



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**Desarrollo de un modelo experimental en bovinos para estudios de factores  
auxiliares de virulencia de una cepa de *Escherichia coli* productora de  
toxina de Shiga.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**PATRICIA REGINA ARANGURÉ PERAZA**

TUTOR:

**DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**

COMITÉ TUTORAL:

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**

**DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS**



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.

Este trabajo se realizó con el equipo e instalaciones de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA), y del laboratorio de patogenicidad microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinarias, FES Cuautitlán, UNAM.

Con financiamiento de los proyectos:

Programas de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación  
Tecnológica.

(PAPIIT) UNAM No. IN216005

“Efectos sobre el Sistema Inmune de cepas de *Escherichia coli*”

Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la  
Enseñanza.

PAPIME PE20077

Cátedra de Investigación FES-C No. IN.2.14

“Mecanismos de patogenicidad microbianos”

M.V.Z. Patricia Regina Aranguré Peraza fue alumna becaria

CONACYT (2008-2010)

COMECYT (2010)

DGAPA-PAPIIT (2005)

## **AGRADECIMIENTOS**

**Dr. Guillermo Valdivia Anda por todo el apoyo durante la elaboración de este proyecto que me ha hecho crecer profesionalmente, por todos los años que he colaborado con usted y las enseñanzas de vida que me deja y por ser una buena persona mil gracias.**

**Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo muchas gracias por aceptar ser parte de este proyecto, por sus consejos y sobre todo su paciencia hacia conmigo, muchas gracias.**

**Dr. Carlos Eslava Campos, de antemano muchas gracias por todos sus consejos y opiniones, es un gran ser humano; lo respeto y admiro.**

**Dr. Juan Carlos Del Río García por su tiempo, ayuda y colaboración en este proyecto mil gracias, lo estimo mucho.**

**Dr. Carlos Gerardo García Tovar, por su atinada asesoría, consejos y siempre buena disposición.**

**Dra. Silvia Giono Cerezo y Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por sus consejos y opiniones acertados para la terminación de este proyecto.**

**A los académicos por su ayuda y gran disposición para la elaboración de este proyecto:  
MVZ Javier Hernández Balderas, MVZ. Dipl. José Antonio Licea Vega, Dr. Miguel Ángel Pérez Razo, Dr. Fernando Alba Hurtado, Dr. Marco Muñoz Guzmán.**

**Por su colaboración, ayuda desinteresada y gran apoyo en Puebla a:  
Téc. Arop., pIME Cuauhtémoc Torres Hernández, p.MVZ Alfonso Estrada Vadillo y a la Familia Estrada Vadillo por abrirme las puertas de su casa.**

**A mis amigos de la UIMSA:**

**M. en C. César Cuenca Verde por todo tu tiempo y ayuda eres un gran maestro y amigo, gracias.  
MVZ Enrique Monge Zúñiga por tu colaboración en este proyecto, por hacer que los momentos amargos fueran ligeros y por tu gran amistad.**

**p.MVZ Emmanuel González Rueda por tu ayuda, consejos y amistad, gracias.**

**p.MVZ Lizbeth González Cásares por tu ayuda desinteresada y amistad mil gracias.**

**p.MVZ Hadad Leones Vioria y p.MVZ Tamara García Baca, gracias por su disposición para que avanzara este proyecto, por ser siempre positivos y alegres, les agradezco mucho.**

**MVZ Ana Victoria Flores Ibarra y MVZ Estela Hernández López por su valiosa ayuda para la elaboración de este trabajo.**

**A Laura Carranza Robles, Lisset Anaid Esquivel Vargas, Gabriela Escalante Mendoza, Reyna Cofas Cuevas, Daniela Neri Vázquez, Teresa Vences Fernández, Eréndira De la Fuente Mancera, Rogelio Catalán Sánchez, Liliana Cruz Martínez, Beatriz Álvarez Pérez, Juan José Gómez Quiñones y Ricardo Gómez Mercado, por su compañía y ayuda gracias.**

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

**Al equipo del Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®), por su tiempo y apoyo brindado en este proyecto.**

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

## **DEDICATORIAS**

### **A MI PAPI**

Una vez más tengo mucho que agradecerte por que a pesar de todo siempre puedo contar contigo, eres mi gran ejemplo a seguir, eres la persona que mas admiro y respeto en el mundo, por que sabes ser un gran padre, madre y amigo incondicional tqm papi.

### **A MI MAMI (+)**

Por ser mi ángel guardián; no te extraño ya que cada paso que doy tu estas.

### **A MIS HERMANOS**

A Elideé por que tu siempre estas para tu familia sobre encima de las cosas, por que se que cuento contigo para todo.

A Gabriela por ser un ejemplo a seguir de lucha y por estar ahí siempre.

A Juan por ser mi gran protector, mi gemelo de corazón, por estar ahí siempre cuando más lo he necesitado.

Los quiero muchísimo y los llevo en mis venas.

### **A CUAUHTÉMOC TORRES**

Gracias por tu gran apoyo, tiempo y paciencia, por ayudarme en todo momento, TA.

### **A MIS SOBRINOS**

Cris y Mafer, por ser siempre mi impulso.

### **A MI MAMÁ LUCHA**

Por que eres mi ancla en este mundo y mis raíces.

### **A TODA MI FAMILIA**

Por que son un gran impulso para seguir adelante, especialmente a Karla, Dora y Ricardo muchas gracias por todo su apoyo y respaldo.

### **A MIS AMIGOS**

No deseo omitir a nadie, a todos y cada uno de ustedes por su apoyo, buenos momento y comprensión mil gracias

### **GRACIAS A DIOS POR PONERME EN ESTA VIDA**

**La enseñanza que deja huella no es la que se hace de cabeza a cabeza, sino de corazón a corazón.  
Howard G. Hendricks.**

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
<b>3.JUSTIFICACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>9</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>47</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias utilizadas para la técnica de PCR.	12
<b>Tabla 2.</b> Reactivos empleados para una reacción total de 25µl.	12
<b>Tabla 3.</b> Parámetros del termociclador para la técnica de PCR.	13
<b>Tabla 4.</b> Información nutricional de leche ALPURA®.	15
<b>Tabla 5.</b> Constantes fisiológicas en becerros.	16
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de deshidratación en becerros.	16
<b>Tabla 7.</b> Grado de lesión según su severidad.	18
<b>Tabla 8.</b> Serotipos de cepas de <i>Escherichia coli</i> identificados, provenientes de becerros con diarrea.	19
<b>Tabla 9.</b> Determinación genética mediante técnica de PCR de cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de becerros con diarrea.	20
<b>Tabla 10.</b> Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O26:H-, aislada de becerros con diarrea	21
<b>Tabla 11.</b> Cuenta total de coliformes en los becerros inoculados con 10 <sup>11</sup> unidades formadoras de colonias de cepas de <i>Escherichia coli</i> .	25
<b>Tabla 12.</b> Cinética de la eliminación de <i>Escherichia coli</i> O26:H- en los becerros inoculados.	26
<b>Tabla 13.</b> Grado de lesiones observadas en rumen en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	27
<b>Tabla 14.</b> Grado de lesiones observadas en abomaso en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	28
<b>Tabla 15.</b> Grado de lesiones observadas en intestino delgado en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	29
<b>Tabla 16.</b> Grado de lesiones observadas en intestino grueso en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	30
<b>Tabla 17.</b> Grado de lesiones observadas en linfonodos en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	31
<b>Tabla 18.</b> Grado de lesiones observadas en bazo a la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esquema de la bacteria <i>Escherichia coli</i> en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia.	2
<b>Figura 2</b> Mecanismos de patogenicidad de los seis patotipos reconocidos de <i>Escherichia coli</i> .	3
<b>Figura 3</b> Becerro Holstein adquirido en Chipilo Puebla.	14
<b>Figura 4</b> Instalaciones utilizadas en experimento.	15
<b>Figura 5</b> Cuenta viable de <i>Escherichia coli</i> O26:H-.	21
<b>Figura 6</b> Presentación de diarrea en los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	22
<b>Figura 7</b> Grado de deshidratación en los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	23
<b>Figura 8</b> Cinética del comportamiento de las medias del recuento de los glóbulos rojos de los dos grupos de becerros inoculados con cepas de <i>Escherichia coli</i> .	23
<b>Figura 9</b> Cinética del comportamiento del hematocrito de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	24
<b>Figura 10</b> Cinética del comportamiento de las media de hemoglobina de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	24
<b>Figura 11</b> Promedios de cloruros por día de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> , realizado por la técnica de flamometría.	25
<b>Figura 12</b> Promedio del conjunto de lesiones en el rumen de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	27
<b>Figura 13</b> Promedio del conjunto de lesiones del abomaso de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	28
<b>Figura 14</b> Promedio del conjunto de lesiones del intestino delgado de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	30
<b>Figura 15</b> Promedio del conjunto de lesiones del intestino grueso de los becerros inoculados con cepas las de <i>Escherichia coli</i> .	31
<b>Figura 16</b> Promedio del conjunto de lesiones de los linfonodos mesentéricos de los becerros inoculados con las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	32
<b>Figura 17</b> Conjunto de lesiones de los diferentes órganos observados en la necropsia de los becerros inoculados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> K12C600.	33
<b>Figura 18</b> Conjunto de lesiones de los diferentes órganos observados en la necropsia de los becerros inoculados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> O26:H-.	33
<b>Figura 19</b> Microfotografía de rumen	34
<b>Figura 20</b> Microfotografía de omaso.	34
<b>Figura 21</b> Microfotografía de abomaso.	35
<b>Figura 22</b> Microfotografía de duodeno	35
<b>Figura 23</b> Microfotografía de yeyuno.	36
<b>Figura 24</b> Microfotografía de ciego.	36
<b>Figura 25</b> Microfotografía de colon.	37
<b>Figura 26</b> Microfotografía de recto.	37
<b>Figura 27</b> Microfotografía de linfonodo mesentérico.	38
<b>Figura 28</b> Microfotografía de bazo.	38
<b>Figura 29</b> Microfotografía de glomérulo renal.	39

## RESUMEN

Las enfermedades gastroentéricas son de las principales causas de enfermedad y mortalidad en la mayoría de las especies animales durante las primeras semanas de vida, las causas suelen ser por diversos agentes, y pueden estar asociadas a factores ambientales, nutricionales y agentes infecciosos. La asociación de *Escherichia coli* con diarreas infecciosas en becerros es conocida desde hace tiempo, existen muchos serotipos de este microorganismo, algunos de ellos potencialmente patógenos, y es escasa la información que se posee respecto a las lesiones en bovinos infectados por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga (STEC). El objetivo de este trabajo fue reproducir la enfermedad causada por cepas de *Escherichia coli* STEC en becerros a partir de una cepa aislada de un brote de diarrea en becerros, para ello se inocularon de forma oral a cuatro becerros de dos días de edad no calostrados, con una dosis de  $10^{11}$  UFC de *Escherichia coli* O26:H-, positiva a los genes *stx1* y *stx2* y productora alta de toxina de Shiga. Los becerros presentaron a las 48 h postinoculación diarrea hemorrágica y deshidratación con alteraciones en aparato digestivo, bazo y riñones, en conjunto con una policitemia relativa e hipocloremia; además de lesiones severas ya que histopatológicamente se observó la presencia de necrosis coagulativa, descamación y atrofia de las vellosidades intestinales, hemorragias a diferentes niveles de el aparato digestivo, disminución en los linfocitos a nivel de linfonodos mesentéricos y bazo. Los resultados obtenidos indicaron que las cepas STEC aisladas de animales que presentaron diarrea fueron capaces de reproducir la enfermedad en becerros recién nacidos con un curso agudo, letalidad a las 48 h post inoculación y con un cuadro clínico idéntico al presentado por los animales en condiciones naturales.

## ABSTRACT

Gastroenteric diseases in newborn calves are among the main causes of illness and death; these are often linked with environmental factors, nutritional conditions and infectious agents. *Escherichia coli* has been associated with infectious diarrhea in calves for a long time, there are many serotypes of this microorganism, some of them potentially pathogenic, but the information is scarce when it comes to lesions produced by strains of Shiga toxins producing *Escherichia coli* in infected calves.

The aim of this work was to initiate the disease caused by strain of STEC in calves from *Escherichia coli* strain isolates in a disease outbreak in calves. Four 2 day-old calves calostrum deprived were inoculated orally with a single dose of  $10^{11}$  CFU of the strain O26:H-, positive to *stx1* and *stx2* genes, with high production of Shiga toxin on Vero cell line assay. Calves presented diarrhea and dehydration on 48 h post-inoculation, along with polycythemia and hypochloremia, also severe alterations were observed in gastrointestinal tract, spleen and kidneys histopathology findings include coagulative necrosis, peeling and atrophy of intestinal villi, hemorrhage at many levels in the digestive system, along with a decrease in lymphocytes y mesenteric lymph nodes and spleen. The results showed that STEC strains isolated from animals that developed diarrhea were able to reproduce the disease in newborn calves with an acute course, lethality at 48 h post inoculation and clinical symptoms identical to that presented by animals in natural conditions .

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas clínicos que enfrenta una unidad de producción son los cuadros gastroentéricos, donde el principal síntoma es la diarrea. (Hoet y col., 2005).

Las diarreas son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad en la mayoría de las especies animales durante las primeras semanas de vida, la causa de estas suele ser multifactorial, y puede estar asociada a factores ambientales, nutricionales y agentes infecciosos (Blood y col, 2007).

Los agentes patógenos entéricos causantes de diarrea están asociados hasta en un 25% con la muerte en becerros. Entre los principales agentes causantes de diarrea están las bacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Clostridium perfringens tipo B y C*), virus (Rotavirus, Coronavirus, Calicivirus, Parvovirus), protozoos (*Eimeria spp* o coccidias), y parásitos (*Cryptosporidium spp*). Estos afectan a bovinos de todas las edades; sin embargo, son los becerros recién nacidos y menores de 3 meses los que presentan la enfermedad entérica en forma más manifiesta. (Hoet y col., 2005).

Otros factores que favorecen la presentación de diarreas en becerros incluyen:

a) Los mecanismos de defensa en el bovino recién nacido no están completamente desarrollados, debido a esta deficiencia junto con el estrés involucrado en el proceso del parto, el becerro es altamente susceptible a un amplio espectro de patógenos, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevada en dicha etapa inicial.

b) Debido al tipo de placenta de los rumiantes, el paso de inmunoglobulinas de la sangre materna hacia el feto está completamente impedido, por lo que el recién nacido es generalmente agammaglobulinémico al parto.

c) La concentración de hidrocorticoides aumenta en forma abrupta en el feto inmediatamente antes del parto; concentraciones elevadas de esta hormona pueden deprimir marcadamente la respuesta inmune celular.

d) El elevado pH gástrico, permite el libre paso de agentes microbianos; debido a que la absorción intestinal durante las primeras horas está caracterizada por un paso abundante no selectivo de macromoléculas y transporte a través del intestino delgado, por lo que es muy probable que se presente la entrada de virus y bacterias. (Olguín, 2005).

Dentro de los agentes patógenos asociados a diarreas infecciosas en becerros está *Escherichia coli*, existiendo muchos serotipos de este microorganismo, algunos de ellos potencialmente patógenos. Esta bacteria coloniza el intestino de los animales pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

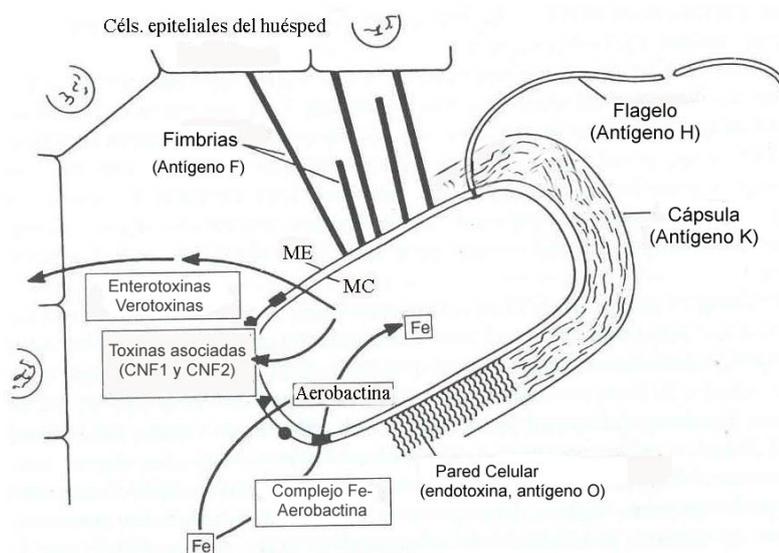
*Escherichia coli* puede sobrevivir en el medio ambiente en heces, polvo y agua durante semanas y meses. Su distribución es mundial y se presenta sobre todo en explotaciones de tipo lechero, donde la morbilidad en becerros puede llegar hasta un 75% y la mortalidad entre 10 y 50%. *Escherichia coli* es transmitida por contacto directo del animal susceptible con un animal

infectado o de manera indirecta por el consumo de alimentos o agua contaminadas con heces provenientes de becerros enfermos o de adultos portadores (Hoet y col., 2005).

### Clasificación serológica de *Escherichia coli*.

En 1947 Kauffmann propuso una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli* para determinar el grupo patógeno al que pertenecen en base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares), H (flagelares) y F (fimbriales). En la actualidad se conocen 181 antígenos O con los que se define el serogrupo, la combinación específica O:H determina el serotipo. (Blanco y col., 2000) (Fig. 1).

El serogrupo y serotipo no confieren virulencia, pero tiene importancia epidemiológica ya que correlacionan con clonas específicas de virulencia (Nataro y col., 1998).



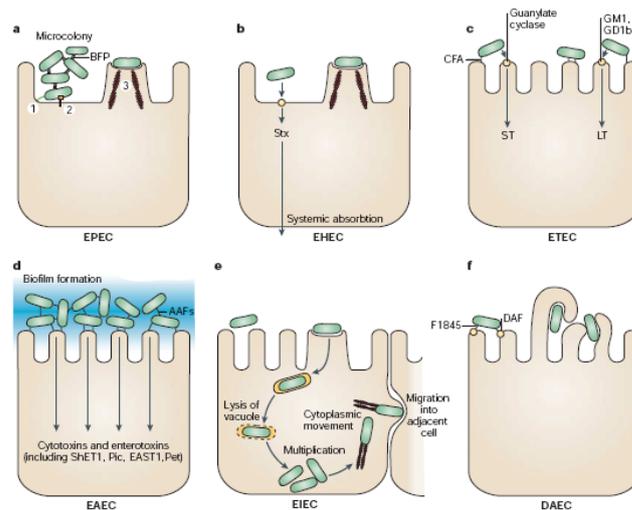
**Figura 1.** Esquema de la bacteria *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia (Tomado de Johnson, 1991).

### Patotipos de *Escherichia coli*.

Este microorganismo fue el primer germen implicado como causa de síndrome diarreico; su diagnóstico como agente responsable del cuadro diarreico es difícil, ya que suele encontrarse como parte de la microbiota normal intestinal, por lo que es complicado establecer una información exacta de la frecuencia de diarrea por *Escherichia coli* en el becerro.

La infección entérica por *Escherichia coli* actualmente se clasifica en 6 grupos basados en las características patológicas de las bacterias (patotipos); enteropatógenas (EPEC), productoras de toxina de Shiga o enterohemorrágicas (STEC O EHEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC), enteroinvasivas (EIEC) y difusamente adherente (DAEC) (Torres y col., 2005).

En la figura 2 se presentan de manera esquemática los mecanismos de patogenicidad de los 6 patotipos.



**Figura 2** Mecanismos de patogenicidad de los seis patotipos reconocidos de *Escherichia coli*: a) enteropatógenas, b) productoras de toxina de Shiga o enterohemorrágicas, c) enterotoxigénicas, d) enteroagregativas, e) enteroinvasivas, f) difusamente adherente. (Tomado de Kaper y col., 2004)

### ***Escherichia coli* enterohemorrágica ó *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga**

*Escherichia coli* productora de toxina de Shiga (STEC), también llamada *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), es considerada un patógeno emergente a nivel mundial y potencialmente fatal en infecciones humanas e infecciones en animales, siendo el serotipo O157:H7 el más representativo (Narváez y col., 2007). Riley (1983) describió y relacionó a EHEC con brotes en humanos caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y asoció la causa a la ingestión de carne cruda o mal cocida. Karmali (1983) la ligó con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre e identificando en esta la presencia de *Escherichia coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que le llamó verotoxina (Vt), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *Escherichia coli* verotoxigénicas (VTEC) (Konowalchuk y col., 1977).

Se observó que la citotoxina se neutralizaba con antitoxina obtenida a partir de la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó “Shiga-like toxin” o toxina semejante a Shiga (Stt) o “Shiga toxin” (Stx), a la *Escherichia coli* capaz de producirla se le dio el nombre de STEC (Rodríguez, 2002).

En las cepas EHEC/ STEC aisladas, se han encontrado las variantes de la toxina de Shiga, Stx1 y Stx2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan una o ambas toxinas.

La Stx1 es esencialmente idéntica en cuanto a sus propiedades biológicas, características físicas y antigénicas a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, difiriendo en sólo un aminoácido; presenta tres actividades biológicas: “citotóxica” sobre células Vero y Hela, “enterotoxigénica” en asa ligada de conejo y “letal” en dosis de 100ng a 2µg en ratón. (Su y col., 1995, Thomas 1996).

La Stx2 exhibe 58% de homología en nucleótidos y 56% de homología en aminoácidos con respecto a Stx1. La Stx2 tiene el mismo receptor y el mismo mecanismo de acción intracelular que le confiere la misma actividad biológica que Stx1; sin embargo, es más letal en ratones. (Su y col., 1995, Thomas 1996).

Estos dos tipos de toxinas de Shiga, Stx1 y Stx2, son holotoxinas constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 32 kDa y 5 subunidades B que tienen un peso molecular de aproximadamente 7.7 kDa.

La subunidad enzimática A posee la actividad biológica bacteriana y la subunidad enzimática B actúa en la unión específica al receptor de la holotoxina a la célula eucariótica blanco. (Su y col., 1995, Thomas 1996). La subunidad B entra en contacto con un glicolípido de membrana (globotriaosil - ceramida o Gb3) y así es internalizada la subunidad A que se subdivide en A1 y A2; el fragmento A1 tiene actividad N-glicosidasa, actuando únicamente sobre el residuo adenina del componente 28s RNA ribosomal de la unidad 60S de la célula eucariótica, que conlleva a la pérdida de afinidad del factor de elongación 1 (EF - 1) hacia el ribosoma, inhibición de la elongación peptídica y finalmente a la muerte de la célula intoxicada por inhibición de la síntesis de proteínas. (Thomas 1996, O'Brien, 1987, Máttar, 2001).

La producción de Stx constituye uno de los mecanismos a través de los cuales *Escherichia coli* puede provocar diarrea sanguinolenta no complicada. Esto se ha puesto de manifiesto, tanto en brotes, como en esporádicos casos en humanos (Whittam y col. 1963) (Pierard, 1992) y de terneros (Dorn, 1983).

Además de la toxina, las EHEC /STEC tienen otros factores auxiliares de virulencia como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), todos los genes necesarios para la formación de la lesión son codificados en una isla de patogenicidad llamada "locus of enterocyte effacement" (LEE) de 35Kb, que fue descrito por primera vez en una cepa EPEC E2348/69 (McDaniel y col., 1995; Kaper, 1997).

LEE codifica para un sistema de secreción tipo III, una serie de proteínas secretadas por este sistema llamadas Esps (proteínas secretadas por EPEC), intimina que es una proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (KDa) (Rodríguez, 2002), que interviene en la adhesión íntima bacteriana a los enterocitos y es codificada por el gen *eaeA* y Tir (translocated intimin receptor) un receptor para la intimina que es translocado dentro de la célula blanco (Frankel y col., 1998, Welinder-Olsson y col., 2005).

La habilidad para producir el esfacelamiento de las células por EHEC es probablemente suficiente para causar la diarrea no sanguinolenta, pero Stx es esencial para el desarrollo de diarrea sanguinolenta y CH. (Máttar y col., 2001)

Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina, (HlyEHEC o EhxA), una serín proteasa extracelular (EspP) y una proteína autoaglutinante (Saa) (Paton y col., 2001).

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una de estas clasificaciones es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas, cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa. (Rodríguez,

2002). La otra clasificación es en función del serotipo, a) cepas *Escherichia coli* O157:H7 y b) cepas no-O157:H7, cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7.

Aunque los criterios en cuanto al papel de STEC en la diarrea bovina son muy controvertidos y en su mayoría lo ubican como parte de la microbiota normal intestinal de esta especie (Blanco y col., 1995), no se debe descartar su papel como patógeno oportunista, aunque el ganado bovino es considerado como el principal reservorio de cepas EHEC/STEC, y ha sido implicado en brotes en humanos.

Dentro del espectro de cepas STEC que son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal del bovino sólo un número limitado de serotipos son patógenos para la especie produciendo diarrea en terneros (Mercado, 2006). Las cepas STEC se transmiten naturalmente entre los bovinos dentro de un establo, algunos factores que condicionan esa diseminación son la alimentación, el manejo del estiércol, aguas residuales, y la presencia de otros animales domésticos e insectos. Se ha considerado que el tracto gastrointestinal del hospedero bovino generalmente es colonizado por estas cepas sin causar la enfermedad y que puede comportarse como un miembro transitorio de la microbiota intestinal (Narváez-Bravo y col., 2007).

## 2. ANTECEDENTES

En bovinos susceptibles infectados naturalmente o experimentalmente con cepas virulentas del serotipo de EHEC, frecuentemente se produce diarrea, atrofia de la vellosidad, daño al epitelio celular, infiltración de neutrófilos en la lámina propia, en lumen intestinal y la formación de una pseudomembrana que presenta eritrocitos, fibrina y neutrófilos. (Chanter y col., 1986; Mainil, 1999). Se ha observado la colonización en rumiantes en el intestino grueso, principalmente en ciego, colon distal y recto con presencia de erosiones y úlceras, histológicamente los enterocitos se presentan cuboidales y no parece existir la predisposición particular por algún tipo de célula en la mucosa (Grauke y col., 2002). También se puede observar edema extenso, erosiones, úlceras y hemorragias en otros sitios del tracto gastrointestinal, sin que muestre colonización bacteriana (Valdivia, 1995).

Los cuadros clínicos y patológicos que se presentan en el bovino por *Escherichia coli* son: septicémico enterotóxico y enterotoxémico (Valdivia, 1995). A pesar de que se aíslan frecuentemente cepas STEC productoras de Stx, en bovinos, son pocos los casos en los que se les ha podido asociar con cuadros clínicos entéricos.

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

En 1994, se aislaron cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas de Shiga en un brote de diarrea en bovinos, en una explotación de tipo lechera intensiva, el cuadro clínico presentado en los becerros (área de lactancia) consistió en diarrea hemorrágica, deshidratación severa y en algunos casos signos de remoneo, torticolis y muerte rápida (80%), también se observó poca o nula respuesta a los tratamientos, en base a lo anterior se realizó el diagnóstico diferencial del problema descartando etiologías frecuentes, se dedujo la posibilidad de un cuadro por toxinas de Shiga por los siguientes factores: el tipo de enteritis hemorrágica, signos nerviosos, y principalmente el asilamiento bacteriológico de cepas de *Escherichia coli* las que sometieron a ensayos sobre línea celular Vero, determinando la producción de citotoxinas, y a un modelo de infección experimental en conejos en el se observó un efecto citotóxico sobre los linfocitos de la mucosa intestinal (Valdivia, 1995).

En un estudio realizado en 2005, se trabajó con las cepas aisladas en el brote de 1994, y se aislaron cepas provenientes de bovinos sanos y enfermos teniendo un total de 98 cepas de *Escherichia coli* aisladas de 40 bovinos, se identificaron por pruebas bioquímicas y caracterizaron por medio de la técnica de PCR. En ese caso se utilizaron cebadores que amplificaban las secuencias para la identificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, se obtuvo una frecuencia del 38.8% (38 cepas) positivas a cualquiera de los genes, resultando 21 bovinos portadores de cepas de *Escherichia coli* positivas a algún gen con una frecuencia del 52.5%. (Aranguré, 2007).

Varios serotipos, particularmente 026 y 0111, se cree que están asociados con enfermedades en aparato digestivo en becerros, aunque no parecen presentar enfermedad en bovinos adultos. En un estudio realizado por Hwa y col. (2008), se aislaron estos serotipos en becerros con presentación de diarrea identificando factores auxiliares de virulencia, y estos se correlacionaron con la presencia de diarrea en becerros.

En 1997 Dean-Nystrom y col., desarrollaron un modelo en becerros inoculándolos con cepas O157:H7 aisladas de bovinos sanos en Estados Unidos, donde se observó la capacidad de causar diarrea y lesión A/E en dos grupos de becerros. El primer grupo estaba formado por becerros menores de 12 horas de edad, privados de calostro, presentaron diarrea a las 18 horas post inoculación, edema en colón y lesión A/E en ileon, ciego, recto y colón, en donde el único signo clínico observado fue diarrea a las 18 horas. El segundo grupo correspondía a becerros menores a 36 horas y se observaron las mismas lesiones pero en menor intensidad, notando que la severidad de las lesiones estuvieron relacionadas con la edad.

Stoudeur y col. (2000) utilizaron una cepa EHEC serotipo O118:H16 aislada de becerros Friesan, de dos semanas de edad con diarrea, la cual se inoculó en 3 becerros de 6 horas de edad, calostrados, desarrollando a las 24 horas después de la inoculación de la bacteria, diarrea no sanguinolenta y posteriormente se observó en la necropsia enteritis y colitis, también se determinó la lesión A/E en intestino delgado y grueso, reportando una baja invasión de la cepa problema en este órgano, demostrándose además que la presencia de la diarrea no estuvo vinculada con el grado de invasión en el intestino.

Se realizó otro estudio inoculando una cepa del serotipo O26:H-, proveniente de un brote de diarrea en becerros. La bacteria se inoculó en becerros de 4 días de edad y se realizó un estudio que se basó principalmente en la determinación del papel que juega el sistema de secreción tipo III en diferentes cepas STEC, las cepas de origen bovino se compararon contra una cepa de origen humano, determinando que existe un diferente tropismo en el intestino del bovino de cepas STEC. (Van Diemen y col., 2004)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Es poca la información que se posee respecto a las lesiones en bovinos infectados por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga (STEC), ya que principalmente se le ha considerado como un importante reservorio y fuente de infección en humanos. Aunque se encontraron solo 4 trabajos utilizando al bovino como modelo animal para el estudio de STEC provenientes de bovinos, estos estudios se enfocaron únicamente a describir los signos clínicos, lesiones histopatológicas y adherencia de la bacteria al intestino; sin embargo, en ninguno de ellos se determinó la función de las toxinas en el desarrollo de diarrea en becerros.

#### **4. HIPÓTESIS**

La cepa O26:H- de *Escherichia coli*, aislada de un brote de diarrea en becerros, que tiene y expresa factores auxiliares de virulencia *stx1* y *stx2*, es capaz de reproducir el cuadro clínico de diarrea hemorrágica en becerros.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

Mediante la inoculación de una cepa de STEC aislada de un brote de diarrea reproducir de forma experimental la enfermedad en becerros de dos días de edad.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Identificar si las cepas de *Escherichia coli* aisladas de bovinos durante un brote de diarrea aguda con sangre, presentan genes relacionados con la virulencia de la bacteria.
- b) Seleccionar una cepa de *Escherichia coli* con factores genéticos relacionados con la virulencia.
- c) Utilizar la cepa seleccionada en un modelo con bovinos de un día de edad para determinar la virulencia.
- d) Analizar las alteraciones clínicas, de laboratorio y patológicas en los bovinos desafiados con la cepa seleccionada.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS EMPLEADAS.

#### Obtención.

Se obtuvieron 16 cepas de *Escherichia coli* provenientes de un brote de diarrea en becerros, dichas cepas fueron trabajadas en el año 2005 (Aranguré, 2007), se codificaron para un manejo adecuado con las siglas PRAP, seguidas de un número que va indicando el orden en que se obtuvieron y trabajaron. Las cepas se encontraban en medio agar especial, se les determinó la viabilidad en agar soya tripticaseína (Bioxon®) y en agar eosina azul de metileno (Bioxon®), en todas las técnicas se utilizaron las cepas de referencia, EDL933 (O157:H7) utilizada como control positivo y la cepa K12C600 utilizada como control y testigo negativo, donadas por la Facultad de Medicina, UNAM.

#### Caracterización.

##### Bioquímica.

A las 16 cepas de *Escherichia coli* se les realizó la identificación bioquímica para descartar contaminación con otros géneros bacterianos, realizándoles las siguientes pruebas:

Pruebas primarias: Tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa.

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

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

##### Serológica.

Se realizó la tipificación serológica de las cepas de *Escherichia coli*.

Identificación del antígeno somático (O).

Se sembraron por extensión las 16 cepas de *Escherichia coli* en tubos 16 x 15 inclinado con agar soya tripticaseína y se incubaron por 24h a 37°C, siguiendo el protocolo descrito por Osrkov y col. (1984), para cosechar el cultivo se adicionaron 10ml de solución salina fisiológica (0.085%), el sobrenadante obtenido se colocó en tubos de 16 x 15, se calentaron a una temperatura de 100°C por 1 hora, agregándoles formaldehído al 0.6%.

Reacción de aglutinación para el antígeno somático (O).

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo redondo (NUNC®), que contenían los 181 antisueros donados por la Facultad de Medicina CU-UNAM, (SERUNAM-MÉXICO®), colocándole 50µl en dilución 1:100 del antisuero y 50µl del antígeno, incubando a una temperatura de 50°C por 18 horas, se envolvieron en plástico para evitar la deshidratación. Se revisó la aglutinación, se observaron a contraluz y los pocillos que dieron positivos se les procedió a realizar la titulación.

##### Titulación.

Se realizó en microplacas de 96 pozos, se agregaron 100µl del antisuero en la porción A de la microplaca, del pozo B al H se agregaron 50µl de solución salina fisiológica, realizándose la dilución, posteriormente se agregaron en cada pozo (columna A-H) 50µl del antígeno positivo en la aglutinación, se incubó a 50°C por 24 horas para posteriormente realizar la lectura.

Identificación del antígeno flagelar (H).

Las 16 cepas de *Escherichia coli* se sembraron en un medio semisólido en tubos de rosca con tubo Craige incluido, se incubaron a 30°C por un período de 15 días o hasta observar movilidad, transcurrido este período se inocularon en agua peptonada, se colocaron a 30°C por 24 horas, posteriormente se agregó formaldehído al 0.6%, dejándoles una hora en reposo para posteriormente colocarlo en microplacas que contenían 56 antisueros donados por la Facultad de Medicina CU-UNAM, (SERUNAM-MÉXICO®).

Reacción de aglutinación para el antígeno flagelar (H).

Se agregaron en las microplacas 50µl de una dilución 1:100 de del antisuero y 50µl del antígeno, incubándose a 50°C por 2 horas, para realizar la titulación de la misma forma que el antígeno O.

Se consideró como positivo la presencia de una película de malla (aglutinación) y como negativo la formación de un botón en el fondo (precipitación).

### Genética.

Se realizó la identificación de los genes *hlyA*, *stx1*, *stx2* y *eaeA* por medio de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

El DNA se obtuvo a partir de colonias bacterianas de las cepas de trabajo crecidas en agar soya tripticaseína, resuspendidas en 1ml de agua desionizada estéril que se homogenizó por agitación en un vortex y fueron lisadas por ebullición durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 2 minutos en una microcentrífuga 16K BIO-RAD®, se tomó el sobrenadante para ser utilizado en la reacción de PCR. Como iniciador se utilizó la secuencia de la tabla 1 (Patón, 1997) (López y col., 2003).

**Tabla 1** Secuencias utilizadas para la técnica de PCR.

Factor auxiliar de virulencia	Secuencia del iniciador	Tamaño de los amplificadores (pb)
<i>stx1</i>	F:5 CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3 R:5 AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3	150
<i>stx2</i>	F:5 GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3 R:5 TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3	255
<i>eaeA</i>	F:5 GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3 R:5 CCA CCT GCA ACA AGA GG3	384
<i>hlyA</i>	F:GCATCATCAAGCGTACGTTCC R:AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534

En un tubo tipo Eppendorf se mezclaron los reactivos de la tabla 2, se agregó el lisado y se homogenizó. Fueron utilizadas las cepas de *Escherichia coli* K12C600 como control negativo y la cepa de *Escherichia coli* EDL933med (O157:H7) como control positivo.

**Tabla 2** Reactivos empleados en la técnica de PCR para una reacción total de 25µl.

Reactivos	Concentración	Cantidad
Buffer	10x	2.5µl
MgCl2	50Mm	1µl
dNTP's	200µM	2µl
Primers	1 gene	3.5µl
Agua bidestilada		13.8µl
Taq polimerasa		0.2µl
DNA		2µl
		25µl

Se colocaron las muestras en un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal controller (MJ Research Inc. ®), con los parámetros que se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3** Parámetros del termociclador para la técnica de PCR.

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

Visualización de los productos de amplificación.

La observación de los productos de amplificación se realizó por corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% (0.6 de agar adicionado en 30ml de TAE1X).

Se vació el gel de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis, se le colocó un peine, una vez solidificado, se retiró el peine y las bases que contenían al gel, después se colocaron las muestras en los pozos.

Se corrió durante 40 minutos en la cámara de electroforesis con un voltaje de 87 Volts y amperaje constante, utilizando una fuente de energía MODEL 250 GIBCO BRL®.

Se visualizaron y capturaron las imágenes de los geles en un equipo transluminador ultravioleta con procesador de imagen SYNGEN®.

### **Producción de toxinas.**

Se realizó anteriormente la cuantificación de la toxina de Shiga en las 16 cepas de *Escherichia coli* aisladas de becerros con presentación de diarrea (Aranguré 2007)

### **Curva de crecimiento.**

#### **Cultivo.**

La cepa de *Escherichia coli* O26:H- (PRAP1), elegida previamente por sus características de patogenicidad, se sembró en 5ml de caldo soya tripticaseína, se incubó a 37°C durante 18 horas, posteriormente este cultivo se agregó en un matraz con 50ml de caldo soya tripticaseína, tomando 1ml del medio en los tiempos de incubación, para realizar la evaluación del crecimiento.

### **Evaluación del crecimiento.**

Lectura de absorbancia.

Se realizó mediante la técnica de espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro JENWAY® 6505 UV/vis, utilizando dos longitudes de onda de 540nm y 640nm, se realizaron las mediciones a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

Preparación de diluciones.

Después de cada lectura se tomó 0.5ml del cultivo de la cepa de *Escherichia coli* con una pipeta estéril y se agregó en un tubo de rosca con 4.5ml de PBS 1X estéril, se agitó el medio en un vortex y se prosiguió con las diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ .

Recuento en placas.

De cada dilución se tomaron 100µl con una micropipeta y se agregaron en placas de petri con agar soya tripticaseína, se sembraron por la técnica de estría en toda la superficie para posteriormente incubarlas a 37°C por 24 horas.

### **Cálculos.**

Se determinaron las siguientes curvas: absorbancia contra tiempo; cuenta viable contra tiempo y absorbancia contra cuenta viable.

### **Preparación de inóculos.**

Se sembró una colonia de las cepas de *Escherichia coli* 026:H- y K12C600, en 5ml de caldo soya tripticaseína cada una por 18h a 37°C, posteriormente se agregó ese medio inoculado a 50ml de caldo soya tripticaseína individualmente, se incubaron a 37°C cada una y se hacían medidas cada hora hasta obtener una densidad óptica de 0.5nm a una longitud de onda de 640nm, una vez obtenida se homogenizaron perfectamente y se tomó en condiciones de esterilidad 6 ml en tubos de ensaye, se tomó 1ml de cada uno para confirmar la densidad óptica, obteniendo 6 cultivos de cada cepa bajo las mismas condiciones.

### **BOVINOS.**

#### **Obtención.**

Los ocho becerros adquiridos pertenecían a la raza Holstein sin calotrar, de una explotación intensiva lechera; en el pueblo de Chipilo que esta ubicado en el municipio de Piaxtla, localizada a 12 kilómetros al suroeste de la ciudad de Puebla, a 120 kilómetros de la ciudad de México y a 2150 metros sobre el nivel del mar.



**Figura 3** Becerro Holstein adquirido en Chipilo Puebla.

### **Alojamiento y manejo.**

#### **Instalaciones.**

##### **Ubicación.**

Los ocho becerros fueron alojados en una propiedad privada ubicada en el municipio Puebla de Zaragoza, estado de Puebla. Limita al norte con el estado de Hidalgo; al este, con el estado de Veracruz; al sur, con Oaxaca y Guerrero; y al poniente con los estados de Morelos, México, Tlaxcala e Hidalgo, a una latitud de 19° 03' N.

##### **Material de las instalaciones.**

Los 8 becerros trabajados en Puebla fueron alojados en cuartos adaptados para animales, se alojaron individualmente, la estructura era de cemento tanto pisos y paredes, los techos de lámina y las puertas de metal y se les colocó una cama de paja.



**Figura 4** Instalaciones utilizadas en experimento.

#### Desinfección de instalaciones

Antes y después de la llegada de cada becerro se aplicó en todas las superficies de las instalaciones una solución de óxido de calcio al 5% (500mg de óxido de cal en 10 litros de agua) por el método de encalado, (SENASA 2006).

#### Monitoreo de temperatura ambiental.

Se monitoreó la temperatura ambiental de las instalaciones con un termómetro ambiental, diariamente para observar algún cambio de temperatura, (datos no mostrados).

#### **Alimentación.**

Se realizó la alimentación de manera manual, por medio de mamilas, previamente lavadas y esterilizadas, utilizando el siguiente protocolo de alimentación, 3litros de leche diarios dividido en 1.5litros por la mañana y la otra mitad por la tarde (Blanco, 2005), usando leche de vaca de la marca ALPURA®.

**Tabla 4** Información nutricional de leche ALPURA®.

Tamaño de la porción: 250 ml	
% IDR	
Porciones por envase: 4	
Contenido energético	601.75Kj 142.0 kcal
Hidratos de Carbono (Carbohidratos)	12g
Lípidos (grasas)	7g
Proteínas	7.75g
Calcio	275mg
Sodio	125g
*Vitamina A (equivalentes a retinol)	150 µg
*Vitamina D	1.56 µg

\*adicionadas

Tomado del envase.

## MODELO ANIMAL.

### Inoculación.

Se dividieron los 8 becerros en dos grupos para la inoculación de las cepas de *Escherichia coli*, de la siguiente forma, 4 becerros con la cepa K12C600 (becerros 1-K12,2-K12,3-K12,4-K12) y 4 becerros con la cepa O26:H- previamente seleccionada (becerros 5-O26,6-O26,7-O26,8-O26), se inocularon a los 8 becerros al segundo día de obtenerlos por vía oral, en mamilas estériles, se les dio a cada uno 250ml de leche previamente mezclada con los 10ml de CST que contenían la dosis bacteriana de  $10^{11}$ UFC, se espero 15 minutos para dar posteriormente 750ml de leche comercial.

### Evaluaciones.

#### Clínica.

Se realizó examen clínico diariamente tomando el reporte de constantes fisiológicas, y de cualquier signo de enfermedad como anorexia, diarrea, depresión, grado de deshidratación y debilidad, tomando los parámetros de las tablas 5 y 6.

**Tabla 5** Constantes fisiológicas en becerros.

Temperatura corporal		
Mínima 38.5°C	Media 39.0°C	Máxima 39.2°C
Frecuencia cardíaca		
Mínima 80 x min.	Media 95 x min.	Máxima 110 x min.
Frecuencia respiratoria		
Mínima 15 x min.	Media 30 x min.	Máxima 40 x min.

(Blood 2002)

**Tabla 6** Porcentaje de deshidratación en becerros.

0 - 5%	Retorno capilar ligeramente lento.
5 - 7%	Moderada , retorno capilar lento mucosas ligeramente deshidratadas
7 - 9%	Moderada, pero con ataxia, depresión, mucosas deshidratadas y aún se incorpora
10 – 12%	Severa, postración, ojos hundidos, extremidades frías.
>12%	Signos nerviosos

(Blood 2002)

### Laboratorio.

Durante el manejo de los becerros se les tomaron a cada uno muestras sanguíneas diariamente por medio de punción de la vena yugular, se les tomaron 4ml de sangre, se depositaron 2ml en un tubo con anticoagulante (EDTA) Venojet® y 2ml en un tubo con gel activador de coagulo Venojet®, para la realización de las siguientes pruebas.

#### Biometría hemática.

Se realizó la determinación de cuenta de eritrocitos, hemoglobina total, hematocrito, índices de Wintrob, recuento de plaquetas, recuento de leucocitos y conteo diferencial de leucocitos, por medio de un equipo automatizado DIATRON ABACUS®, realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

### Químicas Sanguíneas.

Se realizaron las pruebas de urea, creatinina, bilirrubina, proteínas totales, albúmina, globulinas, calcio, fósforo, sodio, potasio, cloruro, aspartato amino transferasa, alanina amino transferasa, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica, gama glutamil transferasa, para la evaluación de la evolución del funcionamiento metabólico de los becerros, se realizaron en el Laboratorio de Diagnostico Integral Veterinario (DIVET®) mediante un equipo automatizado.

### Coprocultivos.

Se realizó la toma de heces de forma directa del recto por medio de un guante de palpación estéril, en el tiempo cero, al tercer día y al último día, para determinar la cuenta total de unidades formadoras de colonias (UFC) en heces, para esto se peso 1g de heces, se realizaron diluciones en PBS estéril ( $10^{-2}$  a  $10^{-10}$ ), posteriormente se tomaron 10 microlitros de cada dilución y se sembraron por estría en agar EMB, MacConkey, para realizar el conteo total de coliformes, enterobacterias y seleccionando 10 colonias de cada aislamiento para la identificación de *Escherichia coli* O26:H- por la técnica serológica de aglutinación directa usando un antisuero O26 donado por la Facultad de Medicina CU-UNAM, (SERUNAM-MÉXICO®).

### Patología.

#### Necropsia.

La necropsia se realizó siguiendo el protocolo descrito por Montesinos (2003), a los ocho becerros para observar y reportar los hallazgos de lesiones en los órganos y tejidos que pudieran estar afectados, así mismo, se realizó la recolección de órganos (riñones, rumen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado, intestino grueso, ganglios mesentéricos y bazo) bajo condiciones asépticas, los órganos se enjuagaron con agua y colocaron en frascos con formalina acuosa al 4% para su fijación y conservación.

#### Análisis histológico.

A los tejidos obtenidos en la necropsia se les realizaron cortes en zonas seleccionadas, fueron colocadas en cápsulas para proceder a enjuagarlas con agua corriente y someterlas a un tren de deshidratación en alcohol etílico en concentraciones crecientes (70°, 80°, 96°, absoluto) media hora a 60°C en cada uno, hasta llegar al xilol (tres cambios) y por último se infiltraron en parafina, posteriormente se realizaron los cortes de las muestras en un microtomo de 5 micras de grosor y se les realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) descrita por Estrada (1982) y Gaete (1996), y fueron evaluados a través de microscopía óptica para cuantificar el grado y tipo de lesiones.

### Análisis de resultados

En la presentación de los resultados se utilizó el método de graduación tipo Likert descrito por Hernández y col. (1993), como se muestra en la tabla 7, en este método se establecen diferentes tipos de lesiones, y se les asignó en forma semicuantitativa un grado de lesión con valores de 0 a 4, según la severidad de la lesión observada y de esta forma poder analizar cuales son las lesiones de mayor importancia según los 3 diferentes grupos de estudio.

**Tabla 7** Grado de lesión según su severidad.

GRADO DE LESIÓN	SEVERIDAD
0	Ausente
1	Leve
2	Moderada
3	Marcada
4	Severa

Hernández y col.(1993)

Para cada órgano se conjuntaron las lesiones observadas y se estableció el grado de lesión del órgano.

El análisis estadístico se llevó a cabo por el método no paramétrico Mann-Whitney.( Armitage y col., 2000)

## 7. RESULTADOS

### CEPAS EMPLEADAS.

#### Obtención.

Las 16 cepas de *Escherichia coli* que se encontraban en agar especial trabajadas en el año 2005, se resembraron en agar soya tripticaseína y agar eosina azul de metileno, en donde se observaron las características propias de las colonias de *Escherichia coli* que fueron lisas, circulares y convexas con bordes bien definidos, con un color característico verde metálico (Bergey, 1984), confirmando homogeneidad de las colonias.

#### Caracterización.

##### Bioquímica.

Se confirmó, mediante el uso de pruebas bioquímicas que las 16 cepas pertenecían al género de *Escherichia coli*, y se descartó la contaminación de estas cepas con otros géneros bacterianos, se observó que el 81.25% de estas cepas dieron un perfil 100% característico de *Escherichia coli*, teniendo una utilización del sorbitol, y solo el 18.75% no lo dieron teniendo una utilización del sorbitol negativa.

##### Serológica

En las cepas *Escherichia coli* aisladas previamente de bovinos con diarrea se encontraron 10 serotipos diferentes, como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8** Serotipos de cepas de *Escherichia coli* identificados, provenientes de becerros con diarrea.

Cepa	Serotipo
PRAP 01	026:H-
PRAP 04	026:H-
PRAP 05	033:H-
PRAP 06	04:H16
PRAP 07	033:H-
PRAP 09	033:H-
PRAP 12	0157:H-
PRAP 13	04:H16
PRAP 30 C	154:H21
PRAP 31 A	043:H25
PRAP 33	0154:H-
PRAP 39 B	015:H11
PRAP 40	0163:H23
PRAP 40 A	08:H23
PRAP 40 B	066:H3
PRAP 40 C	O163:H23

## Genética

Se realizó la identificación del gen *hlyA*, *stx1*, *stx2* y *eaeA* mediante la técnica de PCR, se observó que solo dos cepas de *Escherichia coli* aisladas de becerros tuvieron presencia del gen *hlyA*. De las 16 cepas de *Escherichia coli*, y se observó que 100% de las cepas obtuvieron el gen *stx1*, solo 6 cepas son portadoras del gen *stx2*, 4 cepas con el gen *eaeA* y ninguna teniendo los 4 genes en conjunto, se utilizó como control negativo la cepa de *Escherichia coli* K12C600 y como control positivo la cepa EDL933 como se observa en la tabla 9.

**Tabla 9** Determinación genética mediante técnica de PCR de cepas de *Escherichia coli* provenientes de becerros con diarrea.

CEPAS	Serotipo	<i>hlyA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>
PRAP 01	026:H-	-	+	+	-
PRAP 04	026:H-	-	+	-	-
PRAP 05	033:H-	-	+	+	+
PRAP 06	04:H16	-	+	+	-
PRAP 07	033:H-	+	+	+	-
PRAP 09	033:H-	-	+	+	+
PRAP 12	0157:H-	-	+	+	-
PRAP 13	04:H16	+	+	-	+
PRAP 30 C	154:H21	-	+	-	-
PRAP 31 A	043:H25	-	+	-	-
PRAP 33	0154:H-	-	+	-	-
PRAP 39 B	015:H11	-	+	-	+
PRAP 40	0163:H23	-	+	-	-
PRAP 40 A	08:H23	-	+	-	-
PRAP 40 B	066:H3	-	+	-	-
PRAP 40 C	O163:H23	-	+	-	-
EDL933	0157:H7	+	+	+	+
K12C600	K12	-	-	-	-

*stx1*: toxina de Shiga tipo 1, *stx2*: toxina de Shiga tipo 2,  
*eaeA*: gen que codifica para la intimina, *hlyA*: enterohemolisina.

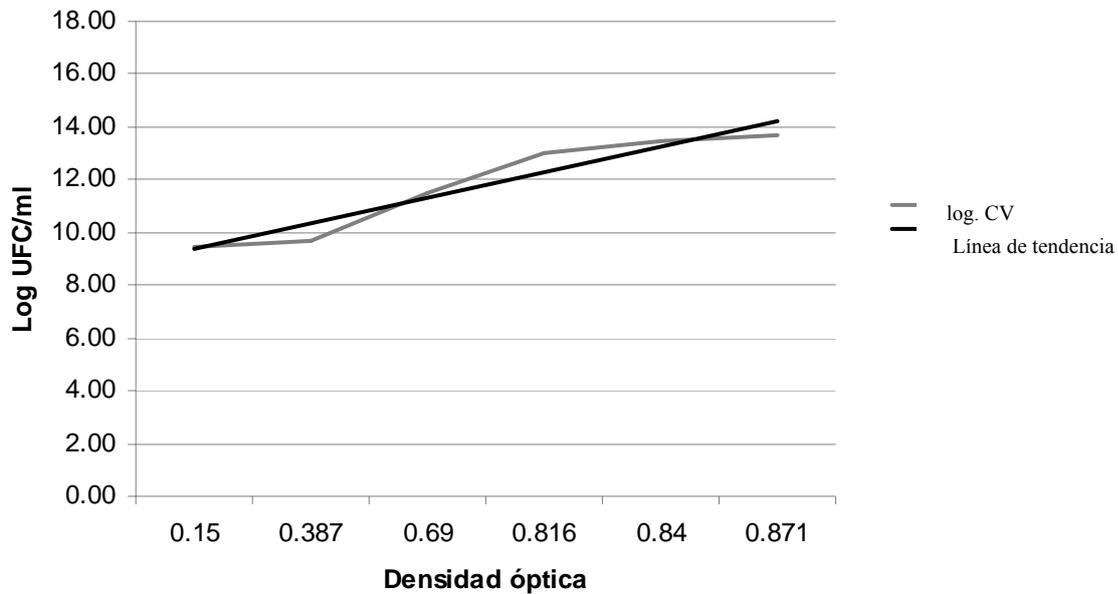
### Curva de crecimiento.

En la curva de crecimiento para la cepa O26:H-, se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 10, se utilizaron dos longitudes de onda de 540nm y 640nm.

**Tabla 10** Curva de crecimiento de *Escherichia coli* O26:H-, aislada de becerros con diarrea.

Tiempo incubación (h)	UFC/ml	log UFC/ml	Densidad óptica (DO) 540nm	Densidad óptica (DO) 640nm
0	2.79E+09	9.4448252	0.321	0.150
1	5.16E+09	9.71222867	0.619	0.387
2	3.14E+11	11.4962375	0.980	0.690
3	9.85E+12	12.9934362	1.155	0.816
4	3.16E+13	13.4989994	1.197	0.840
5	5.20E+13	13.7160033	1.224	0.871

Utilizando espectrofotometría con longitudes de onda de 540nm y 640nm.



**Figura 5** Cuenta viable de *Escherichia coli* O26:H-, realizado por la técnica de espectrofotometría, usando una densidad óptica de 640nm.

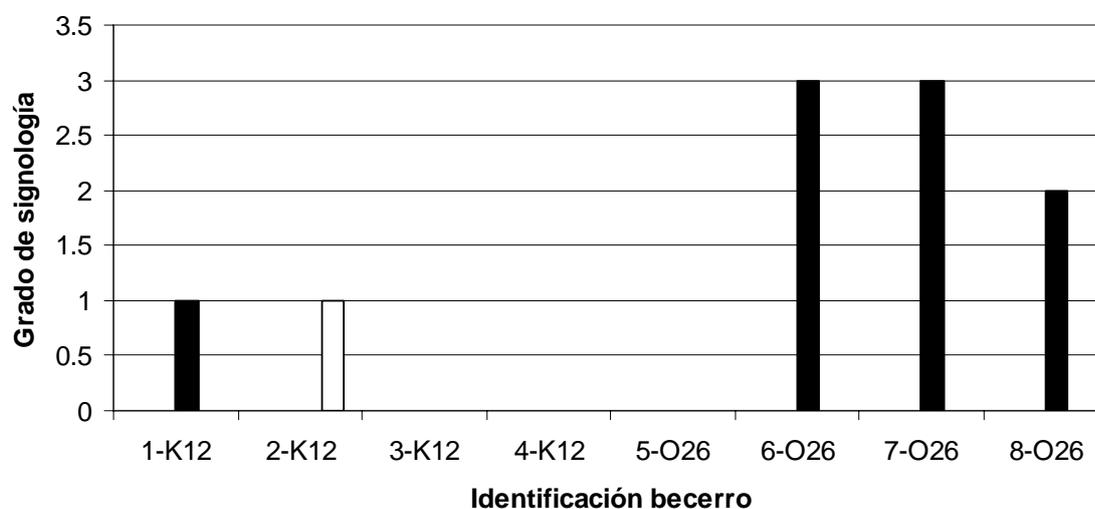
## MODELO ANIMAL.

### Evaluaciones.

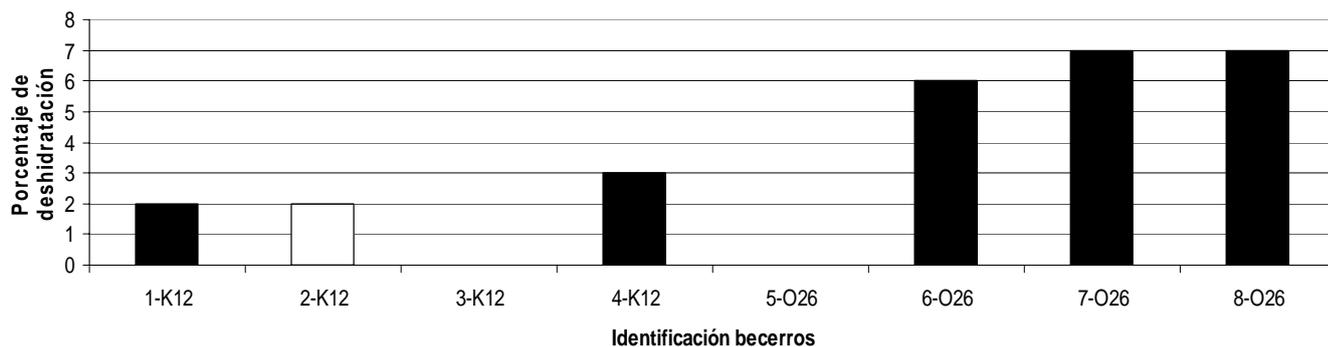
#### Clínica.

En el grupo de los becerros inoculados con la cepa apatógena de *Escherichia coli* K12C600, (1-K12,2-K12,3-K12,4-K12), no se presentó ninguna alteración en sus constantes fisiológicas. En los becerros 1-K12 y 2-K12 se observó una diarrea con un grado de lesión 1 (Figura 6) con una coloración amarillo claro al primer y segundo día postinoculación respectivamente, los dos con un porcentaje de deshidratación del 2%, falleciendo en estos días. El becerro 4-K12, falleció en la noche del día de inoculación y únicamente se observó una deshidratación del 3% sin presentación de diarrea o signos clínicos evidentes, el becerro 3-K12 no presentó ninguna alteración clínica.

En el grupo de los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- (5-O26,6-O26,7-O26,8-O26), no se observaron alteraciones en sus constantes fisiológicas, pero 3 de los 4 becerros (6-O26,7-O26 y 8-O26) presentaron signos clínicos de infección como son diarrea de coloración amarilla con estrías de sangre con un promedio de grado de lesión de 3 (figura 6), se observó la zona del periné, cola y extremidades posteriores manchados con la diarrea, también se observó actitud de indiferencia e inapetencia, una deshidratación de 6% de promedio, falleciendo al segundo día postinoculación (figura 7), el becerro 6-O26 presentó signos nerviosos (remoneo), el becerro 5-O26 falleció en la noche en el día de inoculación sin presentar signos clínicos.



**Figura 6** Presentación de diarrea en los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, al día uno postinoculación (Negro) y día dos postinoculación (Blanco).

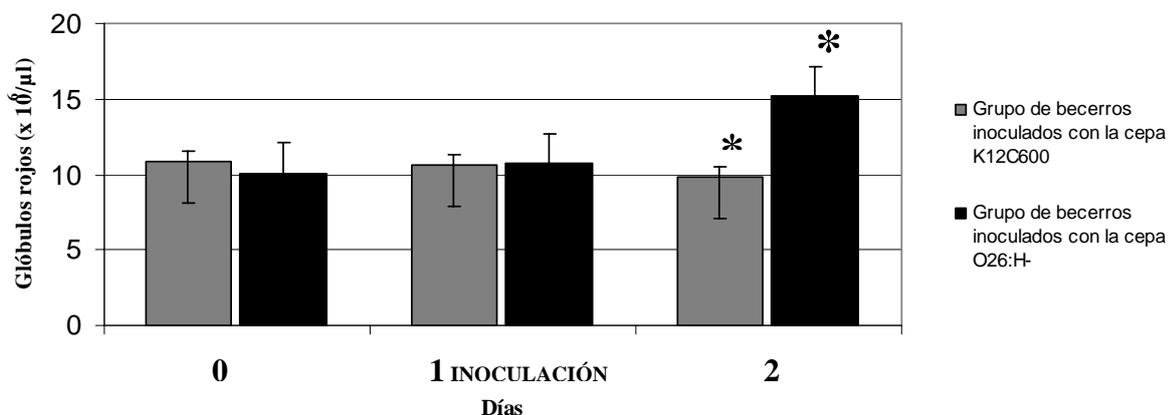


**Figura 7** Grado de deshidratación en los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, al día uno postinoculación (Negro) y día dos postinoculación (Blanco).

### Laboratorio.

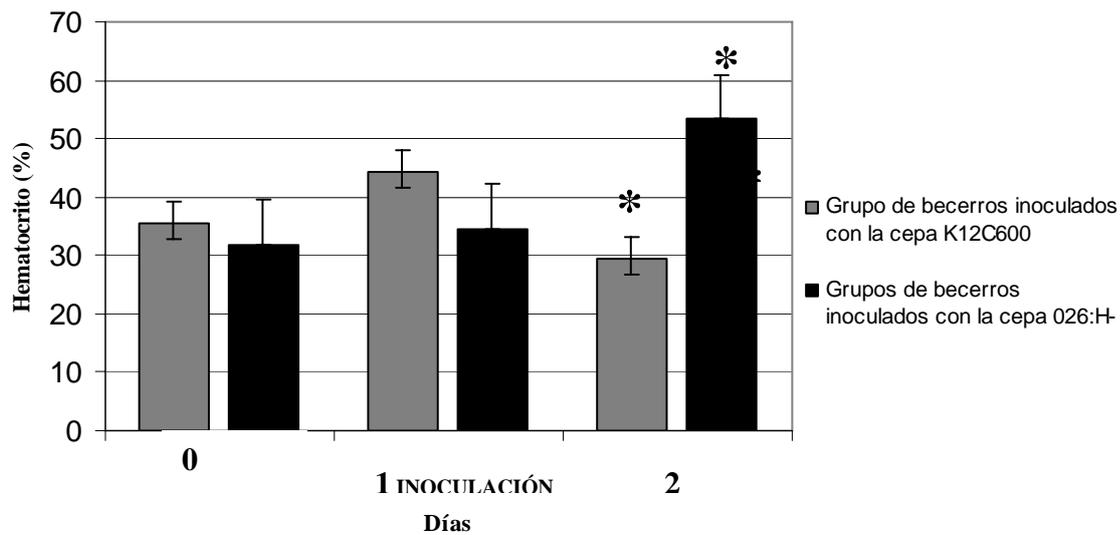
Resultados obtenidos en el hemograma.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- se muestra un aumento en los valores promedios de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina al segundo día postinoculación, respecto al grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600, no se observó ningún cambio en los valores hemáticos como se observa en las figuras 8, 9 y 10.



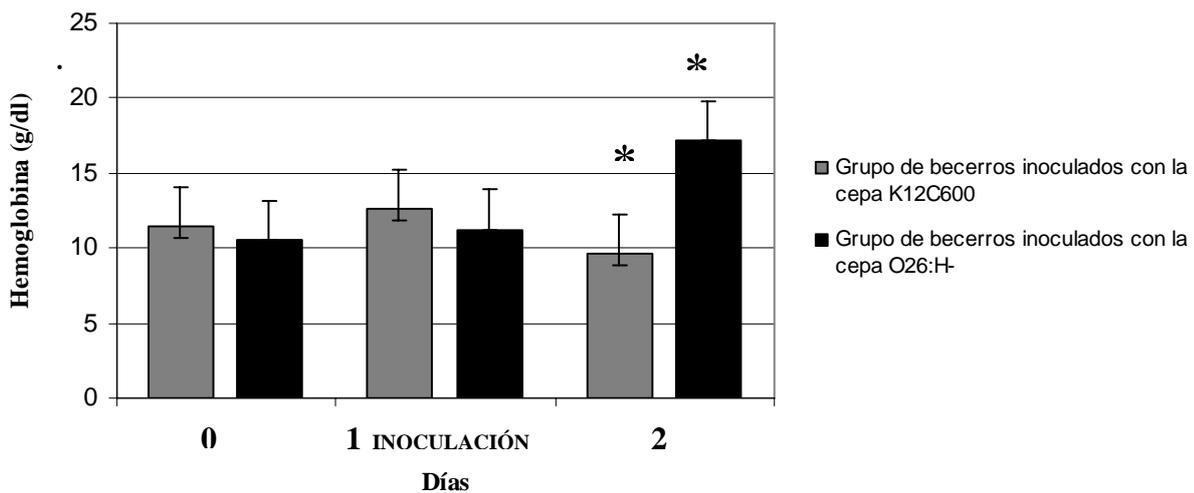
**Figura 8** Cinética del comportamiento de las medias del recuento de los glóbulos rojos de los dos grupos de becerros inoculados con cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativas  $p < 0.05$ .



**Figura 9** Cinética del comportamiento del hematocrito de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativas  $p < 0.05$ .

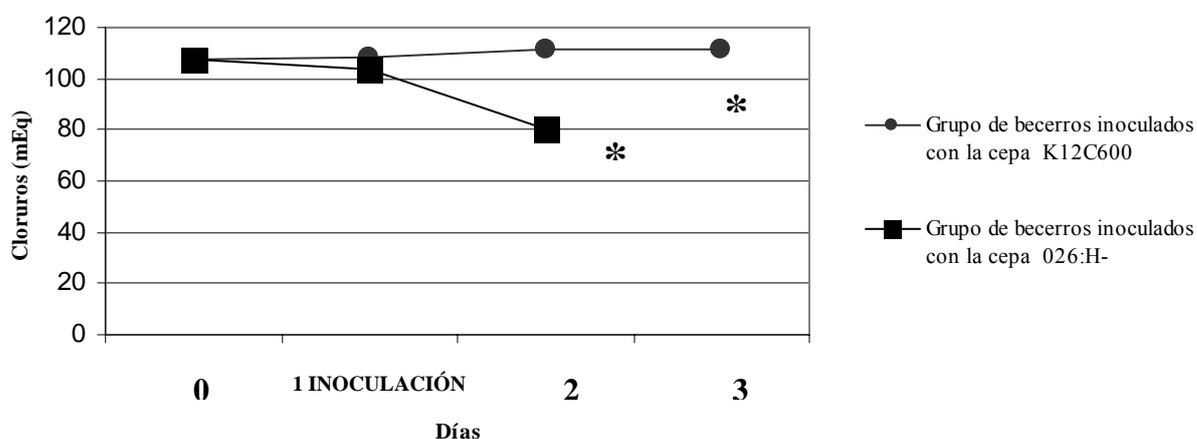


**Figura 10** Cinética del comportamiento de las media de hemoglobina de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativas  $p < 0.05$ .

Prueba realizada en la química sanguínea.

Se observa (Figura 11) en el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H-, una hipocloremia en el día 2 postinoculación.



**Figura 11** Promedios de cloruros por día de los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, realizado por la técnica de flamometría.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

Coprocultivos.

Se realizó el conteo de coliformes totales por gramo de heces, donde se obtuvo un rango de  $10$  a  $93 \times 10^3$  UFC/g en los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 y un rango de  $150$  a  $194 \times 10^3$  UFC/g, en los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H-(Tabla 11).

**Tabla 11** Cuenta total de coliformes en los becerros inoculados con  $10^{11}$  unidades formadoras de colonias de cepas de *Escherichia coli*.

Identificación becerros	DÍAS				
	0	1 Inoculación*	2 (mañana)	2* (tarde)	3*
1-K12	0	NM	$52 \times 10^3$ UFC	$93 \times 10^3$ UFC	----
2-K12	0	NM	$10 \times 10^3$ UFC	NM	$50 \times 10^3$ UFC
3-K12	0	NM	$35 \times 10^3$ UFC	NM	$53 \times 10^3$ UFC
4-K12	0	$48 \times 10^3$ UFC	----	----	----
5-O26	0	$30 \times 10^3$ UFC	----	----	----
6-O26	0	NM	$58 \times 10^3$ UFC	$89 \times 10^3$ UFC	----
7-O26	0	NM	$15 \times 10^3$ UFC	$85 \times 10^3$ UFC	----
8-O26	0	NM	$89 \times 10^3$ UFC	$194 \times 10^3$ UFC	----

NM, No muestreado, \* Toma de muestra realizada en la necropsia.

En la tabla 12 se muestra el porcentaje de aglutinación de las cepas de *Escherichia coli* de los 8 becerros inoculados.

**Tabla 12** Cinética de la eliminación de *Escherichia coli* O26:H- en los becerros inoculados.

Identificación becerros	Horas de muestreo	Porcentaje de aglutinación (%)
1-K12	0	0
	48	0
	58	0
2-K12	0	0
	48	0
	72	0
3-K12	0	0
	48	0
4-K12	0	0
	24	0
	41	0
5-O26	0	0
	24	80
6-O26	0	0
	48	100
	52	80
7-O26	0	0
	48	80
	67	100
8-O26	0	0
	48	60
	63	60

Tomando 10 colonias obtenidas del conteo de coliformes sugestivas de *Escherichia coli* como el 100%

Se tomaron en consideración 10 colonias de las cepas de *Escherichia coli* obtenidas de la cuenta total de enterobacterias que se desarrollaron en el medio MacConkey, se observó que las cepas obtenidas de los muestreos del grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H- fue el único que dio positivo a la aglutinación contra el antisuero O26 (SERUNAM-MÉXICO®), observando que los 4 becerros no presentaron al primer día de muestreo colonias positivas a aglutinación, el becerro 5-O26 presentó a las 24h postinoculación en 60% de colonias positivas a aglutinación, los becerros 6-O26 y 7-O26 se observó 100% de aglutinación de las colonias obtenidas del muestreo a las 52 y 67h respectivamente y el becerro 8-O26 se observó un 60% a las 48 y 63h.

### 3.-Patología

#### Necropsia

En los becerros inoculados con la cepas de *Escherichia coli* O26:H- se observaron lesiones macroscópicas en la necropsia en rumen, abomaso, intestino delgado, intestino grueso, linfonodos mesentéricos y bazo. Se describen a continuación.

En las tabla 13 se presentan las lesiones macroscópicas encontradas en el rumen de los 8 becerros de estudio.

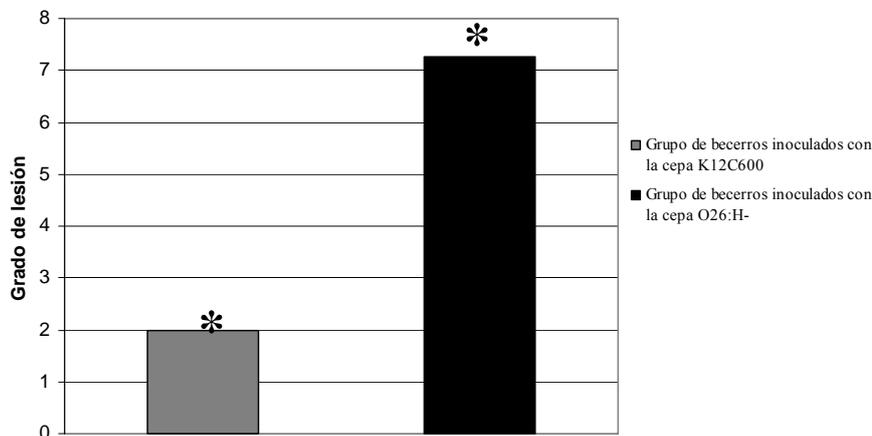
**Tabla 13** Grado de lesiones observadas en rumen en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

		Cepas de <i>Escherichia coli</i>	K12C600				O26:H-			
		Identificación becerro	1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>RUMEN</b>			<b>Grado de lesión</b>							
CONTENIDO:	Mucoso		1	1	1	1	1	1	1	1
	Pastoso		0	0	0	0	0	0	0	0
	Gaseoso		1	1	1	1	4	4	4	4
ALTERACIÓN VASCULAR EN LA MUCOSA:	Hiperemia		0	0	0	0	2	2	3	2
SUMA			2	2	2	2	7	7	8	7
PROMEDIO			2				7.25			

0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.  
No se observó úlceras en la mucosa.

Se aprecia la presencia de gas en rumen en los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, observando que el grupo de becerros inoculados con el serotipo de *Escherichia coli* O26:H- tuvo un grado de lesión de tipo 4 (severo) en la presencia de gas, también se puede observar que este grupo de becerros tuvo alteraciones de tipo vascular en la mucosa ruminal, como lo fue hiperemia con un promedio de lesión de 2 (moderada), y estando ausente en el otro grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600, los dos grupos tuvieron un contenido mucoso de un grado de lesión 1 (leve).

En la figura 12 se puede observar el promedio del conjunto de lesiones para los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, donde el puntaje máximo de lesión es de 16 puntos, por lo tanto el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 fue clasificada como leve y los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- un conjunto de lesiones moderada.



**Figura 12** Promedio del conjunto de lesiones en el rumen de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

Las lesiones macroscópicas de abomaso de los dos grupos de becerros inoculados con cepas de *Escherichia coli* se presentan en la tabla 14.

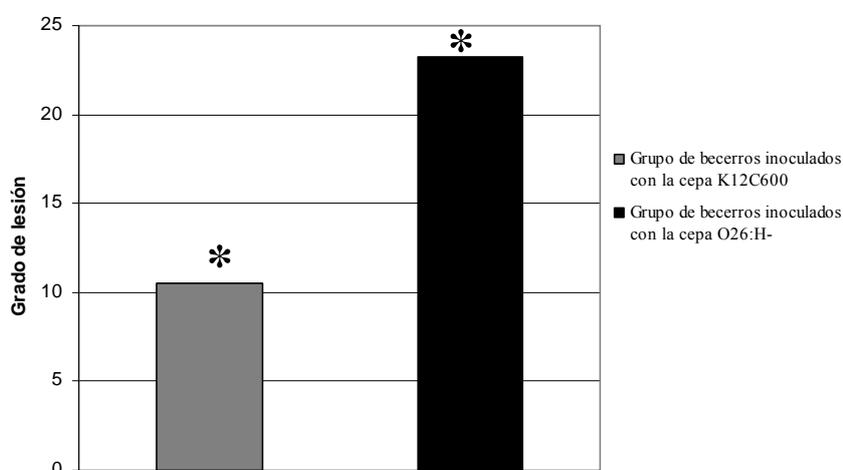
**Tabla 14** Grado de lesiones observadas en abomaso en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

		Cepas de <i>Escherichia coli</i>	K12C600				O26:H-			
		Identificación becerro	1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>ABOMASO</b>			<b>Grado de lesión</b>							
<b>CONTENIDO:</b>	Lechoso		4	4	4	4	4	4	4	4
	Pastoso		3	3	3	3	4	4	4	4
	Gaseoso		2	1	1	2	4	4	3	3
<b>MUCOSA:</b>	Edema		1	1	1	1	4	4	4	4
	Hiperemia		0	0	0	0	2	2	2	2
	Hemorragias		0	0	0	0	2	3	3	3
<b>TIPO DE INFLAMACIÓN:</b>	Catarral		1	1	1	1	0	0	0	0
	Hemorrágica		0	0	0	0	3	3	3	3
<b>SUMA</b>			<b>11</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>23</b>
<b>PROMEDIO</b>				<b>10.5</b>				<b>23.25</b>		

0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.  
No se observó úlceras en la mucosa

Se observó que el contenido encontrado en abomaso es preferentemente de tipo lechoso para el grupo de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli* K12C600, aunque se observó un contenido pastoso y un marcado acúmulo gaseoso en el grupo de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli* O26:H-, a diferencia de los becerros inoculados con la cepa K12C600, con respecto a la mucosa abomasal, ésta presenta edema y la hiperemia en el grupo inoculado con la cepa O26:H-, alcanzando un grado de lesión marcado, sin presentación de úlceras, el tipo de inflamación para el grupo inoculado con la cepa K12C600 fue una abomasitis catarral y una hemorrágica para el grupo inoculado con la cepa O26:H- .

En la figura 13 se muestra el promedio del conjunto de lesiones para los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, donde el puntaje máximo fue de 32 puntos, se observó que el grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600, tuvieron un conjunto de lesiones en abomaso leve, y el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- tuvieron un conjunto de lesiones moderada.



**Figura 13** Promedio del conjunto de lesiones del abomaso de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

En la tabla 15 se detallan el grado de lesión en intestino delgado, respecto a sus observaciones macroscópicas en la necropsia.

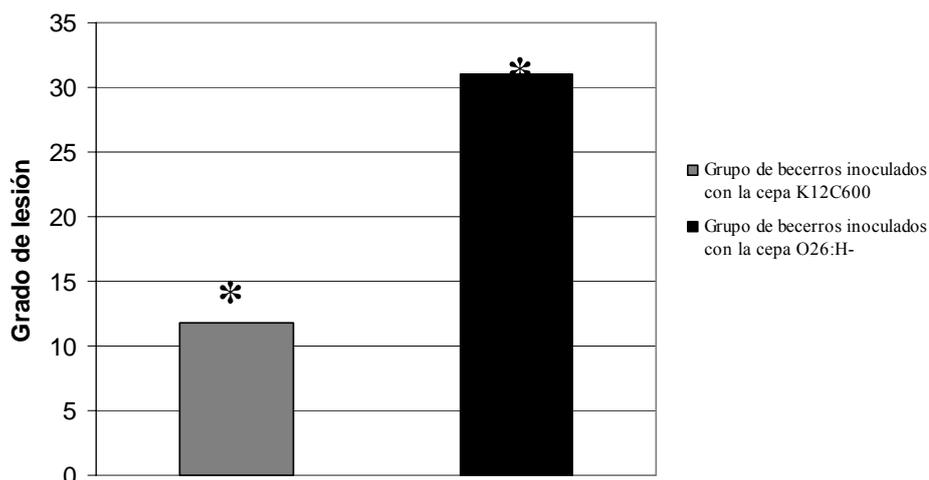
**Tabla 15** Grado de lesiones observadas en intestino delgado en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

		Cepas de <i>Escherichia coli</i>	K12C600				O26:H-			
		Identificación becerro	1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>INTESTINO DELGADO</b>			<b>Grado de lesión</b>							
<b>ADELGAZAMIENTO PARED:</b>			0	0	0	0	3	3	3	3
<b>CONTENIDO:</b>	Acuoso		3	3	3	3	1	1	1	1
	Mucoso		1	1	1	2	3	3	3	3
	Pastoso		1	1	1	1	2	2	2	2
	Gaseoso		1	1	1	1	3	3	3	4
	Amarillo		1	1	0	2	2	2	2	2
	Mal oliente		2	2	2	1	4	4	4	4
<b>MUCOSA:</b>	Edema		1	2	1	1	4	4	4	4
	Hiperemia		0	0	0	0	4	3	4	4
<b>TIPO DE ENTERITIS:</b>	Catarral		1	2	1	2	2	2	2	2
	Hemorrágica		0	0	0	0	3	3	3	3
<b>SUMA</b>			11	13	10	13	31	30	31	32
<b>PROMEDIO</b>			11.75				31			

0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 se observó preferentemente contenido acuoso con un grado de lesión marcada, en el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- , se observó un marcado acúmulo gaseoso y contenido mucoso con la presencia de estrías de sangre, con respecto a la mucosa intestinal, ésta presenta edema e hiperemia alcanzando un grado de lesión marcado, sin presentación de úlceras, clasificándolo como una enteritis hemorrágica.

En la figura 14 se muestra el promedio del conjunto de lesiones en intestino delgado, para los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, siendo el puntaje máximo de grado de lesión de 44 puntos, se muestra que el grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600 tuvo un conjunto de lesiones clasificada como leve y el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- tuvo un conjunto de lesiones clasificada como severa.



**Figura 14** Promedio del conjunto de lesiones del intestino delgado de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

En la tabla 16 se detalla el grado de lesión en intestino grueso, respecto a sus observaciones macroscópicas en la necropsia.

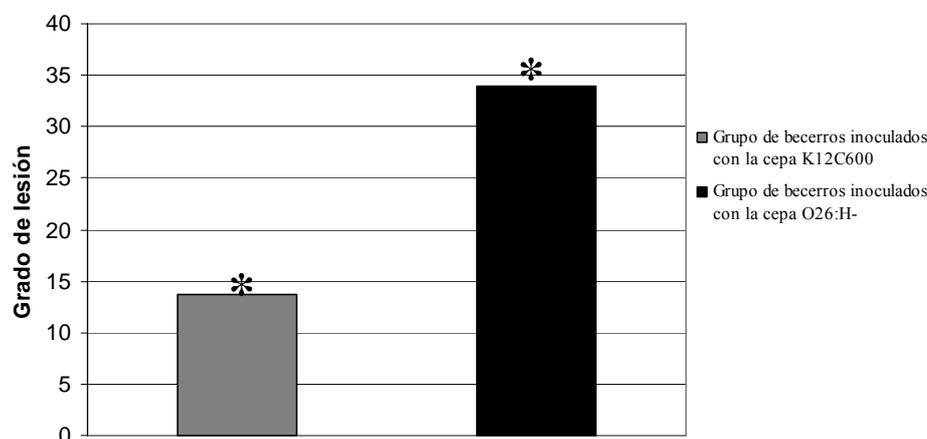
**Tabla 16** Grado de lesiones observadas en intestino grueso en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

		Cepas de <i>Escherichia coli</i>	K12C600				O26:H-			
			Grado de lesión				Grado de lesión			
		Identificación becerro	1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>INTESTINO GRUESO</b>										
<b>ADELGAZAMIENTO PARED:</b>			0	0	0	0	2	2	2	2
<b>CONTENIDO:</b>	Acuoso		2	2	2	2	1	1	1	1
	Mucoso		1	1	1	1	3	3	3	3
	Pastoso		1	1	1	1	2	2	2	2
	Gaseoso		2	3	2	2	4	4	4	4
	Amarillo		2	2	2	3	3	3	3	3
	Mal oliente		2	2	3	2	4	4	4	4
<b>MUCOSA:</b>	Edema		2	1	1	2	4	4	4	4
	Hiperemia		0	0	0	0	4	4	4	4
<b>TIPO DE ENTERITIS:</b>	Catarral		1	1	1	1	3	3	3	3
	Hemorrágica		0	0	0	0	4	4	4	4
<b>SUMA</b>			13	13	13	14	34	34	34	34
<b>PROMEDIO</b>			13.25				34			

0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 se observó un contenido acuoso con un grado de lesión moderada, presentando edema de la mucosa con un grado de lesión leve, en el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- , se observó un marcado a severo acúmulo gaseoso y contenido mucoso presentado estrías de sangre, la mucosa intestinal presentó edema e hiperemia como las lesiones más importantes de igual forma que en intestino delgado, alcanzando un grado de lesión marcado.

En la figura 15 se puede observar el promedio del conjunto de lesiones acumulada en intestino grueso, para los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, siendo el puntaje máximo del conjunto de lesiones de 44 puntos, se muestra en el grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600 tuvo un grado de lesión acumulada clasificada como leve y el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H- tuvo una clasificación general de grado de lesión severa.



**Figura 15** Promedio del conjunto de lesiones del intestino grueso de los becerros inoculados con cepas las De *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

En la tabla 17 se presentan las lesiones macroscópicas observadas en los linfonodos mesentéricos de los 9 becerros de estudio.

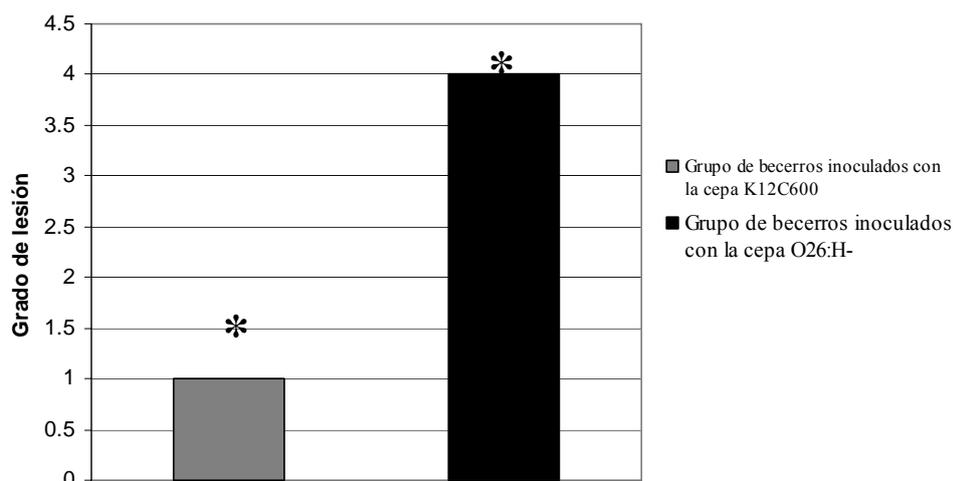
**Tabla 17** Grado de lesiones observadas en linfonodos en la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

	Cepas de <i>Escherichia coli</i> Identificación becerro	K12C600				O26:H-			
		1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>Linfonodos mesentéricos</b>		<b>Grado de lesión</b>							
Aumentados de tamaño		0	0	0	0	2	2	2	2
Exudativos		1	1	1	1	2	2	2	2
<b>SUMA</b>		1	1	1	1	4	4	4	4
<b>PROMEDIOS</b>		1				4			

0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 únicamente se observó contenido exudativo leve de los linfonodos mesentéricos sin presentar aumento de tamaño, respecto al grupo de becerros inoculados con las cepa de *Escherichia coli* O26:H- , se observó un grado de lesión moderado en un aumento de tamaño y al corte un presencia de líquido en los linfonodos mesentéricos.

En la figura 16 se muestra el promedio del conjunto de lesiones para los dos grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*, siendo el puntaje máximo de 8 puntos, se muestra el grupo de becerros inoculados con la cepa K12C600 no presentaron lesión y el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- tuvo una clasificación general moderada.



**Figura 16** Promedio del conjunto de lesiones de los linfonodos mesentéricos de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ .

En la tabla 18 se presentan las lesiones macroscópicas observadas en bazo de los 8 becerros inoculados con cepas de *Escherichia coli*.

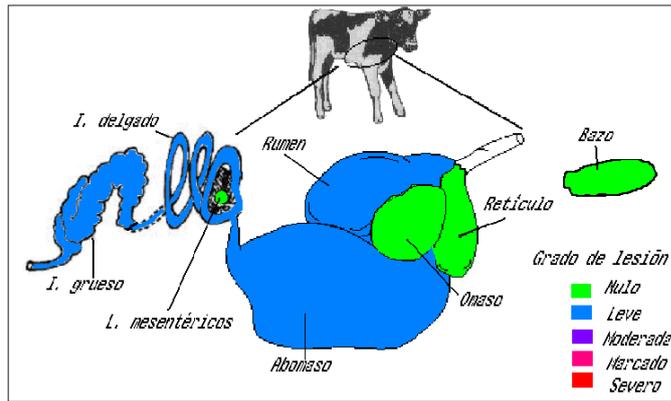
**Tabla 18** Grado de lesiones observadas en bazo a la necropsia de los becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli*.

	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	Identificación becerro	K12C600				O26:H-			
			1-K12	2-K12	3-K12	4-K12	5-O26	6-O26	7-O26	8-O26
<b>BAZO</b>			<b>Grado de lesión</b>							
<b>CAPSULA:</b>	Volumen disminuido		0	0	0	0	4	4	4	4
	Consistencia friable		0	0	0	0	4	4	4	4
	Bordes irregulares		0	0	0	0	4	4	4	4
	Hiperemia		0	0	0	0	4	4	4	4
<b>PARÉNQUIMA:</b>	Hiperemia		0	0	0	0	4	4	4	4
<b>SUMA</b>			0	0	0	0	20	20	20	20

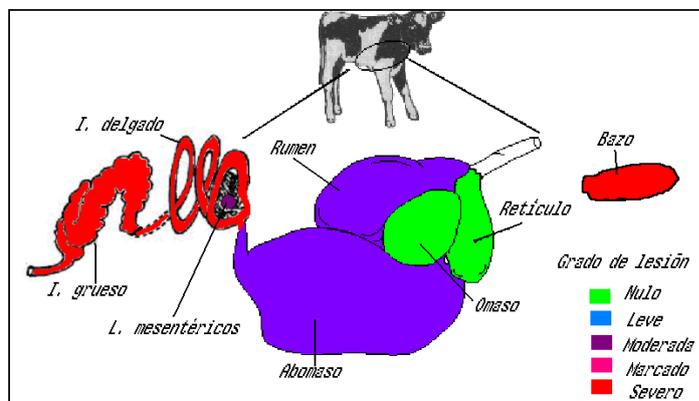
0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 marcada, 4 severa.

Se muestra que el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H-, fue el único que presentó lesiones en bazo con un grado de lesión severo, presentando disminución del tamaño del bazo, con una consistencia friable y con presentación de hiperemia en cápsula y parénquima, con un conjunto de lesiones clasificada como severa.

En la necropsia los riñones, omaso y retículo de todos los grupos de becerros inoculados con las cepas de *Escherichia coli* se encontraban sin cambios patológicos aparentes (SCPA).



**Figura 17** Conjunto de lesiones de los diferentes órganos observados en la necropsia de los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600.



**Figura 18** Conjunto de lesiones de los diferentes órganos observados en la necropsia de los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H-.

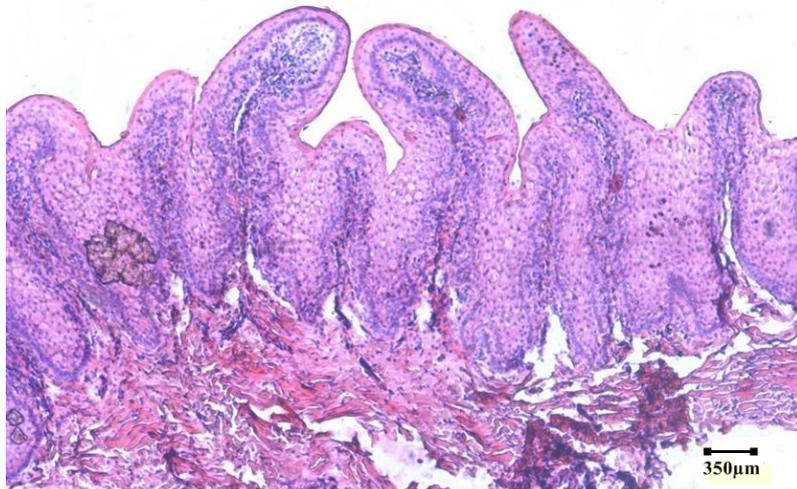
### 3.2 Análisis histológico

Los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* K12C600, no presentaron ninguna lesión microscópica de los órganos seleccionados, el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H-, todos presentaron las mismas lesiones microscópicas en los órganos estudiados, solo rumen (Figura 19) y retículo se observaron sin cambios patológicos aparentes.

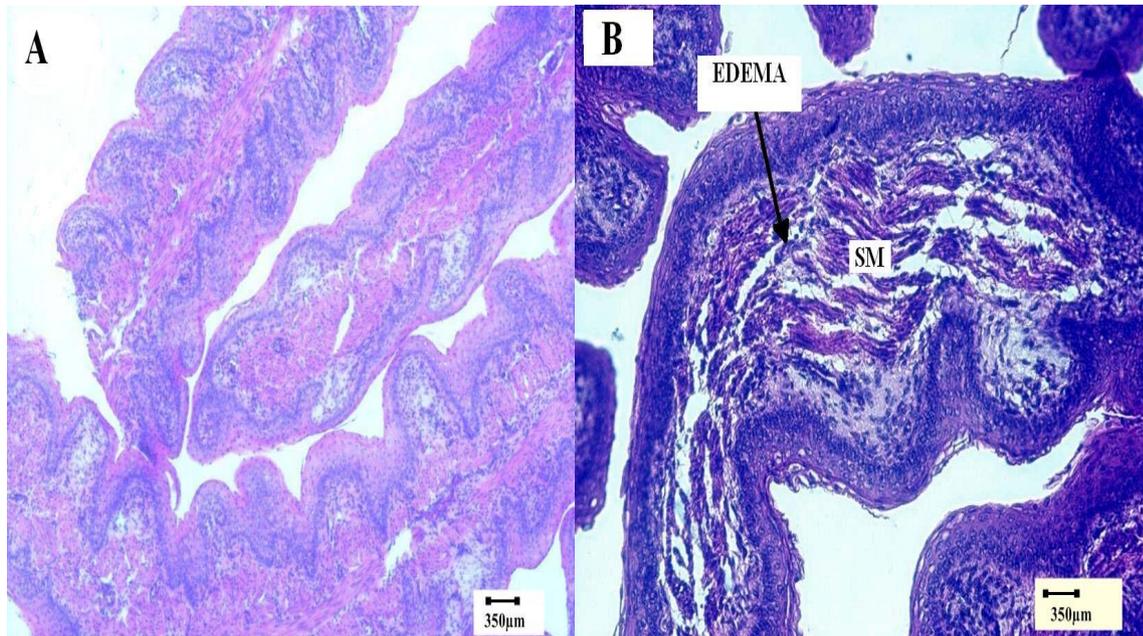
En el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H-, se observó en omaso edema en la punta de las vellosidades (Figura 21), en abomaso presencia de eritrocitos en intersticio, en duodeno presencia necrosis coagulativa y descamación de las vellosidades junto con hemorragia (Figura 22), en yeyuno atrofia de las vellosidades, presencia de leucocitos, congestión y hemorragia en las vellosidades (Figura 23), en ciego se observó necrosis coagulativa de las vellosidades junto con hemorragia e infiltración leucocitaria (Figura 24), en colon leucocitos y hemorragia en la submucosa (Figura 25) , en recto se observó hemorragia, en la submucosa (Figura 26).

También se observó depleción linfoide en linfonodos mesentéricos (Figura 27) y en bazo (Figura 28), en los becerros inoculados con la cepa O26:H-; y en riñón se encontró una degeneración de tipo vacuolar (Figura 29).

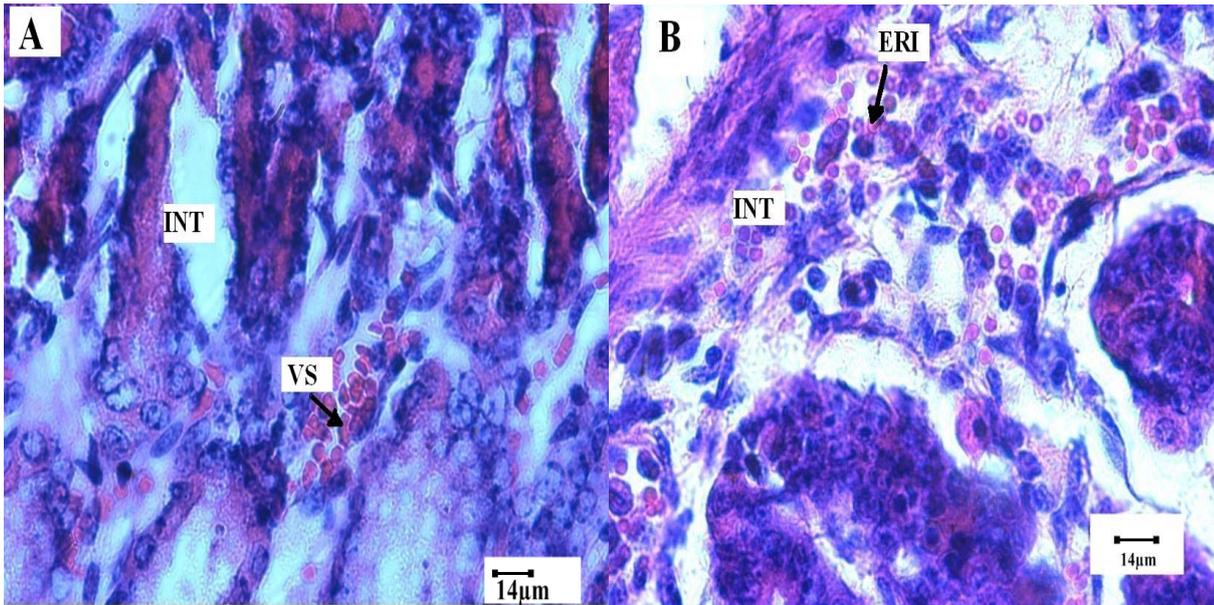
SCPA



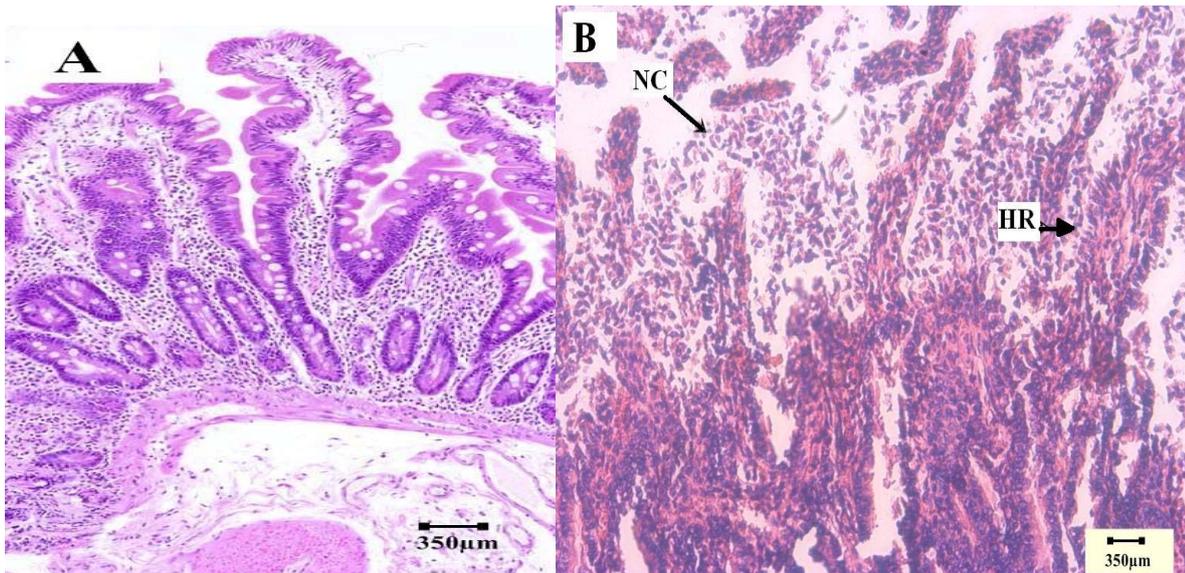
**Figura 19** Microfotografía de rumen. Aumento 100x tinción H-E



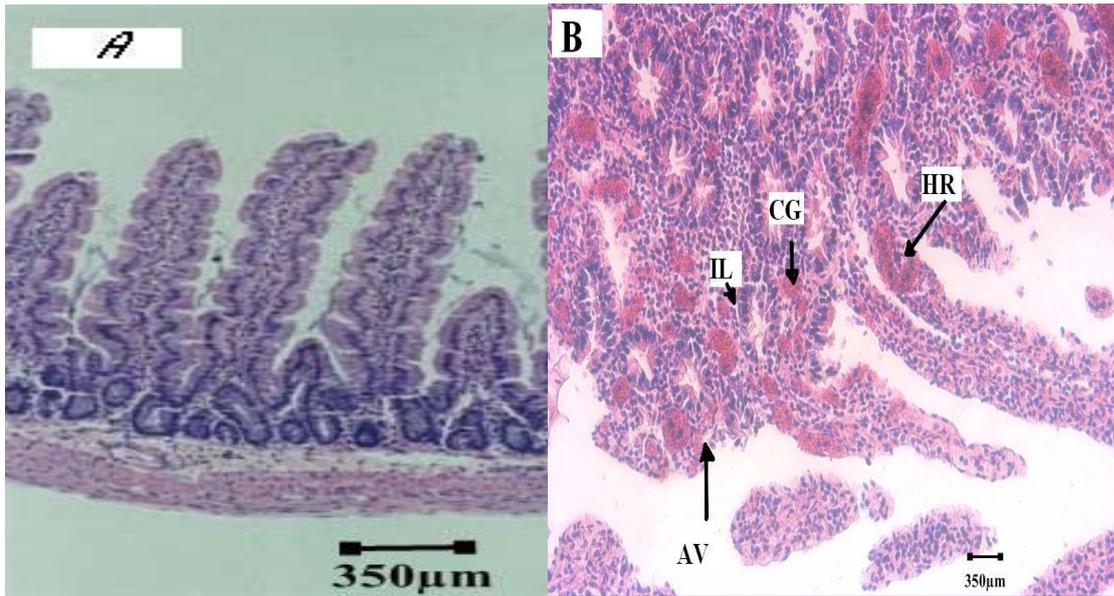
**Figura 20** Microfotografía de omaso, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B). SM: submucosa. Aumento 100x, tinción H-E.



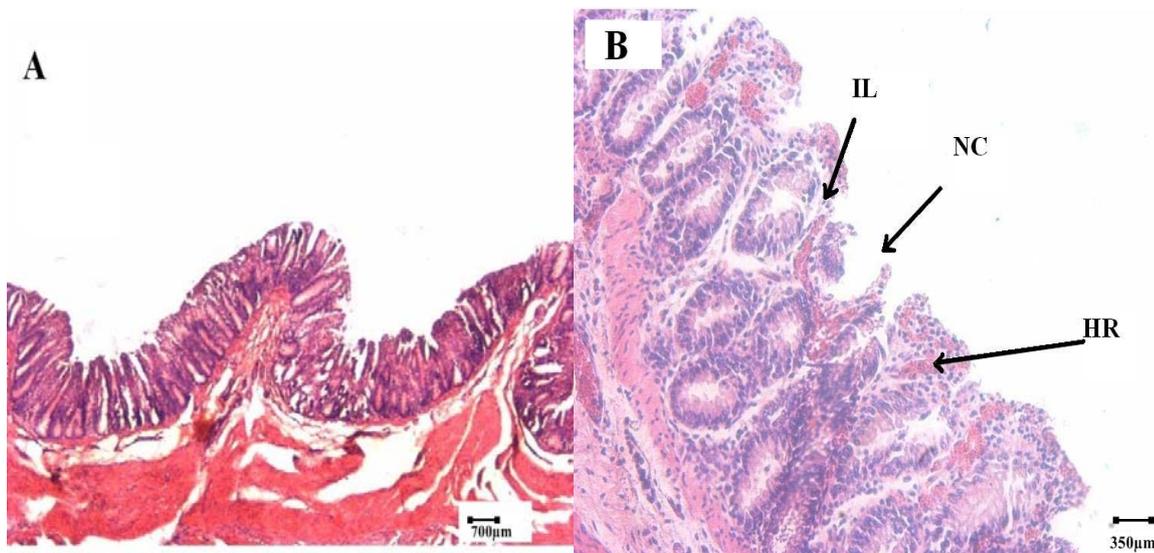
**Figura 21** Microfotografía de abomaso, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B); VA, vaso sanguíneo, INT, intersticio, eritrocito (ER). Aumento 1000x, tinción H-E



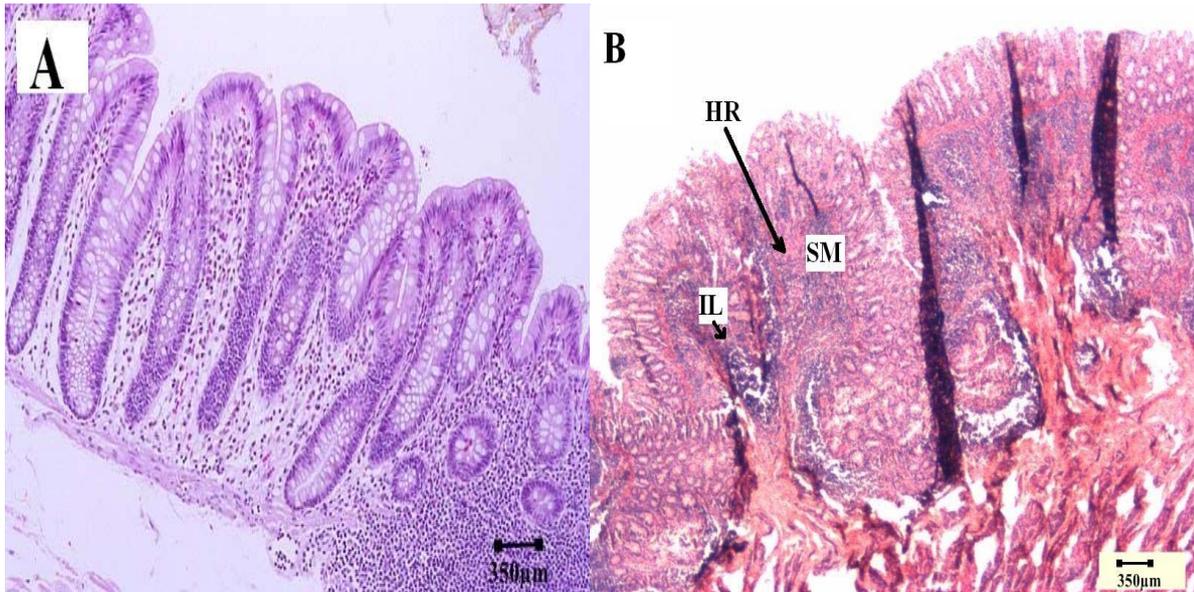
**Figura 22** Microfotografía de duodeno, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), necrosis coagulativa (NR), hemorragia (HR). Aumento 100x, tinción H-E.



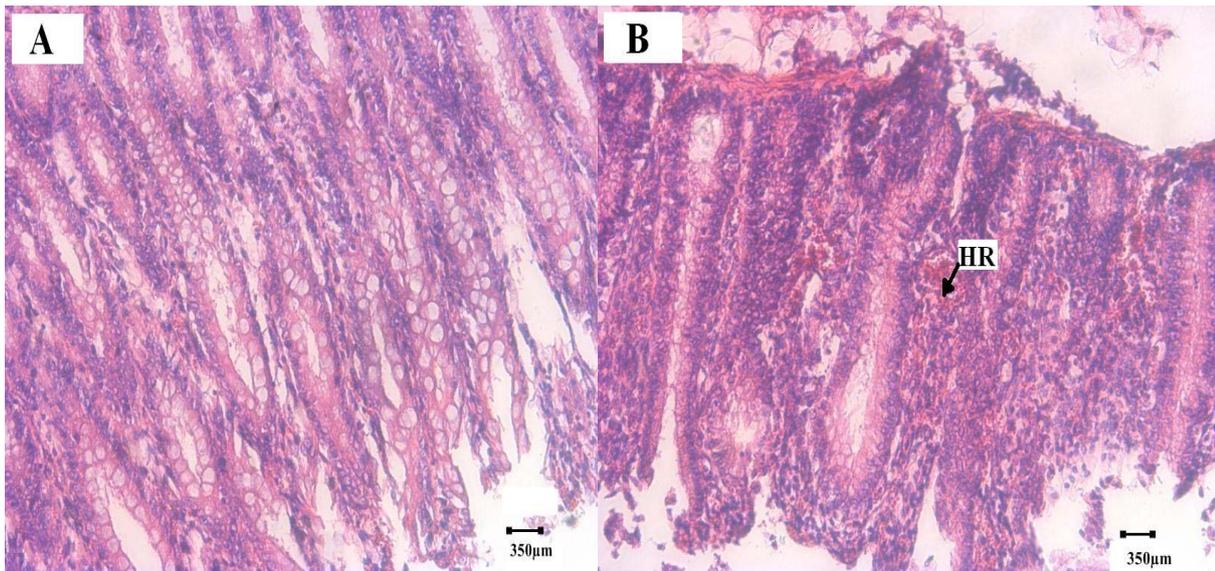
**Figura 23** Microfotografía de yeyuno, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), atrofia de las vellosidades (AV), leucocitos (IL), congestión (CG), hemorragia (HR). Aumento 100x, tinción H-E



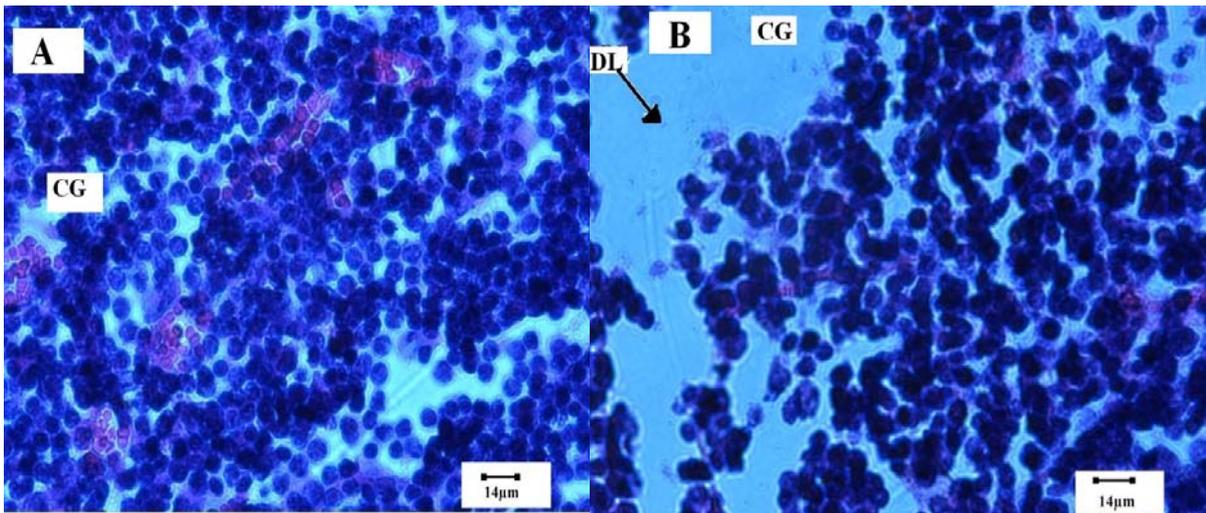
**Figura 24** Microfotografía de ciego, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) aumento 40x y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B) aumento 100x, necrosis coagulativa (NC), hemorragia (HR) e infiltración leucocitaria (IL), Tinción H-E.



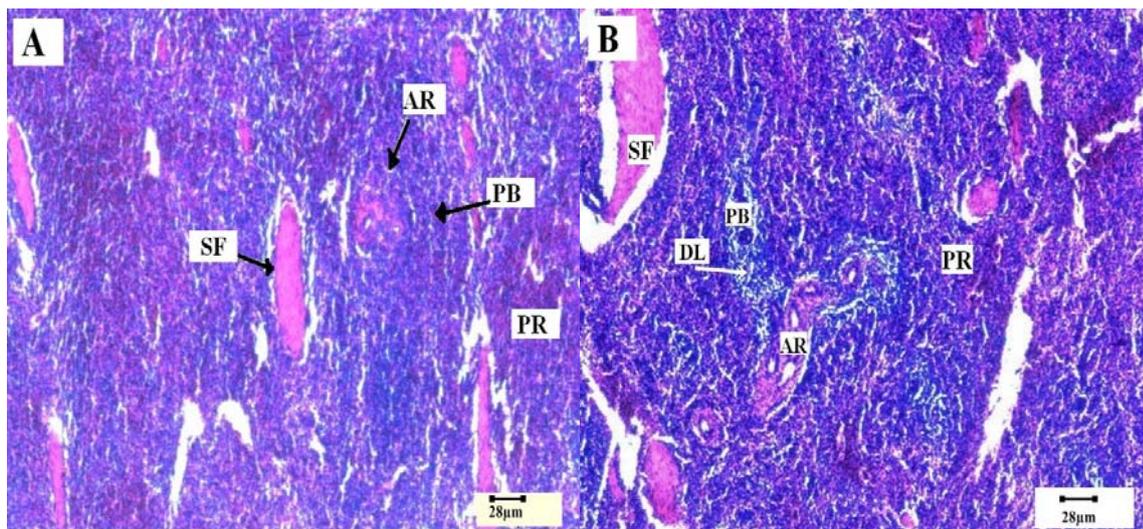
**Figura 25** Microfotografía de colon, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), leucocitos (IL), hemorragia (HR). Aumento 100x, tinción H-E



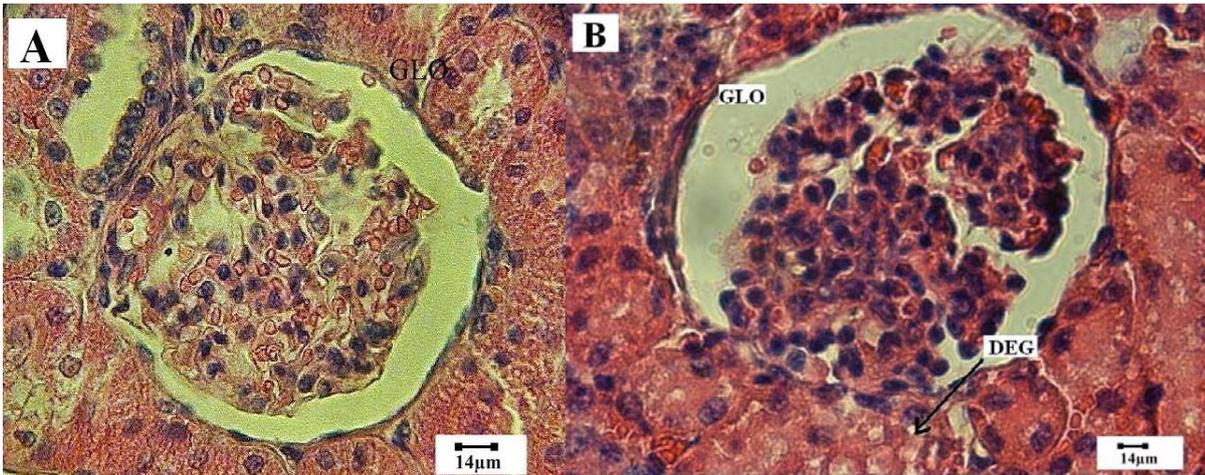
**Figura 26** Microfotografía de recto, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), hemorragia, (HR). Aumento 100x, tinción H-E.



**Figura 27** Microfotografía de linfonodo mesentérico, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), depleción linfoide (DL) en centro germinativos (CG). Aumento 1000x, tinción H-E



**Figura 28** Microfotografía de bazo, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), depleción linfoide (DL); SF: septo fibroso, AR: arteriola, PR: pulpa roja, PB: pulpa blanca. Aumento 400x, tinción H-E.



**Figura 29** Microfotografía de glomérulo renal, en un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* K12C600 (A) y de un becerro inoculado con la cepa *Escherichia coli* O26:H- (B), degeneración vacuolar (DEG). Aumento 1000x, tinción H-E.

## 8 DISCUSIÓN

El presente trabajo consistió en la inoculación en becerros de dos días de edad de una cepa STEC aislada de un brote de campo, con la finalidad de reproducir, de manera experimental, el efecto de esta cepa.

Se realizó la selección de una cepa característica por su serotipo y factores auxiliares de virulencia, se determinó en las 16 cepas de *Escherichia coli* aisladas de un brote de diarrea en becerros el serotipo que pertenecen, estas cepas se repartieron en 10 serotipos (Tabla 8), que en comparación con estudios realizados en España solo coincide el predominio con el serogrupo O26 (Blanco y col., 2000). Se consideró al serotipo O26:H- como el más relevante de todos ellos ya que la literatura reporta que dentro del espectro de cepas STEC que son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal del bovino solo un número limitado de serotipos es patógeno para la especie produciendo diarrea en terneros (Mercado, 2000), entre ellos están O5, O26 y O118, que han sido asociados con enfermedad entérica en animales de granja causando morbilidad y mortalidad significativa (Mainil y col., 1999; Bettelheim y col., 2000). El serotipo O26:H- ha tomado una gran relevancia a partir de reportes de brotes en humanos, jugando un papel importante dentro del grupo STEC (Scotland y col., 1983), *Escherichia coli* O26:H- fue originalmente aislada a partir de becerros con diarrea en 1962 (Mainil y col., 1987), también se ha reportado a partir de aislamientos en ganado vacuno sano (Wells y col., 1991; Mainil y col., 1987), en Canadá (Clarke y col., 1994), en Alemania y Bélgica (Wieler y col., 1996). En un estudio realizado en 2004 en un modelo animal de bovinos se determinó que el serotipo O26:H- fue capaz de colonizar principalmente el intestino grueso eficientemente (Van Diemen y col. 2004).

También se identificó la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y/o *hlyA*, encontrándose una frecuencia del 100% del gen *stx1* como se muestra en la tabla 9, esto implica que los aislados no muestran diversidad y esto puede explicar que aunque se encontraron diferentes serotipos presentes en el brote de diarrea en becerros previamente reportado, pudo existir una transmisión de tipo horizontal de bacteriófagos, en condiciones normales, estos bacteriófagos se hallan integrados en el cromosoma bacteriano, y cuando se induce el ciclo lítico, se liberan grandes cantidades de bacteriófagos capaces de infectar a otras bacterias (Schmidt y col., 1999), nuestros resultados difieren con los reportados por Blanco y col. 2004, Parma y col. 2000, Beutin y col., 1993 y Circuta y col. 2006, quienes luego de un estudio de factores auxiliares de virulencia de cepas STEC de origen bovino obtuvieron una prevalencia del gen *stx2*.

Aunque se ha reportado un alto porcentaje de cepas STEC de origen bovino portadoras del gen *hlyA* (Gyles y col., 2004), nuestros resultados indican que sólo dos cepas tienen dicho gen. La cepa O26:H- utilizada en los experimentos, no tiene el gen codificador de la intimina (*eaeA*), aunque se considera como un factor de adherencia importante, se ha demostrado que no todas las cepas STEC aisladas de becerros con diarrea son portadoras del gen *eaeA*, (Wieler y col., 1996; Sandhu y col., 1996; Jenkis y col., 2002), indicando que otros factores tienen influencia sobre la persistencia de la bacteria en el intestino del bovino, también han demostrado que cepas mutantes, en donde se les nulificó el gen *eaeA*, son capaces de colonizar algunos compartimientos del tracto intestinal del becerro, (Dean-Nystrom y col., 1998; Cornick y col., 2002); en algunos estudios realizados se ha demostrado que el serotipo O26:H- expresa una fimbria tipo 1, ésta puede ayudar a la adherencia de la cepa, (Enami y col., 1999).

En un estudio previo, la cepa O26:H- empleada fue considerada como alta productora de la toxina de Shiga, considerándose altas productoras a un efecto de  $10^5$  y  $10^6$  unidades citotóxicas en cultivo celular (UCCC) en 100 $\mu$ l, este efecto es parecido a la cepa de referencia EDL933 (Aranguré, 2007).

Se decidió a utilizar el inóculo de una concentración de  $10^{11}$ , ya que otros autores que han trabajado con modelos en bovinos empleando cepas de *Escherichia coli* (*stx1+*, *stx2+* y *eaeA+*) utilizaron  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/ml (Dean-Nystrom y col., 1997; Stordeur y col., 2000); y la cepa de trabajo no contiene el gen *eaeA*.

A las 12 horas postinoculación, en tres de los cuatro becerros inoculados (6-O26,7-O26 y 8-O26), se observó una diarrea de tipo hemorrágica, presentando una deshidratación moderada (Figuras 6 y 7), concordando con lo reportado por Dean Nystrom y col.(1997), quienes observaron en becerros recién nacidos sin calostrear inoculados con una cepa O157:H7 aislada de becerro con diarrea, la presentación de diarrea hemorrágica a las 12 horas postinoculación. No se observaron alteraciones en las constantes fisiológicas (frecuencia cardíaca, respiratoria y temperatura corporal) de los 8 becerros inoculados, lo que concuerda por lo reportado en otros dos estudios (Dean-Nystrom, y col., 1998, Stourdeur, y col 2000) y es lógica ya que las cepas STEC no son invasivas (O'Loughlin y col., 2001).

Los resultados de los signos clínicos obtenidos en el presente experimento, concuerdan con los registrados en el brote de diarrea en becerros previamente reportado (Valdivia 1995) de donde se aisló la cepa O26:H- que fue utilizada en el presente experimento, dato que indica que las cepas mantenidas en el laboratorio por 15 años aún conservan sus características de patogenicidad. En este aspecto, los signos que más concuerdan son diarrea hemorrágica, deshidratación, los cuales se presentaron en forma conjunta en los animales 5-O26, 6-O26, 7-O26 y 8-O26, la única diferencia observada fue el caso 5-O26 en el que no se presentó diarrea, pero fue el que se murió más rápido y las lesiones a la necropsia fueron más severas. Una posible explicación a las diferencias observadas entre los individuos pudiera ser que los animales provenían de diferentes madres y por lo tanto existe una cierta variabilidad genética, a pesar de tratarse de la misma raza, sexo y peso, existiendo varios factores que pueden influenciar el resultado de la infección y entre ellos se encuentran los factores del hospedador que implican principalmente la dotación genética del organismo (Díaz y col., 2005).

A diferencia de lo antes expuesto, todos los animales que fueron inoculados con la cepa K12 tuvieron ausencia de lesiones a la necropsia y al examen histológico no se observó ninguna lesión (Figura 17). Como se indica en las figuras 6 y 7, los animales usados como testigo negativo tuvieron diarrea no sanguinolenta y deshidratación leves, muriendo a los 2 días (becerro 4) y al 4° día el resto. Considerando que los animales se mantuvieron sin calostro, se manejaron bajo las mismas condiciones que el resto y fueron mantenidos en condiciones parecidas, la explicación a lo observado radica en la baja del sistema inmune y el estrés al que fueron sometidos, por lo que la causa de la muerte puede ser atribuida a un desequilibrio metabólico severo o lo que se conoce como falla orgánica multisistémica (FOM), dato que refuerza la importancia de calostrear a los animales en todas las explotaciones y a la importancia que tiene el brindar una grado alto de confort a los animales.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- se observó una policitemia de tipo relativa desde el segundo día postinoculación (Figuras 8, 9 y 10), que fue debida a una deshidratación, ya que clínicamente existió en este grupo una deshidratación de un 7% (moderada). Sin embargo, la policitemia también pudo ser de tipo transitoria ya que la liberación de catecolaminas por el efecto del estrés puede llevar a este cuadro. Al conjuntar las lesiones observadas en el examen histopatológico, el bazo de todos los animales del grupo O26 se encontraba sin una baja aparente de la pulpa roja, lesión que se observa en animales con contracción esplénica. (Jub y col., 1985).

La hipocloremia observada en el grupo de becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- en el día 2 postinoculación, fue ocasionada posiblemente por la enteritis, ya que el ácido clorhídrico (HCl), producido y secretado en el abomaso es absorbido en el intestino delgado y al existir una falla en el tránsito por el tracto digestivo los iones de cloro del jugo gástrico no serán absorbidos debidamente, por lo que habrá un secuestro de iones, lo que pudo provocar un proceso de hipocloremia (Gutiérrez., 2004); No se observó ninguna otra alteración en los análisis bioquímicos, esto pudo deberse al curso sobreagudo de la infección. Comparativamente, el grupo de becerros inoculados con *Escherichia coli* cepa K12C600 no tuvo alteraciones bioquímicas.

La eliminación de bacterias coliformes en el grupo de becerros inoculados con la cepa K12 fue de  $49 \times 10^3$  UFC/g de heces en promedio, a diferencia de los becerros inoculados con la cepa de *Escherichia coli* O26:H- con un promedio de  $80 \times 10^3$  UFC/g de heces, la eliminación de las bacterias con el serotipo O26 en este grupo se encontró entre un 60 al 100%; estos resultados indican que ambas cepas colonizaron adecuadamente el tracto gastrointestinal y concuerda con lo reportado por Dean-Nystrom y col., 1997; Brown y col., 1996 y Stourdeur y col., 1999, quienes observaron una eliminación promedio de coliformes de  $10^4$  UFC/g de heces, pero reportando una disminución de la excreción con el tiempo junto con signos clínicos de enfermedad.

Nuestros datos están de acuerdo con lo reportado para el comportamiento epidemiológico de las cepas STEC en bovinos, ya que se empezaron a eliminar en el grupo inoculado con la cepa O26 desde las 48 h, en promedio, persistiendo a todo lo largo del experimento. En condiciones de campo, este comportamiento facilita la persistencia de las cepas STEC en el hato (Lui y col., 2005; Jenkins y col., 2007).

En el grupo inoculado con la cepa K12C600, únicamente se observó un conjunto de lesiones leve en abomaso, rumen e intestinos. En contraste, en el grupo de becerros inoculados con el serotipo O26:H- a la necropsia se observó un conjunto de lesiones severa, con producción de gas e hiperemia moderada, aunque en el análisis histopatológico no se observó ningún daño en las papilas ruminales descartando una patología en éstas, probablemente el gas y el contenido observado se debieron a una invasión de bacterias hacia el abomaso. A la fecha el único reporte de daño en rumen causado por las cepas STEC es el realizado por Valdivia y col. (2000), durante un brote en becerros del cual proviene la cepa O26 empleada en este trabajo; aunque trabajos previos ya habían reportado la capacidad de colonizar este órgano pero sin causar daño (Brown y col., 1996).

En el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H- se observó en la mucosa abomasal, edema e hiperemia, con un conjunto de lesiones leve, comprobando histológicamente la presencia de hemorragia en el espacio intersticial (Figura 21), concordando con lo reportado en el brote de becerros en donde se aisló la cepa trabajada; además en el trabajo de Valdivia y col. (2000) se encontraron úlceras en abomaso.

En las lesiones macroscópicas en intestino delgado se observó una diferencia marcada entre los dos grupos de becerros inoculados, los becerros inoculados con la cepa O26:H- tuvieron en todo el órgano una enteritis de tipo hemorrágica, con un grado del conjunto de lesiones severo, histológicamente se pudo observar en el duodeno la presencia de necrosis coagulativa y descamación de las vellosidades (Figura 22), esto concuerda con lo reportado por Stourdeur y col., 1999 quienes observaron daño en las vellosidades sin presencia de lesiones A/E, dato que soporta la teoría de que existen otros factores de adherencia en las cepas STEC en el intestino, ya que la cepa O26:H- utilizada en este experimento carece del gen *eaeA*. Respecto al yeyuno, se observó atrofia de la vellosidad y presencia de leucocitos (linfocitos), congestión y hemorragia en las vellosidades en los cuatro becerros inoculados. Stourdeur y col. (1999), observaron las mismas lesiones reportadas en esta sección de intestino delgado en dos, de los tres becerros inoculados con una cepa O118:H- aislada de becerros con diarrea hemorrágica.

En el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H- , se apreció a nivel del intestino grueso una enteritis hemorrágica con gas y edema, sin úlceras y un grado del conjunto de lesiones clasificada como severo, lo que también ha sido observado en otros dos modelos donde se inocularon cepas STEC, aisladas de becerros con presentación de diarrea, (Dean-Nystron y col., 1997, Stourdeur y col., 1999), en colon se encontró presencia de leucocitos y hemorragia en la submucosa y hemorragia a nivel del recto. Estos resultados refuerzan los datos de la presencia de estas cepas STEC en intestino grueso, principalmente ciego (Grauke y col., 2002) con lo hallado en el brote de diarrea de donde se aisló la cepa O26:H- (Valdivia, 1995).

En el grupo de becerros inoculados con la cepa O26:H-, a nivel de los linfonodos mesentéricos, se observó un grado de lesión moderado, aumento de tamaño y contenido exudativo al corte, se notó depleción linfoide en los centros germinativos (Figura 27). En el bazo de estos becerros se pudo apreciar hiperemia y una disminución del tamaño que junto con el análisis histológico, indicaron una depleción linfoide en la pulpa blanca (Figura 22), esto concuerda con lo encontrado anteriormente en el brote de diarrea hemorrágica en becerros (Valdivia, 1995), donde se reportó una hiperemia en bazo y una disminución de la pulpa blanca, tal vez debido a una destrucción de linfocitos, dicho efecto pudiera ser asociado a una lisis relacionada a la expresión de receptores GB3 ya que se ha reportado que los linfocitos bovinos son sensibles y tienen en su superficie los receptores para las toxinas Stx1 principalmente (Ferens 2000; Menge y col., 2003,). En otros estudios realizados en bovinos inoculados con Stx1, se observó una estimulación en la circulación sanguínea de las subpoblaciones de linfocitos B y linfocitos T CD8, demostrando una sensibilidad alta a Stx1, esto debido a las diferentes isoformas que presenta la toxina para la unión al receptor Gb3 que se activa durante la proliferación linfocitaria (Stamm y col., 2002).

En los animales trabajados no se observó ninguna alteración de la función renal, sin embargo se apreció una ligera degeneración vacuolar en el epitelio de la cápsula glomerular de los becerros inoculados con la cepa 026:H- lo que indica que las toxinas absorbidas dañaron en forma ligera esta estructura sin llegar a la falla funcional. A su vez los datos sugieren la presencia de una cantidad pequeña de receptores en el glomérulo a diferencia de lo reportado por Pruijboom-Brees y col., 2000 y Hoey y col., 2002 quienes sugieren la ausencia del receptor Gb3 en glomérulo del bovino. Varios trabajos (Valdivia 2003, Obrig y col., 1993) sugieren que el LPS y otros componentes bacterianos, tienen un efecto de modulación sobre la expresión de los receptores Gb3 en las células, por lo que la infección con las bacterias completas inducen la sobre expresión de dicho receptor llevando a una mayor susceptibilidad, así mismo, la edad tiene influencia en la expresión de los receptores para la toxina (Obrig y col., 1993).

Los datos recopilados en el presente trabajo indican que los becerros de 2 días de edad pueden ser colonizados por cepas STEC, aún en ausencia de *eaeA*, la toxina es liberada y absorbida llegando a afectar a nivel local (aparato gastrointestinal) principalmente con una lesión vascular con hemorragia y edema, así como destrucción de algunas zonas de enterocitos. Posteriormente se observan efectos a nivel sistémico, principalmente en los órganos linfoides, caracterizado por una disminución de los linfocitos y por otro lado se puede apreciar un efecto a nivel renal, con destrucción de las células epiteliales de la nefrona. Esta patogenia ha sido previamente descrita en modelos experimentales realizados en conejos (Cortes, 2003; Romero, 2008, y Valdivia 2003).

Los efectos en los becerros inoculados con una dosis de  $10^{11}$  UFC, fueron letales y se presentaron muy rápidamente (1-3 días) por lo que es posible que la dosis infectante en estos animales sea muy baja, quizá de 100 UFC como se reporta en humanos (Máttar y col., 2001) y en modelos experimentales en conejos (Pérez, 2002).

La ausencia de datos de infección y enfermedad en bovinos adultos, considerándolos sólo como reservorios, puede estar basada en que al parecer carecen de receptores para las bacterias y/o toxinas, tanto a nivel intestinal como sistémico, y aunque existen estudios donde se ha inoculado becerros con cepas STEC aisladas de brotes de diarrea hemorrágica en humanos (Brown y col., 1999), no causando enfermedad en becerros, sugiere que las cepas STEC podrían tener diferentes mecanismos de colonización entre ambas especies (Stevens y col., 2002) y que las cepas de origen humano no ocasionan enfermedad en becerros, sin embargo las cepas STEC procedentes de becerros con diarrea, causan enfermedad en los becerros inoculados con estas cepas.

En México existen pocos datos que relacionen la presencia de cepas STEC y las enfermedades en animales, sin embargo el presente trabajo corrobora que estas cepas han estado presentes en el país y se han asociado a enfermedad en diversas especies como bovinos (Valdivia 1995, Aranguré 2007), porcinos (Vázquez, 2007) y caninos (Estrada 2008), además de que cepas aisladas pueden mantener sus características de virulencia conservadas en el laboratorio aún después de 15 años, como lo son los genes *stx1* y *stx2* identificados en el año 2007 (Aranguré), y tres años después en el presente trabajó.

Una posibilidad de la baja cantidad de reportes en México puede estar relacionada al nivel muy bajo de diagnóstico en los bovinos, en los que raramente se llega a establecer la presencia de *Escherichia coli* en un coprocultivo, pero no se realizan pruebas para detectar los factores de virulencia de estas cepas.

Todo esto sugiere que las cepas STEC aisladas de brotes de diarrea son capaces de reproducir enfermedad en becerros recién nacidos a nivel intestinal y sistémico, y que la presencia de toxinas de Shiga puede ocasionar lesiones.

## 9 CONCLUSIONES

- I. La cepa de *Escherichia coli* O26:H- que fue aislada de un brote de diarrea y que expresa factores auxiliares de virulencia al ser inoculada en becerros recién nacidos, fue capaz de reproducir el cuadro clínico, provocando disfunciones y muerte en el segundo día postinoculación.
- II. La inoculación de la cepa de *Escherichia coli* O26:H- fue capaz de desarrollar una diarrea hemorrágica, con lesiones macroscópicas en tracto digestivo, como lo fueron edema, hiperemia y contenido de gas y lesiones microscópicas como fueron hemorragias, atrofia de las vellosidades, infiltración leucocitaria, y depleción linfoide en bazo y linfonodos mesentéricos, a diferencia del grupo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* K12C600 que no presentó lesiones.
- III. Se demuestra que los becerros son susceptibles a cepas aisladas de origen de diarreas en bovinos, y que estas cepas STEC, son causantes de enfermedad por si solas en los becerros.
- IV. La cepa de *Escherichia coli* O26:H- empleada en este trabajo fue obtenida del primer reporte de México de enfermedad en bovinos causadas por cepas STEC.

## 10 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga se encuentran en el país y pueden ser un problema en los hatos ya que se demostró una mortalidad y gran susceptibilidad en animales recién nacidos, así mismo puede llegar a ser un problema de salud pública para humanos por lo que se recomienda implementar medidas y herramientas para la identificación y manejo de estas cepas STEC.

En este proceso se logró mantener durante 15 años de forma pura estas cepas STEC aisladas del brote de diarrea en becerros, por lo que la metodología empleada para la conservación y manejo de estas cepas pudiera ser empleada para futuros aislamientos.

Se recomienda seguir con el proceso de investigación, para determinar la susceptibilidad de los animales por estas cepas STEC, por ejemplo realizar basados en este modelo animal presentado, un desafío con animales con calostro y de diferentes edades y con diferentes dosis de concentración bacteriana, para así poder determinar las lesiones y disfunciones provocadas por estas cepas.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Aranguré P. R, 2007. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga aisladas en la zona norte del valle de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- 2 Armitage E. N., Berry G. 2000. Estadística para la Investigación Biomédica. Harcourt Breace. Barcelona España. 429-433.
- 3 Beutin L., Geier D., Seinruck H., Zimmermann S., Scheutz F 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin Microbiol. 31: 2483-8.
- 4 Berguey D. 1984. Manual of sistematic Bacteriology Edit Board , Vol. 1 pág. 414-416. USA.
- 5 Bettelheim K.A. 2000. Role of non-O157 VTEC. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 385-505.
- 6 Blanco J., Blanco M., Blanco J., Mora A., Alonso M., González E., y Bernárdez H. 2000. Serotipos y genes de virulencia de *Escherichia coli* verotoxigénicos Tipado por PCR de los genes de la isla de patogenicidad LEE de *E. coli* verotoxigénicos y *E. coli* enteropatógenicos edit. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. Pág. 1-15.
- 7 Blanco J., Blanco M., Blanco J., Mora A., Alonso M., González E., Bernárdez H., 2000 *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Edit. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. España pág 1-22.
- 8 Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Mora, A., Prado, C., Alonso, M.P., Mouriño, M., Madrid, C., Balsalobre, C., Juárez, A., 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. Vet. Microbiol. 54, 309–319.
- 9 Blanco J, Blanco M. ETEC, NCEC y VTEC de origen humano y bovino, Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Galicia: Servicio de Publicaciones Diputación Provincial San Marcos España; 1993. P. 35-316.
- 10 Blanco JE, Blanco M, Blanco J. ETEC, VTEC en alimentos y muestras clínicas. Papel de los animales como reservorios de cepas patógenas para el hombre. Microbiología SEM 1995; 11:97-110.
- 11 Blood D. C., Studdert V. P., Gay C. 2007. Saunders comprehensive veterinary dictionary. Saunders Elsevier 3 edit. Toronto Canada.
- 12 Brown C., Harmon B., Zhao T., Doyle M. 1996. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. Microbiol. 63, 27-32.
- 13 Carrillo L. 2003. Microbiología agrícola. Capt. 2; 2-4.
- 14 Chanter, N., Hall, G. A., Bland, A. P., Hayle, A. J. & Parsons, K. R. (1986). Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). *Vet Microbiol* 12, 241±253.
- 15 Cicuta M., Deza N., Roibón W., Pereyra D., Benitez M., Arzú R., Boehringer S. 2006. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina *Shiga* en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. *Rev. Vet.* 17:1, pág. 20 –25.

- 16 Cornick N.A., Booher S.L., Moon H.W. 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect. Immun.* 70, 2704-2707.
- 17 Cortes N. 2003. Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. Tesis de licenciatura, UNAM, FESC, México.
- 18 Dean-Nystrom E., Bosworth B., Cray W., Moon J. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal Calves., *Infec. Immun.*, 65, No. 5, p. 1842–1848.
- 19 Díaz S., Ripoli M.V., Peral-García P., Giovambattista G. 2005 Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. los loci del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta veterinaria* 2005; 25 (1): 40-52.
- 20 Dorn CR, Francis DH, Angrick EJ. Characteristics of Vero cytotoxin producing E. Coli associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. *Vet Microbiol* 1983; 36: 149-159.
- 21 Enami M., Nkasone N., Honma Y., Kakinohana S., Kudaka J., Iwangaga M. 1999. Expression of type 1 pili is abolished in verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Lett.* 179, 467-472.
- 22 Estrada E. 2008. Detección de cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) a partir de caninos de la zona metropolitana. Tesis de Licenciatura, UNAM. FESC. México.
- 23 Estrada F. G. 1992. Manual de técnicas histológicas, AG editor, México; 27-70.
- 24 Fairbrother J. M., Nadeau E. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 25 (2), 555-569.
- 25 Gaete B. A. 1996. Manual de técnicas histológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas. Tesis de Licenciatura FESC-UNAM. México
- 26 Ferens, W. A., Hovde, C. J. 2000. Antiviral activity of Shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 68, 4462±4469.
- 27 Franklen G., Phillips A.D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B., Knutton S. 1998. Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30, 911-921.
- 28 Gasque G. R., Posadas M.E. 1998 Requerimientos nutricionales del ganado bovino lechero, Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia., UNAM. México
- 29 Grauke, L. J., Kudva, I. T., Yoon, J. W., Hunt, C. W., Williams, C. J. & Hovde, C. J. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 68, 2269±2277.
- 30 Gutiérrez A., 2004. Alteraciones de los fluidos corporales, electrolitos y balance ácido-base. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).
- 31 Gyles C.L., Prescott J. F., Songer J.G., Thoen C.O. 2004 Pathogenesis of bacterial infections in Animals. Third edition. Blackwell Publishing. Pais
- 32 Hernandez R., Fernandez P., Baptista. 1993. Metodología de la Investigación. MC. Graw-Hill. México, D.F.
- 33 Hoey D.E., Currie C., Else R., Nutikka A., Linwood C.A., Gally D.L., Smith D.G.E., 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J. Med. Microbiol.* 51, 143-149.

- 34 Hoet Armando E., Boscán Leonardo., 2005 Manual de ganadería de doble propósito, Capt.11 340- 347.COMPLETAR
- 35 Holland, R.E., Wilson, R.A., Holland, M.S., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Mullaney, T.P., White, D.G., 1999. Characterization of *eae+* *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Veterinary Microbiology* 66, 251–263.
- 36 Hwa J. L., Hur J., Stein D. B., 2008. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. *The Veterinary Journal*; 176:205-209.
- 37 Jenkins C., Pearce M.C., Smith A.W., Knigth H.I., Shaw D.J., Cheaty T., Foster G., Gunn G.J. 2002. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probes techniques. *Appl. Microbiol.* 37, 207-212.
- 38 Jubb. K.V., Kennedy P.C., Palmer N. 1985. *Pathology of domestic animals.* Academic press, 2.
- 39 Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983;1:619-620.
- 40 Kaper, J. B. 1998. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 51:S101-S107.
- 41 Karper J. B., Nataro J. P., Mobley H. 2004 *Pathogenic Escherichia coli.*, *Nature reviews Microbiology* 2: 123.
- 42 Konowalchuk J., Speire J., Stavric S. 1977 Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*; 18: 775-9.
- 43 Lui W.C., Jenkins C., Shaw D.J., Matthews L., Pearce M.C., Low J.C., Gunn G.J., Smith A.W.2005. Modeling the epidemiology of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups in young calves, *Epidemiol. Infect.* 133, 449-458.
- 44 López S.C., Cerna J.F., Sepulveda N. V., Thompson R.J., Velázquez F.R., Torres J., Tarr P.I., Estrada T.G. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emmer, infect. Dis.* 9, 1127-1131.
- 45 Mainil J.G., Duchesnes C.J., Whipp S.C., Marques L.R.M., O'Brien A.D., Casey T.A., Moon H.W. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *E. coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 49: 743-747.
- 45 Mainil J. (1999). Shiga}verocytotoxins and Shiga}verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet Res* 30, 235±257.
- 46 Máttar S., Visbal J., Arrieta G. 2001. *E. coli* O157:H7 Enterohemorrágico: Un agente etiológico de diarrea en Colombia subestimado segunda parte. *Rev. MVZ Córdoba*, 6, 81-86.
- 47 McDaniels T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S., Karper J.B.1995. A genetic locus enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1664-1668.
- 48 Menge C., Blessenohl M., Eisenberg T., Stamm I., Baljer G. 2004. Bovine Ileal Intraepithelial Lymphocytes Represent Target Cells for Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72: 1896-1905.

- 49 Menge C., Wieler L., Schlapp T., Baljer G. 1999. Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli* Blocks Activation and Proliferation of Bovine Lymphocyte Subpopulations *In Vitro Infect. Immun.* 67: 2209-2217.
- 50 Mercado E. C. 2006 Control de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino., *MEDICINA (Buenos Aires)*; 66 (Supl. III): 33-36.
- 51 Montesinos R.L. 2003. La técnica de necropsia en bovinos. Memorias Memorias del Curso precongreso necropsias, toma y envío de muestras en bovinos, 1-5.Pais
- 52 Narváez-Bravo C. A., Carruyo-Núñez G., Moreno M., Rodas-González A., Hoet A. E., Wittum T. E. 2007. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ.* XVII, N° 3, 239 – 245.
- 53 Nataro J. P, Karper J. B. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:142-201.
- 54 Naylor S., Low C., Besser T., Mahajan A., Gunn G., Pearce M., McKendrick I., Smith D., Gally D. 2003. Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host infect. *J. Med. Microbiol.* 71:1505-1512.
- 55 Notario R., Fain J., Prado J., Ríos V., Borda O., Gambandé G Telma. 2000Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágico en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal *Revista médica Chile*; 128 n. 12 .pág 2- 20.
- 56 O'Brien A. D., Holmes R. K., 1987. Shiga and Shiga- Like toxins. *Microbiol Rev*; 51:206-220.
- 57 O'Loughlin E.V., Robins-Browne R.M., 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins in eucariotic cells. *Microbes. Infect.* 3, 493-507.
- 58 Obrig T., Chandra B. Louise SBC, lifford A. Lingwood., 1993 Endothelial Heterogeneity in Shiga Toxin Receptors and Responses. *J. Biol. Chem.* V. 268, 15484-15488.
- 59 Olguín A. 2005. Diarrea en becerros. *Rev. Bovinotecnia.* 7:Completar
- 60 Oskov I. and Oskov F. 1984. Serotyping of *Escherichia coli* In *Methods in Microbiology.* Vol.14 Ed. T. Bergan. New Cork: Acad. Press. 43-112.
- 61 Parma A., Sanz M.E., Blanco J.E., Blanco J., Vinas M.R., Blanco M., Padola N., Etcheverria A.I. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina importance in public healt. *Eur. J. Epidemiol*16, 757- 762.
- 62 Paton A. and Paton J. 1997. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO11*, and *rfbO157*. *J. Of Clinical Microbiology*, 36: 598-602.
- 63 Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C.,2001. Characterization of *Saa*, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 69, 6999–7009
- 64 Pierard OP. Infection with verotoxin-producing *E. coli*. *Acta. Clin. Belg* 1992; 47 (6): 387-396.

- 65 Pistone, Creydt, Venzano, Vilte, Mercado C., Ibarra. 2005 Efecto citotóxico en colon humano de *Escherichia coli* enterohemorrágico aislado de terneros con diarrea sanguinolenta. Rev. Argent. Microbiol. v.37 n.3 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- 66 Pérez M., 2002. Efecto de la respuesta inmune provocada por *Escherichia coli* (O157:H7) Verotoxigénica inoculada en el apéndice cecal del conejo. Tesis de Licenciatura. UNAM. FESC, México.
- 67 Pruijboom-Bress I.M., Morga T.W., Arkermann M.R., Nystrom E.D., Samuel J., Cornik N.A., Moon H.W. 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10325- 10329.
- 68 Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med;308:681-685.
- 69 Rodríguez A. G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*; Salud Publica Mex; 44:464-475.
- 70 Romero M. 2008. Expresión del Receptor Gb3 para las toxinas de Shiga (STx) en conejos infectados experimentalmente con *Escherichia coli* enterohemorrágica. (EHEC)., Tesis de Licenciatura UNAM., FESC. México
- 71 Roy J.H.B. 1980. The Calf. 4th ed. Butterworths, London.
- 72 Sánchez A., Guerrero R. 1982. Genética molecular bacteriana. Edit. Reverte, España.
- 73 Sandhu K.S., Clarke R.C., McFadden K., Brouwer A., Louie M., Wilson J., Lior H., Gyles C.L. 1996. Prevalence of the eaeA gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains for dairy cattle in Southwest Ontario. Epidemiol. Infect. 116, 1-7.
- 74 SENASA. 2006. Manual de procedimientos de desinfección. Sanidad animal.
- 75 Schmidt H., Scheef J., Huppertz H.I., Frosch M., Karch H. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- that not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 37, 3491-3496.
- 76 Stevens M.P., van Demien P., Dviza F., Jones P.W., Wallis T.S. 2002. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiol. 148, 3767-3778.
- 77 Stordeur P., China B., Charlier G., Roels S., Mainil J. 2000. Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. Microbes and Infection, 2: 17–24.
- 78 Su C.H., Brandt L.J. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans. Ann. Int. Med. 123, 698-714.
- 79 Torres A., Zhou X., Kaper J. 2005. Adherence of diarrheogenic *Escherichia coli* O157:H7 strains to epithelial cells infect. Immnu.
- 80 Usera Miguel A 2005 *Escherichia coli* O157 productor de verotoxina: un resumen práctico EDIT. Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.
- 81 Valdivia A.G. 1992 *Escherichia coli* Citotóxicas aisladas de Terneros. Memorias del XXII Congreso Nacional de Microbiología, Junio, Acapulco Gro.

- 82 Valdivia A. G. 1997. Aislamiento de una cepa de *Escherichia coli* O157:H-Verocitotóxica a partir de un cuadro de diarreas en terneros. Memorias del XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz.
- 83 Valdivia A.G. 1997 Técnica quirúrgica de apendicetomía, con mantenimiento “*in situ*” como modelo de cirugía experimental en conejos. Memorias del XI Foro de Investigación Multidisciplinaria, FESC, Méx.
- 84 Valdivia A.G. Modelo animal en el conejo para el estudio de cepas citotóxicas de *Escherichia coli*. 1995 Tesis de Maestría Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
- 85 Van Diemen P., Dziva F., Stevens., Wallis T. 2004. Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- Genes Required for Intestinal Colonization in calves. *Infect. Immun.*, vol. 73.:1735-1743.
- 86 Vázquez B.C., 2007. Aislamiento y caracterización patogénica de cepas de *E. coli* productoras de toxina semejante a Shiga de cerdo con enfermedad del edema. Tesis de Licenciatura, UNAM. FESC, México
- 87 Welinder-Olsson C, Eriksson E, Kaijser B. 2005. Virulence genes in verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle. *APMIS.*;113(9):577-85.
- 88 Wells J., Shipman L., Greene K., Sowers E., Green J., Cameron D. 1991 Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E coli* from dairy cattle. *J Clin. Microbiol.* 29:985-9.
- 89 Wieler L.H., Vieler E., Erpestein C., Schlapp T., Steinrúnck h., Baurerfeind R., Byomi A., Baljer G. 1996. Shiga producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *Infect, Immun.* 34, 2980-2984.
- 90 Witthan T., Kaye W., Wilson R. 1988 Genetic evidence of clone descendent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*;157(6):1124-33
- 91 Zamora J., Reinhardt G., Polette M., Macías P. 2000 Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT Y VT, Instituto de microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, casilla 167, V32n.1\_pág. 3 –9.