



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CAUSADOS POR  
Escherichia coli O157:H7 Y DOS MUTANTES EN  
LOS GÉNES *csgD* y *cadA* EMPLEANDO UN  
MODELO EN CONEJOS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**RODRIGO SOLÍS SOSA**

ASESOR: Dr. en C. Guillermo Valdivia Anda



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CAUSADOS POR Escherichia coli 0157:H7  
Y DOS MUTANTES EN LOS GENES csgD Y cadA EMPLEANDO UN MODELO EN  
CONEJOS

que presenta el pasante: Rodrigo Solís Sosa  
con número de cuenta: 40205986-2 para obtener el título de :  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de Junio de 2008.

PRESIDENTE Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

VOCAL Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

SECRETARIO Dr. Guillermo Valdivia Anda

PRIMER SUPLENTE MVZ Olivia Adams Vázquez

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Elisa Gutiérrez Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Trabajo financiado por los proyectos:**

- Programa de apoyo de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT)
- Cátedra de investigación FESC No.IN.2.14
- Programa de apoyo a proyectos para el mejoramiento de la enseñanza (PAPIME)
- Proyecto de mejoramiento de la enseñanza MII 021
- Laboratorio de diagnóstico integral veterinario (DIVET<sup>®</sup>)

**Este trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones de la unidad de investigación multidisciplinaria en salud animal de FESC campo 4**

- Servicios Corporativos Silanes: por su paciencia y apoyo durante mi desarrollo en la empresa y la elaboración de este trabajo especialmente Lic. Carlos Pérez, QFB Federico Arias y M en A. Rita Mancilla

## RECONOCIMIENTOS

- **Dr en C. GuillermoValdivia:** por haber sido un gran guía dentro de esta experiencia única que fue la elaboración de este trabajo; sin usted este trabajo hubiera sido imposible
- **M en C. Victor Perez Valencia:** por haber sido siempre una mano abierta para mis dudas, inquietudes, y locuras. No hay vuelta de hoja, usted no solo me enseñó acerca de veterinaria, sino me enseñó acerca de la vida.
- **MVZ Blanca Moreno Cardenti:** es difícil pensar lo gran amiga que puede llegar a ser una maestra tal y como usted lo fue durante la carrera y aun lo sigue siendo.
- **Mis Sinodales:** Dr, JoseAntonio Montaraz, Dr GuillermoValdivia, Dr Ignacio Soto, MVZ Olivia Adams y MVZ Elisa Gutierrez; por haberme dado parte de su valioso tiempo leer y corregir este trabajo paraís convertirlo en un trabajo digno de un medico de la UNAM
- **M en C Germán Garrido:** por amablemente haber procesado todas las muestras histológicas utilizadas en este trabajo
- **Especial reconocimiento a el Phd Alfredo Torres,** ya que a pesar de que no he tenido el gusto de conocerlo; gracias a su arduo trabajo elaborando las cepas utilizadas en esta investigación, fue posible realizarla.

## **DEDICATORIA**

Al incluir a alguien dentro de estas dedicatorias, quiere decir no solo que fueron un cimiento irremplazable dentro de la elaboración de este trabajo, sino también dentro de mi formación como ser humano.

### **Papá y Mamá**

*Ya que no solo me dieron el regalo más grande que se puede dar, la vida; sino que a lo largo de este largo camino me han dado las herramientas necesarias para aprovechar ese regalo que me dieron. Dichas herramientas: valor, honestidad, rectitud, perseverancia y honradez, me los han inculcado de la mejor manera que se puede, con amor puro. Muchas gracias papás, sin ustedes no seria nada.*

### **Víctor**

*Hermano, ya que hemos crecido juntos, y hemos aprendido juntos que lo que hace fuerte a un equipo no son los puntos en común, sino son las diferencias y diversidad de dicho equipo. Como mi hermano mayor, siempre has sido un ejemplo a seguir, te quiero, te admiro y te respeto, hoy mañana y siempre.*

### **Abuelo Enrique**

*Por medio de un ejemplo impecable de cómo una vida se debe de vivir, me has dado el ejemplo e inspiración para saber que pasos tomar y que decisiones hacer a lo largo de mi vida.*

### **Madre Vicky**

*Me has dado muchas enseñanzas y ejemplos, y sobre todo me has enseñado que la familia es un valor único e irremplazable y eso siempre debe de valorarse ya que al final la familia es con la que cuentas incondicionalmente*

### **Abuelita Angelita**

*Además de enseñarme lo infinito que el amor puede existir dentro de una persona, en estos últimos días me has enseñado que ese amor puede ser transformado en fuerza de voluntad par vencer cualquier cosa, incluso la enfermedad mas infame.*

### **Tío Luis**

*Contigo he vivido cosas únicas y he caminado junto a ti mucho tiempo, gracias a ti conocí lo hermosa que puede ser una vida simple de “rancho”, pero así también he aprendido lo importante que es hacer que las cosas como se deben y llamar a las cosas por su nombre*

### **Familia Materna Y Paterna**

*El nombrarlos a todos ustedes y darles una dedicatoria especial a cada uno de ustedes creo que es lo que realmente se merecen pero si así lo hiciera creo que se llevaría mas las hojas de dedicatorias*

*que las de el trabajo en si, así que solo quiero decirles que un poco de cada uno de ustedes se encuentra dentro de mi así que esta tesis no es solo mía sino un poco de cada uno de ustedes, gracias*

### **Samanta**

*Preciosa, a lo largo de la carrera has sido mucho más que mi mejor amiga, me has visto reír y llorar, desvelarme y sudar, y tú siempre has estado allí para darme luz cuando todas las demás luces se han apagado. Creo que no hay muchas cosas que te pueda decir en unas cuantas líneas que no te haya dicho ya en persona, así que solo resumo todo eso en esta dedicatoria. Gracias, gracias por haber sido mi cómplice en esta locura a la que le llamamos vida.*

### **Cesar**

*Hay personas que te dan su cariño y amistad incondicional, a veces mas allá de lo que tal vez uno mismo debiera de merecer, pero aun así ah están, siempre, firmes, con una mano estirada para el momento en el que se necesite, hermano, tu me has enseñado eso, y a veces siento que no merezco el tener a una persona tan buena como mi mejor amigo, pero lo único que puedo hacer es darte con todo mi corazón la dedicatoria de esta tesis. Te quiero hermano.*

### **Desire**

*Este trabajo no hubiese sido posible sin las muchas horas que gastaste junto a mi en el quirófano realizando este trabajo, pero no solo es eso, durante ese tiempo descubrí la hermosa persona que tenia al otro lado de la mesa de cirugía, la gran amiga que tenia enfrente de mi, y a pesar de que no lo creas, tu amistad es una cosa que siempre valorare mas allá de lo que puedas imaginar, gracias por ser mi amiga Des.*

### **MVZ Cristina Moreno**

*Usted fue una de las personas que mas valor me dio a tomar una de las decisiones mas importantes de mi vida, ser MVZ, le agradezco infinitamente eso.*

### **Amigos De La Carrera**

*Durante las buenas y las malas, los arduos trabajos y las constantes desveladas, siempre estuvieron ustedes allí, apoyándonos mutuamente y la experiencia de mi carrera no hubiera estado completa si no hubiese conocido a personas tan esplendidas como todos ustedes. Gracias: Maggie, Brenda, Fernando, Paco, Gerardo, Abigail, Angelica, Claudia, Efrain, Gaby, Mariana, Fernanda, Richard, Jessey, Lorena, etc...*

### **Animales**

*Gracias a todas esas inocentes vidas que involuntariamente nos cedieron en afan de poder enseñarnos para así, a la larga, salvar muchas mas vidas, gracias por ser la gran inspiración de cualquier veterinario, gracias por ser.*

**... y el estudiante le pregunto**

**¿Porque que me pusiste este camino tan difícil,  
y me hiciste ver tanto sufrimiento,  
me hiciste desvelarme tantas veces  
y me hiciste ver las cosas tan friamente.  
Si yo lo único que siempre soñé  
era ayudar a los demás?**

**...Y Dios le contesto**

**Porque solo así podía realmente comprobar  
si estabas listo para salvar vidas y ser veterinario**



## INDICE

• Agradecimientos	3
• Reconocimientos	4
• Dedicatoria	5
• Índice	8
• Resumen	9
• Introducción	10
○ Breve historia	10
○ Taxonomía	11
○ Virulencia	14
○ Síndrome urémico hemolítico	19
• Antecedentes	20
• Hipótesis	22
• Objetivos	23
• Materiales y métodos	24
○ Selección y manejo de conejos	24
○ Inóculos utilizados	24
○ Técnica quirúrgica de inoculación	26
○ Obtención de muestras	30
○ Procesamiento de muestras	30
○ Elaboración de rangos normales	31
○ Histopatología	31
• Resultados	32
○ Lesiones a la necropsia y cuadro clínico	32
○ Histopatología	35
○ Hematología	44
• Discusión	67
○ Lesiones a la necropsia y cuadro clínico	67
○ Histopatología	72
○ Hematología	76
• Conclusiones	78
• Bibliografía	79

## RESUMEN

*Escherichia coli* es un agente patógeno muy importante tanto en humanos como en animales, el patotipo de *E. coli* enterohemorrágica, además de ser el causante de colitis hemorrágica en humanos, enfermedad de los edemas y colibacilosis en porcinos y Alabama rot en perros, es causante de una enfermedad en humanos que puede llegar a ser mortal denominada síndrome Urémico Hemolítico.

Torres <sup>(2)</sup> creó dos mutantes de *E coli* 86-24 por medio de la inserción de un transposón en diferentes partes de su genoma, dando como resultado una cepa deficiente en la enzima lisina descarboxilasa (P9C12D4) por poseer el transposón insertado en el gen *cadA*, y otra cepa deficiente en la producción de fimbrias enroscadas también llamadas curli (P9C8D1), por poseer el transposón insertado en el gen *csgD*. Ambas cepas, aunque deficientes en diferentes elementos, resultan ser hiperadherentes en células HeLa, cascarilla de semillas, racimos de alfalfa y células CaCo-2.

En este trabajo se busco el caracterizar la patología clínica, lesiones a la necropsia, histopatología, y hemograma de dos cepas mutantes creadas por Torres <sup>(2)</sup>; P9C12D4, P9C8D1 y su cepa silvestre 8624, en el modelo de inoculación en apéndice cecal de conejo utilizado por Valdivia <sup>(7)</sup>, buscando encontrar un aumento el la intensidad de lesiones por parte de las cepas mutantes ya que son hiperadherentes y no poseen represión de sus genes de virulencia.

Al finalizar el experimento, se pudo presenciar un aumento de la intensidad de las lesiones por parte de las cepas mutantes tal y como se había hipotetizado. En el caso de la cepa P9C12D4, este aumento fue muy severo en comparación a la cepa silvestre 8624, teniendo un aumento marcado en las lesiones a nivel glomerular, una disminución del tamaño de los folículos linfoides de la submucosa del apéndice cecal y de la pulpa blanca en el caso de el bazo; hablando de las alteraciones en el hemograma, se pudo observar, a diferencia de los individuos inoculado con otras cepas, una monocitosis muy marcada, llegando así, a crear la hipótesis de que el nivel de lesiones encontradas es, en parte, proporcional al aumento de monocitos en sangre. Así mismo, a diferencia de las cepas de referencia, 8624 y P9C8B1 tuvieron una virulencia moderadamente mayor; como en el caso de P9C12D4, se pudo encontrar un aumento de monocitos en estas cepas, pero así también de neutrófilos, por lo que se sugiere que, en menor grado que la monocitosis, pero también la neutrofilia, es un parámetro que puede ir ligado en cierta medida con la intensidad de las lesiones encontradas, al menos utilizando el modelo de inoculación en el apéndice cecal de conejos, pero más estudios se deberán de realizar al respecto para puntualizar los hallazgos aquí encontrados.

## INTRODUCCION

### BREVE HISTORIA

*Escherichia coli* fue descubierta en 1885 por el Dr Theodor Escherich durante su investigación sobre bacterias en las deposiciones de niños. Desde su descubrimiento, *E. coli* ha sido el caballo de batalla de los bacteriólogos. Esto es en gran parte porque es fácil de cultivar, manipular y caracterizar; consiguientemente, el organismo ha sido muy utilizado en genética microbiana para clonar el material genético de otros microorganismos como parte de procedimientos para aprender más acerca de los mecanismos para su control. <sup>(10)</sup>

La industria alimentaria también reconoce la importancia del organismo y desde los primeros años de la década de 1900 ha sido utilizado como indicador de contaminación fecal en el agua y la leche. En la actualidad, la inclusión de este organismo en muchas especificaciones de los productos alimentarios también reconoce su valor como indicador del estado higiénico de los alimentos. <sup>(10)</sup>

El Dr Escherich, en 1885, descubrió esta bacteria, pero su nombre original no fue el actual, en ese entonces, el género fue denominado *Bacterium* y la bacteria se le nombró *Bacterium coli commune* y no fue sino hasta 1964 que Wilson y Miles, en su obra *Principles of Bacteriology and Immunity* renombraron a este género con el nombre de *Escherichia* en honor a su descubridor, y se le asignó la especie *coli* ya que el colon es el hábitat principal de esta bacteria. <sup>(9, 10)</sup>

Para el año de 1987 ya se conocían otras cuatro especies de Escherichias (*blatta*, *fergussonii*, *bermannii* y *vulneris*). <sup>(10)</sup>

Actualmente, además de ser utilizada ampliamente en bacteriología, se considera también a *E. coli* como un agente etiológico de diversos cuadros clínicos tanto gastrointestinales como extraintestinales, tanto en animales como en el ser humano, en ocasiones, estas infecciones pueden llegar a ser fatales, razón por la cual se han desarrollado numerosas investigaciones para dilucidar exhaustivamente el comportamiento de este microorganismo. <sup>(9, 10, 11)</sup>

## TAXONOMÍA

El termino genérico *Bacterium* fue utilizado por el Dr Escherich para describir el amplio grupo de bacilos no esporulados Gram negativos que se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, en las plantas y en la tierra, y que llevan una existencia saprofítica, comensal o patógena.<sup>(10)</sup>

El genero *Escherichia* fue descrito en 1964 como organismos móviles o inmóviles que se ajustan a la definición de *Enterobacteriaceae*: Bacilos asporogenos Gram negativos, con frecuencia móviles, con flagelos peritricos, fácilmente cultivables en medios ordinarios de laboratorio, aeróbicos y facultativamente anaeróbicos, todas las especies fermentan la glucosa con formación de ácido o de ácido y gas, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, todos reducen de nitritos a nitratos, oxidasa negativos, catalasa positivos, típicamente parásitos intestinales del hombre y de los animales, aunque algunas veces se pueden encontrar libres o en otras partes del organismo y presentan las características bioquímicas específicas (Tabla 1).

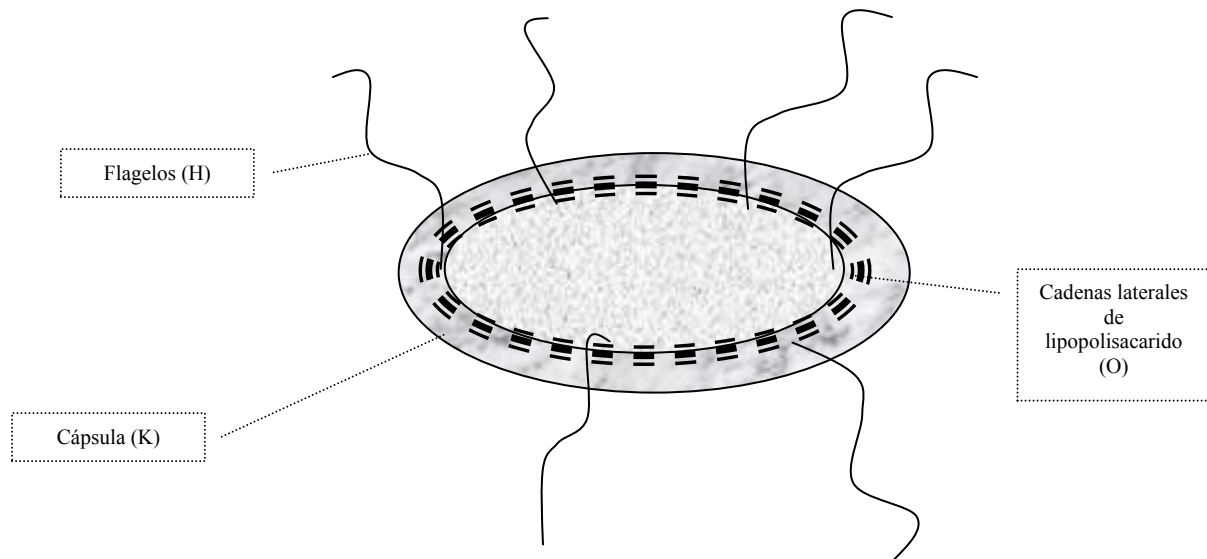
Tabla 1  
Características bioquímicas de *E. coli*

Prueba	Porcentaje de positividad en la reacción
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citratode Simmons	1
Sulfuro de Hidrogeno	1
Hidrólisis de Urea	1
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Motilidad(36°C)	95
Hidrolisis de gelatina (22°C)	0
Fermentación de sacarosa	50
Fermentación de manitol	98
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de sorbitol	94
Fermentación de arabinosa	99
Fermentación de rafinosa	50
Fermentación de ramnosa	80
Fermentación de xilosa	95
Fermentación de melibiosa	75

Brooks,2005

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica compleja, se han clasificado mas de 150 antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) termoestables, mas de 100 antígenos K (cápsulares) termolábiles y mas de 50 antígenos H (flagelares).<sup>(11)</sup> (Fig 1)

**Figura 1**  
**Antígenos de las *Enterobacteriaceae***

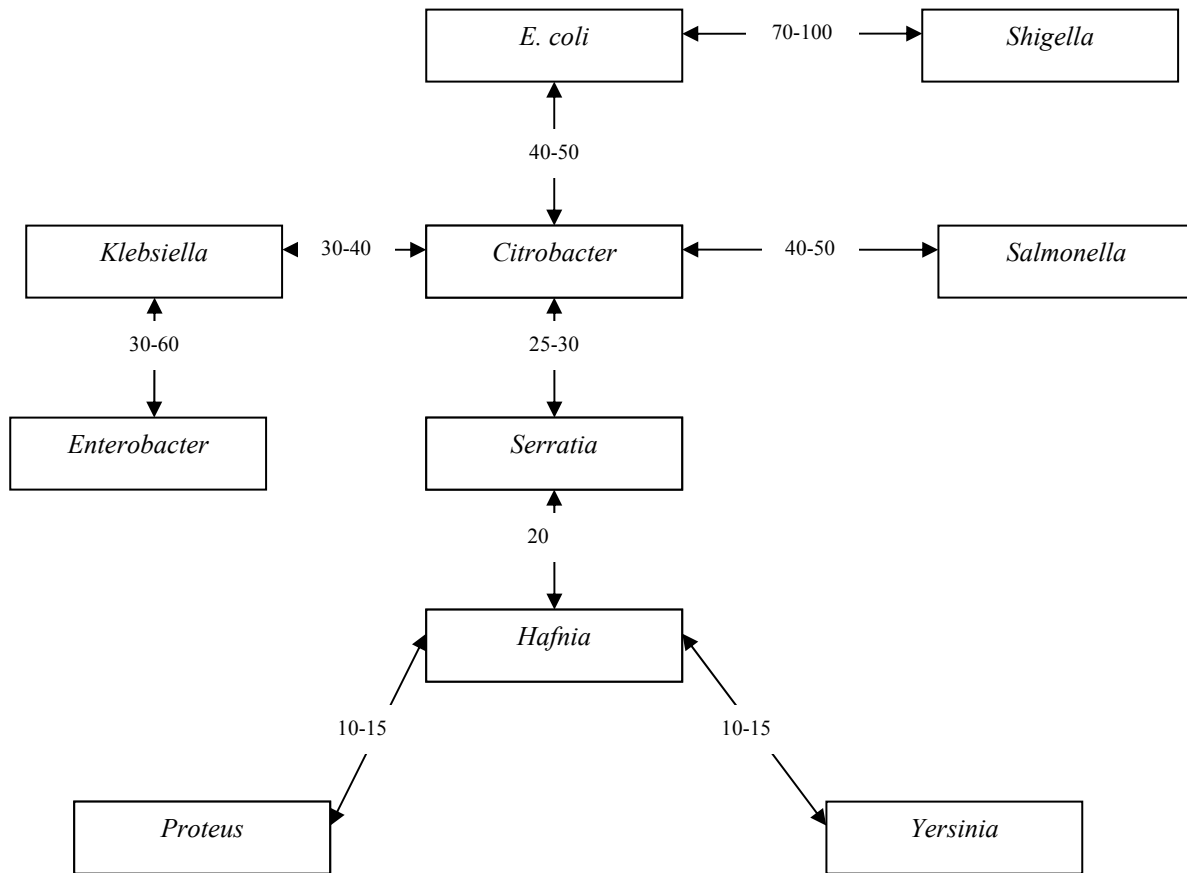


**Modificado de Brooks,2005 y Bell, 2005**

El genero *Escherichia* fue admitido en la familia *Enterobacteriaceae* en 1984, describiendo las características del biotipo principal de *E. coli* y para 1987 el genero *Escherichia* ya contenía cinco especies: *E. blattae* (aislado del intestino posterior de la cucaracha *Blatta orientalis*), *E. fergussonii*, *E. bermannii* y *E. vulneris*. Desde el punto de vista bioquímico todas estas especies son distintas a *E. coli*.<sup>(10)</sup>

En base a la homología del DNA, *E. coli* y cuatro especies del genero *Shigella* deberían de ser consideradas una especie única.<sup>(10)</sup> (fig. 2)

**Figura 2**  
**Parentesco del DNA de *E. coli* y de algunos otros géneros de las *Enterobacteriaceae***



**Los números representan el porcentaje aproximado del parentesco (Bell,2000)**

Las infecciones causadas por *Escherichia coli* están divididas en dos grandes grupos: infecciones intestinales y extraintestinales. <sup>(8,9)</sup>

Las infecciones extraintestinales son especialmente infecciones abdominales (peritonitis), infecciones de heridas, meningitis neonatal, bacteriemias e infecciones urinarias (cistitis pielonefritis y prostatitis). <sup>(8,9)</sup>

Las infecciones intestinales, son divididas en seis patotipos: Enteropatógena (EPEC), Enterotoxigénica (ETEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC) y, la recientemente descrita, Difusamente Adherente (ECDA). <sup>(8,9,10)</sup>

## **VIRULENCIA**

Además de los factores de virulencia y adherencia comunes a todas las enterobacterias, las *E. coli* causantes de infecciones poseen otros medios para crear daño, algunos de estos elementos de patogenicidad se mencionan a continuación:

*Cápsula.*- Ciertas cepas de *E. coli* que causan diarrea en becerros y cerdos, producen abundante lipopolisacárido que puede ayudar en la colonización del intestino. Estudios sobre mutantes espontáneos no generadores de este polisacárido sugieren que el material cápsular contribuye a la formación de microcolonias que se unen al epitelio intestinal. La cápsula en cepas invasivas, puede servir como un elemento antifagocítico. Dentro de las cepas que causan septicemia en humanos, se tiene una gran prevalencia de la presencia de la cápsula de tipo K1, aún mas, las cepas que poseen K1, son mas virulentas en modelos animales que las cepas negativas a este elemento. <sup>(10)</sup>

*Membrana celular.*- El lipopolisacárido (LPS) de la membrana celular está involucrado en la virulencia, particularmente en las cepas invasivas de *E coli*. El LPS es el mayor constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La mayoría de las actividades biológicas de la molécula de LPS se lleva a cabo en el componente del lípido A, pero la cadena externa que constituye al antígeno O, es también un factor importante en la interacción con el hospedero. El LPS estimula a los macrófagos y a otras células a producir un gran rango de citocinas y causar profundos cambios en el hospedero. La inducción del factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina I (IL-I) por el LPS pueden ser los causales de algunas de las alteraciones que son observadas en el Síndrome Urémico Hemolítico. Así la fiebre y la coagulación intravascular diseminada son muy prominentes dentro de la sintomatología de la enfermedad septicémica debida a *E coli*. <sup>(10)</sup>

Las proteínas de la membrana externa pueden contribuir a la virulencia. *TraT* es una lipoproteína de la membrana externa específica de ciertos plásmidos de tipo F; le confiere resistencia a la acción bactericida del suero. <sup>(10)</sup>

*pilis.*- Los pilis o fimbrias, son delgados filamentos proteináceos que se proyectan desde la superficie de la bacteria y les confieren propiedades de adherencia a los organismos.

- Tipo I.- La mayoría de las *E coli*, sean patógenas o no, poseen pili Tipo I, el cual es relativamente largo (2  $\mu\text{m}$ ) y lleva a cabo la adherencia en superficies diversas, incluyendo las células sanguíneas de Tipo A de humano y cuyo. Este pili aparentemente no es un factor de virulencia en las enfermedades entéricas, pero parece contribuir a la virulencia de los patógenos de tracto urinario.<sup>(12, 9)</sup>
  
- K88 (F4).- El pili K88 fue el primer pili de *E coli* descubierto. Cepas de ETEC de porcinos que poseen el pili K88 son capaces de adherirse eficientemente a la mucosa intestinal de lechones, así manteniendo poblaciones muy elevadas en el intestino. El pili K88 promueve la colonización particularmente en la parte anterior del intestino delgado de lechones. Receptores específicos para la unión de este pili se encuentran en el epitelio intestinal, los lechones carentes de estos receptores son resistentes a las enfermedades causadas por K88 pero son susceptibles a infecciones por ETEC con otras adhesinas. El gen del receptor K88 es dominante e individuos homocigotos recesivos son resistentes.<sup>(10,13)</sup>
  
- K99 (F5).- El pili K99 es similar en estructura y función al pili K88 pero es encontrado en ETEC de porcinos, ovinos y bovinos.<sup>(14, 10)</sup> Típicamente, el pili K99 se encuentra en ETEC con cápsulas muy abundantes de los serogrupos 8, 9, 20 64 y 101. Al igual que en K88 la producción de K99 está mediada por un plásmido y por temperatura y la adherencia se da con células intestinales de animales jóvenes. La cantidad de K99 producida por cepas del grupo O101 es considerablemente mayor a la de otras cepas pertenecientes a otros serogrupos O.<sup>(14, 10)</sup>
  
- 987P (F6).- Este pili está determinado por un plásmido, se encuentra en las ETEC de bovinos y porcinos de los grupos O9 20, 101, y 141 los cuales son asociados con diarrea de neonatos. Se ha reportado que un locus de 9 genes adyacente al gen que codifica para la toxina termoestable codifica las proteínas necesarias para la síntesis y expresión de éste pili. Algunas cepas de ETEC porcina son capaces de expresar tanto este pili como el K88.<sup>(14, 10)</sup>
  
- F41.- Además del pili K99, el K41 frecuentemente se encuentra en cepas de ETEC bovinas y porcinas de los serogrupos O9 y 101. F41 también se encuentra en cepas ETEC de bovinos y



porcinos carentes de K99, K88 y 987p; éste parece ser el responsable de la colonización del intestino de cerdos, corderos y becerros. <sup>(10)</sup>

- Antígenos del factor de colonización I y II.- Son los mejor caracterizados de muchas de las adhesinas que promueven la colonización en cepas de ETEC en humanos. Estos pilis mediados por plásmidos son antigénicamente diferentes entre ellos y entre los pilis que promueven la adhesión en otras especies. <sup>(10)</sup>
- Vir.- Ha sido identificado en un pequeño número de cepas de *E coli* que causan septicemia en becerros y corderos. Estas cepas poseen el plásmido vir que codifica para una toxina y para un antígeno fimbrial de superficie. La toxina es letal para animales de experimentación, pero no existe información acerca de la significancia de la fimbria. <sup>(10)</sup>
- Curli.- Una de las cepas problema de este trabajo se generó con una inserción de un transposón en el gen *csg* el cual codifica para la producción de estas fimbrias. Algunas cepas de *E coli* recuperadas de cepas de vacas mastíticas producen esta fimbria delgada y enroscada la cual es capaz de unirse a la fibronectina. Se ha planteado que este pili juega un papel muy importante en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de la glándula mamaria, pero la evidencia actualmente existente aún no ha podido comprobar este planteamiento. Las fimbrias enroscadas también han sido asociadas a ciertos aislamientos patogénicos en aves. <sup>(10, 12, 13)</sup> Paton reporta en 1998 que las cepas de EHEC O157 H7 no poseen esta fimbrias <sup>(40)</sup>, aunque el aislamiento por Tarr de la cepa **8624** O157 H7 sí posee dichos elementos. <sup>(1)</sup>

### ***Enterotoxinas***

- Toxina Termolábil (LTs).- Las cepas enterotoxigénicas de *E coli* han sido caracterizadas para humano, bovino y porcino. Solo las cepas de ETEC de humano y porcino, tienen la capacidad de producir LT. La acción básica de esta toxina es estimular la adenilato ciclase del epitelio intestinal. Los elevados niveles de AMP cíclico dan como resultado una hipersecreción de electrolitos y agua. <sup>(15)</sup>

- Toxina Termoestable.- Esta toxina posee dos principales variantes, ST I y ST II. ST I, está caracterizada por inducir la acumulación de líquido en el intestino de ratones lactantes que han sido inoculados por vía oral con dicha toxina. Este es el único tipo que generalmente producen las cepas ETEC pertenecientes a bovinos, por el otro lado, ST II es producida por algunas cepas de ETEC porcina. <sup>(10)</sup>
- Verotoxinas (Toxinas de Shiga).- Konovalchuck, en 1977, observó que las cepas de *E. coli* aisladas de heces humanas provenientes de casos de diarrea, producían una toxina similar a la producida por un tipo de *Shigella dysenteriae* (Tipo I) denominada toxina de Shiga (Stx), la que resultaba citopática para las células Vero (células de riñón de mono verde africano). Posteriormente esta toxina recibió diferentes nombres, tales como Toxina Shiga-Like, SLTx o Verotoxina. En 1978 Koster y col. propusieron que una toxina circulante fuese la causa de la colitis, hemólisis e insuficiencia renal presente en niños con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).<sup>(10)</sup>

Las toxinas de Shiga producidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1 y *E. coli* comprenden una familia de multi-subunidades, genética y estructuralmente relacionadas. Las toxinas parecidas a Shiga se clasifican de acuerdo a la similitud antigénica con Stx. Aquellas cuya actividad citotóxica es neutralizada por antisuero para Stx son llamadas como Stx-1, en tanto que las que no son neutralizadas con este antisuero son denominadas Stx-2. Existen también subtipos de Stx-2, similares antigénicamente hablando, pero con marcadas diferencias en su actividad biológica, reactividad serológica y unión al receptor. <sup>(10)</sup>

Las Stx se unen a las células blanco a través de un glicolípido neutro, globotriacilceramida (Gb3) y globotetraocilceramida (Gb4) y producen una inhibición de la síntesis proteica en las células blanco a través de la actividad de una glicosidasa-N específica de las subunidades A de la toxina que actúan en un sitio adyacente a la adenina 4324 en el componente 28S del rRNA de los ribosomas eucariontes. Las células de los epitelios del glomérulo humano son sensibles a los efectos citotóxicos de Stx, en especial cuando la exposición al TNF $\alpha$  incrementa en la superficie celular la expresión de Gb3 ya que éste actúa en la unión e internalización de la toxina por endocitosis. La composición de ácidos grasos y la longitud de la cadena de fosfolípidos de la Gb pueden jugar un rol importante en la distribución intracelular y en los efectos biológicos de la toxina. <sup>(10)</sup>

Las dosis subletales de Stx pueden también alterar la producción de mediadores vasoactivos provenientes del endotelio, tales como la endotelina y óxido nítrico los cuales a su vez pueden contribuir a cambios microvasculares tales como la colitis hemorrágica y el SUH. Además, las células que han sido afectadas de manera no letal presentan una alta susceptibilidad al ataque de polimorfonucleares activados. Las células mesangiales, las células epiteliales de los túbulos renales, los monocitos y las líneas celulares derivadas de los monocitos, son también susceptibles a los efectos tóxicos de la Stx. <sup>(10)</sup>

- Hemolisina.- La alfa hemolisina es producida por ciertos serogrupos de *E coli* causantes de diarrea y enfermedad de los edemas en porcinos. La presencia de hemolisina en aislamientos de infecciones extraintestinales en humanos es también bastante común. Se ha sugerido que el rol de la hemolisina en la presentación de infecciones extraintestinales es de elevar los niveles de hierro circulante en el huésped. <sup>(10)</sup>
- Factor Citotóxico Necrotizante.- Una toxina proteica producida por un pequeño número de cepas altamente virulentas de *E coli* O78:K80 que son septicémicas para becerros y corderos, fue originalmente llamada toxina vir y demostrada como letal para ratones, pollos y becerros. Recientemente, la toxina vir, se ha demostrado como un miembro de la familia de toxinas llamadas factor necrotizante citotóxico (CNF) siendo renombrada esta toxina como CNF2. Además de CNF2, existe CNF1 la cual es una toxina aislada frecuentemente de infecciones extraintestinales en humanos. Ambos tipos de CNF inducen una multinucleación de las células HeLa, y causan necrosis a la piel del conejo. CNF1 ha sido reportada como asociada a la alfa hemolisina codificada cromosómicamente en cepas de *E coli* recuperadas de perros con diarrea. <sup>(10)</sup>

## **SINDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)**

El SUH es un cuadro caracterizado por la combinación de insuficiencia renal aguda (IRA), trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. <sup>(35, 36)</sup>

Afecta tanto a niños como a adultos y está causado, en la mayoría de los casos, por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) siendo la más frecuente la del serotipo O157:H7 aunque

otros serotipos han cobrado importancia en los últimos años, como el serotipo O:111 en Europa.<sup>(35,36)</sup>

La patogénesis del SUH es compleja, y la enfermedad se atribuye en especial al efecto citotóxico por inhibición de la síntesis proteica que producen las toxinas de Shiga (Stx)<sup>(38)</sup>. Luego de ingresar la toxina a la circulación, se une al receptor Gb3 (Globotracilceramida) de las células endoteliales (principalmente en el riñón) lo que provoca inicialmente entrada de líquido a la célula y posteriormente la liberación de citocinas inflamatorias, anticuerpos anticitoplasmáticos de los neutrófilos, factor de necrosis tumoral e interleucinas.<sup>(24)</sup> En los vasos sanguíneos se produce ulceración endotelial con depósito de fibrina, las plaquetas se activan y adhieren a dicho sitio generando trombosis y alteración de la función del órgano blanco. Principalmente se afectan intestino, riñón y sistema nervioso central.<sup>(37)</sup> Se observa caída del filtrado glomerular debido a la microtrombosis, llevando a la retención de urea, creatinina, ácido úrico y fosfatos. Debido al consumo de plaquetas se produce trombocitopenia, con aparición de hemorragias espontáneas. La interacción endotelial-plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares agrava aún más el daño endotelial. Se produce anemia hemolítica debido a la destrucción de los glóbulos rojos en la sangre al circular por los vasos dañados.<sup>(38)</sup>

En la infancia típicamente es precedido por un cuadro de dolor abdominal y diarrea acuosa y/o sanguinolenta con un promedio de 6 días de evolución previos al diagnóstico.<sup>(39,40)</sup> Pueden asociarse vómitos y fiebre.<sup>(36)</sup> Posteriormente el paciente se vuelve más irritable, presenta palidez, petequias y púrpuras. Evoluciona a la oliguria o anuria y, si fuera tratado con exceso de líquidos, puede presentar un cuadro de sobrecarga hídrica acompañado de edema, aumento de peso, hipertensión y congestión pulmonar.<sup>(39,24)</sup> Las manifestaciones neurológicas incluyen convulsiones, ataxia, letargia y coma. El aparato gastrointestinal puede sufrir infartos, intususcepción, perforación, prolapso rectal, apendicitis o hepatomegalia.<sup>(34, 36, 39)</sup> La triada clínica fundamental del SUH consiste en insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. Constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en niños de Argentina.<sup>(36)</sup>

## ANTECEDENTES

En el 2003, Torres y col. <sup>(2)</sup>, se dieron a la tarea de buscar y caracterizar, todos los elementos involucrados en la adherencia de *E.coli* O157:H7 a cultivos de células epiteliales. Esto fue realizado mediante la inserción del transposón (*Tnp*) EZ::TN <R6Kγori/KAN-2> (EPIBIO™) en diferentes regiones del genoma de *E. coli* y después seleccionando a las colonias de cepas mutantes que poseyeran características diferenciales de adherencia a células HeLa en comparación con la cepa silvestre **8624**, la cual fue aislada por primera vez por Tarr y col. en un brote de colitis hemorrágica con varias presentaciones de SUH en Washington <sup>(1)</sup>. De estas cepas mutantes se obtuvieron, entre otros, los mutantes **P9C12D4**, con la inserción del transposón *Tnp* en el gen *cad* después del nucleótido 1642 de 2190, inhibiendo la producción de la enzima lisina descarboxilasa I (LDI); ésta cepa es hiperadherente en células Hela y Caco-2. También se obtuvo la cepa mutante **P9C8B1**, ésta posee el transposón (*Tnp*) insertado en el locus *csgD* después del nucleótido 67 de 651 del gen *csg*, inhibiendo la codificación para formar fimbrias enroscadas y posee una capacidad ligeramente menor de crear biofilms en medio mínimo de glucosa que la cepa **8624**. <sup>(2)</sup>

En ese mismo trabajo <sup>(2)</sup>, Torres encontró que al realizar mutaciones en el gen *csgD*, encargado, entre otras funciones, de regular la producción de curlina y fimbrias enroscadas, lograba obtener una mayor adherencia de esta cepa a cultivos celulares HeLa y Caco-2, obteniendo algo muy similar a la inserción del *Tnp* en el gen *cadA*, el cual codifica para la lisina descarboxilasa y se ha sugerido que, además de eso, es un gen “antivirulencia” que regula la actividad de virulencia de las bacterias en situaciones normales por medio de la descarboxilación de la lisina hacia cadaverina aparentemente inhibiendo la expresión de ciertos genes putativos de virulencia. <sup>(2, 19)</sup>

Se realizó otro trabajo concerniente a estos dos genes y sus propiedades de hiperadherencia al momento de ser inhibidos, el cual, fue llevado a cabo por Torres y Jeter en 2005 <sup>(20)</sup>, en dicho estudio, se investigó la capacidad hiperadherente de estas cepas en diferentes superficies tales como racimos de alfalfa, cascarilla de semillas, placas estériles de PVC y cultivos celulares, encontrando que el mutante en *csgD* fue hiperadherente en los racimos de alfalfa, semillas y cultivos celulares, pero no fue capaz de formar biofilms en placas de PVC, por otro lado, la cepa **P9C12D4** fue hiperadherente en todas estas superficies y además sí fue capaz de formar biofilms estables en placas de PVC.

Se han desarrollado estudios en relación a la función del gen *cadA*; Patrice Moureau en 2006 <sup>(21)</sup> reporta que la actividad del gen *cadA* no es solo como un gen regulador de la lisina descarboxilasa, sino también de como la actividad de esta enzima ayuda a la bacteria a sobrevivir el pH del estómago y las condiciones adversas encontradas a lo largo del recorrido por donde pasa la bacteria, favoreciendo así la colonización del intestino grueso. Por otro lado se ha encontrado que el gen *cadA* en *Shigella flexneri* inhibe la producción de dos enterotoxinas y que la presencia de la cadaverina, uno de los productos de la actividad de la lisina descarboxilasa (codificada en el gen en cuestión) causa una atenuación de la virulencia de esta bacteria <sup>(22)</sup>. Se ha especulado que este gen puede ser responsable de la modulación de la actividad de virulencia de *E. coli*. <sup>(22)</sup>

Con lo que concierne al gen *csgD*, gen que codifica para la activación de la transcripción del operón *csgBA*, el cual a su vez codifica para la producción de las subunidades de las fimbrias enroscadas de *E. coli*, ha sido sujeto de numerosas investigaciones. <sup>(23, 22, 25, 26)</sup>

Primeramente es conveniente subrayar una de las características específicas de las colonias de *E. coli* deficientes en la expresión de fimbrias enroscadas (también denominadas curli), éstas, tienen la capacidad de fijar la tinción Rojo de Congo, por lo que en un cultivo con este colorante, una colonia capaz de expresar curli formará colonias de color rojo y por el contrario, una cepa que no exprese estas fimbrias formara colonias de color blanco. <sup>(32)</sup> Utilizando esta característica diferencial de estas colonias, Torres <sup>(2)</sup>, pudo seleccionar a la cepa que recibió la inserción del transposón en el gen *csgD* denominándola **P9C8B1**.

Paton <sup>(40)</sup>, mencionó en 1998 que el serotipo O157:H7 era un serotipo que de forma natural no producía este tipo de fimbrias; por el contrario, en el trabajo de Torres <sup>(2)</sup> se utilizó la cepa **8624**, una O157:H7 que sí expresa curli; tal es el caso que así se pudo diferenciar el mutante de la cepa que la originó.

Las fimbrias enroscadas además de su función de formación de biofilms, son capaces de internalizar a una bacteria a células eucarióticas, logrando hacer invasiva inclusive a la cepa **K12** en el caso de insertarle ese gen. <sup>(31)</sup>

## **HIPOTESIS**

1. Ambas cepas mutantes, **P9C12D4** y **P9C8B1**, de *Escherichia coli* alteradas a favor de una hiperadherencia, podrán causar lesiones mas severas a nivel histológico, clínico y hematológico en el modelo de inoculación en el apéndice cecal de conejo.

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

1. Evaluar, a nivel macroscópico, microscópico y serológico, las alteraciones provocadas en conejos inoculados en el apéndice cecal con cepas de *Escherichia coli* O157:H7

### Objetivos Particulares

1. Evaluar las alteraciones clínicas que se originan al inocular en el apéndice cecal de conejos cepas de *Escherichia coli* **8624, P9C12D4 y P9C8B1**
2. Evaluar las lesiones en el apéndice cecal, riñones y bazo provocadas al inocular las cepas de *Escherichia coli* **8624, P9C12D4 y P9C8B1**
3. Evaluar las alteraciones en el hemograma, urea y creatinina sérica provocadas al inocular en el apéndice cecal del conejo las cepas de *Escherichia coli* **8624, P9C12D4 y P9C8B1**



## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Selección y Manejo de Conejos

Se utilizaron 21 conejos de raza Nueva Zelanda, el criterio de selección de estos conejos fue al azar, simplemente que tuvieran un peso aproximado de 1.8 Kg y estuvieran aparentemente libres de enfermedades. Dichos conejos se obtuvieron del módulo de cunicultura de la FES Cuautitlán y fueron dietados de cualquier alimento sólido 24 horas antes de someterlos al procedimiento quirúrgico de inoculación.

Después de haberles realizado la técnica quirúrgica, se les alojó en jaulas convencionales en el bioterio, prestado por el Laboratorio de Diagnostico Veterinario (DIVET). En dicho alojamiento, se les proporcionó alimento y agua fresca *ad libitum*.

### 2.- Inóculos Utilizados

Las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron en este trabajo fueron esencialmente divididas en dos: cepas de referencia y cepas problema.

Las cepas problema fueron obtenidas de la Universidad de Texas, donadas amablemente por el Phd Alfredo Torres. Dichas cepas son:

- **8624.-** Cepa obtenida de un brote en Washington aislada por Tarr en 1989, esta cepa es resistente a la estreptomicina. <sup>(1)</sup>
- **P9C12D4.-** Mutante isogénico de la cepa **8624** creado por Torres y Kaper en marzo del 2003. Esta cepa posee el transposon (Tnp) EZ::TN <R6Kγori/KAN-2> (EPIBIO<sup>TM</sup>) (resistente a kanamicina 50 ug/mL y estreptomicina 100ug/mL) insertado en el gen *cadA* después del nucleótido 1642 de 2190, inhibiendo la producción de la enzima Lisina Descarboxilasa I (LDI). Esta cepa es hiperadherente en células Hela y Caco-2 y posee una capacidad ligeramente menor de crear biofilms en medio mínimo de glucosa que la cepa **8624**. <sup>(2)</sup>
- **P9C8B1.-** Mutante isogénico de la cepa **8624** creado por Torres y Kapper en marzo del 2003 la cual posee el transposón (Tnp) EZ::TN <R6Kγori/KAN-2> (EPIBIO<sup>TM</sup>) (resistente a kanamicina 50 ug/mL y de estreptomicina 100ug/mL) insertado en el locus *csgD* después del nucleótido 67 de 651 del gen *Csg*, inhibiendo la codificación para formar fimbrias enroscadas.

Las cepas empleadas como referencia fueron proporcionadas amablemente por el Dr Guillermo Valdivia; Estas cepas fueron:

- **EDL933**.- Cepa donada por el Dr. José Luis Puente del instituto de Biotecnología de la UNAM, y aislada por primera vez en el CDC, Atlanta, por A. D. O'Brien. Esta cepa posee un genotipo EHEC clásico O157:H7 Stx1+, Stx2+ y *eae*+.<sup>(3)</sup> A lo largo del trabajo se le denominará como **IBT** por su origen en el Instituto de Bio Tecnología
- **EDL933 Δ-Ler**.- Cepa donada también por el Dr. José Luis Puente del IBT y creada en Noviembre del 2000 por Simon J. Elliot y col. Es una cepa **EDL933** con una deleción no polar del gen *ler*, el cual es un regulador de la cascada de los promotores LEE2, LEE3 y LEE4 pertenecientes a la isla de patogenicidad de EHEC. Por tal motivo evita la expresión de las lesiones características A/E.<sup>(5)</sup>
- **K12 C600**.- cepa rugosa donada por el Dr Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM, no posee LEE ni factores de virulencia.<sup>(4)</sup>
- **933W**.- Cepa rugosa donada por Dr. Carlos Eslava de la FM UNAM, es una cepa **K12 C600** lisogenizada con el fago **933W**, el cual codifica para la producción de Stx2.<sup>(6)</sup>

El diseño experimental empleado fue el siguiente: El número de animales necesario se determino en base a los trabajos previos de Valdivia <sup>(7)</sup>, en los cuáles el 100% de los animales trabajados e inoculados bajo las mismas condiciones de este experimento reaccionan en forma idéntica de acuerdo al inóculo empleado. Además, cualquier animal que hubiese muerto por la cirugía en sí, se eliminó, respetando la numeración cronológica asignada.

Cabe mencionar que todos los animales utilizados en este trabajo fueron manejados y tratados en condiciones humanitarias de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a las normas internacionales.

Tabla 1

Características del inóculo y número de animales utilizados.

Inóculo	Características	Número de animales
CST estéril	Caldo soya tripticaseina (Beckton Dickinson)	3
K12 C600	Apatógena, cepa rugosa	2
933W	K12 + stx2	2
EDL933 (IBT)	O157:H7, stx1+, stx2+, eae+, curli-	2
Δ-Ler	EDL933 O157:H7 con gen <i>Ler</i> eliminado incapacitado para expresar el fenotipo EAE	3
8624	O157:H7, stx1+, stx2+, eae+, curli+	3
P9C8B1	Cepa mutante con el transposón <i>Tnp</i> insertado en el gen <i>csgD</i>	3
P9C12D4	Cepa mutante con el transposón <i>Tnp</i> insertado en el gen <i>cadA</i>	4

El inóculo se preparó 18 h antes de su uso inoculando en 3 ml de caldo soya tripticaseina (CST) (Bioxon™) una asada, a partir de un tubo de agar soya tripticaseina (AST) (Bioxon™) sembrado con la bacteria correspondiente (sin sembrar nada en el caso del inóculo de CST estéril) para después ser incubado en estufa bacteriológica a 37 °C.

### 3.- Técnica Quirúrgica de Inoculación

La técnica quirúrgica fue realizada según lo mencionó Valdivia en 1995<sup>(7)</sup>

Se realizó la tricotomía de toda la región abdominal del conejo y se le tomó una muestra de sangre por punción yugular.

Se procedió a tranquilizar al animal con 0.08 mg de propionil promacina (0.14 ml de combelen®) además de aplicar 0.044 mg de sulfato de atropina (0.08 ml de Atropina Sulfato 2%) y un poco después se aplicaron 0.26 mg de ketamina (0.48 ml de Anesket®). El protocolo de medicación completo llevado a cabo a lo largo de todas las cirugías es indicado en la Tabla 3.

**Tabla 2**

**Protocolo de anestesia utilizado**

Medicamento	Dosis por Kg.		Inducción		Mantenimiento	
	ml	mg	ml	mg	ml	mg
<b>Combelen</b>	0,14	0,08				
<b>Anesket</b>	0,48	0,26	0,65	65	0,33	33,33
<b>Atropina Sulfato 2%</b>	0,08	0,04				

Tras observar la entrada del paciente al primer plano de anestesia (aproximadamente 5 minutos), se procedió a colocarlo en decúbito dorsal y realizar la antisepsia del área de intervención con cloruro de benzalconio 1:100 tiempo durante el cual el paciente se fue profundizando hasta el plano III de anestesia.

Una vez alcanzado el plano III quirúrgico se procedió a realizar la técnica:

**PRIMER TIEMPO:** Incisión de la piel por la línea mediana ventral aproximadamente 2 cm. debajo del esternón abarcando piel y línea alba. Una vez en cavidad se procedió a localizar el apéndice cecal el cual (la mayoría de las veces) se encontró en la región hipocondríaca derecha dorsal al ciego. Una vez ubicada la estructura, ésta se expuso sobre gasas mojadas en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE).

**SEGUNDO TIEMPO:** Se seleccionó un segmento de 5 cm aproximadamente en el cual fuese fácil ligar la vasculatura local del órgano y que fuese lo suficiente proximal al ciego para permitir una fácil manipulación del saco ciego (fig 3-a). Se procedió a ligar con doble nudo de cirujano de vicryl 3-0 la vasculatura local a lo largo de una porción de 2 o 3 cm de largo, lo suficiente para crear una holgadura cómoda entre el apéndice cecal y su vasculatura principal (fig 3-b)

**TERCER TIEMPO:** Una vez ligada la vasculatura local del órgano se pinzó la región que había quedado sin irrigación con dos pinzas rectas de Kelly una junto a la otra (fig 3-c) y se realizó un corte entre ambas pinzas (fig 3-d).

**CUARTO TIEMPO:** Una vez realizado el corte se procedió a cerrar el extremo proximal al ciego por medio de una sutura de jareta proseguida de una sutura de Connel-Cushing con monocryl 3-0 de la forma descrita por Valdivia en 1995. <sup>(7)</sup> (fig 3-e)

QUINTO TIEMPO: Se prosiguió a abrir la pinza del lado distal al ciego en donde cuidadosamente se instiló SSFE por medio de una jeringa de 60 ml unida a una sonda de alimentación infantil, recuperando el liquido en un pequeño frasco estéril, tomando todas las medidas necesarias para evitar el derrame del liquido hacia las vísceras o la cavidad. Este procedimiento se repitió hasta que el liquido que se recuperaba dejó de ser turbio.

SEXTO TIEMPO: Una vez lavado el segmento ciego, se prosiguió a realizar una sutura de jareta proseguida con Connel-Cushing del mismo modo que se indica en el cuarto tiempo, con excepción de que al momento de cerrar la jareta, antes de apretarla, se aplicó con una jeringa insulínica 1 ml del inóculo correspondiente (fig 3-f), cambiando inmediatamente los campos quirúrgicos por unos nuevos, así como los guantes del cirujano y el instrumental.

SEPTIMO TIEMPO: Ya que ambos muñones fueron cerrados, y se comprobó la hermeticidad de ellos, se tomaron los cabos libres de las suturas de ambos muñones y se anudaron entre ellos.

OCTAVO TIEMPO: Se procedió a regresar la víscera a su posición natural para proseguir a cerrar la pared abdominal con súrgete continuo anclado de monocryl 2-0 y de la piel con puntos en "U" de nylon 3-0. Finalmente se aplicó Negasunt (coumaphos 3%, propoxur 2% y prortalbin 5%) como cicatrizante.

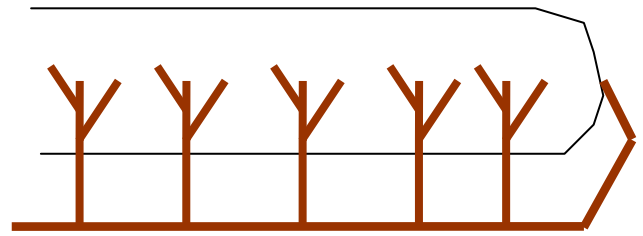
TIEMPOS SÉPTICOS: Los tiempos cuarto, quinto y sexto, son considerados tiempos sépticos por tal motivo se tomaron todas las medidas correspondientes como toques de cloruro de benzalconio 1:100 a la mucosa intestinal expuesta, y cambio de equipo de cirugía después de acabados los tiempos sépticos.

Asímismo para mejorar la calidad del procedimiento se procuró en todo momento manejar delicadamente las vísceras, manteniéndolas hidratadas con SSFE constantemente y depositándolas siempre sobre gasas hidratadas.

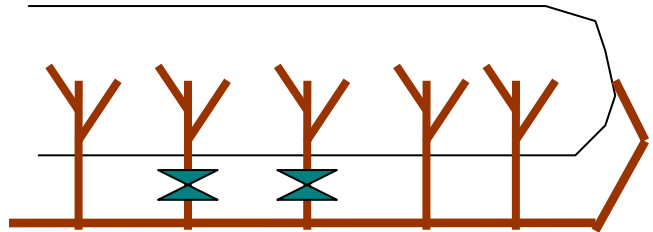
**Figura 3**

**Representación gráfica de la técnica quirúrgica utilizada**

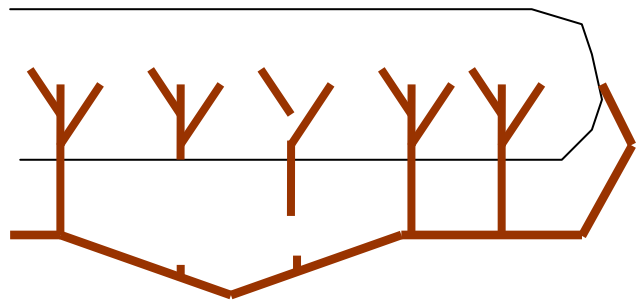
**A) Aspecto del apéndice cecal.**



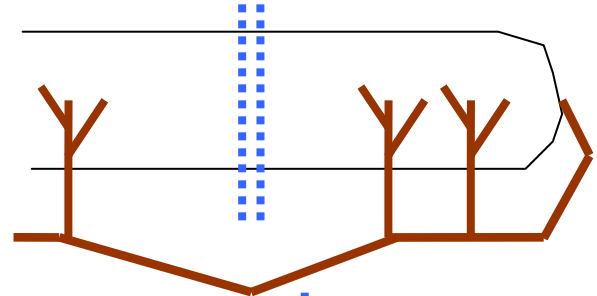
**B) Ligadura de ramificaciones que irrigan una zona del apéndice cecal.**



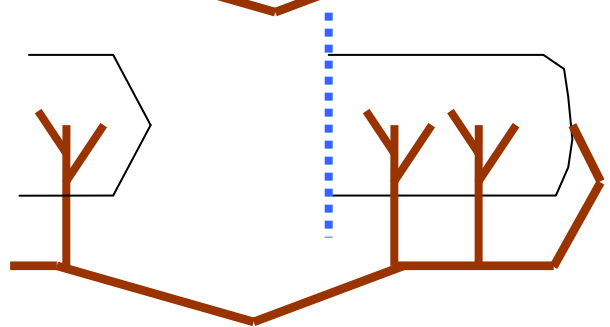
**C) Corte de los vasos ligados.**



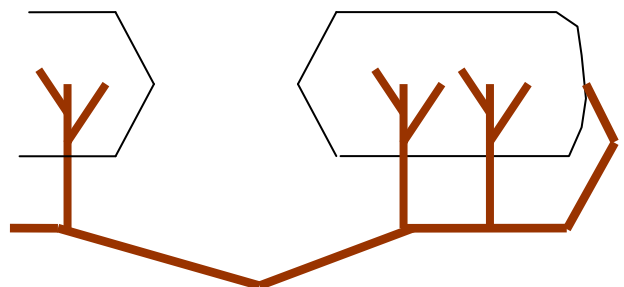
**D) Pinzar con dos pinzas de Nelly el segmento isquémico.**



**E) Cierre del segmento proximal del apéndice cecal.**



**F) Cierre del saco ciego formado adicionando el inóculo en cuestión.**



#### **4.- Obtención de Muestras**

Durante los 7 días que prosiguieron a la intervención quirúrgica se obtuvieron muestras de sangre por medio de punción yugular o intracardiaca, estas muestras fueron dos: una, para realizar cuantificación de urea y creatinina séricas (3 ml) en un tubo con gel activador de coàgulo, y la otra, para biometría hemática (3 ml) en un tubo con EDTA.

Al séptimo día a los conejos que no murieron se les realizó eutanasia humanitaria por medio de desnucamiento y desangrado para posteriormente hacerles la necropsia, en la cual, se obtuvieron muestras de bazo, riñón y apéndice cecal; fijando las muestras en paraformaldehído al 4% para su procesamiento con tinción H-E, asimismo, se tomaron muestras de heces para buscar sangre oculta. Cabe mencionar que los pacientes que fallecieron antes de los siete días, se les realizó la necropsia y la toma de muestras de órganos de la misma manera al momento de la detección de su muerte.

#### **5.- Procesamiento de Muestras**

QUIMICA SANGUINEA: La sangre sin anticoagulante obtenida de los conejos se remitió al Laboratorio de Diagnostico Veterinario (DIVET) para cuantificar creatinina y urea sérica.

BIOMETRIA HEMATICA: La sangre con EDTA obtenida de los conejos se envió al Laboratorio de Diagnostico Veterinario (DIVET) en donde se cuantificaron los siguientes valores: Eritrocitos (GR), Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Hto), Leucocitos (GB), Linfocitos (L), Monocitos (M), Neutrófilos (N), Neutrófilos en Banda (Bd), Neutrófilos Segmentados (S), Eosinófilos (E) y Basófilos (B).

HISTOPATOLOGIA: Las muestras de bazo, riñón y apéndice cecal fueron procesadas con la tinción H-E de rutina por el M. en C. Germán Garrido del laboratorio de citología de la FESC.

## **6.- Elaboración de Rangos Normales.**

Para poder comparar los datos que se obtuvieron, se tomaron como rangos normales los resultados de las muestras de sangre obtenidas prequirúrgicamente; ya procesadas estas muestras iniciales se tomaron las medias de cada uno de los elementos a analizar y se tomó como rango máximo la suma de la media y una desviación estándar de los elementos de todos los individuos y como mínimo la resta de este mismo número.

## **7.- Histopatología**

Al momento de la necropsia se tomaron muestras de riñón, bazo y apéndice cecal para ser fijadas inmediatamente en paraformaldehído. La revisión de las laminillas, se realizó ocultando los nombres de las laminillas y dándole una puntuación a cada uno de los elementos evaluados de la siguiente manera: el número 0, sin cambios patológicos aparentes; 1, leve; 2, moderado y 3, severo. Se realizó una evaluación de los cortes de estos órganos, prestando especial atención a lo anteriormente descrito en la literatura <sup>(7)</sup>:

- Riñón.- Atrofia glomerular, eventos vasculares (congestión) y siderosis:
- Apéndice Cecal.- Necrosis epitelial, atrofia de folículo linfoide en mucosa y atrofia de folículo linfoide en submucosa.
- Bazo.- disminución de la pulpa blanca, de la pulpa roja, hemosiderina y congestión del órgano.



## RESULTADOS

La nomenclatura que se utilizó para los diferentes individuos fue la siguiente “*número de cirugía + tipo de inculo*”, los individuos que fallecieron durante la cirugía o inmediatamente después, fueron eliminados del experimento, respetando la numeración consecutiva. (tabla 4).

**Tabla 1**  
**Individuos utilizados**

INOCULO	INDIVIDUOS
CST	4, 7, 10
K12	30, 37
933W	29, 39, 40
IBT	20, 38
Δ-LER	26, 36
8624	5, 6, 13
P9C12D4	9, 17, 34
P9C8B1	12, 15, 19, 35

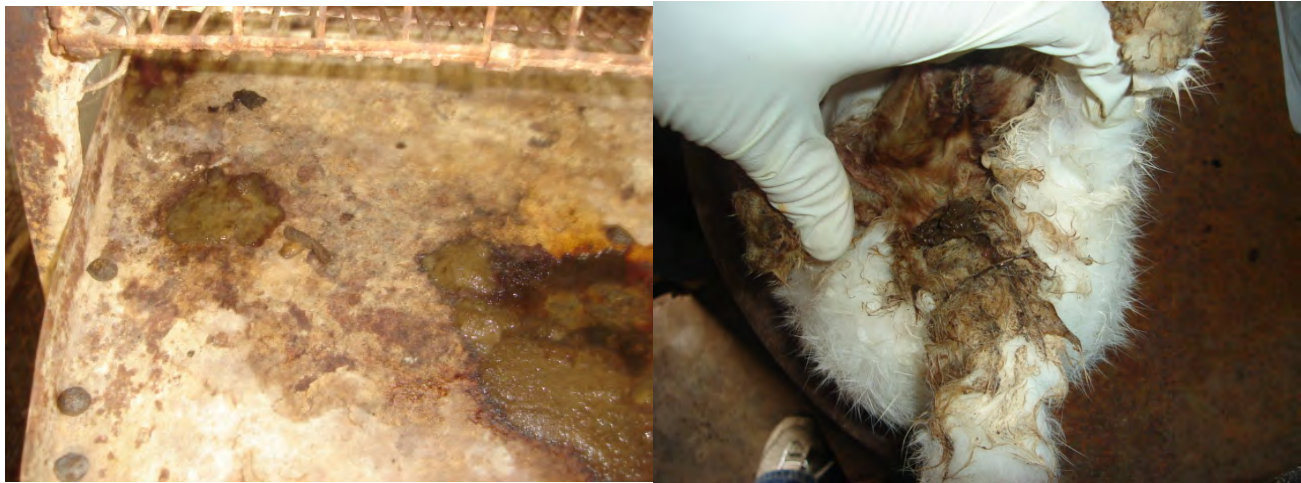
### 1.- Lesiones a la necropsia y cuadro clínico

El cuadro clínico observado durante los días post-inoculación, así como lo encontrado al momento de realizar la necropsia es resumido en la tabla 5.

**Tabla 2**  
**Signos clínicos y lesiones a la necropsia.**

Conejo	Inoculo	Diarrea	Sangre oculta en heces	Ascitis	Hipoplasia esplénica	Congestión intestinal	Contenido del apéndice cecal
4	CST	-	-	-	-	-	Purulento
7	CST	-	-	-	-	-	Purulento
10	CST	-	-	-	-	-	Purulento
30	K12	++	-	-	++	-	Purulento
37	K12	+	-	-	-	-	Purulento
29	933W	+++	+	-	-	-	Hemorrágico
39	933W	+++	+	-	+	-	Hemorrágico
40	933W	+++	+	-	-	-	Hemorrágico
20	IBT	+++	+	+	++	++	Hemorrágico
38	IBT	+++	+	-	++	+	Hemorrágico
26	Δ-LER	++	+	+	++	+	Hemorrágico
36	Δ-LER	++	-	-	++	+	Hemorrágico
5	8624	++	+	-	++	-	Hemorrágico
6	8624	++	+	-	++	+	Hemorrágico
13	8624	++	+	-	++	++	Hemorrágico
9	P9C12D4	+++	+	-	++	++	Hemorrágico
17	P9C12D4	+++	+	-	++	++	Hemorrágico
34	P9C12D4	+++	+	-	++	++	Hemorrágico
12	P9C8B1	+++	+	-	++	+	Hemorrágico
15	P9C8B1	++	+	+	++	-	Hemorrágico
19	P9C8B1	+++	+	-	++	-	Hemorrágico
35	P9C8B1	++	+	-	++	+	Hemorrágico

Clave: - ausente; + leve; ++ moderada; +++ severa



**Figura 4.- Izquierda, charola manchada con diarrea de uno de los conejos; derecha, tren posterior manchado por diarrea**

La diarrea, en la mayoría de los casos, aunque con severidad variable, poseía características similares; color amarillento, presencia de moco, pastosa y los individuos presentaban todo el tren posterior manchado (fig 4); asimismo, en todos los casos con excepción de los **CST**, **K12** y el individuo 36 **Δ-Ler**, dieron un resultado positivo a la prueba de sangre oculta en heces.

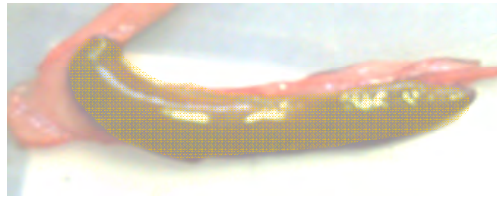


**Figura 5.- Intestinos presentando inflamación clásica por una cepa agresiva (8624)**

Hubo tres individuos que presentaron una ascitis marcada al momento de la necropsia, 15 **P9C8B1**, 26 **Δ-Ler** y el 20 **IBT** (fig 5).

También al momento de la exploración post-mortem, se pudo encontrar una de las características clásicas de la inoculación de STEC en este modelo reportadas por Valdivia A.G en 1995; una

hipoplasia esplénica en la que el órgano se adelgaza de forma muy marcada y toma un color cobrizo (fig 6).



**Figura 6.- Bazo disminuido de tamaño con un color cobrizo característico**

Hubo una congestión intestinal de intensidad variable en todos los individuos inoculados con **IBT**,  **$\Delta$ -Ler** y **P9C12D4**.

Finalmente, el apéndice cecal (A.C) de los conejos inoculados con **CST** y **K12**, poseían un aspecto blanquecino en el exterior, y al abrirlos, fue expulsado un contenido de color blanco y consistencia grumosa. El apéndice del resto de los individuos (**933W**, **IBT**, **8624**,  **$\Delta$ -Ler**, **P9C12D4** y **P9C8B1**) presentaba un aspecto rojizo oscuro en el exterior y al abrirlo, el contenido era de tipo grumoso de un color achocolatado y la mucosa presentaba zonas muy intensas de congestión y hemorragia (fig 7).



**Figura 7.- Apéndice cecal expuesto, encontrando un contenido grumoso sanguinolento**

## 2.-Histopatología

Tabla 6

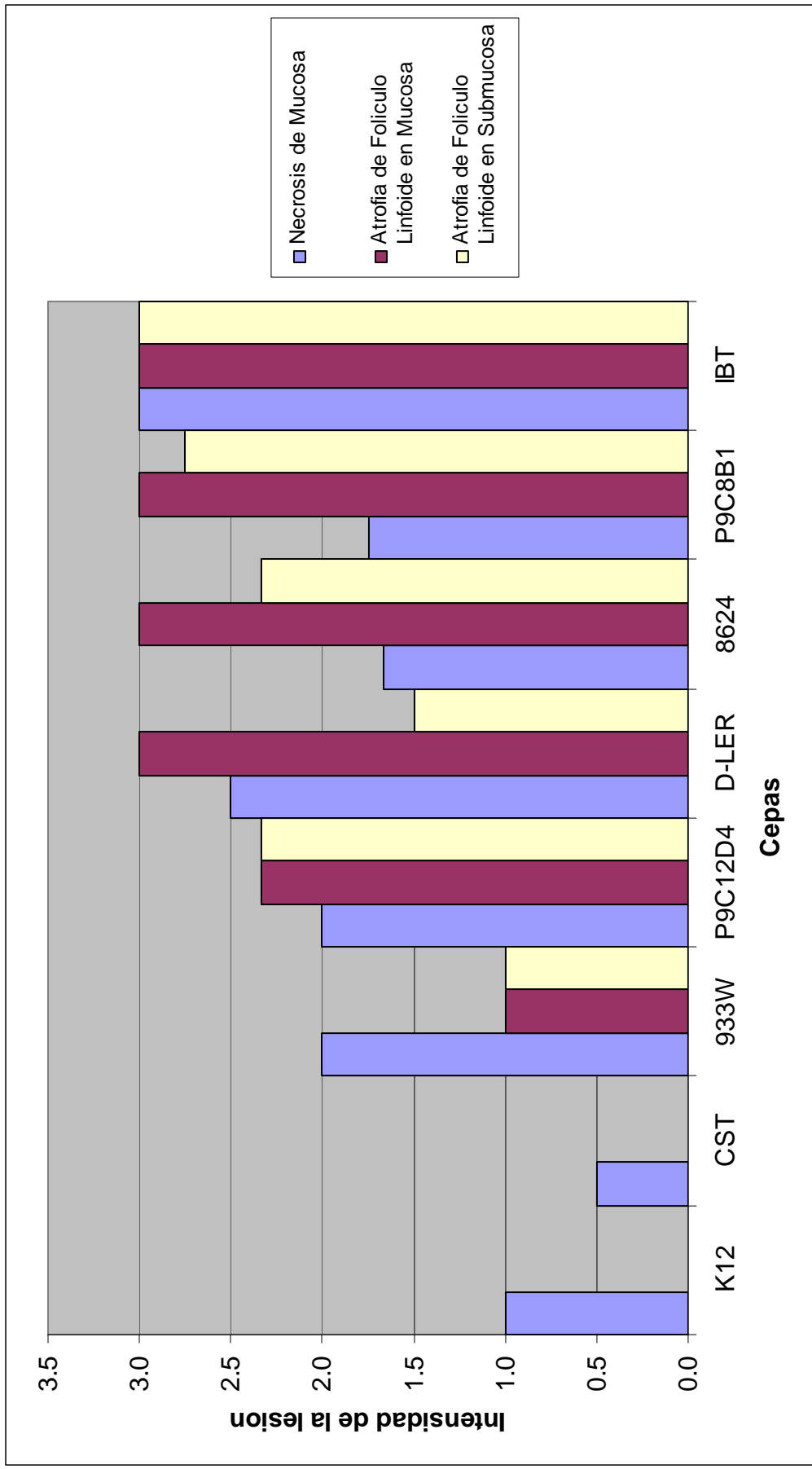
Intensidad de los hallazgos histopatológicos en el apéndice cecal de los conejos inoculados

Individuo	Lesiones en apéndice cecal		
	Folículo linfoide de mucosa	Folículo Linfoide de Submucosa	Necrosis Epitelial
7CST	0	0	0
10CST	0	0	1
30K12	0	0	1
37K12	0	0	1
29933W	1	1	2
20IBT	3	3	3
38IBT	3	3	3
26Δ-LER	3	1	3
36Δ-LER	3	2	2
58624	3	2	2
68624	3	2	2
138624	3	3	1
9P9C12D4	3	3	2
17P9C12D4	3	2	1
34P9C12D4	1	2	3
12P9C8B1	3	2	0
15P9C8B1	3	3	2
19P9C8B1	3	3	2
35P9C8B1	3	3	3

Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1=Leve, 2=Moderado, 3=Severo, LN=Necrosis de folículo linfoide)

**Figura 8**

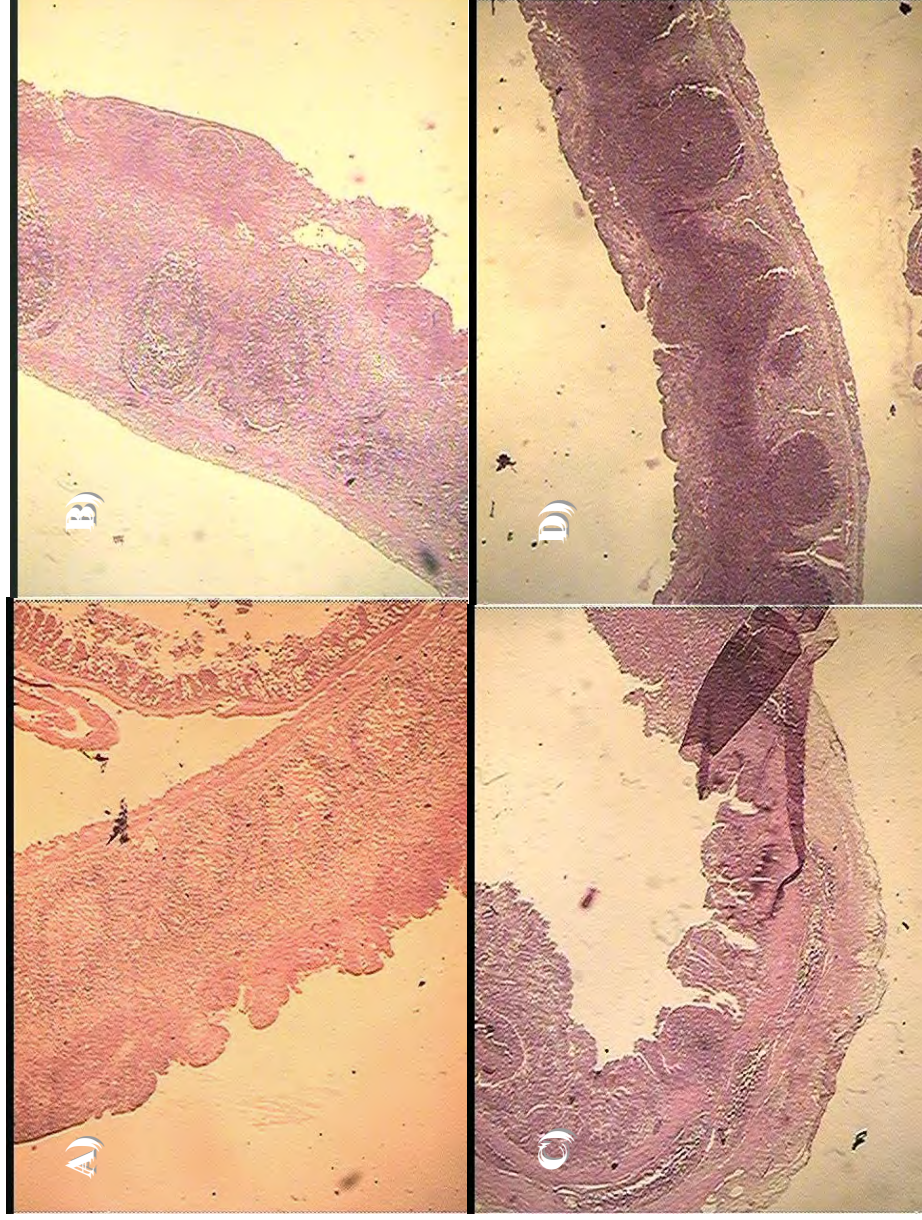
**Promedio de las intensidades en las lesiones halladas a nivel histopatológico en el apéndice cecal de los conejos inoculados**



Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1=Leve, 2=Moderado, 3=Severo

**Figura 9**

Diferentes grados de atrofia de folículos linfoides del apéndice cecal de los conejos inoculados



A) 17P9C12D4, atrofia severa; B) 5 8624, atrofia moderada; C) 29 933W, atrofia leve; D) 7 CST, sin cambios patológicos aparentes. 20X H-E

Tabla 7

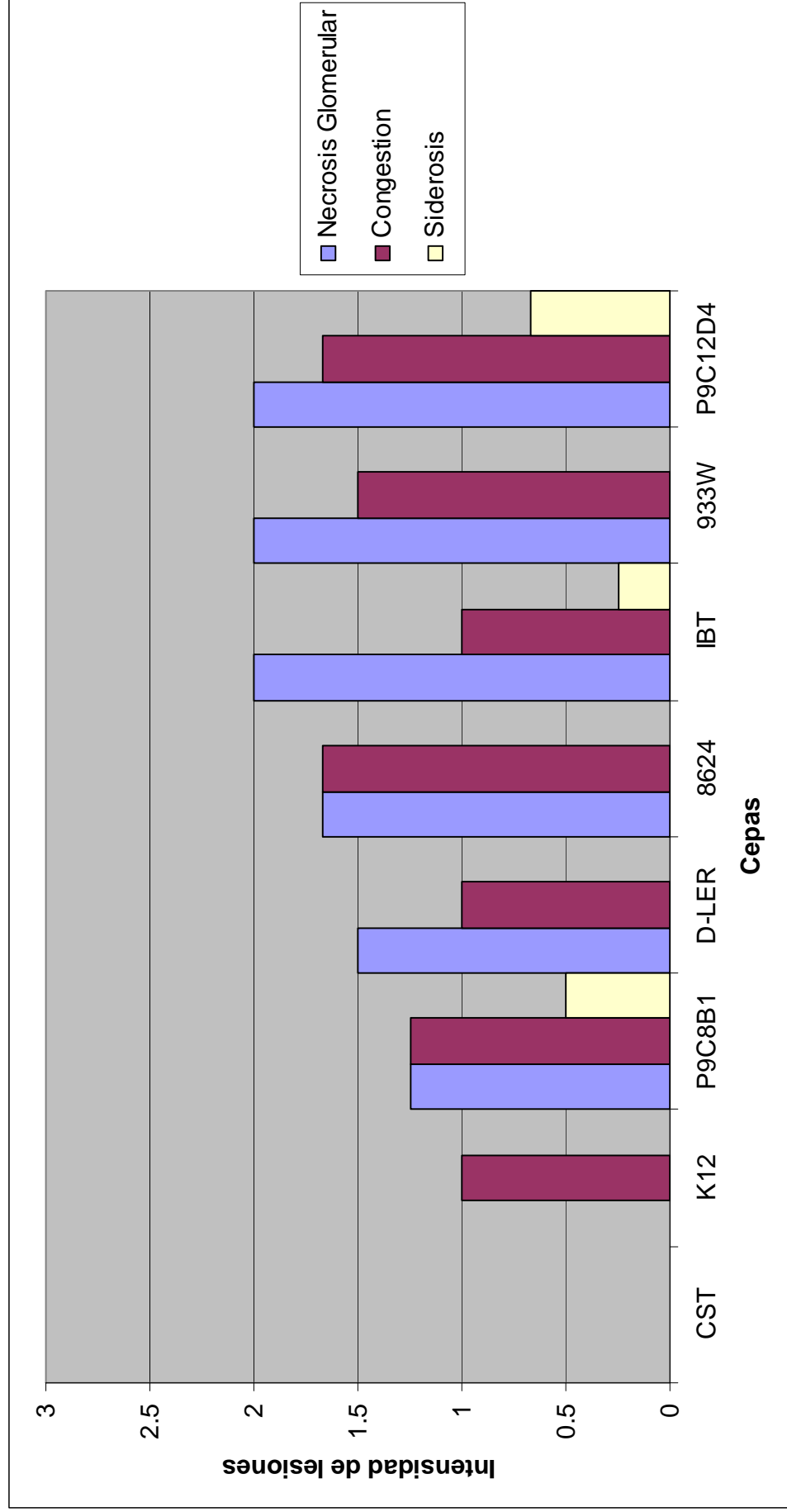
Intensidad de los hallazgos histopatológicos en el riñón de los conejos inoculados

Individuo	Lesiones en Riñón		
	Necrosis Glomerular	Congestión	Siderosis
7CST	0	0	0
30K12	0	1	0
37K12	0	1	0
29933W	1	1	0
20IBT	3	2	3
24IBT	2	0	0
38IBT	1	0	0
26Δ-LER	2	1	0
36Δ-LER	1	1	0
58624	1	2	0
68624	1	2	0
138624	3	1	0
9P9C12D4	3	3	1
17P9C12D4	2	2	1
34P9C12D4	1	0	0
12P9C8B1	2	1	0
15P9C8B1	0	1	2
19P9C8B1	2	2	0
35P9C8B1	1	1	0

Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo

**Figura 10**

**Promedio de las intensidades en las lesiones halladas a nivel histopatológico en el riñón de los conejos inoculados**

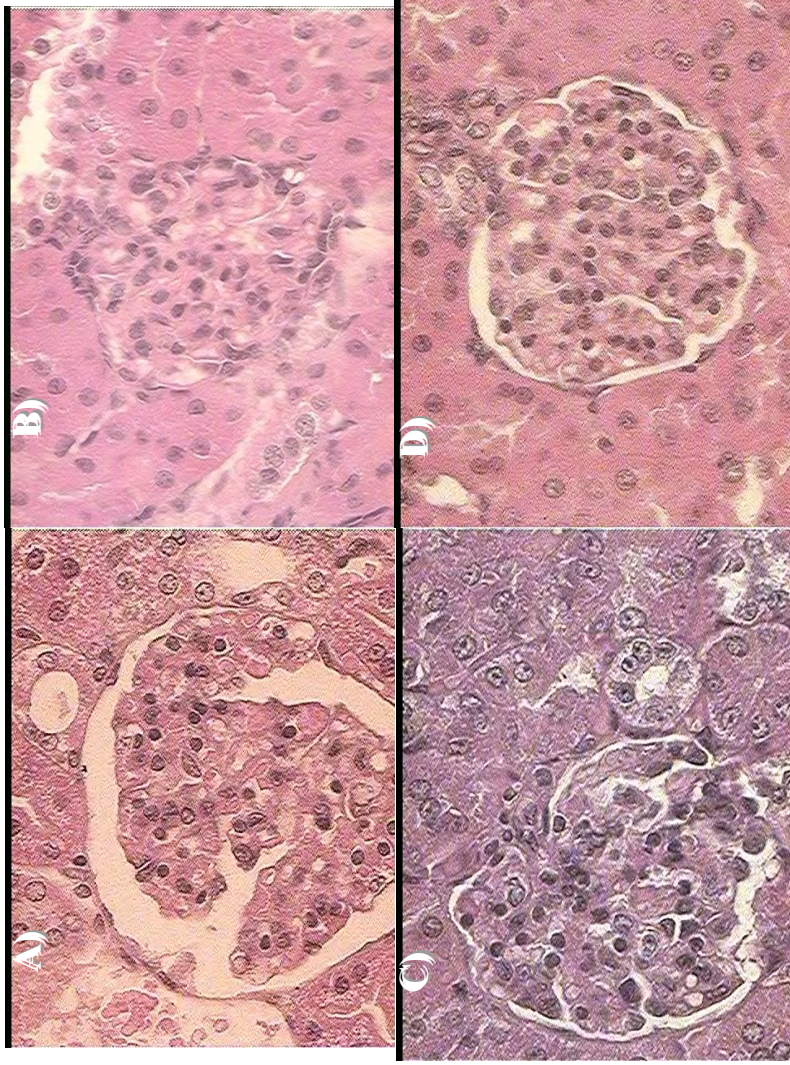


Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3 = Severo



**Figura 11**

**Diferentes grados de necrosis glomerular del riñón de los conejos inoculados**



A) 13 8624, necrosis severa, B) 26 □-Ler, necrosis moderada; C) 29 933W, necrosis leve; D) 7 CST, sin cambios patológicos aparentes. 400x H-E.

Tabla 8

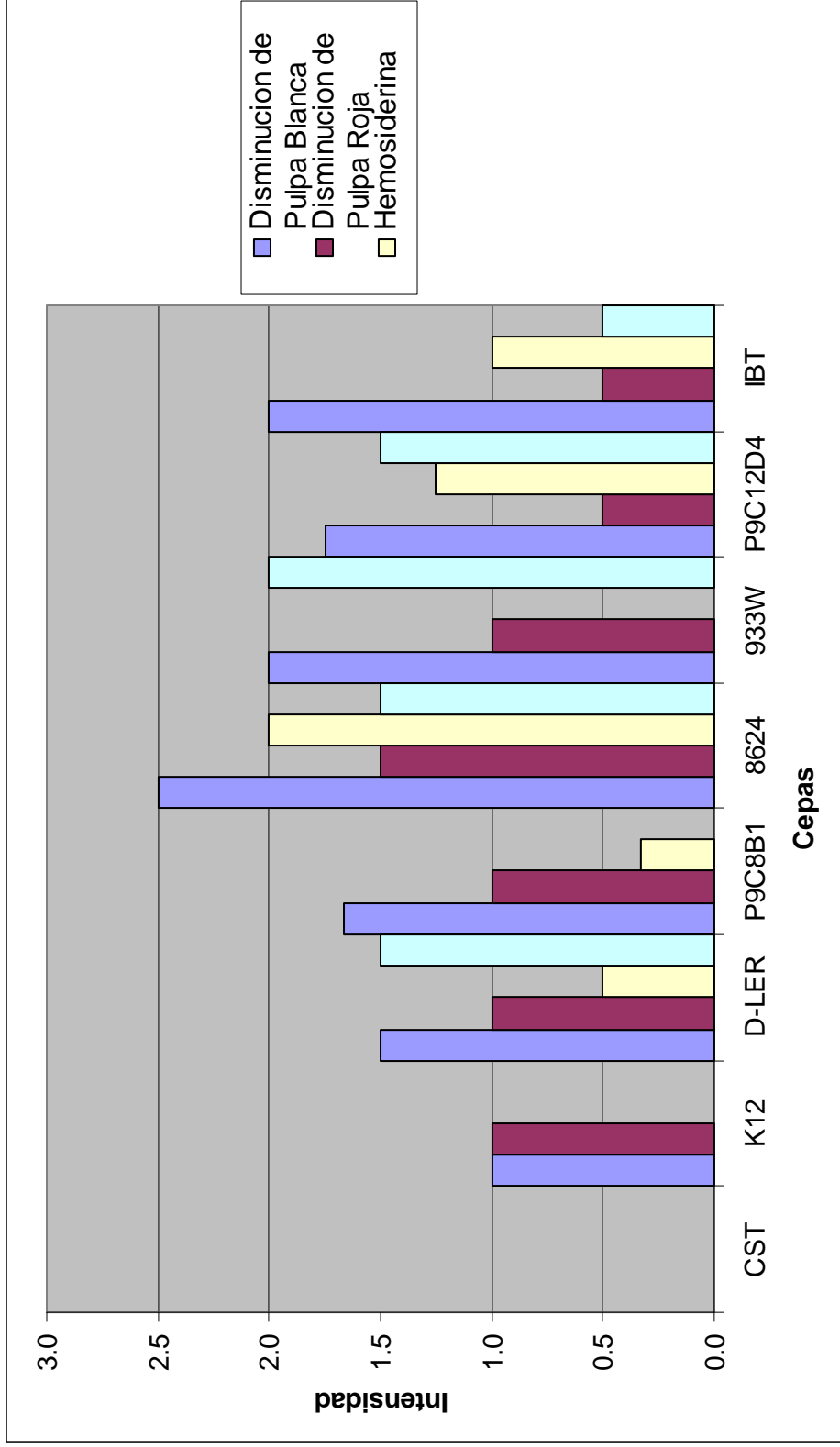
Intensidad de los hallazgos histopatológicos en el bazo de los conejos inoculados

Conejo	Lesiones					
	Disminución de			Lesiones		
	Pulpa Roja	Pulpa Blanca	Hemosiderina	Hemosiderina	Congestión	Congestión
4CST	0	0	0	0	0	0
7CST	0	0	0	0	0	0
10CST	0	0	0	0	0	0
30K12	1	1	0	0	0	0
37K12	1	1	0	0	0	0
40933W	1	2	0	0	2	2
29933W	1	2	0	0	2	2
20IBT	0	1	0	0	0	0
38IBT	1	3	2	2	1	1
26Δ-LER	1	2	1	1	2	2
36Δ-LER	1	1	0	0	1	1
68624	1	2	1	1	1	1
138624	2	3	3	3	2	2
9P9C12D4	0	1	2	2	2	2
17P9C12D4	1	3	0	0	2	2
35P9C12D4	0	1	2	2	1	1
34P9C12D4	1	2	1	1	1	1
12P9C8B1	0	1	0	0	0	0
15P9C8B1	3	2	0	0	0	0
19P9C8B1	0	2	1	1	0	0

Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3= Severo

Figura 12

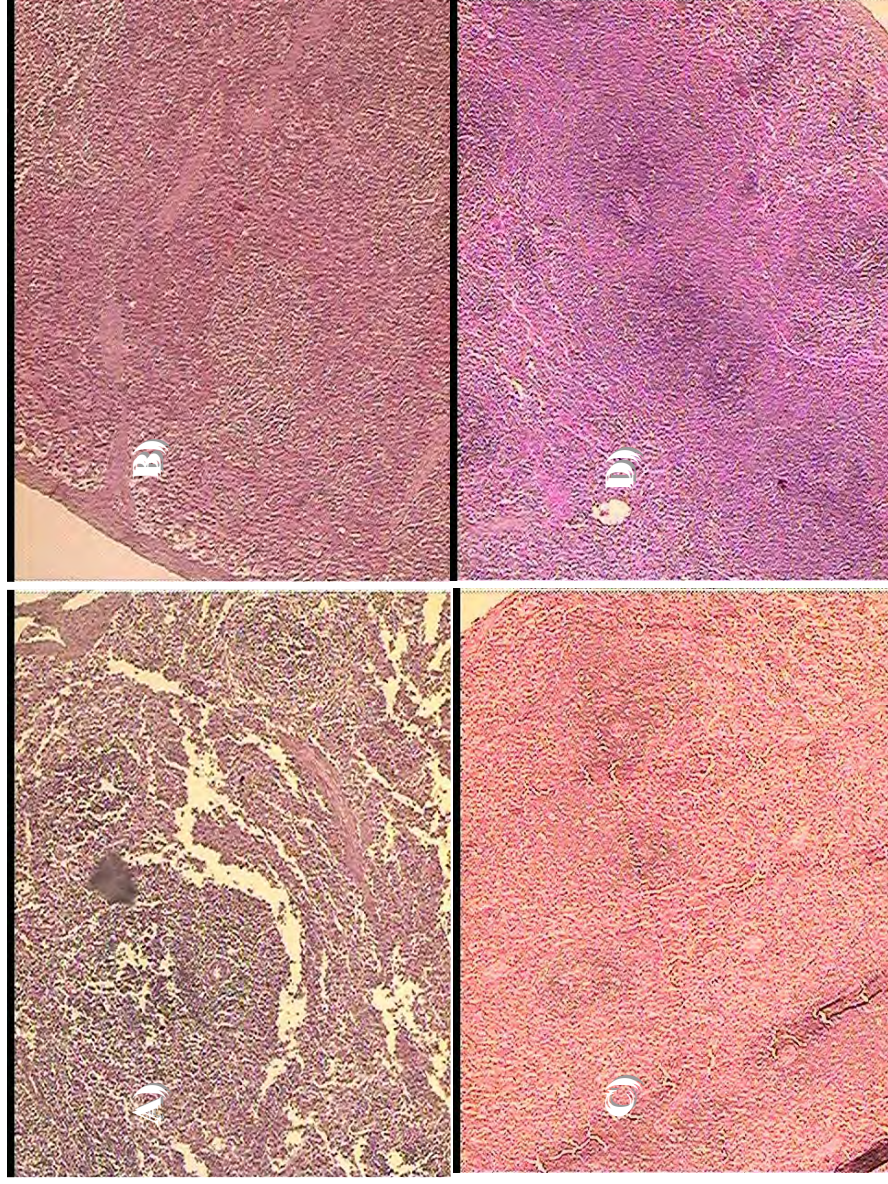
Promedio de las intensidades en las lesiones halladas a nivel histopatológico en el bazo de los conejos inoculados



Clave: 0 = Sin cambios patológicos aparentes, 1 = Leve, 2 = Moderado, 3= Severo

**Figura 13**

**Diferentes intensidades en la disminución de la pulpa blanca**



A) 15 P9C8B1, Disminución severa; B) 13 8624, disminución moderada; C) 26 □-Ler, disminución leve; D) 7 CST, sin cambios patológicos aparentes. 40X H-E.

### 3- Hematología

Después de la cuantificación de los parámetros anteriormente escritos, se extrajeron los valores básales de todos los individuos en sus diferentes parámetros, se les obtuvo su desviación estándar, ese valor le fue sumado a la media del parámetro para obtener el rango máximo de dicho parámetro y se le restó ese mismo valor para obtener el rango mínimo, obteniendo los siguientes valores de referencia:

**Tabla 9**

**Rangos normales de BH, CS y US obtenidos para los individuos utilizados**

	MIN	MAX	UNIDADES	MIN	MAX	UNIDADES
<b>Eritrocitos</b>	5,12	6,27	millones/mm3	-	-	-
<b>Hemoglobina</b>	7,7	9,5	g/dl	-	-	-
<b>Hematocrito</b>	25,6	31,9	%	-	-	-
<b>Volumen Globular Medio</b>	50	50,87719298	fl	-	-	-
<b>Hemoglobina Globular Media</b>	15,0390625	15,15151515	pg	-	-	-
<b>Concentración Media de Hemoglobina Globular</b>	30,078125	29,78056426	g/dl	-	-	-
<b>Leucocitos</b>	6,24	9,21	miles/mm3	-	-	-
<b>Linfocitos</b>	35	74	%	2.184	6.8154	(Miles/mm3)
<b>Monocitos</b>	0	2	%	0	0.1842	(Miles/mm3)
<b>Neutrófilos</b>	24	59	%	1.4976	5.4339	(Miles/mm3)
<b>Eosinófilos</b>	0	3	%	0	0.2763	(Miles/mm3)
<b>Basófilos</b>	0	1	%	0	0.0921	(Miles/mm3)
<b>N. en Banda</b>	0	3	%	0	0.2763	(Miles/mm3)
<b>N. Segmentados</b>	23	57	%	2.184	6.8154	(Miles/mm3)
<b>Urea</b>	22	32,3	mg/dl	-	-	-
<b>Creatinina</b>	0,3	0,73	mg/dl	-	-	-

**Min:** Valor obtenido de la diferencia entre la media del parámetro de las muestras obtenidas prequirurgicamente de todos los conejos y la desviación estándar de dicha media

**Max:** Valor obtenido de misma forma que “Min” solo que la desviación estándar se le sumo a la media

Tabla 10

Cantidad de eritrocitos contada a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	7.2	7.3	7.1	6.9		‡	
7 CST	6.6	10.1	10.1	6.1	6.4		‡
10 CST	6.9	6.9	7.2	7.2		‡	
20 K12	6.84	6.84	6.84	5.95	6.39	6.89	6.74
21 K12	7.67	5.49	6.58	6.20	7.11	6.56	6.71
29 933W	7.02	6.34	6.07	5.5	5	5.2	5.3
39 933W	7.63	6.53	4.91	4.8	4.7	4.75	4.8
40 933W	7.02	6.34	6.07	5.5	5	5.2	5.3
20 IBT	6.7	8.61			‡		
21 IBT	7.39	7.9	7.9	8.49	6.4		‡
26 Δ-LER	6.92	6.14			‡		
36 Δ-LER	6.15	6.15	6.1	6.1	5.92	4.28	7.82
5 8624	8	7.9			‡		
6 8624	8.4	7	7.5	8.4	6.7	5.6	‡
13 8624	6.9	7.2	7.1		‡		
17 P9C12D4	5.6	5.73	5.73	5.94		‡	
34 P9C12D4	6.9	6.9	5.46	5.46	4.91	4.91	‡
12 P9C8B1	6.7	7.5	7.5	7.5	6.9	5.8	5.9
19 P9C8B1	5.98	7.08	6.53	5.78	4.89	4.76	4.58
15 P9C8B1	7.6	8.6			‡		
35 P9C8B1	7.88	7.18	6.9	6.9	6.64	6.64	8.4

Eritrocitos: millones/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 14

Media de eritrocitos de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

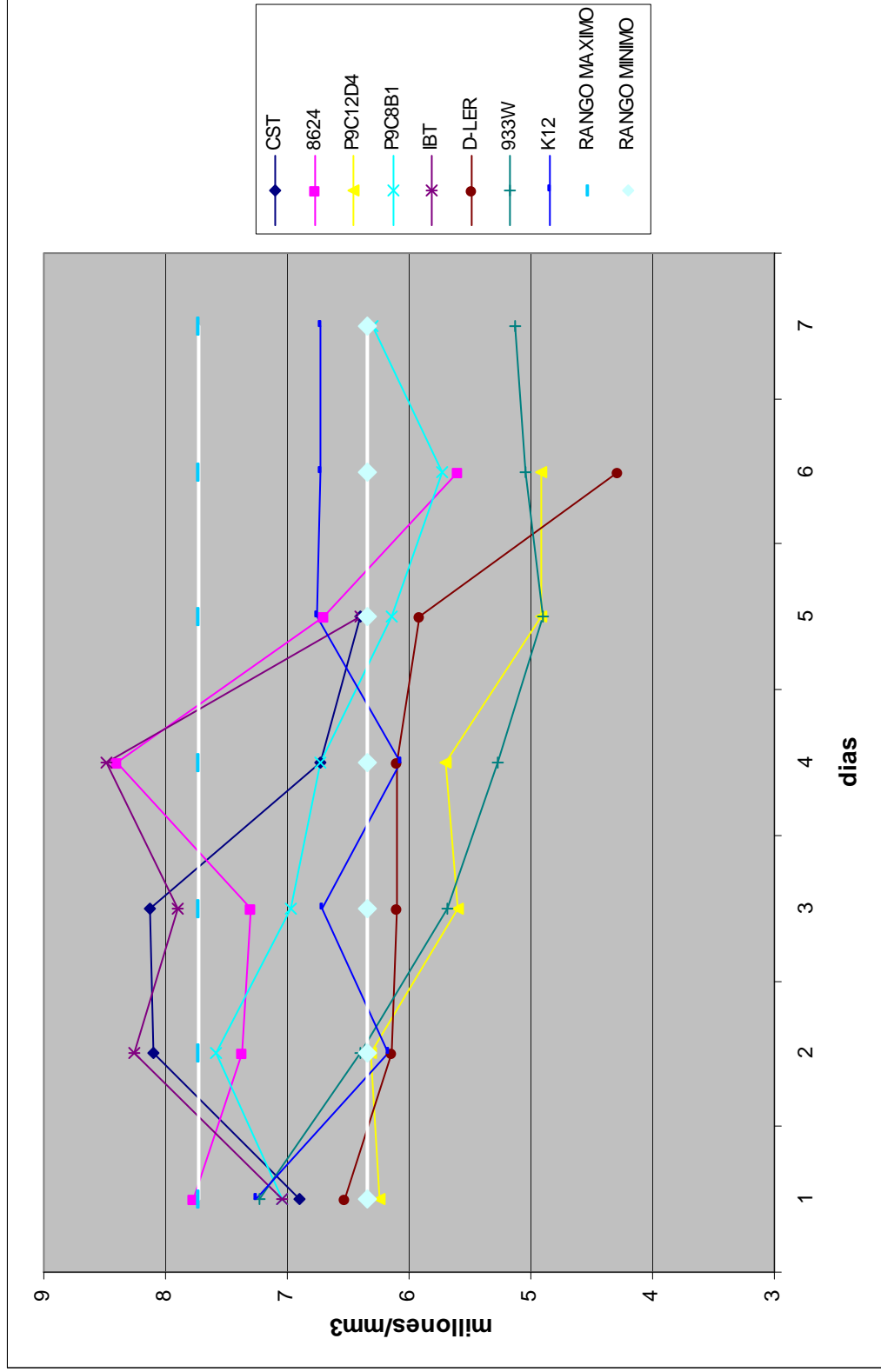


Tabla 11

Cantidad de hemoglobina contada a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	12.7	12.7	11	9.3		†	
7 CST	12.5	19.2	19.2	11.3	12		†
10 CST	12.9	12.9	13.7	13.7		†	
20 K12	13.10	13.10	13.10	11.39	12.25	13.20	12.91
21 K12	13.80	10.10	11.95	11.20	12.75	11.90	12.14
29 933W	12.7	10.9	11.3	10	9.4	9.5	9.7
39 933W	12.9	10.7	8.6	8.4	8.3	8.2	8.1
40 933W	12.7	10.9	11.3	10	9.4	9.5	9.7
20 IBT	12.9	15.2			†		
21 IBT	15.9	16.4	16.4	15.2	15.1		†
26 Δ-LER	15.9	11.3			†		
36 Δ-LER	10.3	10.3	10.1	10.1	10.6	7.2	19
5 8624	13.4	12.9			†		
6 8624	14.1	12.2	13	14.1	11	9.3	†
13 8624	12.6	13.2	13.2		†		
17 P9C12D4	13.2	13.1	13.1	11.4		†	
34 P9C12D4	12.9	12.9	8.9	8.9	8.36	8.36	
12 P9C8B1	11	14	14	13.5	12.1	10.9	11.5
19 P9C8B1	12.6	12.2	11.7	10.9	9.1	9.5	9.7
15 P9C8B1	14	15.2			†		
35 P9C8B1	12.6	12.5	11.9	11.9	11.4	11.4	14

Hemoglobina: g/dl

†: La muestra no se toma porque el animal falleció



Figura 15

Media de hemoglobina de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

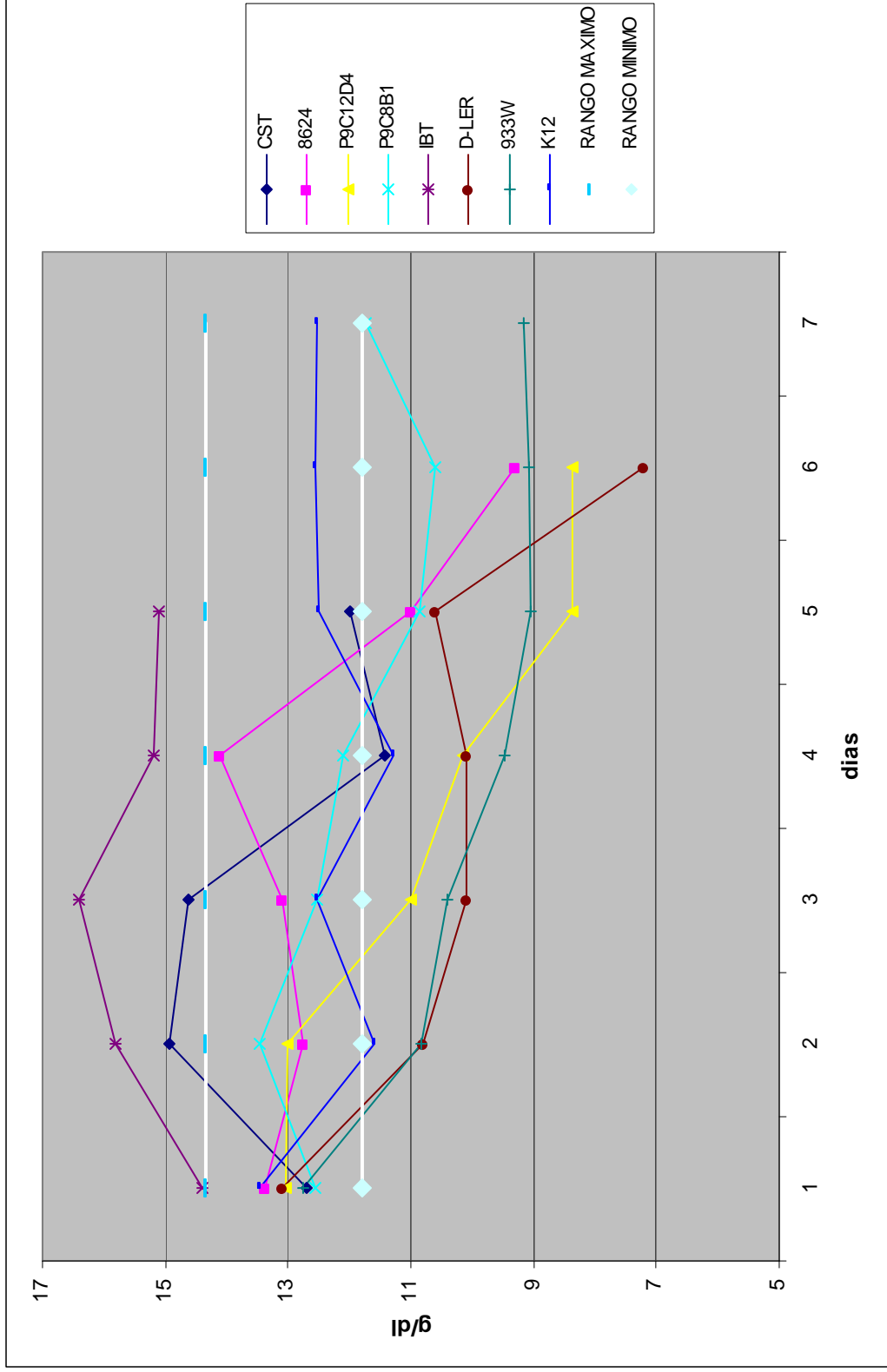


Tabla 12

Hematocrito obtenido a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	36.8	38.6	37.1	35.6		‡	
7 CST	40.5	62.8	62.8	36.5	32.1		‡
10 CST	41	41	42	42		‡	
20 K12	40.00	40.00	40.00	34.78	37.39	40.31	39.42
21 K12	41.20	31.10	36.15	33.63	37.94	35.96	36.55
29 933W	41.3	34.3	32.7	30	28.9	29	30
39 933W	42.4	35.4	28	27	27	26.5	26
40 933W	41.3	34.3	32.7	30	28.9	29	30
20 IBT	36.4	44.3			‡		
21 IBT	41.8	42.9	42.9	44.9	34		‡
26 Δ-LER	38.8	34.3			‡		
36 Δ-LER	34.5	34.5	34.4	34.4	31.5	22.9	40.1
5 8624	43.6	43.2			‡		
6 8624	32.1	37.8	35	32.1	35.7	30.2	‡
13 8624	42	44.4	42.2		‡		
17 P9C12D4	11.2	30.7	30.7	31.4		‡	
34 P9C12D4	38	38	28.8	28.8	28.3	28.3	‡
12 P9C8B1	35.7	43.3	43.3	45.2	38.7	34.6	34.7
19 P9C8B1	31.7	37.2	33.4	28.9	25.6	24.7	24.9
15 P9C8B1	43.9	48.8			‡		
35 P9C8B1	42.7	37.8	38.1	38.1	33.6	33.6	46.3

Hematocrito: %

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 16

Media de hematocrito de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

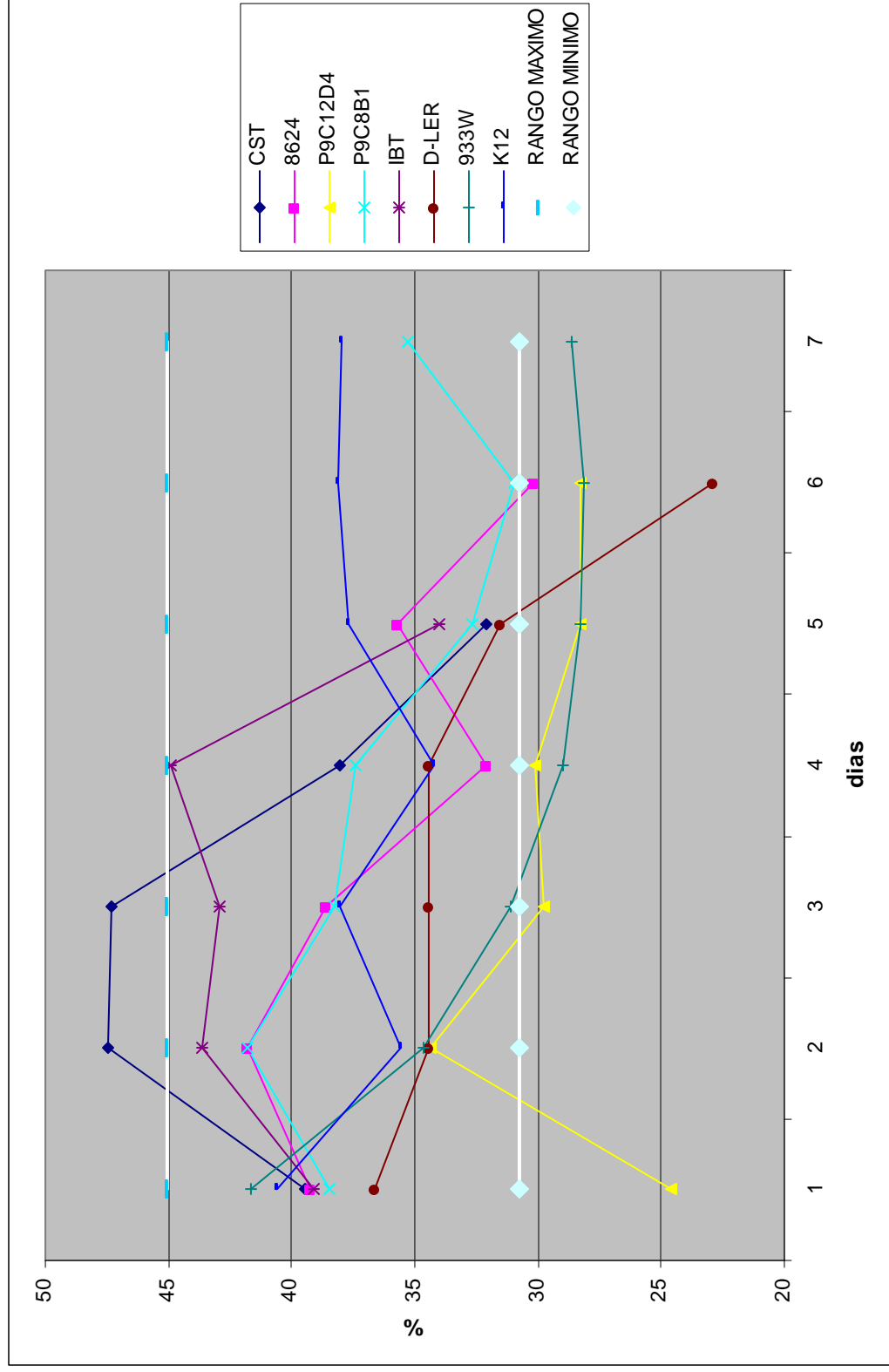


Tabla 13

Cantidad de leucocitos obtenida a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	2.7	4	4.5	5		‡	
7 CST	3.2	2.7	2.7	11.3	10.4		‡
10 CST	18	18	12.6	12.6		‡	
20 K12	5.52	3.50	4.51	4.36	5.19	4.53	4.68
21 K12	6.20	4.79	5.50	5.08	5.70	5.46	5.54
29 933W	8.6	7.06	12.8	11	9.9	9.2	8.7
39 933W	6.88	4.34	5.67	5.2	4.7	4	3.2
40 933W	8.6	7.06	12.8	11	9.9	9.2	8.7
20 IBT	4.81	2.05			‡		
21 IBT	9.46	9.55	9.55	5.95	5.91		‡
26 Δ-LER	6.02	7.26			‡		
36 Δ-LER	5.24	5.24	6.23	6.23	6.87	9.1	8.8
5 8624	11.5	7.8			‡		
6 8624	11.8	12	11.8	11.8	13.1	19.6	‡
13 8624	7.1	12.1	5.9		‡		
17 P9C12D4	4.5	11.9	11.9	8.09		‡	
34 P9C12D4	6.5	6.5	7.7	7.7	8.06	8.06	‡
12 P9C8B1	13.1	13.1	13.1	8.8	10.6	11.5	9.4
19 P9C8B1	6.43	5.45	5.05	3.13	5.07	11.9	12
15 P9C8B1	7.2	3.4			‡		
35 P9C8B1	6.34	19.2	15.7	15.7	18.8	18.8	26

Leucocitos millones/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 17

Media de leucocitos de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

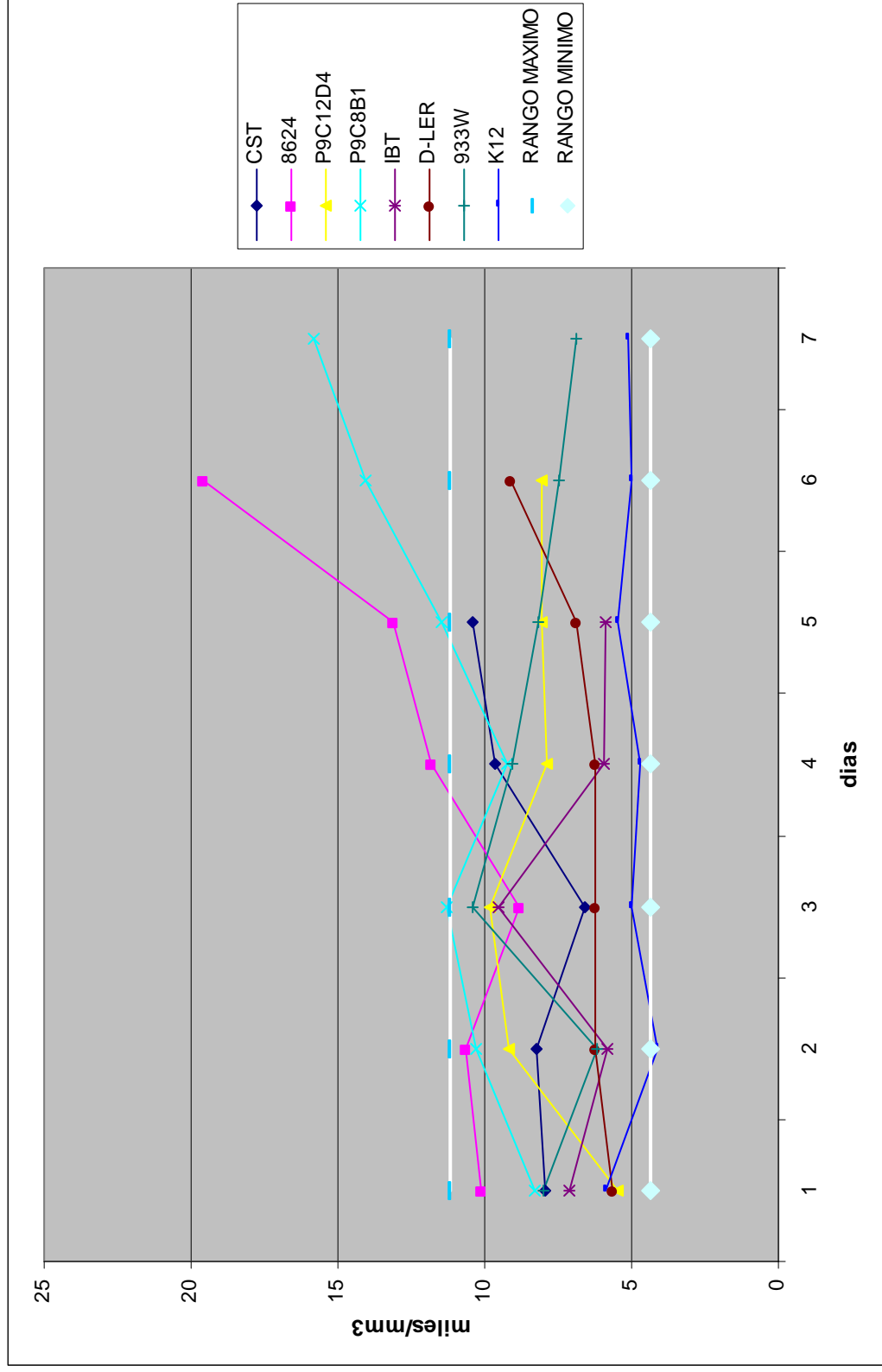


Tabla 14

Cantidad de linfocitos obtenida a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	5.396	1.6	2.07	2.6		‡	
7 CST	8	8.37	8.37	1.469	3.224		‡
10 CST	8.1	8.1	5.67	5.67		‡	
20 K12	4.86	1.61	3.23	3.52	4.85	3.37	3.67
21 K12	4.59	2.87	3.73	3.62	4.32	3.75	3.88
29 933W	2.322	4.236	9.472	7.15	6.336	5.06	4.089
39 933W	5.7792	3.2116	5.2164	4.68	4.371	3.72	2.944
40 933W	2.322	4.236	9.472	7.15	6.336	5.06	4.089
20 IBT	3.9442	0.9225			‡		
21 IBT	7.095	4.584	4.584	3.451	2.4822		‡
26 Δ-LER	4.3946	1.7424			‡		
36 Δ-LER	4.1396	4.1396	3.8626	3.8626	4.6716	5.551	7.04
5 8624	5.75	4.992			‡		
6 8624	1.18	2.592	1.77	1.18	2.62	1.96	‡
13 8624	1.278	0.605	0.826		‡		
17 P9C12D4	3.15	3.808	3.808	1.5371		‡	
34 P9C12D4	3.705	3.705	3.388	3.388	4.5136	4.5136	
12 P9C8B1	2.358	3.668	3.668	1.056	2.332	1.61	1.316
19 P9C8B1	4.501	1.744	3.535	1.878	4.2081	8.33	6.36
15 P9C8B1	3.024	0.306			‡		
35 P9C8B1	1.4582	3.072	2.355	2.355	6.016	6.016	6.76

Linfocitos: miles/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 16

Media de linfocitos de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

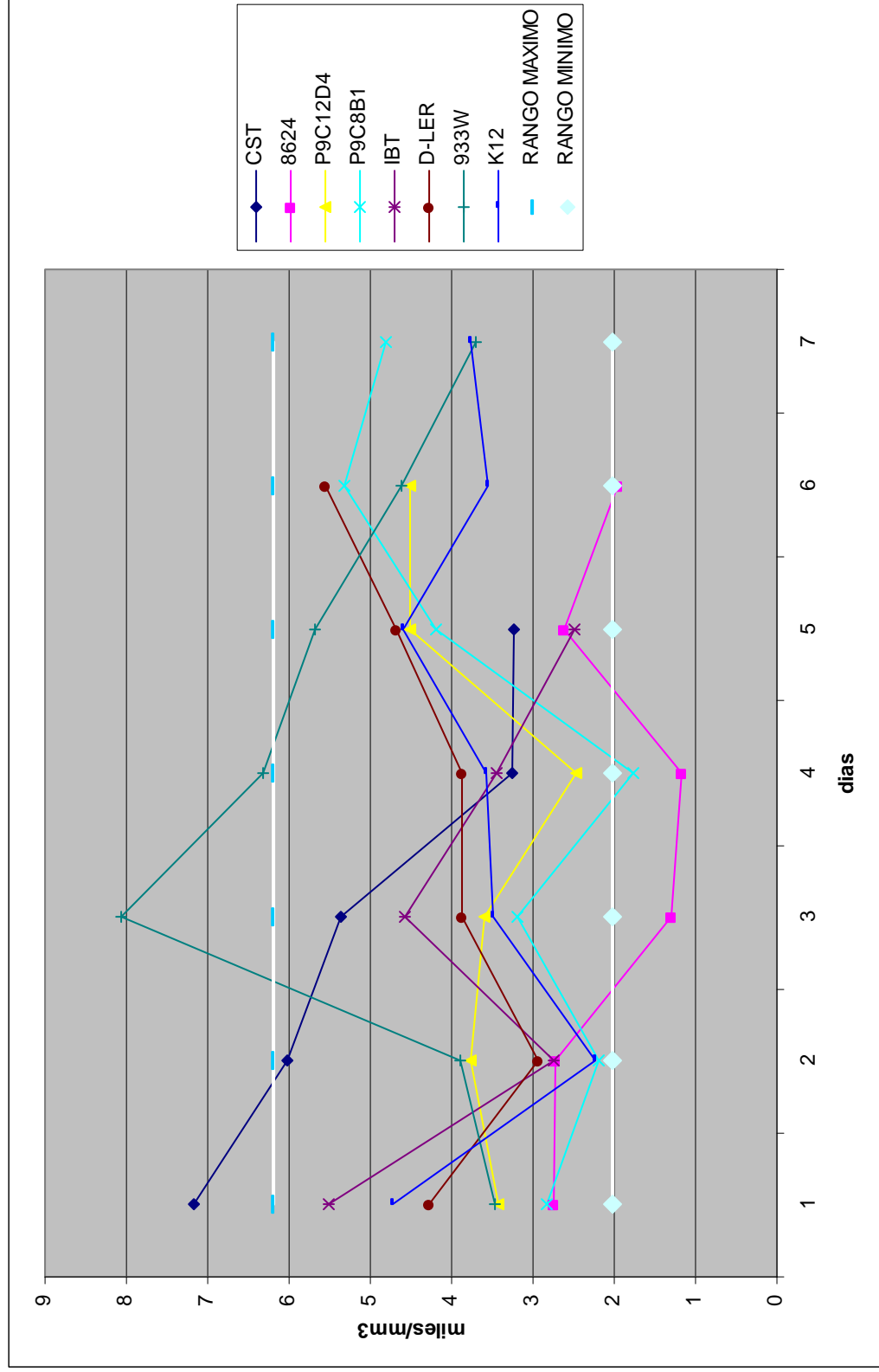


Tabla 15

Cantidad de monocitos obtenida a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	0.284	0.04	0.225	0.45		‡	
7 CST	.16	0	0	0.113	0.104		‡
10 CST	0	0	0.756	0.756		‡	
20 K12	0.00	0.42	0.21	0.09	0.27	0.36	0.26
21 K12	0.00	0.10	0.05	0.02	0.06	0.08	0.06
29 933W	0.172	0.1412	0.256	0.77	0.495	0.368	0.261
39 933W	0.1376	0.2604	0.2835	0.26	0.141	0.16	0.128
40 933W	0.172	0.1412	0.256	0.77	0.495	0.368	0.261
20 IBT	0	0.082			‡		
21 IBT	0.0946	0.573	0.573	0.119	0.1182		‡
26 Δ-LER	0.2408	0.5082			‡		
36 Δ-LER	0.0524	0.0524	0.0623	0.0623	0.3435	0.091	0.528
5 8624	0.115	0.39			‡		
6 8624	0	0.732	0.118	0	0	0.392	‡
13 8624	0	0.242	0.059			‡	
17 P9C12D4	0	0.952	0.952	0.7281		‡	
34 P9C12D4	0.39	0.39	0.231	0.231	0.806	0.806	‡
12 P9C8B1	0	1.048	1.048	0.088	0	0.115	0.094
19 P9C8B1	0.2572	0	0.303	0.3756	0.3042	0.714	0.96
15 P9C8B1	0	0.034			‡		
35 P9C8B1	0.3804	0.768	1.413	1.413	1.128	1.128	1.04

Monocitos: miles/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció



Figura 17

Media de monocitos de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

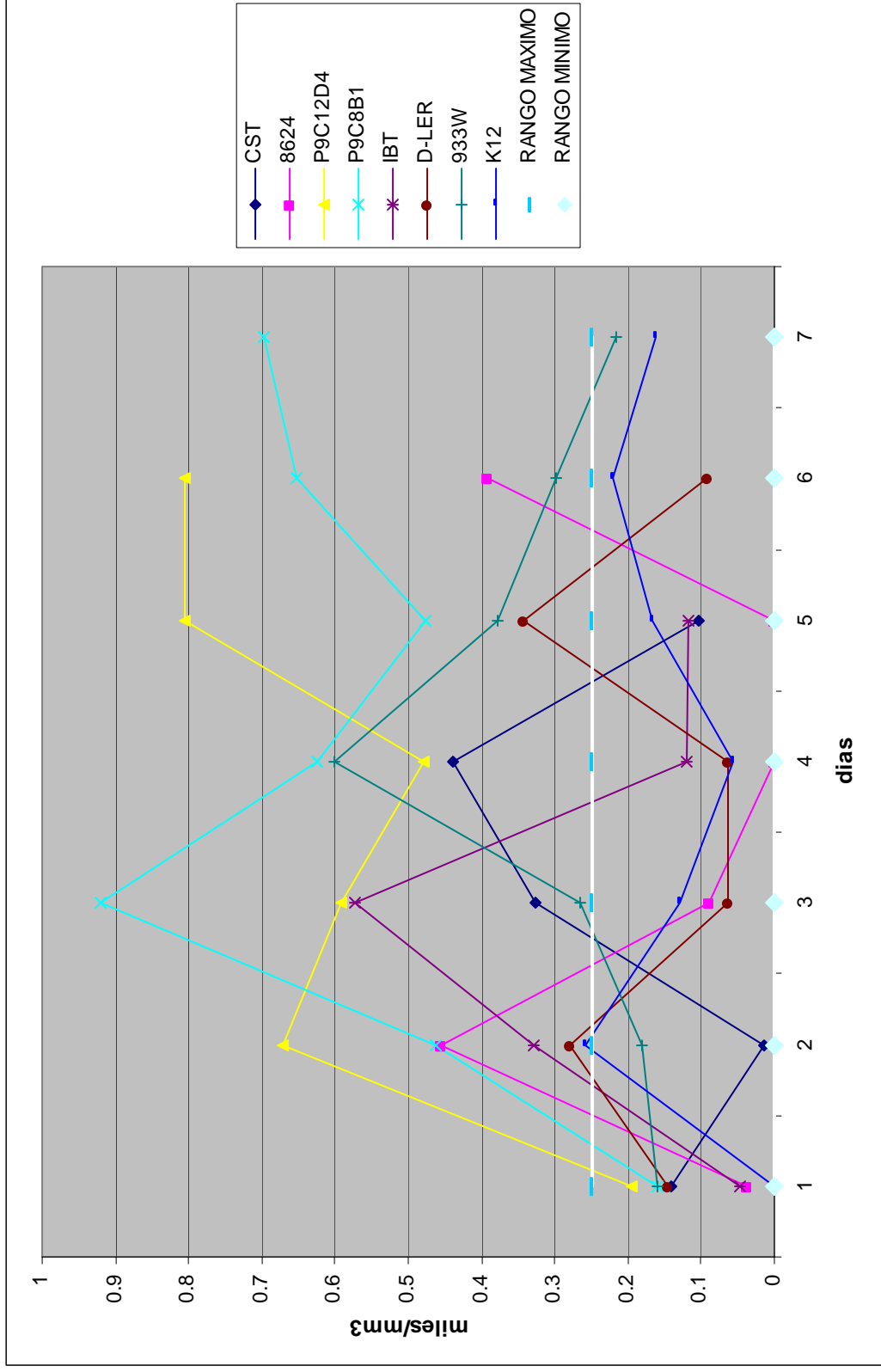


Tabla 16

Cantidad de eosinófilos obtenidos a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	0	0	0.045	0.1		‡	
7 CST	0.32	0	0	0.226	0.104		‡
10 CST	0.18	0.18	0	0		‡	
20 K12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21 K12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
29 933W	0	0.2824	0	0	0	0	0
39 933W	0.1376	0	0	0.052	0.047	0	0
40 933W	0	0.2824	0	0	0	0	0
20 IBT	0	0			‡		
21 IBT	0	0	0	0	0		‡
26 Δ-LER	0	0			‡		
36 Δ-LER	0	0	0.0623	0.0623	0	0	‡
5 8624	0.115	0			‡		
6 8624	0.236	0	0.236	0.236	0.314	0.392	‡
13 8624	0.142	0.121	0.177		‡		
17 P9C12D4	0	0	0	0		‡	
34 P9C12D4	0	0	0	0	0	0	‡
12 P9C8B1	0	0	0	0	0	0.115	0.094
19 P9C8B1	0	0	0	0	0	0	0
15 P9C8B1	0	0.068			‡		
35 P9C8B1	0	0	0	0	0	0	0

Eosinófilos: miles/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 18

Media de eosinofilos de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

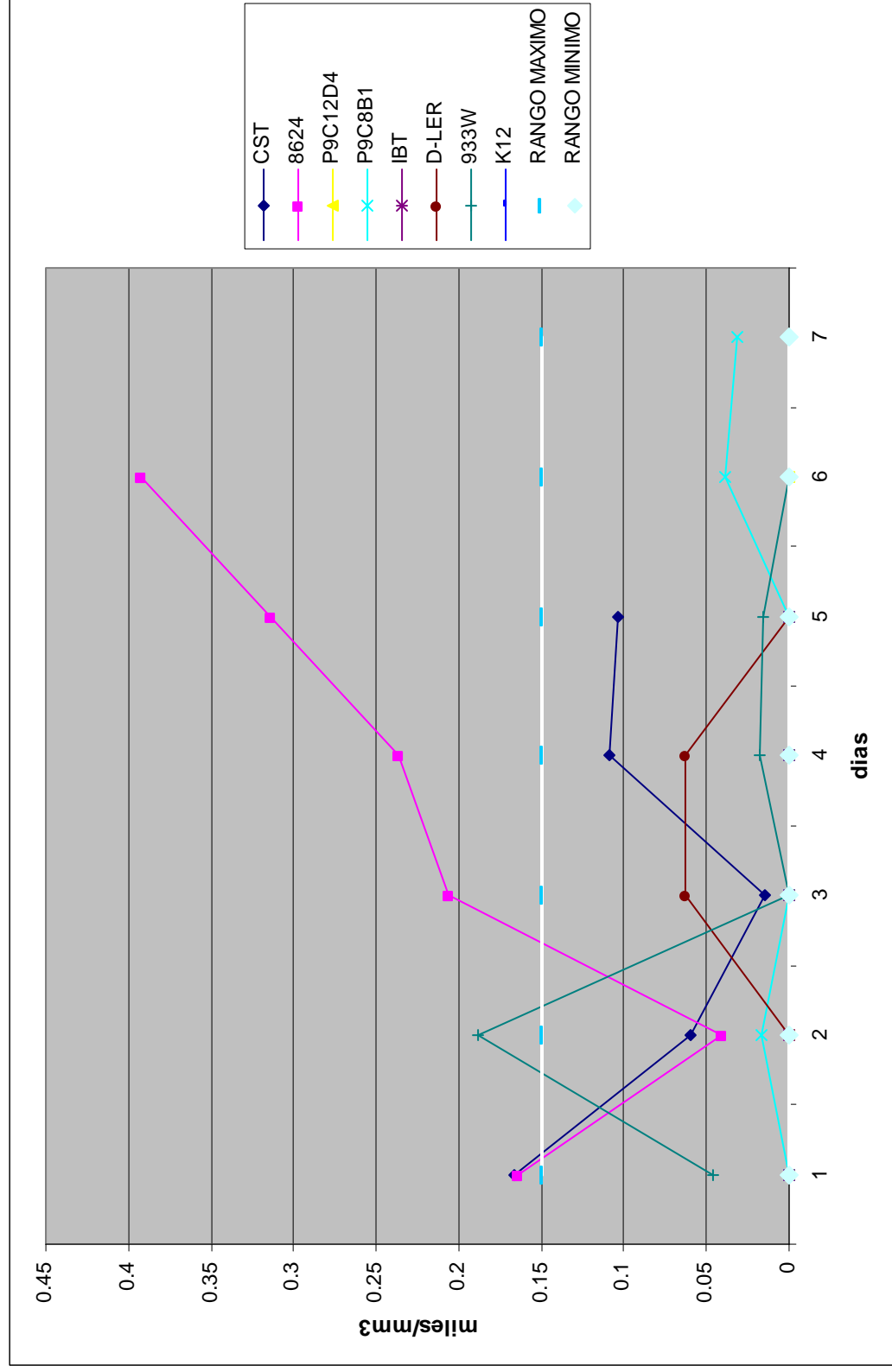


Tabla 17

Cantidad de neutrófilos en banda obtenidos a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	0,142	0	0,09	0,2		‡	
7 CST	0,64	0,54	0,54	0,226	0,312		‡
10 CST	0,18	0,18	0	0		‡	
20 K12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21 K12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29 933W	0	0	0	0	0	0	0
39 933W	0	0,0434	0	0	0,047	0	0
40 933W	0	0	0,1024	0	0	0	0
20 IBT	0	0			‡		
21 IBT	0	0	0	0,119	0,1182		‡
26 Δ-LER	0	0,1452			‡		
36 Δ-LER	0,0524	0,0524	0,4361	0,4361	0,0687	0	‡
5 8624	0,115	0			‡		
6 8624	0	0	0	0	0	0,0784	‡
13 8624	0,071	0,363	0			‡	
17 P9C12D4	0	0	0	0,4045		‡	
34 P9C12D4	0,065	0,065	0	0	0,1612	0,1612	‡
12 P9C8B1	0	0,109	0	0,1252	0,1014	0,238	0,12
19 P9C8B1	0	0,068	‡				
15 P9C8B1	0	0,192			0		
35 P9C8B1	0,0798	0,15775	0,08733333	0,1004	0,0338	0,156	0,10266667

Neutrófilos en banda: miles/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 19

Media de neutrófilos en banda de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

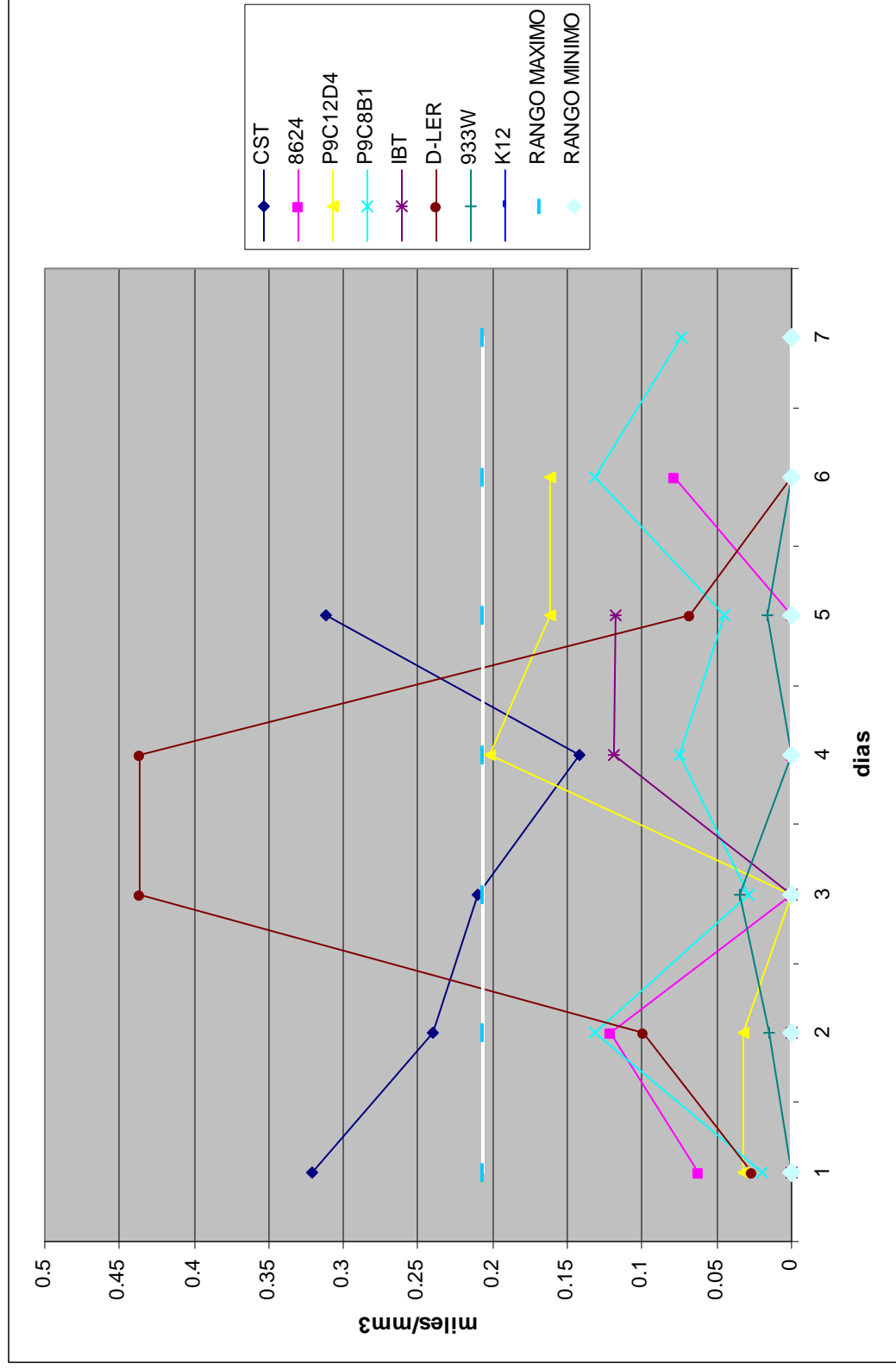


Tabla 18

Cantidad de neutrófilos segmentados obtenidos a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	1.593	2.36	2.07	1.65		‡	
7 CST	2.144	1.809	1.809	9.266	6.656		‡
10 CST	9.54	9.54	6.174	6.174		‡	
20 K12	0.66	1.47	1.07	0.75	1.12	1.35	1.15
21 K12	1.61	1.82	1.72	1.45	1.61	1.78	1.71
29 933W	6.106	2.4004	3.072	3.08	3.069	3.772	4.35
39 933W	0.8256	0.8246	0.1701	0.208	0.094	0.12	0.128
40 933W	6.106	2.4004	2.048	3.08	3.069	3.772	4.35
20 IBT	0.8658	1.0455			‡		
21 IBT	2.2704	4.393	4.393	2.261	3.1914		‡
26 Δ-LER	1.3846	4.8642			‡		
36 Δ-LER	0.9956	0.9956	1.8067	1.8067	1.7862	3.458	‡
5 8624	5.405	2.418			‡		
6 8624	10.384	8.676	9.676	10.384	10.349	16.072	‡
13 8624	5.609	10.769	4.779			‡	
17 P9C12D4	1.35	7.14	7.14	5.4203		‡	
34 P9C12D4	2.34	2.34	4.081	4.081	2.5792	2.5792	‡
12 P9C8B1	1.6718	3.597	1.212	0.7512	0.4563	2.618	4.56
19 P9C8B1	4.176	2.924	‡				
15 P9C8B1	4.5014	15.168			11.932		
35 P9C8B1	5.80004	7.45275	7.08866667	6.72106667	6.79343333	7.90133333	10.156

Neutrófilos segmentados: miles/mm<sup>3</sup>

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 20

Media de neutrófilos en segmentados de los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

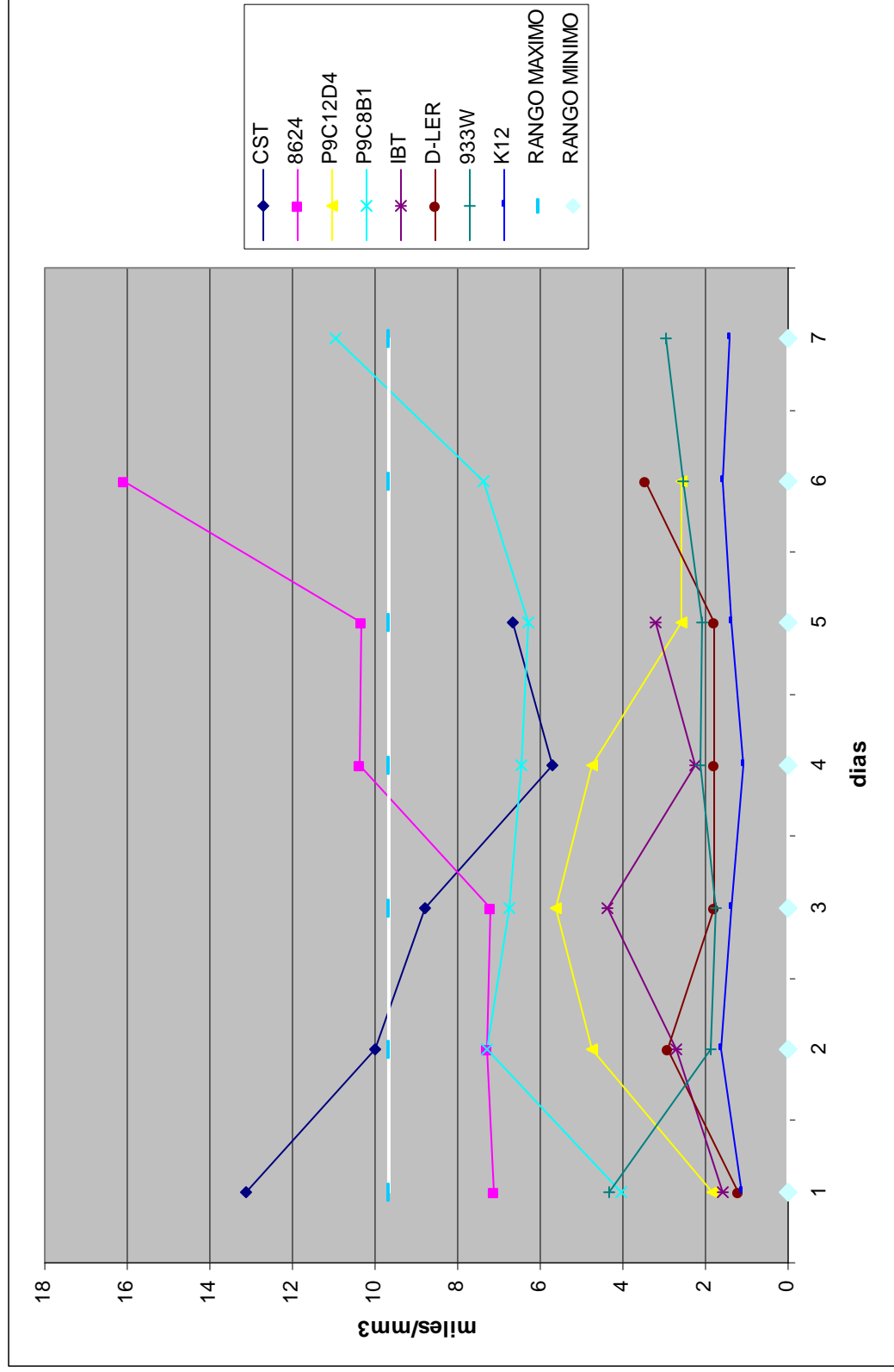


Tabla 19

Cantidad de urea obtenida a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	33.2	30.9	66	101.1		‡	
7 CST	34.4	34.4	34.4	41.3	60.5		‡
10 CST	120	120	114.7	114.7		‡	
20 K12	37.00	33.00	35.00	31.30	33.77	34.78	34.64
21 K12	32.00	14.20	23.10	23.96	31.24	23.66	25.28
29 933W	80	85	46	77	99	70	50
39 933W	16	51	80	80	60	70	50
40 933W	80	85	46	77	99	70	50
20 IBT	28	123			‡		
21 IBT	18	25	25	99	30.4		‡
26 Δ-LER	46	59			62		
36 Δ-LER	34.5	34	34	34	45	54	56
5 8624	111	115.2			‡		
6 8624	54.6	54.6	54.6	54.6	51.1	57.4	‡
13 8624	64	81	34.7		‡		
17 P9C12D4	37	76	76	103		‡	
34 P9C12D4	40.5	40.5	89.2	89.2	42	42	
12 P9C8B1	40.3	41.4	41.4	34.5	74.7	51.5	75
19 P9C8B1	24	26	30	45	45	151	149
15 P9C8B1	74	94			‡		
35 P9C8B1	43.8	37.5	31.5	31.5	20.7	20.7	22.5

Urea: mg/dl

‡: La muestra no se toma porque el animal falleció



Figura 21

Media de urea sérica en los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal

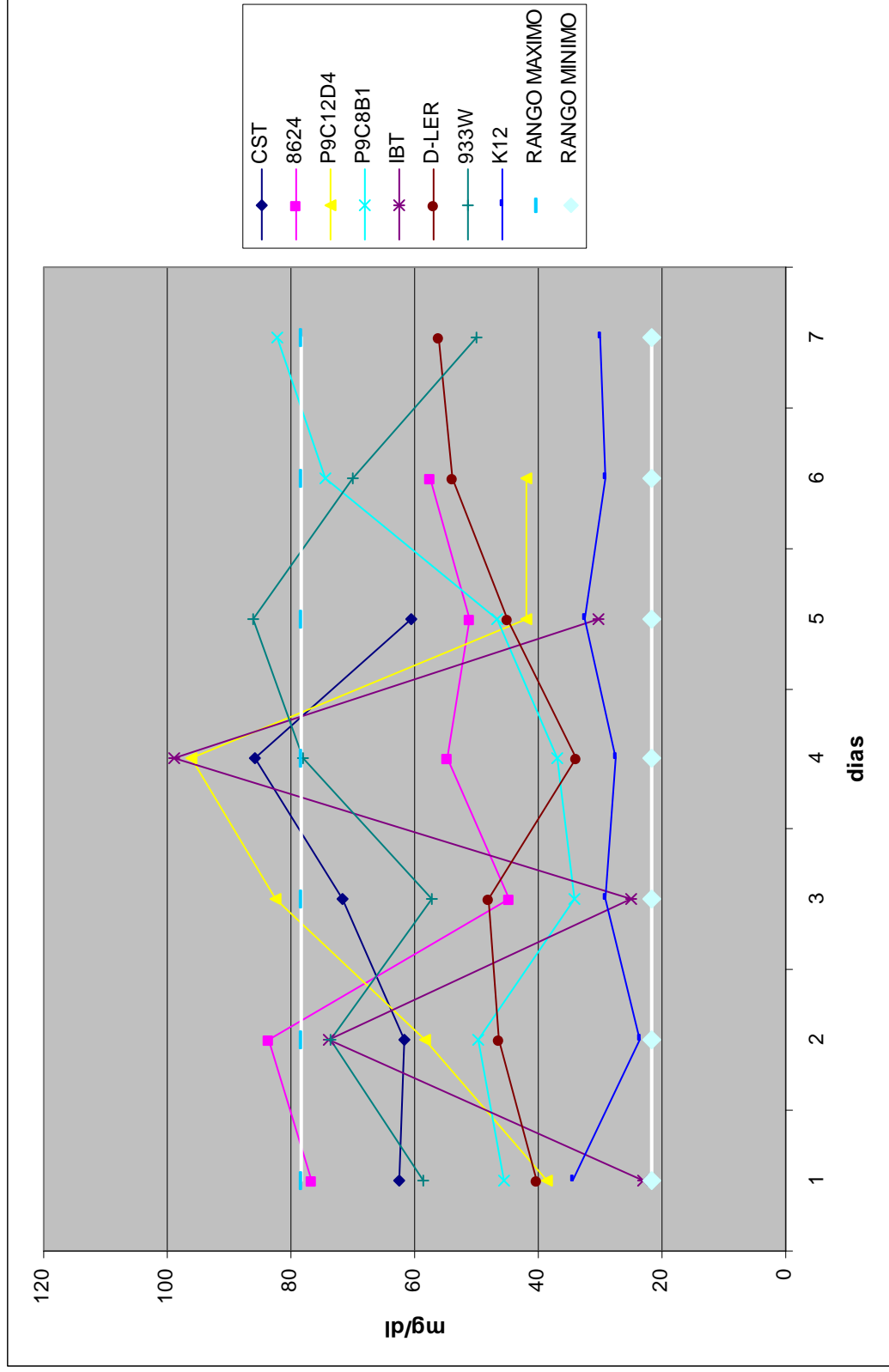


Tabla 20

Cantidad de creatinina obtenida a lo largo de los días post cirugía en los conejos inoculados

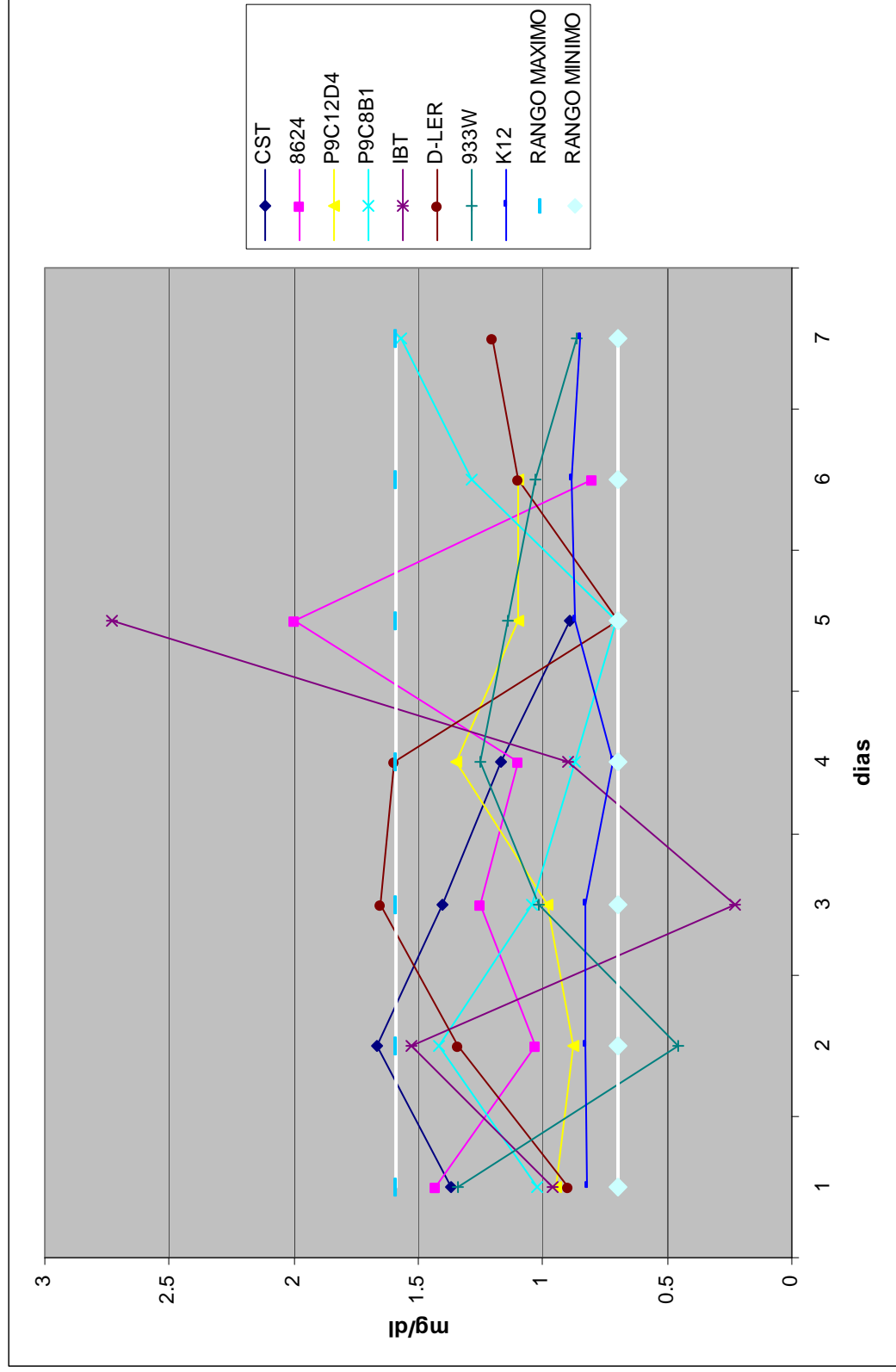
Día/ Individuo	1	2	3	4	5	6	7
4 CST	0.7	1.6	2.4	1.9		†	
7 CST	1	1	1	0.8	0.89		†
10 CST	2.4	2.4	0.8	0.8		†	
20 K12	0.78	0.45	0.62	0.61	0.74	0.62	0.65
21 K12	0.87	1.21	1.04	0.83	1.00	1.15	1.06
29 933W	1.06	0.1	0.84	1.2	1.11	1	0.8
39 933W	1.9	1.17	1.36	1.36	1.2	1.1	1
40 933W	1.06	0.1	0.84	1.2	1.11	1	0.8
20 IBT	1.32	2.83			†		
21 IBT	0.6	0.23	0.23	0.9	2.73		†
26 Δ-LER	1.2	1.08			1.7		
36 Δ-LER	0.6	1.6	1.6	1.6	0.7	1.1	1.2
5 8624	1.8	1			†		
6 8624	1.1	1.1	1.1	1.1	2	0.8	†
13 8624	1.4	1	1.4			†	
17 P9C12D4	0.9	0.76	0.76	1.49		†	
34 P9C12D4	1	1	1.2	1.2	1.1	1.1	†
12 P9C8B1	0.6	0.7	0.7	0.1	0.4	0.8	0.9
19 P9C8B1	1.19	0.97	0.93	1.02	1.02	2.35	1.9
15 P9C8B1	1	2.9			†		
35 P9C8B1	1.3	1.1	1.5	1.5	0.7	0.7	1.9

Creatinina: mg/dl

†: La muestra no se toma porque el animal falleció

Figura 22

Media de cretinina sérica en los conejos inoculados con cada cepa en el apéndice cecal



## DISCUSION

### Lesiones a la necropsia y cuadro clínico

En el tiempo postoperatorio el cual fue de 7 días, los conejos fueron alojados en el bioterio del laboratorio DIVET y se observó que hubo diferencias muy marcadas entre todas las cepas, pero así también, entre individuos de la misma cepa se encontraron, en ocasiones, algunas discrepancias, situación así mismo similar en la necropsia de estos animales.

Con lo que respecta a diarrea, los conejos inoculados con Caldo soya tripticaseína estéril no presentaron diarrea alguna, con excepción del primer día en el que, más que diarrea, se observó una disminución en la consistencia de las heces, esto probablemente debido al manipuleo de los intestinos durante la cirugía lo cual pudo haber provocado una enteritis iatrogénica de forma muy leve, la cual resolvió a las 24 horas, recuperando la consistencia y forma normal de las heces del conejo. Esta situación ha sido reportada por varios autores en el caso de apendicetomías en seres humanos <sup>(27)</sup>. En el caso de los individuos inoculados con la cepa **K12 C600**, sí presentaron una diarrea que oscilaba entre leve a moderada, la cual no presentaba sangre oculta y en la necropsia no se encontró ascitis, ni congestión intestinal; interesantemente, se pudo observar en el animal 30 **K12**, una moderada hipoplasia esplénica al momento de la necropsia, lo cual lo describe Valdivia en su trabajo de investigación de 1995 <sup>(7)</sup> pero en cepas productoras de verotoxinas, esto, según lo explica, debido a una agresión hacia los centros germinales de linfocitos en este órgano. Esta discrepancia puede tener diversos orígenes, primero, el órgano se veía disminuido de tamaño, más no presentaba ese color rojo intenso (cobrizo) que se ha reportado anteriormente, entonces se puede adjudicar a otro tipo de problemas, muy diferentes a la afección de la toxina, tal vez, simplemente, debido a una condición innata del animal, lo cual, no es posible ni confirmar ni negar ya que no se observó el estado del bazo antes de la cirugía, pero al verlo a nivel histológico podemos ver que tuvo una reducción proporcional tanto de la pulpa blanca como de la roja, lo cual no denota una necrosis de centros germinativos, sino una reducción de todo el órgano.

Al momento de realizar la necropsia, en todos los individuos que fueron inoculados con cepas avirulentas (**CST** y **K12**), se les observó el apéndice cecal disminuido de tamaño y con un color pálido y al momento de abrir el segmento, se apreció un líquido blanquecino viscoso con un olor muy desagradable, tal y como lo reportó Valdivia en su trabajo de 1995 <sup>(7)</sup>, este contenido obviamente representaba un exudado purulento, situación hasta cierto punto predecible ya que, en el

caso de **K12**, a pesar de que es una cepa apatógena, es una bacteria Gram (-) que posee LPS (incompleto) y elementos que producen inflamación y supuración, y en el caso del inóculo de **CST**, a pesar de que era un inóculo estéril, la porción del apéndice no lo era, ya que a pesar de que se lavó exhaustivamente el segmento antes de inocular, es muy difícil eliminar al 100% de la flora saprofita del órgano, y se le está agregando un caldo nutritivo el cual va a favorecer el crecimiento de estas bacterias y causará el mismo fenómeno que en el caso de la inoculación con **K12**.

En el caso de las dos cepas problema, **P9C12D4** y **P9C8B1**, comparadas con la cepa silvestre de donde se originaron, **8624**, se puede observar un aumento en la signología de ambas, en el caso de **P9C12D4**, se tuvo una diarrea muy marcada en todos los individuos inoculados, diarrea que presentaba positividad a la prueba de sangre oculta en heces, pero que dicha sangre era notoria a simple vista, e interesantemente, no solo era apreciable sangre fresca, proveniente de tracto intestinal caudal, sino también, se veía una estriación de color chocolatoso, lo cual indica que también se tenía hemorragia en regiones craneales del tracto digestivo, sugiriendo que no solo se produjo una colitis hemorrágica, sino también hemorragias en el resto del tracto intestinal, situación confirmada al momento de realizar la necropsia ya que todo el tracto intestinal, desde ileon hasta colon, presentaba congestión muy marcada (fig. 5), ésta diarrea fue tan severa que, de hecho, ninguno de los animales logró sobrevivir los 7 días del experimento y fallecieron desde el 4° día con una diarrea profusa, expulsión masiva de mucosa y sangre, emaciación muy severa, disnea y cianosis de mucosas; todos estos individuos presentaron una hipoplasia esplénica moderada con la ya anteriormente mencionada característica de color cobrizo. Situación similar se puede observar con el inóculo **P9C8B1** pero en una intensidad un poco menor y de igual manera en la cepa **8624** pero aún menor que en sus dos mutantes.

La posible explicación del porque del aumento de la virulencia de las dos cepas mutantes en comparación a su cepa progenitora, nos la explican, parcialmente, diferentes autores. Torres <sup>(2)</sup>, en el trabajo en que creó a estas dos cepas, nos muestra que ambas son hiperadherentes en células HeLa, menciona, por un lado, de que la cepa **P9C12D4** tiene insertado un transposón en el gen *cadA*, transposón que inhibe la producción de la enzima Lisina descarboxilasa y que la cepa **P9C8B1** posee ese mismo transposón insertado en el gen *csgD*, el cual es un gen activador, principalmente, de la transcripción del operón *csgBA* que codifica para la producción de subunidades de las fimbrias enroscadas, también llamadas Curli, importantes en la formación de biofilms <sup>(2, 23)</sup>; así también, en otro trabajo, Torres refiere como la hiperadherencia de estos

genotipos bacterianos, no solo es encontrada en células HeLa, sino también se repite en superficies vegetales y células Caco-2 en el caso de ambas cepas, y, en el caso de **P9C12D4**, puede crear eficientemente biofilms en superficies inertes. <sup>(20)</sup>

Viéndolo desde un punto de vista simplista, se podría minimizar el papel de la adherencia de las cepas de *E. coli* en este modelo experimental, ya que, al permanecer la bacteria en un saco aislado no necesitaría de factores de adherencia para mantenerse en contacto con los enterocitos del tracto gastrointestinal, ya que el factor de peristalsis que generalmente eliminaría a una bacteria poco adherente del tracto gastrointestinal se encuentra neutralizado, pero hay que recordar que en trabajos anteriores <sup>(17)</sup>, utilizando este mismo modelo, se ha demostrado que bacterias afectadas en sus capacidades de adherencia, caso de la cepa **Δ-Ler**, también utilizada en este trabajo, dan como resultado efectos diferentes, denotándonos que la adherencia de la bacteria no solo le evita el desprenderse de la mucosa intestinal, sino que la adherencia debe de activar o modular la expresión de ciertos juegos de genes importantes en la producción de algunos factores de virulencia y según lo indica Torres en un trabajo con colaboración de la U. A. de Puebla <sup>(29)</sup>, nos demuestra que el gen *ler*, eliminado en la cepa **Δ-Ler**, no solo controla la expresión de genes encontrados en la isla de patogenicidad LEE, sino también regula genes extra LEE, elementos que nos pueden dar la explicación de situaciones encontradas en el actual estudio y serán discutidas posteriormente.

En el caso de la cepa **P9C12D4**, con el gen *cadA* inhibido gracias a la inserción de un transposón en ese locus, se observó la virulencia mayor. Al observar esta virulencia es imperante el analizar la actividad de este gen mas allá de codificar para la formación de una descarboxilasa de la lisina, sino se tiene que indagar mas a fondo para discernir si este gen además de eso, controla otro juego de genes o, en su defecto, encontrar si los productos derivados de la descarboxilación de la lisina pueden regular negativamente la expresión de genes de virulencia.

Siguiendo con sus estudios, Torres en 2005 <sup>(30)</sup>, indica que el gen *cadA*, regula la virulencia de diferentes cepas de *E. coli*, y en base a eso explica el porque esta convirtiéndose el Serotipo O:111 en la primera causante de HUS en Europa, ya que este serotipo generalmente carece naturalmente de el gen *cadA* por lo que no se encuentran inhibidos ni modulados los genes de la isla de patogenicidad LEE, en ese mismo trabajo, explica que la cadaverina, un producto de la descarboxilación de la lisina es una poliamina, que con su presencia reduce la permeabilidad de la membrana de la bacteria, esto como protección hacia medios ácidos, pero en consecuencia

disminuye la eliminación de los productos de la bacteria hacia el exterior. Aún mas, McCormick <sup>(19)</sup> encontró que la adición de cadaverina a cepas deficientes de *cadA* de *S. flexneri*, causaba la atenuación de dos enteroroxinas y de su capacidad de virulencia.

Después de analizar estos puntos acerca del gen *cadA* nos podemos dar cuenta de que si este gen se encuentra inhibido, no solo se aumentara la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal, sino que se encontrara aumentada la capacidad de esta para eliminar sus toxinas al exterior, por lo que no es raro encontrar un aumento tan dramático en la signología de estos animales. Cabe mencionar que en diversos trabajos <sup>(21, 30)</sup> se discute, no solo de la capacidad de este gen para modular la actividad de virulencia de *E.coli*, sino de proteger a la bacteria en contra de situaciones de acidez extrema, tales como la acidez estomacal, a la cual se ve sometida la bacteria en una situación de infección natural. Por lo que una de las bondades del modelo experimental con el que estamos trabajando, en este caso en particular, es que podemos evitar que la bacteria pase por esta acidez y sobreviva en el nicho en el cual, de otra forma, en forma hipotética, no llegaría. Otros trabajos, aún no publicados, han intentado inocular esta bacteria por vía oral en gazapos de una semana de nacidos, en este modelo, aún se podría obtener algún resultado ya que la acidez del estomago aún no alcanza sus niveles máximos, pero no podría ser posible utilizar confiablemente otro tipo de modelos en el que la bacteria pasase por medios ácidos. Como ya se menciona esto es en una situación hipotética, ya que si este fuera el caso, no existirían infecciones en humanos por cepas carentes de este gen, como es el caso de el serotipo O:111, pero, este serotipo es uno de los prevalentes en Europa; esto podría ser explicado, por un lado, por situaciones especiales que alcalinizaran la acidez del estomago, (ingestión excesiva de antiácidos) o, por otro lado, cambios adaptativos de la bacteria, los cuales tuvieran sistemas alternos de protección en contra de la acidez estomacal, esto ha sido estudiado por Torres en sus trabajos del 2005 <sup>(31)</sup>

En lo que respecta al gen *csgD*, el cual está inhibido en la cepa **P9C8B1**, podemos observar que se tuvo una virulencia mas marcada que en su cepa progenitora, **8624**, pero menor a la virulencia de la cepa **P9C12D4**.

El gen *csgD*, es un gen que codifica a la transcripción del activador del operón que codifica para la subunidad productora de Curli. Este tipo de fimbrias es delgada, enroscada y es análoga a las *Thin aggregative fimbriae (Thaf)*, encontradas en *Salmonella*, <sup>(25)</sup> las cuales, para fines de identificación rápida son capaces de fijar a la tinción de rojo de Congo; se ha encontrado que estas fimbrias son

necesarias para la óptima formación de biofilms, y como el biofilm es una forma de supervivencia de la bacteria en situaciones extracorporales, se ha observado que la expresión de Curli es estimulada en situaciones de alta osmolaridad y baja temperatura, aunque, como lo menciona Brombacher en el 2003 <sup>(23)</sup>, la inhibición de estas fimbrias no significa la inhibición de la expresión del gen, sino que se da pasos delante de la transcripción del gen *csgD*, por lo que si este gen, no solo estimúlase la expresión de Curli, sino alguna otra función dentro de la bacteria, entonces esta función no sería inhibida y se seguiría expresando en situaciones *in vivo*, entonces, pudiendo encontrar diferencias entre una cepa que si posea activo este gen, caso de la **8624**, y otra que lo tenga inhibido, caso de la **P9C8B1**, lo cual es coincidente con lo hallado en nuestro trabajo. Ahora, estas diferencias halladas nos sugieren que el gen *csgD* regula negativamente algún otro tipo de gen de virulencia, que al ser liberado por la inhibición con el transposón, nos da un cuadro clínico más evidente que el de **8624**.

Existen otros trabajos <sup>(31)</sup> que contradicen lo anterior, pues reportan que Curli sí es expresada dentro del hospedero, y que la presencia de estas fimbrias al interior del hospedero, a diferencia de lo ocurrido extracorporalmente, favorece la internalización de la bacteria dentro del epitelio intestinal, las diferencias entre estos dos trabajos pueden ser debidas a que se usaron cepas diferentes, y existen cambios patoadaptativos dentro de las bacterias que podrían eliminar la regulación de la expresión de los curli en un caso, y en el otro, aún no tener ese cambio, resultando en que se mantenga la represión de ese gen dentro del hospedero, tal como lo demuestra Sakellaris en el 2000 <sup>(33)</sup> cuando, investigando el loci de Curli en *Shigella*, se da cuenta de que en varias de las cepas estudiadas, especialmente en las más patógenas, el gen *csgD* se encuentra roto, faltante o desacomodado, a lo cual concluye que este cambio patoadaptativo se ha llevado a cabo a favor de la optimización en la colonización de esta bacteria a las células de su huésped, situación transpolable a este mismo gen en *E. coli*. Independientemente de que se exprese o no este gen dentro de nuestro modelo, sabemos que el patotipo de EHEC no es invasivo, por lo que no sería relevante si se encontraran fimbrias enroscadas o no expresadas en una EHEC.

Hay un trabajo realizado en ratones <sup>(32)</sup>, en el que se compara la producción de toxinas de Shiga entre cepas productoras y no productoras de curli en células HeLa, en ese trabajo se encontró que no existen diferencias significativas entre la producción de unas y de otras por lo que debe existir otra causa más allá de la producción de las toxinas de Shiga para explicar el ligero aumento de la virulencia de esta cepa en comparación a la **8624** en nuestro modelo.



Torres, <sup>(2, 20)</sup> en su trabajo acerca de la adherencia de estas cepas a células HeLa, encuentra que la cepa **P9C8B1**, a pesar de no poseer fimbrias enroscadas, que son capaces de unirse a proteínas del huésped, tales como la fibronectina, posee un fenotipo hiperadherente, en su trabajo no da una explicación de esta contradicción, pero es posible que el mecanismo metabólico de la bacteria pudiese dejar de utilizar parte de su capacidad en producir curli y se podría dedicar a generar adhesinas de otro tipo con mejor capacidad de adhesión que los curli; para comprobar esta suposición deberán de realizarse más estudios al respecto.

### **Histopatología**

Según lo indica Tzipori <sup>(41)</sup>, las principales lesiones histopatológicas encontradas en órganos de pacientes humanos que sufrieron de SUH son: microangiopatía trombótica, lesión endotelial y microtrombos, hay inflamación endotelial, engrosamiento del espacio subendotelial, deposición de material similar a la fibrina en estos lugares y estrechamiento del lumen capilar, Valdivia, en su trabajo realizado en 1995 <sup>(7)</sup>, describió, además de las lesiones renales, disminución de la pulpa blanca en bazo, aumento de macrófagos en esta área, así como un aumento en la deposición de hemosiderina en el parénquima del órgano. Otro conjunto de lesiones que menciona Valdivia refiriéndose al segmento inoculado en el modelo de inoculación en apéndice cecal de conejo, es un infiltrado mononuclear abundante, escasos polimorfonucleares, abundantes eritrocitos, zonas ulceradas en la mucosa, también observó una disminución de la población celular de linfocitos en forma marcada y un infiltrado perivascular en la submucosa formado por linfocitos maduros.

### ***Lesiones en Apéndice Cecal***

No se encuentra mucha información bibliográfica acerca de las lesiones que produce *E coli* en el apéndice cecal de conejos a los que se les realizó una cirugía de inoculación del tipo que se llevó a cabo en este trabajo, este modelo fue desarrollado por Valdivia en 1995 <sup>(7)</sup> y lo que se sabe de estos fenómenos está descrito por él en esa investigación y en algunas subsecuentes.

Como es de esperarse, inclusive la inoculación con un caldo de cultivo estéril, provocará una ulceración del segmento, tanto por el manipuleo en la cirugía, como por la proliferación de otro tipo de bacterias, por tal motivo se logró apreciar un grado de lesión leve un poco menor a la provocada por la cepa **K12**, pero de igual manera sin otro tipo de lesión evidente, el resto de las cepas presentaron un grado relativamente alto de ulceración de la mucosa, lo cual nos demuestra la

actividad de la bacteria en el lugar de inoculación, situación que se observó en la necropsia, cuando todos los segmentos examinados de estas cepas se encontraban con úlceras muy evidentes y con un contenido de color oscuro..

Una de las lesiones que describe Valdivia <sup>(7)</sup> es la atrofia de los folículos linfoides de la mucosa y una migración de linfocitos maduros desde otros sitios, interesantemente, las cepas **IBT**, **P9C8B1**, **8624** y **Δ-Ier**, denotaron una severa disminución de ese folículo linfoide, no así el caso de las cepas **933W** y **P9C12D4**. La disminución de este efecto en la cepa **933W** es debida seguramente a que ésta sólo produce la toxina Stx2 y no posee el resto de los elementos de virulencia de una clásica EHEC <sup>(42)</sup>, por otro lado, la disminución de la virulencia de la cepa **P9C12D4** es un tema un poco más complicado y de primera instancia un poco contradictorio, ya que en el resto de los elementos analizados, esta cepa resultaba ser más virulenta que la otra mutante. Una explicación de esto podría ser que al realizarle las pruebas bioquímicas primarias a las cepas problema (datos no mostrados), ésta, a diferencia de las otras dos, fue la única que resultó motilidad (-); hay que recordar que la creación de estas cepas fue por medio de inserciones al azar de un transposón <sup>(2)</sup>, inserciones que después fueron clasificadas según los fenotipos diferenciales de la bacteria, pero eso no descarta la posibilidad de que el transposón no solo se haya insertado en el loci que se observa, sino que tal vez fue insertado en otros muchos genes que de primera instancia no pudieron ser observados; siendo probablemente este el caso de esta cepa, que puede poseer un transposón insertado en el loci que codifica para la expresión de flagelos. Más estudios deberán ser realizados para determinar, primero, si es verdad que esta cepa posee un transposón insertado en este loci, y, segundo, si es relevante esta mutación para explicar estas diferencias observadas.

En el caso de **P9C8B1**, se pudo observar una actividad similar a la cepa silvestre **8624** con excepción de un ligero aumento en la atrofia del folículo linfoide de la submucosa.

### ***Lesiones renales***

Los indicios histopatológicos que se tomaron en cuenta en este trabajo fueron: necrosis glomerular, congestión de vasos sanguíneos y siderosis en el órgano. Como era de esperarse, en los animales administrados con **CST**, no se encontró alguna señal cambio histopatológico aparente, pero el otro testigo negativo con el que se contaba, **K12**, sí presentó una congestión leve en la vasculatura renal, esto, muy seguramente debido a los efectos de la presencia de LPS (incompleto, solo conformado por el lípido A y el core), la cual desencadena una serie de citocinas que pudiesen ocasionar esta

reacción, este fenómeno lo observó y lo explicó someramente, Valdivia en su trabajo de 1995 y posteriormente Brambilia y Gonzalez <sup>(17)</sup>, suponen que la simple presencia del soma celular sobre el domo del apéndice cecal es suficiente para generar una disminución de linfocitos T cooperadores y sus precursores.

El mayor conjunto de lesiones encontrado fue en los conejos inoculados con **P9C12D4**, presentando una necrosis glomerular muy severa, congestión y siderosis en grado moderado a severo. Esto es un hallazgo lógico considerando las características de esta cepa, por otro lado con la cepa **P9C8B1**, se encontró una virulencia inclusive menor, que lo hallado en su cepa silvestre **8624**, esto denota que tal vez, la expresión de curli puede mediar y de algún modo favorecer una mayor absorción de toxina por parte del conejo; se deberán realizar más investigaciones al respecto, no obstante, en otros trabajos se ha encontrado que las fimbrias enroscadas le dan capacidad de internalización a una bacteria a células eucarióticas <sup>(31)</sup> por lo que, aunque sabemos que las cepas EHEC no son invasivas y en este modelo la adherencia no es necesaria, se puede inferir que la adherencia no solo evita que la bacteria sea eliminada sino que le puede dar un acceso más directo a sus toxinas hacia el torrente sanguíneo, esto se puede corroborar al observar una disminución en la intensidad de las lesiones renales en la cepa **Δ-Ler** en comparación a la cepa **IBT**, ya que análogamente a **8624** y **P9C8B1**, **Δ-Ler** se encuentra inhibida en sus capacidades de adherencia por una delección del gen *ler* inhibiendo la utilización de intimina en comparación a la cepa silvestre **EDL933 (IBT)**; este fenómeno lo explican Brambilia y Gonzalez <sup>(17)</sup>, cuando al inocular en el apéndice cecal del conejo cepas de *E. coli* con diferentes factores de virulencia encuentran que cuando se tiene una adherencia íntima al epitelio, los linfocitos CD4 positivos a proteínas CD5, CD25 y CD43, disminuyen en esta zona, situación diferente cuando no existe esta adherencia a pesar de que se sigan produciendo toxinas de Shiga.

Se midió la infiltración de hemosiderina dentro de las células del riñón ya que en cuadros hemolíticos severos, como es el caso del SUH, se pueden observar acúmulos de hemosiderina, principalmente en células de los túbulos renales y del sistema retículo endotelial <sup>(43)</sup>, se encontró que las dos cepas mutantes originaron siderosis de leve a moderada al igual que la cepa **IBT**, lo cual nos indica el nivel de eritrolisis intravascular que sufrieron estos animales.

### ***Lesiones esplénicas***

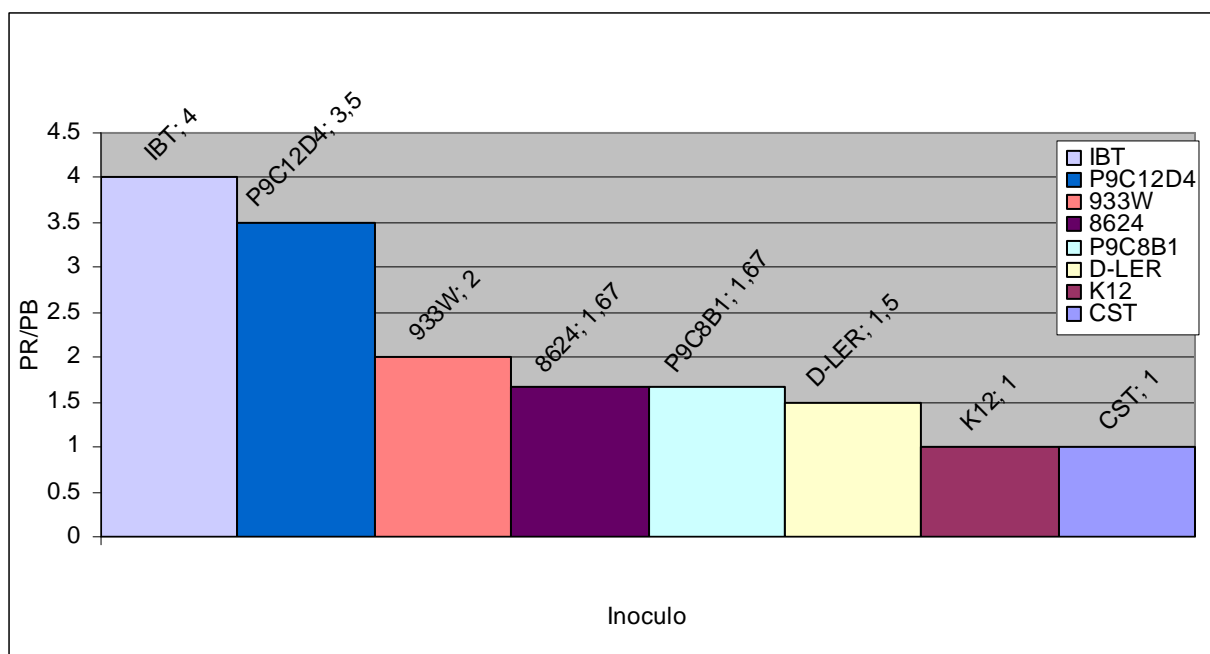
Los conejos inoculados con **CST** no demostraron cambios patológicos aparentes en este órgano, situación que de igual manera se observó en la necropsia, En el caso de **K12**, se logró observar una disminución proporcional de ambas zonas; en el caso de la investigación de Brambilia y Gonzalez <sup>(17)</sup>, se encontró que **K12** al contrario de todo el resto de las cepas que utilizaron, tuvo un aumento en los linfocitos de ambas pulpas, esto pudiese ser un poco contradictorio, pero hay que recordar que en el caso de ese trabajo se cuantificaron específicamente linfocitos y en este caso solo se calificó la cantidad de pulpa blanca y roja, y viendo que en todos los individuos **K12** estos cambios siempre guardaron una proporción 1/1 entre pulpa roja y pulpa blanca (PR/PB), se puede inferir que realmente la disminución observada es relativa y no tiene significancia en nuestro trabajo.

A diferencia de la cepa anteriormente expuesta, el resto sí tuvieron cambios en su relación PR/PB, por lo que en estas se puede analizar el porque de estos cambios.

Para poder realizar una evaluación más certera y basándonos en el caso de la relación 1/1 de la cepa **K12**, se decidió realizar un índice PR/PB en el que se resalte la diferencia entre ambas pulpas (figura 23)

**Figura 23**

**Relación Pulpa Roja/Pulpa Blanca**



La numeración en el eje X corresponde a la cantidad de veces que la pulpa blanca disminuyó con respecto a la pulpa roja. (P.e. un número 4, querrá decir que la pulpa blanca se redujo con un factor de 4 con respecto a la pulpa roja).

Como era de esperarse, la pulpa blanca del conejo inoculado con **P9C12D4** tuvo una reducción con un factor de 3.5, lo cual denota una alta agresión hacia los linfocitos de este órgano; según indican Brambilia y Gonzalez <sup>(17)</sup>, esta agresión fue específicamente hacia los linfocitos CD4 (CD5 y CD43) de la pulpa blanca.

La cepa **P9C8B1**, tuvo una reducción similar a la de la cepa silvestre **8624** y solo ligeramente mayor a la de **Δ-Ler**, esto nos podría indicar que, en el caso de las lesiones de bazo, sí es necesaria una adherencia completa (de todo tipo de adhesinas, fimbriales y no fimbriales, incluyendo a curli), ya que, las tres cepas deficientes en algún tipo de adhesina, no presentaron una reducción tan evidente, y en el caso de **8624**, su reducción no fue tan notoria porque, probablemente, como lo menciona Sakellaris <sup>(33)</sup> tal vez, esta cepa aún mantiene activa la represión de su completo potencial de virulencia por el gen *csgD*, y en el caso de **P9C12D4** y probablemente de igual manera en **IBT** este gen ya no juega un rol protagónico en la represión de virulencia.

### **Hematología**

Primeramente se obtuvieron los rangos normales de los individuos, rangos que fueron muy similares a los anteriormente reportados <sup>(7)</sup>.

En la fórmula roja, se puede observar en términos generales una anemia que se va complicando a lo largo de los días, siendo remarcable la anemia originada por **P9C12D4**, levemente más severa que las demás, esto como ya se mencionó, por su mayor capacidad de expresar factores de virulencia <sup>(2)</sup>; con respecto a la ligera hemoconcentración que se observó en unos cuantos animales durante los primeros días post inoculación, esto seguramente debido a la deshidratación del animal causada por la cirugía, pero no es clínicamente significativo ya que, al paso de pocos días, estos valores regresaron a la normalidad y comenzaron a descender como en el resto de las cepas. Como era de esperarse, los animales con inóculos de **K12** y **CST**, nunca salieron del rango normal preestablecido para estos parámetros.

En la fórmula blanca, podemos observar que las cepas **P9C8B1** y **8624**, presentaron una leucocitosis bastante marcada a partir del 4° día post inoculación hasta el fin del experimento. El resto de las cepas no presentaron cambios aparentes en lo que respecta a su fórmula blanca.

Al comparar la cepa **8624** con sus dos mutantes, podemos observar que en el caso de la respuesta celular, la cepa que posee todos sus elementos de virulencia intactos tiene más capacidad de activar citocinas para así movilizar células de defensa, especialmente neutrófilos (llamados heterófilos en el caso del conejo) situación un poco contradictoria ya que, como se ha mencionado en ciertos trabajos <sup>(44)</sup>, la presencia de neutrófilos y macrófagos aumentan los efectos de las toxinas de Shiga y empeoran el cuadro de SUH, así que, por consecuencia lógica, la cepa **P9C12D4**, que fue en general la más virulenta, debería de tener una leucocitosis muy severa, cosa que no fue así.

A pesar de que no existió una leucocitosis en la cepa **P9C12D4**, se puede observar que la presencia de monocitos aumentó en el caso de ambas cepas mutantes a diferencia del resto de los inóculos. Esto podría ser una posible explicación de lo que se planteó en el párrafo anterior, tal vez, como lo menciona Palermo en su trabajo <sup>(45)</sup> a pesar de que la presencia de neutrófilos es en gran parte lo que complica el cuadro de SUH, el rol protagónico lo tienen los macrófagos, especialmente de hígado y bazo, los cuales a pesar de ser numéricamente mucho menores a los neutrófilos, estos, al ser inhibidos en un modelo de ratones inyectados con Stx2 dieron como resultado un aumento del 50% en la supervivencia de los ratones, para poder dar una explicación a este fenómeno, probablemente se deberá buscar en el parénquima del bazo de los individuos inoculados con esta cepa el aumento de macrófagos. A diferencia de las dos cepas mutantes, la cepa silvestre **8624**, presentó una neutrofilia marcada que fue elevándose a lo largo de los días post inoculación.

El resto de las cepas realmente no presentó muchos cambios en sus niveles leucocitarios, quizás, si se quisiera evidenciar en forma más clara cambios en estas cepas, se deberá de elevar la dosis de inoculación o modificar alguna de las variables que se utilizaron, pero eso queda como antecedente para subsecuentes experimentos.

En lo que respecta a los niveles de urea y creatinina sérica, la literatura indica <sup>(7)</sup> que se observa una clara elevación, sobre todo de creatinina, en este modelo experimental, así como en casos de SUH <sup>(40)</sup>, que muestran una clara evidencia de lesión renal; en el caso de nuestro estudio también se encontraron lesiones bastante severas en riñón a nivel histopatológico en ciertas cepas utilizadas, pero a nivel serológico no fue así, ya que, a pesar de lo notorio de las lesiones, probablemente aún existía mucho parénquima funcional para poder depurar los elementos que buscábamos, por lo que si se quisiese encontrar una evidencia más grave de lesión renal a nivel serológico, deberíamos de adaptar el modelo para originar un cuadro más crónico.

## CONCLUSIONES

1. Las dos cepas mutantes elaboradas por Torres en 2005, presentaron un nivel de lesiones a nivel macroscópico y microscópico mayores que la cepa silvestre **8624** y el resto de las cepas utilizadas.
2. La cepa **8624** y sus dos mutantes, poseen una capacidad mayor de crear alteraciones en el hemograma que las cepas con las que anteriormente se había trabajado (**IBT, Δ-Ler, 933W, K12**)
3. El aumento del grado de virulencia de las dos cepas mutantes y la cepa silvestre **8624** son, probablemente, debidas a una capacidad mayor de inducir monocitosis y neutrofilia en el animal.
4. Los niveles de urea y creatinina sérica no presentaron ninguna variación significativa.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Tarr, P. I., M. A. Neill, C. R. Clausen, J. W. Newland, R. J. Neill, and S. L. Mosley.** 1989. Genotypic variation in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from patients in Washington, 1984-1987. *J. Infect. Dis.* 159:344-347.
2. **Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect. Immun.* 71:4985-4995.
3. **Beutin, L., M. A. Montenegro, I. Ørskov, F. Ørskov, J. Prada, S. Zimmermann, and R. Stephan.** 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2559-2564.
4. **Yarmolinsky, M. B., and G. Wiesmeyer.** 1960. Regulation by coliphage lambda of the expression of the capacity to synthesize a sequence of host enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46:1626-1645.
5. **Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4
6. **O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal.** 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226:694-696.
7. **Valdivia, G.** Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de verotoxinas (VT) de *Escherichia coli*. Tesis, FES-C. UNAM. Mexico. 1995.
8. **Delgado, A.** Microbiología Médica. 5ª edición. Elsevier, España, 2006
9. **Carlton, G. et al.,** Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3ª edición, Iowa State University Press. EUA. 1993



10. **Bell, C. et al.** *E. coli* una aproximación practica al microorganismo y su control en los alimentos. 1° ed. Ed.Acribia, S.A. Zaragoza. 2000.
11. **Brooks, F. et al.** Microbiologia Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18° edicion. Manual moderno. Mexico. 2005
12. **De Graaf, F.** Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. Curr top microbial immunol 151: 29-51
13. **Bertschinger, H. U. et.al** Bacterial colonization and morphology of the intestine in porcine *Escherichia coli* . Vet Patol, 1983. 20:99-110
14. **Gaastra, W. et.al.** Host Especifical fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol Rev. 1982, 46:129-61
15. **Fisman, P.** Mechanism of action of cholerae toxin in ADP-ribosylating toxins and G proteins. Ameican society of Microbiology. 1990 127- 40
16. **Cordero Del Campillo, M, et.al,** Parasitología Veterinaria. 1° edición. Editorial Mc Graw–Hill Interamericana. España, 1999
17. **Brambilia, D, et.al.** Efecto de los factores auxiliares de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7 sobre los linfocitos titulares en un modelo en conejos. Tesis, FES-C. UNAM. Mexico. 2006.
18. **Perez O, M. .** Efecto sobre la respuesta inmune provocado por *Escherichia coli* (O157:H7) verocitotoxica inoculada en el apéndice del conejo. Tesis, FES-C. UNAM. Mexico. 2002.
19. **McCormick, B. A., M. I. Fernandez, A. M. Siber, and A. T. Maurelli.** 1999. Inhibition of *Shigella flexneri*-induced transepithelial migration of polymorphonuclear leucocytes by cadaverine. Cell Microbiol. 1:143–155.

20. **Torres, A. G., and C. Jeter.** 2005. Differential Binding of *Escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa, Human Epithelial Cells, and Plastic Is Mediated by a Variety of Surface Structures. *Appl envirom microb.* **71**:8008-8015.
  
21. **Moreau, P.** 2006. The Lysine Decarboxylase *CadA* Protects *Escherichia coli* Starved of Phosphate against fermentation Acids. *J of Bact.* **189**:2249-2261.
  
22. **Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode, and A. Fasano.** 1998. “Black holes” and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *E coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3943-3948.
  
23. **Brombacher, E. Dorel, C. Zehnder, A. Landini, P.** 2003. The curli biosynthesis regulator *CsgD* coordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *E. coli*. *Microbiology. Gran Bretaña.* **149**:2487-2857.
  
24. **Zambrano P, Deluchi A, Hevia P y col.** Síndrome hemolítico urémico en Santiago de Chile: Evolución de la función renal y factores pronósticos. *Revista Chilena de Pediatría* 2005, **76**:(1-9).
  
25. **Jeter, C. Matthyse A.** 2005. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Am. Phytopatol. Soc. USA* vol **18** No**11**:1235-1242.
  
26. **Gophna, U. Barlev, R. Seijfers, R. Oelschalager, T. Hacker, J. Ron, Z.** 2001. Curli Fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Inf and Imunn. Alemania,* Vol **69** No **4**: 2659-2665.
  
27. **Russel MG, Dorant E, Brummer R-JM, et al.** Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn’s disease: results of a large case-control study. *Gastroenterology* 1997; **113**:377–82.

28. **Russel MG, Dorant E, Brummer R-JM, et al.** Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. *Gastroenterology* 1997; **113**:377–382.
  
29. **Torres, A. Lopez-Sanchez, G. Milflores-flores, L. et.al** . Ler and H-NS, Regulators Controlling Expression of the Long Polar Fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 control study. *Journ Bacter* 2007, **189**:5916-5928.
  
30. **Torres, A. Lopez-Sanchez, Vazquez-Juarez, R. et.al** . Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *infection an immunity* 2006, **Vol 73 No 8**:4766-4776
  
31. **Gophna, U. Barlev, M. Seijffers, R. et.al** .Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *infection an immunity* 2001, **Vol 69 No 4**:2659-2665
  
32. **Uhlich, G. Keen, J. Elder, R.** Variations in the *csgD* Promoter of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Increased Virulence in Mice and Increased Invasion of HEp-2 Cells. *infection an immunity*. 2002, **Vol 70 No 1**:395-399
  
33. **Sakellaris, H. Hannik, N. Rajakumar , K. et.al** Curli loci of *Shigella* spp. *infection an immunity* 2000, **Vol 68 No 6**:3780-3783
  
34. **Rivero MA, Padola NL, Etcheverrua AL, Parma AE.** *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *Medicina Buenos Aires*, 2004, **64**:352-356.
  
35. **Facundo JCJ, Delgado Y, Castillo D, Pavón V, Gómez A, Sánchez LA.** Síndrome hemolítico urémico. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 2003, **19**:(1-13)
  
36. **Ruiz G.** Utilidad de los antibióticos para prevenir el síndrome urémico hemolítico en pacientes con diarrea sanguinolenta. *Archivos de medicina familiar y general*, 2005, **1**: (40 – 44).
  
37. **Noris M, Remuzzi G.** Hemolytic Uremic Syndrome. *J American Society of Nephrology*, 2005, **16**: (1035 – 1050)

38. **Gadea MP, Varela G, Bemad M y col.** Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. Revista Médica del Uruguay Revista de Posgrado de 120a VIa Cátedra de Medicina. 2004, **64**:(352-356).
39. **Barreto G, Pardillo T.** *E. coli* Enterohemorrgico (EHEC). Algunas consecuencias de su presentación en el humano. Revista Electrónica “Archivo Médico de Camagüey”, 2000 , **4**:(1-5).
40. **Paton, J, Paton A.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbial. Rev. 1998, **11**:450-479
41. **Tzipori, S. Sheoran, A. et al.** Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin. Microb. Rev. 2004, **Vol 17 No 4**: 926-941
42. **J W Newland, N A Strockbine, R J Neill** Cloning of genes for production of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II. Infect Immun. 1987; **55(11)**: 2675–2680.
43. **Jubb, K. Kennedy, P. Palmer, N.** pathology of domestic animals. (vol 2). 3 ed. Academic Press, 1985, USA.
44. **Flagler, M. Strasser, J. Chalk, C. Weiss, A** Comparative Analysis of the Abilities of Shiga Toxins 1 and 2 To Bind to and Influence Neutrophil Apoptosis. Infect. And Immun, 2007, **vol 75, No 2**:760-765
45. **M. S. Palermo, M. F. Alves Rosa, N. Van Rooijen & M. A. Isturiz** Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. Clin Exp Immunol 1999; **116**:462–467