDL 933 IBT, EDL 933 Δ-Ler **	$10^{-5}$	$10^5$

(\*): cepas problema aisladas en este trabajo.

(\*\*): cepas de referencia

(\*\*\*): unidades citotóxicas en cultivo celular en 100 microlitros.

### EFFECTO TOXICO EN CULTIVO CELULAR DE LAS CEPAS DE *E. coli* EXAMINADAS

Cuadro No. 9a

#### FRECUENCIA DE LOS EFECTOS OBSERVADOS EN LAS 12 CEPAS PROBADAS

EFFECTO	%
Sin efecto	15.4
Citotóxico	77
Citotónico y vacuolizante	7.6
Total	100

Cuadro No. 9b

#### FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS CEPAS POSITIVAS

(n=10)

EFFECTO	%
Vacuolizante y citolítico	23.1 (30)
Citotónico y citolítico	7.7 (10)
Citotónico, citolítico y vacuolizante	7.7 (10)
Citolítico	38.5 (50)
Total	77 (100)

**Efecto citotóxico:** Las células se redondean con notables y extensivos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente produciendo la muerte celular.

**Efecto citotónico:** Células aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se pueden observar prolongaciones filamentosas (75, 76, 79, 81, 143).

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

**Cuadro. No. 10**  
**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA PARA LOS FACTORES**  
**AUXILIARES DE VIRULENCIA (*stx1*, *stx2* y *eaeA*)**  
**DE LAS CEPAS DE *E. coli* AISLADAS (n=49)**

<b>GENES</b>	<b><i>E. coli</i> positivas</b>
<b><i>stx 1</i></b>	<b>33</b>
<b><i>stx 2</i></b>	<b>47</b>
<b><i>eaeA</i></b>	<b>28</b>

*stx1* y *stx2*: Genotipos para la identificación de toxina de Shiga 1 y 2 en las cepas de *E. coli*.  
*eaeA*: Genotipo que codifica para la intimina.

**Cuadro No. 11**  
**FRECUENCIA DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *E. coli***

<b>GENOTIPO</b>	<b>CEPAS POSITIVAS A LOS GENES</b>	<b>(%)</b>
<b><i>stx1, stx2, eaeA</i></b>	26	53.1
<b><i>stx2</i></b>	13	26.5
<b><i>stx 1, stx 2</i></b>	6	12.2
<b><i>stx1</i></b>	1	2.0
<b><i>stx2, eaeA</i></b>	2	4.1
	<b>CEPA NEGATIVA</b>	
<b><i>stx1, stx2, eaeA</i></b>	1	2.0
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>100</b>

*stx1* y *stx2*: Genotipos para la identificación de toxina de Shiga 1 y 2 en las cepas de *E. coli*.  
*eaeA*: Genotipo que codifica para la intimina.

## SEROTIPIFICACIÓN

De las 49 cepas de *Escherichia coli*, se obtuvieron 16 cepas con reacción positiva a alguno de los serogrupos probados. Los resultados se muestran en el Cuadro No. 12 y en el Cuadro No. 13 se muestran los resultados obtenidos en sus diferentes relaciones antigénicas.

**Cuadro No. 12**

**CARACTERIZACIÓN DE SEROGRUPOS DE CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE CERDOS**

SEROGRUPO			CEPAS POSITIVAS	%
STEC/EPEC	EHEC	O157:H7	3	6.12
STEC/EPEC		EHEC	3	6.12
EHEC		O157:H7	3	6.12
STEC/EPEC			4	8.2
EHEC			3	6.12
<b>TOTAL</b>			<b>16</b>	<b>32.68</b>

Se identificaron 6 cepas pertenecientes al serotipo O157:H7 y prevalencia de 67.32% sin reacción a los antisueros en 33 cepas.

**Cuadro No. 13**

**FRECUENCIA DE CEPAS DE *E. coli* POSITIVAS A DIFERENTES SEROGRUPOS**

PATOTIPO	SEROTIPOS "O" INCLUIDOS EN EL ANTISUERO	O157:H7	No. DE CEPAS	(%)
STEC/EPEC, EHEC	O26, O103, O111, O145, O157. O26, O103, O111, O145, O157. <b>O2, O5</b>	+	3	6.12
EHEC	O26, O103, O111, O145, O157. <b>O2, O5</b>	+	3	6.12
STEC/EPEC, EHEC	O26, O103, O111, O145, O157. O26, O103, O111, O145, O157. <b>O2, O5</b>	-	3	6.12
STEC/EPEC	O26, O103, O111, O145, O157.	-	4	8.2
EHEC	O26, O103, O111, O145, O157. <b>O2, O5</b>	-	3	6.12
			16	32.68

Estos resultados indican la frecuencia para las cepas que pertenecen a los serogrupos incluidos en los antisueros SERUNAM® STEC/EPEC, EHEC y al serotipo O157:H7; de los serogrupos STEC/EPEC, EHEC y de STEC/EPEC.

**Cuadro No. 14**

**COMPARACIÓN DE LAS CEPAS O157:H7**

Caso	Identificación	Procedencia	PCR			CÉLULAS VERO	SEROLOGIA		
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	Citotoxicidad (cualitativa)	STEC/EPEC	EHEC	O157:H7
2	CIVB 008	442-730	+	+	+	+	+	+	+
3	CIVB 009	VQ	+	+	+	+	+	+	+
4	CIVB 013	IS-2	-	+	-	+	-	+	+
9	CIVB 032	2240 A1	-	-	-	+	+	+	+
9	CIVB 031	2240 A2	+	+	-	+	-	+	+
11	CIVB 038	2240 B	-	+	+	+	-	+	+

Todas las cepas fueron sorbitol y movilidad positivas.

**Cuadro No. 15**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS NO O157:H7**

Caso	Identificación	Procedencia	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	Citotoxicidad (cualitativa)	Citotoxicidad (cuantitativa)	STEC/EPEC	EHEC	Posible serogrupo
4	CIVB 014	DIVET	-	+	-	+	-	-	+	O2, O5
4	CIVB 017	DIVET	-	+	-	+	-	-	+	O2, O5
4	CIVB 015	DIVET	-	+	-	+	-	+	+	
7	CIVB 029*	DIVET	+	+	+	+	-	+	-	
9	CIVB 034	DIVET	-	+	+	+	-	-	+	O2, O5
9	CIVB 033	DIVET	+	+	+	+	-	+	-	
9	CIVB 035	DIVET	+	+	-	+	-	+	-	
11	CIVB 040	DIVET	+	+	+	+	-	+	-	
11	CIVB 039	DIVET	-	+	-	+	-	+	+	
11	CIVB 042	DIVET	-	+	-	+	-	+	+	

\* Cepa sorbitol negativo.

Todas las cepas fueron sorbitol negativo y movilidad negativa.

**Cuadro No. 16**

**CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS SORBITOL NEGATIVO Y QUE NO REACCIONARON CON  
LOS ANTISUEROS PROBADOS**

Caso	Identificación	Procedencia	PCR			SEROLOGÍA	
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	EHEC	O157:H7
2	CIVB 004	DIVET	-	+	-	-	-
2	CIVB 006	DIVET	+	+	+	-	-
5	CIVB 021	DIVET	-	+	-	-	-
5	CIVB 018	DIVET	+	+	+	-	-
5	CIVB 019	DIVET	+	+	+	-	-
5	CIVB 020	DIVET	+	+	+	-	-
5	CIVB 022	DIVET	+	+	+	-	-
5	CIVB 023	DIVET	+	+	+	-	-
6	CIVB 024	DIVET	+	+	+	-	-
6	CIVB 025	DIVET	+	+	+	-	-
6	CIVB 026*	DIVET	+	+	+	-	-
7	CIVB 029**	DIVET	+	+	+	-	-

\*\* Pertenece al grupo sexológico STEC/EPEC.

\* Ensayada sobre células Vero resultó con 10 UCCC/100µl, además de presentar efecto vacuolizante.

El resto de las cepas no fueron probadas cuantitativamente sobre células Vero.

Todas las cepas resultaron positivas al ensayo sobre células Vero en forma cualitativa.

Todas las cepas fueron movilidad positiva y sorbitol negativo.

**Cuadro No. 17**

**TOTAL DE CASOS TRABAJADOS EN LOS QUE SE LOGRO AISLAR CUANDO MENOS 1 CEPA  
DE *E. coli* CON LOS FACTORES DE VIRULENCIA ENSAYADOS**

<b>Caso</b>	<b>Identificación</b>	<b>Procedencia</b>	<b>stx1</b>	<b>stx2</b>	<b>eeA</b>	<b>Porcentaje a los 3 genes</b>
1	CIVB 001	Intestino	+	+	+	100
	CIVB 002		+	+	+	
	CIVB 003		+	+	+	
2	CIVB 004	Escurridero	-	+	-	60
	CIVB 007		-	+	-	
	CIVB 006		+	+	+	
	CIVB 005		+	+	+	
	CIVB 008		+	+	+	
3	CIVB 010	Intestino	-	+	-	25
	CIVB 011		-	+	-	
	CIVB 012		-	+	-	
4	CIVB 009	Intestino	+	+	+	0
	CIVB 014		-	+	-	
	CIVB 017		-	+	-	
	CIVB 015		-	+	-	
	CIVB 013		-	+	-	
5	CIVB 016	Heces	+	-	-	83
	CIVB 021		-	+	-	
	CIVB 018		+	+	+	
	CIVB 019		+	+	+	
	CIVB 020		+	+	+	
	CIVB 022		+	+	+	
6	CIVB 023	l. grueso l. delgado Ciego Colon	+	+	+	100
	CIVB 024		+	+	+	
	CIVB 025		+	+	+	
	CIVB 026		+	+	+	
7	CIVB 027	Heces	+	+	+	100
	CIVB 029		+	+	+	
9	CIVB 028	Intestino	+	+	+	43
	CIVB 032		-	-	-	
	CIVB 034		-	+	+	
	CIVB 030		+	+	+	
	CIVB 036		+	+	+	
	CIVB 033		+	+	+	
	CIVB 035		+	+	-	
11	CIVB 031	Intestino	+	+	-	50
	CIVB 039		-	+	-	
	CIVB 042		-	+	-	
	CIVB 038		-	+	+	
	CIVB 037		+	+	+	
	CIVB 041		+	+	+	
	CIVB 043		+	+	+	
	CIVB 044		+	+	-	
12	CIVB 040	Granja San Juan del Río	+	+	+	20
	CIVB 047		-	+	-	
	CIVB 045		+	+	-	
	CIVB 046		+	+	-	
	CIVB 048		+	+	-	
	CIVB 049		+	+	+	



## VIII. DISCUSIÓN

En los animales de los cuales se obtuvieron las muestras en las explotaciones trabajadas se observó un cuadro clínico variable; en lechones de 3 días de edad con diarrea, en animales entre los 20 y 45 días de edad y en cerdos adultos, todos ellos con un desenlace mortal. Tomando en consideración el curso, el periodo de incubación corto en los lechones y que el problema primordialmente se presentó entre los 20 a 45 días de edad sugería una etiología viral o enterotoxémica. Otro factor importante fue el hecho de que las lesiones a la necropsia se ubicaron casi exclusivamente en aparato digestivo, lechones con intestinos hemorrágicos, estómago lleno con alimento seco, ambos con edema, así como en sistema nervioso con presencia de edema en cerebro. Lechones y adultos con lesiones sugestivas de enfermedad del edema (ED) y/o diarrea postdestete (PWD), parecido a lo descrito en la bibliografía (146). Basándonos en lo anterior se procedió a realizar el diagnóstico del problema.

En los aislamientos bacterianos se seleccionaron cepas de *Escherichia coli* que presentaran un patrón típico como criterio de selección el color verde metálico en placas de EMB y después en cuanto a pruebas bioquímicas. Como se muestra en el Cuadro No. 5; se obtuvo una frecuencia de 41.2% de cepas del género de *Escherichia coli* (49 cepas) y un 58.8% pertenecientes a otros géneros. Esto nos indica que no todas las cepas con color verde metálico pertenecen únicamente a éste género.

En lo referente a las pruebas bioquímicas; en el cuadro No. 4a se muestra que de las cepas sorbitol negativo se obtuvo una frecuencia de 24.5%; movilidad positiva de 91.8% y lactosa negativa de 8.2%. Los resultados para MR-VP, urea, citrato, indol, LIA y TSI presentaron el patrón típico de *Escherichia coli* y fueron interpretados de acuerdo a la bibliografía como se indica en el Cuadro No. 4 (92).

Se debe considerar este criterio de identificación ya que puede variar para alguna de las pruebas, observado y reportado en trabajos previos, donde a partir de cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones se observó una variación en el patrón de pruebas bioquímicas como urea, movilidad, indol y ornitina (156); en cepas aisladas de terneros hubo variación en urea (17); esto es reforzado por Fratamico y col. en 1987 que aislaron cepas de *Escherichia coli* urea positivas a partir de cerdos y bovinos (87) y por la relación que tienen las cepas no fermentadoras del sorbitol con la producción de verotoxinas (159). Las O157:H7 pueden llevar una o dos copias para urea, genes que no se expresan in vitro pero son funcionales y pueden contribuir a la resistencia ácida in vivo de las bacterias (62).

Se reporta que *Escherichia coli* serotipo O157:H7, no fermenta el D-sorbitol, ramnosa y no produce  $\beta$  glucoronidasa y que se encuentra con poca frecuencia en cerdos (169). En 1999 se reporta que no todas las cepas sorbitol negativo son *Escherichia coli* O157:H7 y que hay cepas no O157:H7 sorbitol positivo involucradas en cuadros de SUH (149, 114, 6). En base a los datos que se obtuvieron en el presente trabajo se puede decir que las cepas aisladas de *Escherichia coli* tienen un comportamiento bioquímico que concuerda con lo reportado por los diferentes investigadores antes mencionados.

Las Stx son proteínas citotóxicas, de dos tipos en Stx1, que es idéntica a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (62); ya que se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida de ésta misma (59, 60), y Stx2 con 56% de homología a Stx1. La gran mayoría de *Escherichia coli* en flora normal no son patógenas, pero la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) en la flora normal de vacas y de otros ruminantes puede ser patógena para los humanos, y puede causar enfermedades en combinación con otros factores de colonización y virulencia (108).

Para determinar la producción de Stx se empleó el método cualitativo de "Capa de agar sobre líneas celulares Vero" (174); observando el efecto citotóxico de una colonia completa de *Escherichia coli* inoculada sobre las células Vero como se muestra en el Cuadro No. 6. En este estudio se obtuvo una frecuencia del 100% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas, positivas a la producción de Stx. Las lesiones observadas coinciden con las descritas por diversos investigadores (79, 143, 76, 75). Durante el desarrollo de esta prueba también se observó efecto citotónico, probablemente por la síntesis de LT, que al paso del tiempo se terminó observando el efecto citotóxico. Al respecto Zamora y col. en 1999 aislaron cepas de *Escherichia coli* de lechones con enteritis y determinaron la producción de LT con una frecuencia de 6.9%, Stx con 4.5% y STa con 15.9%. Zamora y col. en 2000 aislaron cepas a partir de lechones con diarrea <40 días, probándolas para determinar la producción LT y Stx obteniendo una frecuencia de 6.4% de cepas positivas a la producción de LT y 6.9% a la síntesis de Stx, con un 86.6% sin efecto. En Inglaterra Wray y col. en 1993 aislaron cepas productoras de LT (17.6%) sobre STa (5.3%) y Stx (4.7%). En Alemania Ojeniyi y col. en 1994 observaron que predominan las infecciones por cepas LT sobre STa ya sea en lechones de hasta 7 días de edad, como en aquéllos mayores de 22 días de vida, considerando tanto las cepas que produjeron sólo LT o en combinación con STa y/o Stx.

Con los resultados obtenidos en otros países como Chile, Alemania e Inglaterra se refuerza la probabilidad, aunque no se incluyó en este estudio, de que el efecto citotónico este dado por la toxina LT; y en cuanto a las cepas productoras de Stx que probaron, la frecuencia en los aislamientos de síntesis de proteína es mucho menor en cuanto a la frecuencia de los resultados obtenidos en este trabajo; y de acuerdo a éstos, es posible concluir que en una determinada región prevalece un tipo de cepas toxigénicas, lo que puede estar relacionado al ambiente y con las medidas preventivas específicas que se apliquen en cada lugar.

Al evaluar en este estudio, la presencia de citotoxinas en cultivo celular de forma cuantitativa, como se muestra en el Cuadro No. 7, los resultados obtenidos sobre las microplacas con células Vero inoculadas con filtrados de *Escherichia coli* y determinar cuantitativamente la síntesis de Stx, el efecto de las cepas problema probadas y los testigos utilizados al ser comparadas se apreció un efecto diferente en intensidad de las cepas aisladas con respecto a los testigos positivos.

Como se muestra en el Cuadro No. 8, las cepas testigos utilizadas pertenecen al grupo de altas productoras de citotoxinas (119), por lo tanto las cepas problema aisladas en este estudio fueron y pertenecen al grupo de bajas productoras de citotoxinas.

Previamente se ha reportado que los títulos de producción de citotoxina están entre 10 y 150 unidades citotóxicas por 100µl en cultivos celulares (UCCC) para aislamientos de cerdos (119), lo cual concuerda con los datos encontrados en este estudio; en los que se obtuvieron 10 UCCC para las cepas aisladas de cerdos en las que se cuantificó la producción de citotoxinas.

Por otro lado, Jeon Jo y col. en Korea realizaron un análisis de citotoxicidad en células Vero de cepas aisladas de bovinos, cerdos y pollos, en donde cultivos con filtrados de toxina para Stx2 positivas no afectaron al cultivo (172). Hay un reporte de que *Escherichia coli* positiva a *stx2* no era citotóxica para células Vero (68). Una secuencia de inserción de 1310 pb se identificó en este aislamiento y la inserción interrumpió el final del carboxilo en la subunidad A que encoda para la región del gen de *stx2*. El aislamiento no produjo Stx2 totalmente funcionales y las células Vero probablemente no fueron afectadas. No está claro por qué las muestras *stx2* positivas no muestran citotoxicidad y por qué muestras *stx* negativas muestran citotoxicidad. Estudios moleculares y genéticos se requieren para definir los factores asociados con la citotoxicidad en células Vero (172).

En el desarrollo de la prueba de efecto citotóxico de forma cuantitativa sobre células Vero se utilizaron 7 cepas de referencia, de las cuales todas dieron efecto citotóxico y 6 cepas problema, en las que no todas dieron reacción positiva a la producción de citotoxina, en algunos cultivos se observó un efecto citotónico y vacuolización de las células; efecto que puede ser debido a la producción de LT ó CDT, que como ya se mencionó anteriormente no fue probado en este estudio, pero que concuerda con efectos que han sido reportados previamente por otros investigadores. La frecuencia obtenida de los efectos observados en las cepas probadas y de los diferentes efectos citotóxicos de las cepas positivas se muestran en los Cuadros No. 9a y 9b.

Estos resultados muestran que los cerdos son importantes reservorios de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) al parecer no todas ellas citotóxicas, aunque no todas las cepas citotóxicas son productoras de Stx (175).

Aunque en este trabajo no se haya determinado la producción de LT, STa y CDT como efectos importantes a considerar, aún así, muestra a diferencia de estudios anteriores; que el número de cepas productoras de toxinas es alto con una frecuencia de efecto citotóxico por Stx del 100%.

Asimismo, la técnica cuantitativa de citotoxicidad en células Vero por Inoculación en microplacas de 96 pozos utilizada por el Dr. Guillermo Valdivia A. en 1995, que consiste en la inoculación de filtrados bacterianos en monocapas de líneas celulares es laboriosa, necesita más tiempo, equipos especiales de laboratorio y antibióticos. Además se debe tener en cuenta que en ocasiones la síntesis de la toxina de la bacteria en medios de cultivo líquidos puede ser baja y podría ser insuficiente para lesionar a las células. La técnica cualitativa empleada de Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y Stx (174) es más económica, rápida y sencilla, y se pueden examinar fácilmente gran cantidad de muestras. Además, de acuerdo con Parreira y col. en 1994, es posible detectar más cepas toxigénicas que con los extractos bacterianos, que puede ser debido a la técnica de extracción de toxinas utilizada, a la necesaria filtración a que se debe someter el extracto, y a que el ensayo se haga en el mismo día de la extracción o se conserve a 20 °C hasta su uso, por lo que concluyen que estos procedimientos pueden conducir a una pérdida o disminución de la concentración de la actividad tóxica de algunos filtrados. La técnica es sencilla, económica y permite identificar precoz y efectivamente las cepas.

Riley en 1983 describió y relacionó a EHEC con un cuadro de CH debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida (60). La bacteria aislada fue *Escherichia coli* del serotipo O157:H7. Karmali en 1983 la asoció con el SUH, con la presencia en heces de *Escherichia coli* productora de Stx (79), principal mecanismo de patogenicidad de EHEC, que sintetizan una o ambas toxinas, aunque no está claro que sólo la posesión de los genes *stx* confiera patogenicidad, dado que puede persistir la ausencia de otros factores de virulencia (107, 169, 35), y el fenómeno de adherencia y esfacelación causando lesiones sobre las células epiteliales (A/E), y presentan el gen *eae* que codifica para la proteína de membrana externa intimina y el plásmido pO157, que codifica para la enterohemolisina. (39, 129).

En nuestro sentido, las cepas EHEC podrían pertenecer a un subgrupo de STEC e incluye una connotación clínica que no está implicada en esta última: mientras no todas las STEC son patógenas, las EHEC sí lo son; por ello, se emplea el término de “típicas EHEC” para denotar a las cepas de STEC, tales como la O157:H7 (126).

Se emplea el término de EHEC típicas a las cepas de STEC, tales como la O157:H7 que tienen el fago Stx, el plásmido que codifica para enterohemolisina (Ehx) y presentan el fenómeno de A/E. Las EHEC atípicas no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido para enterohemolisina (126).

Cepas no O157:H7 cuya frecuencia de aislamiento es mayor que las O157:H7, pueden ser sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7; capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque pueden aislarse de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 y de carne de guajolote, ternera, pescado y mariscos (107, 169).

El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC no O157:H7 es la toxina Stx, el fenómeno de A/E y la presencia de pO157 (126).

En este trabajo 48 de las cepas de *Escherichia coli* aisladas presentaron alguno de los genes que codifican para la producción de los auxiliares de virulencia para *stx1*, *stx2* o el gen *eaeA* que codifica para el fenómeno de borrado y esfacelamiento de las vellosidades en intestino; igualmente estas fueron positivas a la producción de toxina Shiga en las células Vero, esto se muestra en el Cuadro No. 10. De la evaluación de la expresión de los genes del 41.2% de las cepas aisladas, se obtuvo una frecuencia de 95.1 % de *stx2*, 67.3% de *stx1* y 57.2% de *eaeA*. Estos fueron los porcentajes encontrados al analizarlos individualmente.

Como se muestra en el Cuadro No. 11, al analizar la interrelación de los genes; se observa la expresión de estos con una frecuencia de 53.1% de *stx1*, *stx2* y *eaeA*, en 26 cepas; 26.5% de *stx2*, en 13 cepas; 12.2% de *stx1*, *stx2*, en 6 cepas; 4.1% de *stx2*, *eaeA*, en 2 cepas; 2.05% de *stx1* en 1 cepa y 2.05% de la no expresión de los 3 genes en 1 cepa. Se evidenció predominio en la frecuencia de los genes de *stx1*, *stx2* y *eaeA* de 53.1%; seguido de *stx2* de 26.5%, *stx1*, *stx2* de 12.2%, *stx2* y *eaeA* de 4.1% y *stx1* de 2.05%.

Estos datos muestran que el gen que codifica para la expresión de la toxina *stx2* es el que más frecuentemente se encuentra en cepas aisladas de los cerdos estudiados, esto es muy marcado al hacer la evaluación de la expresión del gen individual y en su interrelación con *stx1*, y *eaeA* respectivamente.

La presencia de los genes *stx2*, *stx1/stx2* y *stx1* en sus diferentes asociaciones, detectados con la técnica de PCR y al ser comparado con lo reportado por otros investigadores (14) muestra que estas cepas pertenecen al grupo de las *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) con una frecuencia de 41.0% (20 cepas) del total de cepas aisladas.

Las cepas que presentan los genes que codifican para *stx1*, *stx2* y *eaeA*, de acuerdo con lo reportado por otros investigadores, muestran que pertenecen al grupo de las *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC), con una frecuencia de 53.1 % en 26 cepas y de 4.08% en 2 cepas que sólo presentaron los genes *stx2* y *eaeA* respectivamente. Estos datos evidencian que el gen para la *stx2* como es reportado es el factor de virulencia que está implicado con más frecuencia en la patogenia de las enfermedades que causan estas bacterias.

El gen *eaeA* participa en el proceso de infección por estas cepas patógenas de *Escherichia coli*, en la adherencia bacteriana a las células del epitelio intestinal de los cerdos el cual está mediado por adhesinas para posteriormente permitir la producción de toxinas productoras de enfermedad (107).

La frecuencia de cepas negativas a alguno de los genes fue de 2.05% y dieron reacción citotóxica en células Vero, lo que posiblemente indica es que la técnica empleada es eficaz y sensible para la caracterización de este factor de virulencia. Anteriormente se mencionó que Jeon Jo y col. en Korea, realizaron un análisis de citotoxicidad en células Vero de cepas aisladas de bovinos, cerdos y pollos, en donde cultivos con filtrados de toxina para *stx2* positivas no afectaron al cultivo (63), también existe un reporte de que *Escherichia coli* positiva a *stx2* no era citotóxica para células Vero (68). Una secuencia de inserción de 1310 pb se identificó en este aislamiento y la inserción interrumpió el final del carboxilo en la subunidad A que encoda para la región del gen de *stx2*. El aislamiento no produjo Stx2

totalmente funcionales y las células Vero probablemente no fueron afectadas. No está claro por qué las muestras *stx2* positivas no muestran citotoxicidad y por qué muestras *stx* negativas muestran citotoxicidad, por lo que se requieren estudios moleculares y genéticos para definir los factores asociados con la citotoxicidad en células Vero (172) así como sucedió en el análisis de una de las cepas aisladas en nuestro trabajo. También podría ser que se trate de una cepa que debido al manejo que fue sometida haya presentado algún tipo de mutación o que se trate de una cepa atípica.

Todas las cepas que contienen Stx1 y Stx2 (cualquiera de los subtipos) están asociadas con enfermedades humanas, pero también se encuentran en *Escherichia coli* aisladas de animales, aunque no estén asociadas a enfermedades (21, 132). Un estudio (131) indica que SUH y la diarrea pueden estar asociados con *Escherichia coli* O157:H7, cepas que no producen Stx a través de los factores de virulencia, aunque esto no ha sido aclarado.

La mayoría de EHEC de origen humano, puede provenir de fuentes animales como cepas STEC, las cuales no están consideradas como habitantes normales del intestino humano (145).

Duffy y col. en 2001, reportan que el tracto gastrointestinal de rumiantes, especialmente bovinos y humanos, parece ser el principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7; y éstas cepas se han aislado de la mayoría de las especies animales empleadas para la producción (38, 72).

Prevalencia alta de cepas de *Escherichia coli* productoras de Stx que producen abortos en cerdos se han reportado (44, 85), la mayoría de los aislamientos fueron *eaeA* negativos y a la fecha ningún brote se ha atribuido a cepas originadas de cerdos. Un estudio de aislamientos STEC de un rango de especies domésticas, con genes *Stx2* fueron raros en todos, excepto en ganado y perros (15). En el presente estudio, alrededor de la mitad de los aislamientos de STEC fueron positivos en *eaeA* sugiriendo que algunos eran EHEC potenciales. Esto es consistente con otros estudios (53, 14) en los cuales perros, gatos, gallinas y cerdos tienen prevalencias más bajas de STEC que rumiantes.

Se sugiere a los cerdos como potenciales reservorios de *Escherichia coli* O157:H7 (106) pero ningún brote ha guiado a productos de origen porcino. En estudios de cerdos se han aislado y reportado serogrupos de O157 comúnmente (170), pero ninguno de enfermedades diarreicas en cerdos donde se produzca Stx (168).

Las cepas EHEC son la única categoría de *Escherichia coli* que ocasionan diarrea y se consideran una zoonosis (59). Sherwood aisló EHEC en un 3% de terneros con diarrea en 1985 (138), pero desde entonces se ha encontrado este patógeno en el ganado bovino en proporciones importantes, principalmente en ganado sano, con índices que fluctúan entre 34.5% a 63% (15, 138, 26, 123, 110).

Los animales son portadores de serogrupos que no se encuentran frecuentemente en el ser humano, aunque serogrupos patógenos para el hombre han sido hallados también en animales (59, 26). Se ha demostrado la habilidad de *Escherichia coli* O157:H7 para colonizar persistentemente cerdos de 3 meses de edad y con 2 meses postinoculación (23). Estudios realizados en Chile muestran una elevada frecuencia de colonización por EHEC en porcinos de 69% (26) y un 34% en bovinos; un análisis molecular mostró que existía una relación clonal entre cepas O157 aisladas de pacientes con SUH y de contenido intestinal de cerdos (123).

En Argentina, se observó tanto en bovinos como en porcinos un predominio de cepas portadoras de genes para ambas toxinas Stx1 y Stx2 con 44.1% y 63.9%, seguido de Stx1 sólo con 29.4% en bovinos y 19.4% en porcinos y finalmente con Stx2 sólo con 26.5% en bovinos y 16.7% en porcinos. La prevalencia de EHEC observada en este estudio es elevada tanto en bovinos como en porcinos sanos en relación a países industrializados (110), pero similar a lo observado en otro estudio realizado en Chile, también en mataderos que mostró un 35.5% de portadores en bovinos y 69% en cerdos (26). Recientemente Beutin y col. en Berlín, encontró una frecuencia de 21% en bovinos y 7.5% en cerdos de las cepas EHEC (14).

Las cepas responsables de la enfermedad del edema sintetizan una variante de la Stx2 (Stx2e), responsable de enteritis hemorrágica y del SUH del hombre (1, 2, 162).

Cicuta y col. en 1999 en Argentina, estudiaron la prevalencia de *Escherichia coli* Toxigénicas y Shigatoxigénicas en lechones con un predominio de las ST (24.5%) sobre LT (2.9%). Las cepas productoras de Stx tuvieron una prevalencia de 5.9%; las cepas de *stx2e* representaron el 2.1%. Debido a la vinculación de las cepas Stx2e con la enfermedad del edema y la merma del desarrollo de los lechones, su hallazgo de 2.1% señala un riesgo potencial en la sanidad. La participación del cerdo en la cadena alimentaria del hombre, también otorga significancia en la salud pública (31).



Recientemente patrones de virulencia de *stx2e* producida por *Escherichia coli* de cerdos con enfermedad del edema y de humanos se compararon, y las cepas de cerdos enfermos se reportaron como diferentes a las patógenas humanas. *Escherichia coli* productora de Stx2e aislada de humanos y cerdos difieren en sus perfiles de virulencia e interacciones con las células del epitelio intestinal (142).

Kaufmann mostró en un estudio, 31 cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) que albergan *stx2e*, aisladas previamente de muestras fecales de cerdos sanos a la matanza (77) y las caracterizaron fenotípica y genotípicamente. Zweefel y col., encontraron una frecuencia de 48.3% de la presencia del gen *stx2e* en cerdos sanos muestreados en el rastro. Estos mismos autores obtuvieron una frecuencia de 29% de cepas no O157 sorbitol positivo STEC (*stx2e*) aislados de los cerdos sanos pertenecen a serotipos encontrados en STEC aislados de los humanos, incluyendo dos serotipos (O9:H-, O26:H-) reportados en asociación con SUH (177). Por otra parte, los serotipos eran diferentes de aquéllos aislados de los casos de enfermedad del edema en los cerdos. El gen *eae*, que se correlaciona fuertemente con la severa enfermedad humana, no fue descubierto. Por consiguiente, aunque las cepas aisladas parecen no estar asociadas con enfermedades humanas severas, aún así no pueden excluirse a los cerdos sanos como una fuente potencial de infección humana con Stx2e (177).

Darong y col. en China, investigaron la prevalencia de *Escherichia coli* asociada a cerdos con diarrea postdestete y/o cerdos con enfermedad del edema. El rango de detección para *stx2e* fue de 35% (40).

Como se muestra en el Cuadro No. 12, en los resultados de la caracterización de serogrupos de cepas de *Escherichia coli* aisladas por aglutinación directa, se observó una prevalencia de 32.7% en 16 cepas cuando menos a uno de los serogrupos para STEC/EPEC, EHEC y O157:H7; se tuvo una prevalencia de 6.12% de los serogrupos STEC/EPEC Y EHEC en 3 cepas; 6.12% de los serogrupos EHEC y O157:H7 en 3 cepas; 6.12% del serogrupo EHEC en 3 cepas; 6.12% de los serogrupos STEC/EPEC, EHEC y O157:H7 y siendo la prevalencia más alta de 8.2% de los serogrupos STEC/EPEC en 4 cepas. La prevalencia de las cepas sin reacción fue de 67.3% en 33 cepas.

Como se muestra en el Cuadro No. 3, la mezcla de los antisueros polivalentes STEC/EPEC y EHEC contienen 5 serogrupos iguales, el antisuero de EHEC contiene dos serogrupos más pero diferentes: O2 y O5, que son con los que se obtuvieron los diferentes serotipos de las cepas positivas a algunos de ellos.

Los resultados obtenidos en sus diferentes relaciones antigénicas se muestran en el Cuadro No. 13, el cual evidencia la prevalencia de cepas de *Escherichia coli* positivas a diferentes serogrupos donde se obtuvo una prevalencia de 12.2% para las cepas que pertenecen a los serogrupos incluidos para los patotipos STEC/EPEC, EHEC y al serogrupo O157:H7; de 12.2% para los serogrupos STEC/EPEC, EHEC y de 8.2% para STEC/EPEC.

Esto muestra que las prevalencias más altas para las cepas aisladas de acuerdo a los serogrupos para causar enfermedad incluidos en los patotipos utilizados en este trabajo es para STEC/EPEC, EHEC y O157:H7 así como para STEC/EPEC, EHEC, lo que es de gran importancia ya que son algunos de los serotipos más comunes como causa de enfermedad en humanos y que se han encontrado en otros estudios.

*Escherichia coli* O157:H7 puede persistir en ganado por más de 6 meses (16), hay evidencia que sugiere que este serotipo puede adaptarse y persistir en el tracto alimentario de rumiantes (27).

Como ya se mencionó, los rumiantes son el mayor reservorio para *Escherichia coli* O157:H7 y otras *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), estas bacterias son portadas (transitoriamente) por varios animales no rumiantes como pájaros silvestres, pavos, caballos, perros y cerdos, se ha encontrado que portan STEC O157:H7 (16, 27, 161, 63, 65, 80, 106).

La prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en estas especies no rumiantes es más baja que en rumiantes (16, 37). Sin embargo, reportes recientes de infección natural han ocurrido en Japón, Noruega y Chile y sugieren que los cerdos pueden ser reservorios en potencia para *Escherichia coli* O157:H7 (27, 65, 106, 123).

Estudios realizados en Chile muestran una elevada frecuencia de colonización por EHEC en porcinos de 69% (26) y utilizando electroforesis de campo pulsado (PFGE) se mostró que existía una relación clonal entre cepas O157 aisladas de pacientes con SUH y de contenido intestinal de cerdos (123).

Notario y col. en 2000 en Argentina, aislaron en porcinos cepas de EHEC en heces con una prevalencia de 58.1% y caracterizaron genotípicamente las cepas aisladas en relación a los factores de virulencia con predominio de cepas portadoras de genes para ambas toxinas *stx1* y *stx2* con 63.9%; seguido de *stx1* sola con 19.4% y *stx2* sola con 16.7% respectivamente. En algunos animales identificaron cepas de EHEC con variados genotipos. Asimismo, aislaron cepas de los serogrupos O26 (2.8%), O111 (16.7%) y O157 (8.3%), los cuales se encuentran con frecuencia en seres humanos asociados con diarrea con sangre o SUH. También encontraron cepas con los serogrupos O111 y O157 simultáneamente (5.5%). Las

cepas de EHEC fueron sorbitol negativas con una prevalencia de 41.6% con serogrupos O111 y O157. La prevalencia que observaron en porcinos sanos fue alta en relación a países industrializados (110). En un estudio realizado en Chile detectaron en mataderos un 69% de colonización por EHEC en cerdos (26). Beutin y col. en 1993 en Berlín, encontraron una prevalencia de 7.5% en cerdos (14).

Existiendo un reservorio animal importante, las posibilidades de diseminación del patógeno y su transmisión al hombre están relacionadas con múltiples factores, algunos relacionados con técnicas de sacrificio de animales, manipulación de carne a nivel industrial y doméstico, hábitos como el comer carne cruda o mal cocida, consumo de derivados lácteos sin pasteurizar, entre los más importantes (110).

Los niveles de colonización en diferentes animales que aparecen en la literatura, varían ampliamente y estos índices no guardan una estricta relación con la proyección a nivel clínico. Estas aparentes discrepancias pueden tener diferentes explicaciones, hay un aspecto técnico ya que la tasa de aislamiento de EHEC puede estar afectada por el número de colonias estudiadas de cada animal, algunos autores sugieren tomar un número superior a 5 colonias (75, 165). Otro aspecto importante es la orientación del estudio microbiológico, si está enfocado a detectar exclusivamente EHEC O157 o también incluye otros serogrupos de *Escherichia coli* productores de citotoxinas (110).

Es interesante conocer el genotipo toxigénico de las cepas de EHEC que colonizan animales para compararlo con el patrón de las cepas asociadas a infecciones humanas en cada región. El patrón genotípico más comúnmente hallado en Argentina fue la presencia de cepas portadoras de genes para ambas toxinas Stx1 y Stx2 (111), lo cual coincide con el genotipo de las cepas de EHEC aisladas en niños de Chile y Argentina (33, 89). En otros países del hemisferio norte, el patrón más frecuentemente observado es Stx2 (100, 14).

El fenotipo sorbitol negativo es una característica que posee la mayoría de las cepas de EHEC O157:H7 (71) y un estudio realizado en Chile mostró que este fenotipo se observa en el 100% de las cepas aisladas de pacientes con SUH independiente del serogrupo (114). Por lo tanto el fenotipo sorbitol negativo en cepas EHEC tiene importancia epidemiológica (67).

Recientes estudios en Chile refieren que 44% de las cepas de EHEC aisladas de bovinos de matadero fueron sorbitol positivas (26), 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 cuando se pretende conocer la prevalencia real de este patógeno (110).

En cuanto a los serogrupos de EHEC, se destacó la presencia de O157, O26 y O111 que se asocian a infecciones humanas. El elevado número de cepas que no fueron tipificables con estos antisueros era de esperar, teniendo en cuenta que los animales pueden portar numerosos serotipos de EHEC (75, 118, 96). Rivas refirió el aislamiento concomitante de dos serotipos y genotipos distintos de EHEC en un niño argentino con SUH (124). En este estudio se hallaron cepas de diferentes serogrupos (O111 y O157), así como animales con 2 y 3 genotipos diferentes de EHEC (110).

La alta prevalencia de EHEC en porcinos y la presencia de serogrupos que afectan al ser humano indican que en Argentina estos animales constituyen un importante reservorio de este patógeno y que la ingestión de carne mal cocida es un factor de riesgo de infección (110).

De acuerdo a los resultados de nuestro trabajo, la cepa CIVB 008 fue aislada de la toma de agua de la granja (escurridero) y la cepa CIVB 009 fue tomada de una necropsia a partir del intestino de los cerdos de la misma granja. Es importante resaltar que estas cepas contienen los tres genes ensayados y pueden ser clonas de la misma bacteria que está infectando a los lechones causando infección intestinal hemorrágica.

El caso 9 proviene del intestino del mismo lechón afectado, como se puede apreciar la cepa CIVB 032 no presentó genes *stx1* ni *stx2* bajo las condiciones de la prueba, pero resultó del serotipo O157:H7, esto puede ser explicado porque la secuencia de genes empleada como iniciador en el PCR está diseñada para detectar el gen *stx1* y *stx2* del humano, sin embargo es diferente de las secuencias empleadas para el *stx2e*, por lo que es posible que contenga este gen; de otra manera, también puede ser que se trate de una cepa O157:H7 no toxigénica como las previamente descritas (108) y el efecto sobre las células Vero haya sido producido por la toxina CDT como lo muestra el Cuadro No. 14.

Para las cepas CIVB 014, 017 y 034, considerando el contenido de los antisueros polivalentes (Cuadro No. 3) es posible que se trate de los serogrupos O2 u O5.

Las cepas CIVB 015, 039 y 042 pueden tratarse de los serogrupos O23, O111, O103 u O145. En el resto de las cepas consideradas en el cuadro No. 15 es posible que se trate de una reacción cruzada con alguno de los serotipos anteriores.

Es importante considerar que las cepas CIVB 029, 033 y 040 contienen los tres genes de virulencia por lo que es muy probable pertenezcan a las EHEC.

Como se puede apreciar en la el Cuadro No. 16, todas las cepas que no reaccionaron serológicamente con los grupos probados (O23, O103, O111, O145, O157, O2 y O5), contienen en un 83% los tres genes ensayados por lo que pueden pertenecer a las EHEC no consideradas. Además, coincide que todas son sorbitol negativo y contienen el gen *stx2*, por lo que nos sugiere fuertemente la presencia del fago lisogenizando a las cepas.

Al analizar los resultados del Cuadro No. 17, es posible observar que de los 12 casos trabajados, excepto en uno, fue posible aislar al menos una cepa que contuviera los tres genes de virulencia ensayados. Incluso en la necropsia del caso 6 se pudieron aislar las cepas patógenas de todo el tracto intestinal lo que demuestra que ellas estaban colonizando el intestino de este cerdo, por lo que es posible asociarla a las lesiones encontradas.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Se aislaron cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de cerdos.
2. Las cepas identificadas estuvieron relacionadas a un cuadro de diarreas hemorrágicas en cerdos.
3. La fuente de contaminación provino del agua empleada para dar de beber a los cerdos, esta agua a su vez proviene de un escurridero en la parte baja del cerro.
4. Se identificaron otros serotipos de cepas STEC no reportados previamente como causantes de enfermedad o como presentes en cerdos.
5. La técnica de ensayo sobre células Vero con una capa de agar fue sensible y específica para detectar la producción de Stx en las cepas probadas, siendo más fácil de realizar que en técnicas donde se utilizan filtrados de los cultivos bacterianos.
6. Se obtuvo una cepa O157:H7 que no contiene ninguno de los genes de virulencia ensayados.

## **X. PROSPECTIVAS**

1. Es necesario realizar estudios complementarios de serología para las cepas que no pudieron ser tipificadas con los antisueros empleados.
2. Se deberá determinar la procedencia de las cepas que infectaron y causaron enfermedad en los cerdos estudiados.

## **XI. BIBLIOGRAFIA.**

1. Aarestrup FM, Jorsal SE, Ahrens P, Wiuff C, Scheutz F. 1996. Oedema disease caused by O-rough *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 139: 373.
2. Aarestrup FM, Jorsal SE, Ahrens P, Jensen NE, Meyling A. 1997. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *J. Clin. Microbiol.* 35: 20–24.
3. Acheson, D. W. K. y G. T. Keusch. 1996. Which Shiga toxin-producing types of *Escherichia coli* are important? *ASM News* 6:302-306.
4. Agudelo C, Viveros H, Castañeda E. 1992. Enterobacterias como agentes etiológicos de la diarrea en la comunidad. *Biomédica.* 12 (2):37-43.
5. Akashi, S., Joh, K., Tsuji, A., Ito, H., Hoshi, H., Hayakawa, T., Ihara, J., Abe, T., Hatori, M., Mori, T., Nakamura, T. 1994. A severe outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Eur. J. Pediatr.* 153, 650–655.
6. Ammon A, Petersen LR, Kar ch H. 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis.* 179:1274-1277.
7. Anónimo. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 1220 pp, Washinton, D.C.
8. Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, y J. G. Morris, Jr. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18:29-51.
9. Asakura, H., S. Makino, T. Shirahata, T. Tsukamoto, H. Kurazono, T. Ikeda, y K. Takeshi. 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol. Immunol.* 42:815-822.
10. Austvoll, J. 1957. Gut oedema in a litter of four day old pigs. *Vet Rec* 69:104.
11. Bertschinger, H.U., and Pohlenz, J. 1974. Cerebrospinale Angiopathie bei Ferkeln mit experimenteller Coli-Enterotoxämie. *Schweiz Arch Tierheilk.* 116:543-554.
12. Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., Griffin, P.M. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.* 269, 2217–2220.
13. Bettelheim, K. A. 2003. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. *Exp. Biol. Med.(Maywood.)* 228:333-344.
14. Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in 7 different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2483–2488.



15. Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Karch, H. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic-animals of different species. J. Clin. Microbiol. 33, 631–635.
16. Beutin, L., Knollmann-Schanbacher, G., Rietschel, W., Seeger, H. 1996. Animal reservoirs of *Escherichia coli* O157:[H.7]. Vet. Rec. 139, 70-71.
17. Biberstein, Ernst L., Chung Zee, Yuan. 1990. Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia, S.A.
18. Biehl, L. G., Hoefling, D. C., 1986. Diagnosis and treatment of diarrhea in 7 to 14 day old pigs. J. Am Vet Assoc 188:1144-1146
19. Blanco J, Blanco M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénica, necrotoxigénica y verotoxigénica de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 11:324-9.
20. Blanco M, Blanco JE, González T, Ramos J. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. Am J Vet Res. 54:1446-51.
21. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., 2001. O:H serotypes of human verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC).
22. Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, J. Rey, J. M. Alonso, M. Hermoso, J. Hermoso, M. P. Alonso, G. Dahbi, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez, y J. Blanco. 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J. Clin. Microbiol. 41:1351-1356.
23. Booher, S.L., Cornick, N.A., Moon, H.W., 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. Vet. Microbiol. 89, 69–81.
24. Boop CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine N. 1999. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. En: Manual of clinical microbiology. Murray PR, E Jo Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover. 7th ed. Washington, D.C. E d. ASM. Press. 459-474.
25. Borczyk A, Karmali MA, Lior H, Duncan LMC. 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 1:98.
26. Borie C, Monreal Z, Martínez J, Arellano C, Prado V. 1997. Detection and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in slaughtered cattle. J. Vet Med. 44: 273-9.
27. Borie, C., Monreal, Z., Guerrero, P., Sanchez, M. L., Martínez, J., Arellano, C., Prado, V. 1997. Prevalence and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and pigs slaughtered in Santiago. Chile. Arch. Med. Vet. 29, 205-212.
28. Brett, K. N., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, y S. P. Djordjevic. 2003. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. J. Clin. Microbiol. 41:2716-2722.

29. Caprioli, A. y A. E. Tozzi. 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe, p. 1. En J. Kaper and A. D. O' Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
30. Cassels FJ, Wolf MK. 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J. Ind. Microbiol.* 15:214-226.
31. Cicutta, M.E.; Parma, A.E.; Viñas, M.R.; Sanz, M.E.; Boehringer, S.I.; Roibón, W.R.; Benitez, M.C.; Barceló, M.C.; Vena, M.M. 1999-2000. Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina. *Rev. Vet.* 10/11, 1 y 2.
32. Clugston, R.E. and Nielsen, N.O. 1974. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle. *Can J Comp Med* 38:22-28.
33. Cordovéz A, Prado V, Maggi L, Cordero J, Martínez J, Misraji L, Ríos R, Soza G, Ojeda A, Levine MM. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2153-57.
34. Cornick, N.A., Booher, S.L., Casey, T.A., Moon, H.W., 2000. Persistent colonization of sheep by *E. coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4926–4934.
35. Cravioto A, Vázquez V, Soria A, Navarro A, Ortiz M. 1988. Producción de citotoxina tipo shiga (SLT)1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Vol Med. Hosp. Infant. Mex.* 45: 206-210.
36. Cray Jr., W.C., Moon, H.W., 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1586–1590.
37. Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., Harkin, M.A., 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidem. Infect.* 119, 245–250.
38. Chapman, P.A., 2000. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol.* 88, 51S–60S.
39. Donnenberg MSS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Koper JB. 1993. The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* 92:1418-1424.
40. Darong Cheng, Huaichang Sun, Jiansheng Xu, Song Gao. 2006. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Veterinary Microbiology.* 115: 320–328
41. Domínguez, A., P. Gosálvez, M. E. Llorens, T. Llovet, B. Mirelis, E. Planes, G. Prats, y J. Rodríguez. 2001. Guía per a la prevenció i el control de la infecció per *Escherichia coli* O157:H7 i altres *E. coli* verotoxígenes, 166 pp. Generalitat de Catalunya, Barcelona.
42. Dorn CR, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. 1989. Properties of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. *Epidemiol Inf.* 103:83-95.

43. Duffy, G., Garvey, P., Wasteson, Y., Coia, J.E., McDowell, D.A., 2001. Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli*. A technical booklet produced for an EU Concerted Action CT98-3935).
44. Eriksson, E., Nerbrink, E., Aspan, E.B.A., Gunnarsson, A., 2003. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the Swedish pig population. *Vet. Rec.* 152, 712–717.
45. Erskine, R.G; Sojka, W. J.; y Lloyd M. K. 1957. The experimental reproduction of a syndrome indistinguishable from oedema disease. *Vet. Rec.* 69:301-303.
46. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. 1994. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México. 251.
47. Farmer JJ III. 1995. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Manual of clinical microbiology. 6ª ed . Washington, D.C. ASM Press. 440.
48. Fegan, N. y P. Desmarchelier. 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia. *Lett.Appl.Microbiol.* 28:335-339.
49. Finlay BB, Falkow S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev.* 53:210-230.
50. Flores-Abuxapquí JJ, Suárez-Itoil GJ, Heredia-Navarrete MR, Puc- Franco MA, Franco-Monsreal J. 1994. Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch. Med. Res.* 25:303-307.
51. Fratamico P., R. L. Buchanan, and P.H. Coode. 1993. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 Sorbitol-Positive mutant. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4245-4252.
52. Fukushima, H., Hashizume, T., Morita, Y., Tanaka, J., Azuma, K., Mizumoto, Y., Kaneno, M., Matsuura, M.O., Konma, K., Kitani, T. 1999. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr. Int.* 41, 213–217.
53. Gallien, P., Klie, H., Lehmann, S., Protz, D., Helmuth, R., Schafer, R., Ehrler, M., 1994. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* from field isolates of domestic animals in Sachsen-Anhalt. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 107, 331–334.
54. Gannon, V.P.J., and Gyles, C.L. 1990. Characteristics of the Shiga like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. *Vet. Microbiol.* 24:89-100.
55. García A. C. 2004. Detección del gen *stx2* en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Barcelona.
56. Geldreich, E. E., K. R. Fox, J. A. Goodrich, R. M. Chark, y D. L. Swerdlow. 1992. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Water Res.* 26:1127-1137
57. Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254:710-713.

58. Grant, S. B., C. P. Pendroy, C. L. Mayer, J. K. Bellin, y C. J. Palmer. 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3466-3469.
59. Griffin PM, Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 13: 60-98.
60. Gutiérrez-Cázarez Z, Qadri F, Albert MJ, Giron JA. 2000. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* harboring longus type IV pilus gene by DNA amplification. *J Clin Microbiol.* 38:1767-1771.
61. Gyles, C.L. 1993. *Escherichia coli*. In: C.L.Gyles & Ch. O. Thoen, (eds). Pathogenesis of bacterial infections in animal. Pp. 164-187. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, USA.
62. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. 2004. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Third Edition. Blackwell publishing.
63. Hancock, D. D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E., Carpenter, L.V. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35, 11–19.
64. Hani, H.; Brandli, A; Nicolet, J.; Von Roll, P.; Luginbugl, H; and Horning, B. 1976. Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsguts (1971-1973). III. Pathologie des Digestionstraktes. *Schweiz Ardh Tierheilk.* 118:13-29.
65. Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., van den Biggelaar, F.L.A.M., van Leeuwen, W.J., de Boer, E. 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 67–75.
66. Holland RE. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young faro animals. *Clin Microbiol Rev.* 3: 345-375.
67. Jerse AE, Yu J, Tal BD, Kaper JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad. Sc.* 87: 7839-43.
68. Jinneman, K.C., Weagant, S.D., Johnson, J.M., Abbott, S.L., Hill, W.E., Tenge, B.J., Dang, N.L., Ramsden, R., Omiecinski, C.J., 2000. A large insertion in the Shiga-like toxin 2 gene (stx2) of an *Escherichia coli* O157:H7 clinical isolate. *Int. J. Food Microbiol.*
69. Johnson, W. M., Lior, H., 1987. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 43, 19-23.
70. Johnson, W. M., Lior, H., 1988a. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter spp.* *Microb. Pathogenesis* 4, 115-126.
71. Johnson, W. M., Lior, H., 1988b. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Pathogenesis* 4, 103-113.

72. Kaddu-Mulindwa, D.H., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S., Beutin, L., 2001. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 95–101.
73. Karch, H., M. Bielaszewska, M. Bitzan, y H. Schmidt. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34:229-243.
74. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1:619-620
75. Karmali MA. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2: 15-38.
76. Kashiwasaki, M., T Ogawa, Y. Isayama, Y. Akaike, K. Tamura, R. Sakazaki. 1980. Detection of vero cytotoxic strains of *Escherichia coli* isolated from disease animals. *Matl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn).* 20: 116-117.
77. Kaufmann, M., Zweifel, C., Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Beutin, L., Stephan, R. 2006. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J. Food Prot.* 69, 260–266.
78. Kibel, M. A. y P. J. Barnard. 1968. The hemolytic-uraemic syndrome: a survey in Southern Africa. *S. Afr. Med. J.* 42:692-698.
79. Konowalchuck, J., Speirs J. I., S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775-779.
80. Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, Tamura K, Suzuki K, Watanabe H et al. 1999. Houseflies: Not simple mechanical vector of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:625-629.
81. Konowalchuk, J., J. I. Speir, y S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.
82. Kurokawa, K., K. Tani, M. Ogawa, y M. Nasu. 1999. Abundance and distribution of bacteria carrying stxII gene in natural river water. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:405-410.
83. Law D. 1988. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 157: 1120-1123.
84. Lee Lang, A., Y. L. Tsai, C. L. Mayer, K. C. Patton, y C. J. Palmer. 1994. Multiplex PCR for detection of the heat labile toxin gene and shigalike toxin I y II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *App. Environ. Microbiol.* 60:3145-3149.
85. Leung, P.H.M., Yam, W.C., Ng, W.W.S., Peiris, J.S.M., 2001. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.* 126, 173–179.

86. Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, y W. C. Yam. 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7549-7553.
87. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
88. Licence, K., Oates, K.R., Synge, B.A., Reid, T.M., 2001. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol. Infect.* 126, 135–138.
89. López EL, Díaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Rubeglio E, Woloj M, Vázquez M, Turco M, Pickering LK, Cleary TG. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 160: 469-75.
90. López S., Catalina., Cerna, Jorge F., Villegas S, Nicolas., Thompson, Rocio., Velazquez, F. Raul., Torres, Javier., Tarr, Phillip I., Estrada G., Teresa. 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 9, No. 1, January.
91. Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K., Rahn, K., Borczyk, A., Lior, H., 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol. Infect.* 123, 17–24
92. Mac Faddin, Jean F. 1991. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana S. A. de C. V.
93. McIngvale, S. C., D. Elhanafi, y M. A. Drake. 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:799-806.
94. MacLeod, D.L., and Gyles, C.L. 1990. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga like toxin II variant. *Infect. Immun.* 58:1232-1239.
95. Mc Veigh A, Fasano A, Scott DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson DC et al. 2000. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect. Immun.* 68:5710-5715.
96. Mainil JG, Duchesnes CJ, Whipp SC, Marques LRM, O'Brien AD, Casey TA, Moon HW. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 48: 743-7.
97. Marques, L.R.M.; Peiris, J.S.M., Crys, S.J.; and O'Brien, A:D. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:33-38.
98. Mattar S, Vázquez E. 1988. *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. *Emerging Infec. Dis.* 4:126-127.

99. Mattar S, Vásquez E. 1996. Importancia de la vigilancia de un brote de *Escherichia coli*. Bol Oficina Sanitaria Panamericana. 120:523.
100. Montenegro MA, Bulte M, Triumph T, Aleksic S, Reuter G, Bulling E, Helmuth R. 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. J. Clin. Microbiol. 28: 1417-21.
101. Mead, P. S. y P. M. Griffin. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 352:1207-1212.
- 102 . Meng, J. y M. P. Doyle. 1998. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, p. 92-108. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), AMS Press, Washington D.C.
103. Melton-Celsa, A. R. y A. D. O'Brien. 1998. Structure, biology, y relative toxicity of shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-128. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C.
104. Morse, S. S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg. Infect. Dis. 1:7-15.
105. Nakao, H. y T. Takeda. 2000. *Escherichia coli* Shiga toxin. J. Nat. Toxins. 9:299-313.
106. Nakazawa, M., Akiba, M., Sameshima, T. 1999. Swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Emerg. Infect. Dis. 5, 833–834.
107. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.
108. Naylor, S.W., Gally,D.L., Low, J.C. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. International Journal of Medical Microbiology. 295:419–441
109. Nielsen, N.O., and Clugston, R.E. 1971. Comparison of *E. coli* endotoxin shock and acute experimental edema disease in young pigs. Ann NY. Acad. Sci. 176:176-189.
110. Notario P, Rodolfo, Fain B, Juan Carlos, Prado J, Valeria, Ríos V, Maritza, Borda O, Noemí, Gambandé G, Telma. 2000. Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal. Rev. Méd. Chile v. 128, n. 12.
111. O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, y S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:694-696.
112. O'Brien, A. D. y R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev. 51:206-220.
113. O'Brien, A. D. y J. Kaper. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Yesterday, today, and tomorrow, p. 1-11. En J. Kaper y A. D. O' Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
114. Ojeda A, Prado V, Martínez J, Arellano C, Borczyk A, Johnson W et al. 1995. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. J Clin Microbiol. 33:2199-2201.

115. Ojieniyi, B., P. Ahrens, A. Meylinf. 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. Hybridization assay, polymeraza chain reaction and phenotypic assays, J. Vet. Med. B41: 46-59.
- 116 . Orskov, I., and Orskov, F. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In Methods in Microbiology, vol. 14. Ed. T. Bergan. New Cork: Acad. Press, pp. 43-112.
117. Orskov, F., Orskov, I., Villar, J.A. 1987. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet. 2:276.
118. Ostroff SM, Griffin PM, Tauxe RV, Shipman LD, Greene KD, Wells JG et al. 1990. A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157 infections in Washington State. Am. J. Epidemiol. 132: 239-47.
119. Palacios, M.M.A. 1992. Detección de citotoxina (SLTIIv) en cepas de *Escherichia coli* de origen porcino. Tesis ENCB, IPN, México.
120. Parreira, V.R., C. W. Arns, T. Yano. 1994. An agar-overlay method for detection de toxins produced by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 120: 303-306.
121. Paton, A. W. y J. C. Paton. 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga- like toxin II-related cytotoxin associates with a case of hemolytic uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 34:463-465.
122. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Wells, B. R., Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, y M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.
123. Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., Levine, M. 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. J. Clin. Microbiol. 37, 778–781.
124. Rivas M, Voyer L, Tous M, Leardini N, De Mena MF, Wainstein R et al. 1993. Hemolytic uremic syndrome: co-infection with two different serotypes of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. Medicina (Buenos Aires). 53: 487-90.
125. Roberts, P.H., Davis, K.C., Garstka, W.R., Bhunia, A.K., 2001. Lactate dehydrogenase release assay from vero cells to distinguís verotoxin producing *Escherichia coli* from non-verotoxin producing strains. J. Microbiol. Methods 43, 171–181.
126. Rodríguez Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex. 44: 464-475.
127. Satcher.D. 1995. Emerging infections: getting ahead of the curve. Emerg. Infect. Dis. 1:1-6.
128. Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemuhl, J. Heesemann, y H. Karch. 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. Infect. Immun. 61:534-543.
129. Schmidt H, Beutin L, Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun. 63:1055-1063.



- 130.** Schmidt, H., C. Geitz, P. I. Tarr, M. Frosch, y H. Karch. 1999. Non- O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* 179:115-123.
- 131.** Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., Karch, H. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H-strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3491–3496.
- 132.** Schmidt, H. Bielaszewska, M., Karch, H., 2001. Characterization and typing of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* by molecular methods. In: Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y., McDowell, D.A. (Eds.), Conference Proceedings on 'Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli*' organised by an EU Concerted Action (CT98- 3935) in Malahide, Dublin, Ireland. pp. 124–129. ISBN 1-84170-147-5.
- 133.** Schimmelpfennig, H.H. 1970. Untersuchungen zur Aetiologie der Oedemkrankheit des Schweines. In Beiheft 13 zum Zentralblatt für Veterinärmedizin Berlin; Paul Parey, pp. 1-80.g
- 134.** Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, y H. Karch. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1205-1208.
- 135.** Schofield, F.W., and Schroeder, J.D. 1954. Some important aspects of oedema disease in swine (enterotoxaemia). *Can. J. Comp. Med.* 18:24-28.
- 136.** Schofield, F.W., and Davis, D. 1955. Oedema disease (enterotoxaemia) in swine. II. Experiments conducted in a susceptible herd. *Can. J. Comp. Med.* 19:242-245.
- 137.** Shanks, P.L. 1938. An unusual condition affecting the digestive organs of the pig. *Vet. Rec.* 50:356-358.
- 138.** Sherwood D. Snodgrass DR, O'Brien AD. 1985. Shiga-like toxin production from *Escherichia coli* asociated with calf diarrhea. *Vet. Rec.* 116: 217-8.
- 139.** Smith, H.W. 1963. The haemolysins of *Escherichia coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 85:197-211.
- 140.** Smith, H.W. an Linggood, M.A. 1971a. Observations on the pathogenic properties of the K88. HLY and ENT plasmids of *Escherichia coli* with particular referece to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 4:467-485.
- 141.** Sojka, W.J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonw Agric. Bur, Farnham Royal, Bucks, England, pp. 104-156.
- 142.** Sonntag, A.K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., Schmidt, M.A., Karch, H. 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8855–8863.
- 143.** Speirs, J. I., S. Stavric., Konowalchuck, J. 1977. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect. Imm.* 1977. 16: 617-622.

- 144.** Stephan, R. y F. Untermann. 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J. Clin. Microbiol.* 37:1570-1572.
- 145.** Stephan, R., Ragetti, S., Untermann, F., 2000. Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *J. Appl. Microbiol.* 88, 335–341.
- 146.** Straw, P.E.; Zimmerman, J.J.; Allaine, S.D.; Taylor, D.J. 2006. Diseases of swine. Blackwell publishing. 9<sup>th</sup> edition.
- 147.** Sweeney, E.J. 1972. *Escherichia coli* enterotoxaemia of swine: A bacteriological study of Irish outbreaks during 1971. *Ir. Vet. J.* 26:69-73.
- 148.** Swerdlow, D. L., B. A. Woodruff, R. C. Brady, P. M. Griffin, S. Tippen, H. D. Jr. Donnell, E. Geldreich, B. J. Payne, A. Jr. Meyher, J. G. Wells, K. D. Greene, M. Bright, N. H. Bean, y P. A. Blake. 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117:812-819.
- 149.** Tarr PI. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 20:1-10.
- 150.** Tarr, P. I. y M. A. Neill. 1996. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 174:1136-1139.
- 151.** Thomas A, Cheosty T, Frost J, Chart H, Smith H, Rowe B. 1996. Verocytotoxin – producing *Escherichia coli*, particulary serogroup O157 associated with human infections in England and Wales: 1992-1994. *Epidemiol. Infect.* 1996; 117:1-10.
- 152.** Timoney, J. F. 1949. Experimental production of oedema disease of swine. *Vet. Rec.* 61:710.
- 153.** Timoney, J. F. 1950. Oedema disease in swine. *Vet. Rec.* 62:748-756.
- 154.** Timoney, J. F. 1957. Oedema disease of swine. Timoney, J. F. *Vet. Rec.* 69:1160-1175.
- 155.** Timoney, J.F., Jr. 1986. Genetic and characterization studies on edema disease toxin. Proc. 9<sup>th</sup>. Int. Congr. Pig. Vet. Soc., Barcelona. P. 199.
- 156.** Torres, R. J. 1992. Estudio sobre el uso del vinagre como preventivo de diarrea colibacilar en cerdos, ensayando su efectividad para controlar a *Escherichia coli* enteropatógena (K88, K99, 987P). Tesis de licenciatura, FES Cuautitlán UNAM, Méx.
- 157.** Trevena, W., R. Hooper, C. Wray, G. Willshaw, T. Cheasty, y G. Domingue. 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet. Rec.* 138.
- 158.** Tschäpe, H., R. Prager, W. Streckel, A. Fruth, E. Tietze, y G. Bohme. 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school green butter as the infection source. *Epidemiol. Infect.* 114:441- 450.

- 159.** Tzipori, S., K. I. Wachsmuth, C. Chapman, R. Birner, J. Brittingham, C. Jackson, and J. Hogg. 1986. The pathogenesis of Hemorrhagic Colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Gnotibiotic Piglets. *J. Infect. Dis.* 184:712-716.
- 160.** Valdivia, A. G. 1995. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de Verocitotoxinas de *Escherichia coli*, Tesis de Grado, FES Cuautitlan UNAM. Mex.
- 161.** Wallace, J.S., Cheasty, T., Jones, K. 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* 82, 399–404.
- 162.** Wasteson Y, Lund A, Olsvik Ø. 1992. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *Vet. Microbiol.* 30: 179–190.
- 163.** Weinstein, D.L.; Jackson, M.P.; Samuel, J.E.; Colmes, R.K.; and O'Brien, A.D. 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 170:4223-4230.
- 164.** Wells, J. G, Davis, B. R., Wachsmuth I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R., Morris, G. K. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 18:512-520.
- 165.** Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN et al. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 985-9.
- 166.** Wittham TS, Kaye WJ, Wilson RA. 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.
- 167.** Whittam, T. S., S. D. Reid, y R. K. Selander. 1998. Mutators and longterm molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg. Infect. Dis.* 4:615-617.
- 168.** Woodward, M.J., Kearsley, R., Wray, C., Roeder, P.L., 1990. DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheal disease in cattle and pigs. *Vet. Microbiol.* 22, 277–290.
- 169.** World Health Organization. 1998. Zoonotic non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific workin group meeting.
- 170.** Wray, C., McLaren, I.M., Carroll, P.J. 1993. *Escherichia coli* isolated from farm-animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet. Rec.* 133, 439–442.
- 171.** Yarze, J.C., Chase, M.P., 2000. *E. coli* O157:H7 – Another waterborne outbreak!. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1096.
- 172.** Yeong Jo, M., Hyun Kim, J., Hyang Lim, J., Young Kang, M., Bum Koh, H., Ho Park, Y., Young Yoon, D., Seok Chae, J., Kug Eo, S., Hwa Lee, J. 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International Journal of Food Microbiology.* 95:41– 49.

- 173.** Yoh, M. y T. Honda. 1997. The stimulating effect of fosfomicin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Epidemiol. Infect.* 119:101-103.
- 174.** Zamora, M. V., Reinhardt, M. V., Polette, T. M., Macías, T. M. 2000. Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT1. *Arch. Med. Vet. Chile.* 2000 V.32 n.1.
- 175.** Zamora, M. V., Reinhardt, M. V., Polette, T. M., Macías, T. M. 1999. Diarrea neonatal porcina. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* toxigénicas productoras de STa, LT y VT1. *Arch. med. Vet.* 31: 237-242.
- 176.** Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, y H. Karch. 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40:1441-1446.
- 177.** Zweifel, C., Schumacher, S., Beutin, L., Blancc, J., Stephaa, R. 2006. Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Veterinary Microbiology.* 117:328–332.
- 178.** <http://www.sciencenet.com.au/vtetable.htm>.