

01672  $\frac{1}{2}$  2oj.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFLUENCIA DEL PLASMIDO CoIV EN LA FAGOCITOSIS in vitro DE *Escherichia coli*.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

presenta

YOLANDA DEL CONSUELO ALMANZA MARQUEZ

Asesores:

Phd. MsC. MVZ. José López Alvarez

Phd. MVZ. Jorge Pérez Martínez

MEXICO, D. F.

1992





## **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 está 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.

## RESUMEN

Almanza Márquez Yolanda del Consuelo. Influencia del plásmido ColV en la fagocitosis in vitro de *Escherichia coli*. (bajo la dirección del Dr. José López Alvarez y el Dr. Jorge Pérez Martínez).

Se detectó la presencia del plásmido ColV en una población limitada de cepas septicémicas de *E. coli* y se les determinó su virulencia midiendo su  $DL_{50}$ . Las dos cepas más virulentas (YA4 ColV\* y YA21 ColV\*) se utilizaron para comparar el efecto del plásmido ColV en la virulencia y en la resistencia a la fagocitosis. Estas cepas se sometieron a diferentes tratamientos para tratar de obtener sus isogénicas libres del plásmido ColV y ColV\* colicina V. Además a la cepa de laboratorio *E. coli* K12 711 se le introdujo el plásmido ColV, proveniente de la cepa YA4, para obtener su isogénica 711 ColV\*. Se compararon los efectos sobre los tratamientos en la cepa silvestre *E. coli* YA21 ColV\* con su isogénica YA21 ColV\*, y a la 711 con su isogénica 711 ColV\*. Aunque se obtuvo la cepa *E. coli* YA21 ColV\* colicina V, se descartó su uso por disminuir notoriamente su tiempo de reproducción. En los estudios de virulencia se demostró que el plásmido ColV participa en ella. Se analizó la influencia del plásmido ColV en la interacción bacteria-fagocito, mediante los análisis de bacterias asociadas o no a los macrófagos, el número de microorganismos del sobrenadante y posterior a la lisis de los macrófagos. Adicionalmente se compara la capacidad de adherencia al vidrio de las cepas en estudio. El análisis de los resultados nos permite proponer que las cepas ColV\* tienen una mayor capacidad de supervivencia y que probablemente participan en

la codificación para la síntesis de alguna adhesina u otra molécula que le permite adherirse a los macrófagos pero que también evita que sea internalizada fácilmente.

## CONTENIDO

### Página

#### **Capítulo 1**

Revisión de literatura

Mecanismos de patogenicidad mediados por

plásmidos: El plásmido ColV..... 1

Introducción general..... 11

#### **Capítulo 2**

Detección del plásmido ColV en cepas

septicémicas aviares..... 13

Material y métodos..... 13

Resultados..... 15

Discusión..... 15

#### **Capítulo 3**

Determinación de la virulencia en cinco

cepas de *Escherichia coli* ColV<sup>+</sup>..... 17

Material y métodos..... 18

Resultados..... 20

Discusión..... 22

#### **Capítulo 4**

Manipulación del plásmido ColV..... 23

Material y métodos..... 23

Resultados..... 27

Discusión..... 30

## **Capítulo 5**

El plásmido ColV en la virulencia bacteriana.....	32
Material y métodos.....	32
Resultados.....	34
Discusión.....	35

## **Capítulo 6**

Interrelación de <i>Escherichia coli</i> con macrófagos peritoneales de pollo.....	39
Material y métodos.....	40
Resultados.....	45
Discusión.....	53
<b>Discusión general</b> .....	56
<b>Conclusiones</b> .....	59
<b>Literatura citada</b> .....	60
<b>Apéndice 1: Medios de cultivo y reactivos</b> .....	71
<b>Apéndice 2: Curvas de crecimiento bacteriano de cinco cepas aviares de <i>E. coli</i> ColV<sup>+</sup></b> .....	73
<b>Apéndice 3: DL<sub>50</sub> de cinco cepas de <i>E. coli</i> aviares por el método de Reed y Muench utilizando un modelo de pollo de engorda</b> .....	79
<b>Apéndice 4: DL<sub>50</sub> de <i>E. coli</i> ColV<sup>+</sup> y ColV<sup>-</sup> por el método de Reed y Muench usando un modelo murino</b> .....	85

## CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1.1. Características mediadas por plásmidos que ayudan a la supervivencia bacteriana.....	2
1.2. Asociación de plásmidos con mecanismos de patogenicidad bacteriana.....	3
3.1 Virulencia y patrones de resistencia detectados en cinco cepas de <i>E. coli</i> ColV <sup>+</sup> aviares.....	21
4.1 Manipulación del plásmido ColV de dos cepas de <i>E. coli</i> aisladas de septicemia aviar.....	28
5.1 Virulencia en pollos por <i>E. coli</i> ColV <sup>+</sup> y ColV <sup>-</sup> .....	36
5.2 DL <sub>50</sub> de <i>E. coli</i> ColV <sup>+</sup> y ColV <sup>-</sup> (modelo murino).....	37
6.1 Interacción de <i>E. coli</i> ColV <sup>+</sup> y ColV <sup>-</sup> con macrófagos peritoneales de pollo <i>in vitro</i> .....	46
6.2 Microorganismos extracelulares e intracelulares después de 90 minutos de incubación con macrófagos peritoneales de pollo.....	48

## FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
2.1 Detección de colicina V por el método de la sobrecapa.....	16
6.1 Interacción fagocito-bacteria usando <i>E. coli</i> YA21 ColV <sup>+</sup> .....	49
6.2 Interacción fagocito-bacteria usando <i>E. coli</i> YA21 ColV <sup>-</sup> .....	49
6.3 Relación fagocito-bacteria con la cepa <i>E. coli</i> 711 ColV <sup>+</sup> .....	50
6.4 Relación fagocito-bacteria usando la cepa <i>E. coli</i> 711.....	50
6.5 Adherencia al vidrio de <i>E. coli</i> YA21 ColV <sup>+</sup> .....	51
6.6 Adherencia al vidrio de <i>E. coli</i> YA21 ColV <sup>-</sup> .....	51
6.7 Adherencia al vidrio por <i>E. coli</i> 711 ColV <sup>+</sup> .....	52
6.8 Adherencia al vidrio por <i>E. coli</i> 711.....	52

## CAPITULO 1. REVISION DE LITERATURA.

Mecanismos de patogenicidad mediados por plásmidos: El plásmido ColV.

Los plásmidos, moléculas cíclicas de ADN de cadena doble y de replicación autónoma del cromosoma bacteriano, fueron descubiertos en virtud de alguna función reconocible tal como la resistencia a varios antibióticos o la síntesis de proteínas bactericidas. En la actualidad se les puede detectar por técnicas físicas aun sin reconocerles algún efecto fenotípico (por ejemplo los plásmidos crípticos); gracias a estas técnicas se han detectado plásmidos en prácticamente todos los grupos bacterianos (18). La mayoría de los plásmidos llevan genes que no son esenciales para la vida bacteriana, ya que éstos están contenidos en el genoma (18). Sin embargo, cada vez son más las evidencias de que algunos plásmidos juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana ante condiciones desfavorables e inclusive pueden ser capaces de conferir propiedades patogénicas a las células que los hospedan. En los cuadros 1 y 2 se muestran algunos ejemplos.

El plásmido ColV pertenece al grupo de plásmidos llamados bacteriocinógenos colicinogénicos, que codifican para la síntesis de colicinas, sustancias antibióticas altamente específicas de naturaleza proteínica, liberadas por algunas cepas de *E. coli* y otras enterobacterias, cuya especificidad se basa en la unión a receptores específicos de la membrana externa de otras cepas relacionadas (24, 64). Las cepas portadoras de plásmidos colicinogénicos son además inmunes a las colicinas que sintetizan ya que contienen una pequeña

Cuadro 1.1 Características mediadas por plásmidos que ayudan a la supervivencia bacteriana

BACTERIA	PLASMIDO	CARACTERISTICA	REFERENCIA
<u>Streptococcus lactis</u>	pL7 (33 Kb)	Aumenta la resistencia a la luz UV y la estabilidad del profago	15
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	pME	Sistema de resistencia al mercurio	11, 80
<u>Escherichia coli</u>	gen traT de plásmidos de Inc. F	incremento de la resistencia al suero.	2, 6, 56
<u>Escherichia coli</u>	R100	resistencia al Complement.	57
<u>Yersinia enterocolitica</u>	42-48 Md. Expresión dependiente a 37 C	síntesis de proteínas de la membrana externa que inhiben la fagocitosis	28, 43, 61, 94
Bacterias Gram + y Gram -	plásmidos R cuyo determinante de resistencia varia de tamaño según su contenido de genes R	resistencia a los antimicrobianos	18, 23, 34, 81
<u>Vibrio anguillarum</u>	pJMI-like	Secuestro de hierro	83

Cuadro 1.2 Asociación de plásmidos con mecanismos de patogenicidad.

BACTERIA	PLÁSMIDO	MECANISMO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>	pColV	incremento de la virulencia*.	51
<i>Shigella spp.</i>	140 Md		31, 32, 68, 89
<i>Bacillus anthracis</i>	110 Md y 60 Md		85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	42-48 Md		28, 33, 61, 93, 94
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pTi 250 Kd	inducción de tumores en plantas dicotiledóneas	16, 35, 37, 41, 78
<i>Bacillus anthracis</i>	pX02 60 Md	asociación a la síntesis de capsula	29, 40, 85
	pX01	toxina de antrax	40, 82
Cepas enterotoxigenicas de <i>E. coli</i> (ETEC)	56 a 80 Md	síntesis de enterotoxinas (LT y ST)	21, 30, 48, 77
	50 a 70 Md	antígenos de colonización	22, 42
<i>Yersinia enterocolitica</i>	41 Md. Expresión dependiente a 37 C	invasión a tejidos	43, 61, 94
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.5 Kb	capacidad de adherirse a células epiteliales humanas	20, 22
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	118-312 Md	invasión a la mucosa del ileon	36
<i>E. coli</i> invasiva	pVir 92 Md (pJL1 y pJL2)	toxina LTC y antígeno Vir de superficie	45, 46, 70
<i>Staphylococcus aureus</i>		síntesis de enterotoxina	21
	fago grupo II bajo control de plásmido (565) y cromosoma	toxina exfoliativa	21, 89, 92
<i>Shigella flexneri</i>	140 Md	asociado a virulencia por invasividad y proliferación en epitelio de colon y síntesis de antígeno	67, 69, 90

\*No se conoce el mecanismo para el incremento de la virulencia.

proteína de inmunidad que inactiva a la colicina (25). Esta inmunidad es independiente a la resistencia debida a la pérdida por mutacion del receptor específico para la colicina (25).

Se han reconocido alrededor de 20 colicinas, las cuales se designan por letras. La síntesis de una colicina dada es debida a un plásmido correspondiente, identificado con la misma letra; así, se designa como plásmido ColV al que codifica para la síntesis de la colicina V (24, 64, 91).

El plásmido ColV no ha sido completamente caracterizado, pero en los ultimos años se ha incrementado el interés por él y su relacion con la patogenicidad.

Recientemente, se ha demostrado que los plásmidos ColV pertenecen a una clase diversa de plásmidos IncFI, cuyo tamaño varía de 80 a 180 Kb, lo cual podría explicar que se le relacione con una complejidad de factores individuales (91).

Smith (70-75), al realizar una amplia investigación sobre las características de patogenicidad de las cepas invasivas de *E. coli* aisladas de bovinos, corderos, pollos y seres humanos, encontró que era común en estas bacterias la producción de la colicina V y que esta característica podía transmitirse por conjugación y perderse después de someter a las cepas a tratamiento con lauril sulfonato de sodio, mostrando así que esta característica es controlada por un plásmido. Algunas cepas que se convirtieron en ColV fueron moderadamente sensibles a la acción letal de la colicina V (14 de 20) mientras que las restantes fueron marcadamente resistentes. La característica de producir colicina V se podía perder

ocasionalmente después de una serie de pases sucesivos en medios líquidos.

Al analizar el papel que juega el plásmido ColV en la patogenicidad de *E.coli*, Smith derivó formas ColV positivas y ColV negativas de diferentes cepas de *E.coli*, inclusive de cepas no invasivas, y al realizar pruebas de virulencia en pollos y en ratones, encontró que todas las formas ColV fueron claramente más patógenas que las ColV<sup>-</sup> e invariablemente la eliminación del plásmido ColV se acompañó de una disminución de la patogenicidad. En otro experimento, después de realizar sucesivas transferencias del plásmido ColV de una cepa silvestre a una cepa de *E. coli* K12, finalmente encontró un incremento en la patogenicidad. Otros plásmidos Col, como los ColE, los ColIb no aumentaron la patogenicidad de *E. coli* K12 (70, 71, 73).

Además de las pruebas de virulencia, Smith midió la eliminación bacteriana de sangre, líquido peritoneal e hígado después de inocular endovenosamente a ratones y pollos con *E. coli* K12 ColV<sup>+</sup>, ColV<sup>-</sup> y resistentes a la colicina V (Colicina V<sup>r</sup>) y detectó que las ColV<sup>+</sup> tuvieron una mayor capacidad de supervivencia que las ColV<sup>-</sup> y las ColV<sup>r</sup>, inclusive aún después de 24 horas postinoculación. Al medir la supervivencia de éstas cepas en suero de pollo, encontró resultados similares, demostrando con esto que los organismos ColV<sup>+</sup> tienen una mayor capacidad para invadir tejidos y para resistir los mecanismos de defensa del hospedero.

Smith y Huggins (73, 74) detectaron una alta prevalencia del plásmido colV en cepas invasivas de *E. coli* aisladas de bovinos (25 de 31), ovejas (3 de 5) y pollos (36 de 44). Minshew y cols. (55) en 1978 analizaron su frecuencia a partir

de diferentes aislamientos clínicos en humanos, detectándolo en un 12% en aislamientos a partir de sangre, en 7% de aislamientos de infecciones urinarias y en un 16% de aislamientos de otras infecciones extraintestinales, mientras que en *E. coli* aislada de la flora normal intestinal o de cepas enteropatógenas, no se encontró. Sin embargo, Davies y cols (19) no solamente encontraron un porcentaje mayor en aislamientos extraintestinales en humanos (31.6 % en sangre y 26.2 % en orina), sino que también lo detectaron en aislamientos fecales (13.6 %); ellos consideraron que este aumento se debió a que utilizaron un mayor número de cepas indicadoras de la colicina V.

La mayoría de las infecciones endógenas que derivan en peritonitis, apendicitis u otras complicaciones sépticas se originan en el tracto gastrointestinal, siendo cada vez más común que los organismos entéricos, especialmente *E. coli*, sean los agentes etiológicos predominantes (13). Se ha planteado la posibilidad de que las cepas de *E. coli* portadoras del plásmido ColV tengan mayores posibilidades de sobrevivir a los mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal y de competir con la flora autóctona (13, 73). Smith y Huggins (73) detectaron que las formas ColV\* se volvieron predominantes en *E. coli* de la flora fecal de dos voluntarios que habían ingerido mezclas de cepas no conjugativas ColV\* y ColV' o de ColV\*, ColV' y ColV'. Inclusive en uno de estos voluntarios la cepa ColV' predominó durante varias semanas. Estos investigadores, en otro experimento, inocularon oralmente a grupos de pollos con cepas ColV' y ColV' y posteriormente analizar el contenido cecal, detectaron que las cepas ColV\* tuvieron mayor capacidad de sobrevivir; por otro lado (72), al inocular oralmente con estas cepas

a becerros privados de ingerir calostro, los hallazgos de las cepas CoIV\* y CoIV<sup>-</sup> fueron similares en las diferentes regiones del tracto alimentario, así, en nódulos linfáticos, sangre, hígado, bazo, pulmón, músculos, riñones, cerebro y en líquido cefalorraquídeo, se encontraron muchos más organismos CoIV\* que CoIV<sup>-</sup>. En contraste, en algunos aislamientos de orina y bilis se encontraron cepas CoIV<sup>-</sup>, estos hallazgos pudieran sugerir que las cepas CoIV<sup>-</sup> son eliminadas más fácilmente. Claney y Savage (13) midieron la capacidad del plásmido CoIV de adherirse a células epiteliales de duodeno de ratón in vitro, para la cual utilizaron cepas isogénicas de *E. coli* de laboratorio K12 CoIV\* y CoIV<sup>-</sup> y encontraron que hubo una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.0005$ ) en el número de bacterias viables adheridas. Los autores consideraron que aunque este experimento fue in vitro, las formas CoIV pudieran tener la capacidad de adherirse para posteriormente penetrar al torrente sanguíneo y causar una infección generalizada, característica de *E. coli* CoIV\*.

Otros investigadores (1, 5, 17, 51, 62, 74) han corroborado la participación del plásmido CoIV en la virulencia bacteriana; empero, el papel de la colicina V como un mecanismo de patogenicidad no ha sido claramente dilucidado. Ozanne y cols. (58, 59) analizaron la producción de la colicina V in vitro e in vivo y, entre otros hallazgos, encontraron que la colicina V es relativamente termoestable, ya que al someterla a 60°C por tres horas o a 100°C por 20 minutos, conservó su actividad bactericida, pero no resistió el tratamiento de autoclave. Los mismos autores detectaron la producción de colicina V en líquido peritoneal de ratones a las 10 o 12 horas postinoculación intraperitoneal con cepas CoIV\*, aún en ratones

agonizantes. Analizaron el efecto de la colicina V sobre la fagocitosis in vitro con una cepa resistente a dicha colicina, detectando una disminución en la fagocitosis. También detectaron una permeabilidad vascular incrementada al inocular subcutáneamente colicina V y endotoxina. Sin embargo, al inocular únicamente dializados colicinogénicos o dializados tripsinizados, los resultados fueron negativos. Al inocular una mezcla de células de *E. coli* ColV\* viables con otras bacterias Gram negativas muertas, con una dosis subletal, se incrementó en 40% la mortalidad en ratones en relación a la mortalidad observada en ratones inoculados únicamente con las cepas ColV\* y un 90% más que cuando se inoculó la mezcla de un número similar de bacterias de una cepa no colicinogénica con bacterias muertas, por lo que propusieron que la colicina V pudiera potencializar el efecto de la endotoxina.

La posible relación entre la producción de la colicina V con el incremento de la virulencia fue analizada por Quackenbush y Falkow (62), para lo cual inactivaron a los genes que codifican para su síntesis mediante la inserción del transposon Tn1 en el plásmido ColV y posteriormente seleccionaron a esta cepa ColV\* colicina V\* y compararon su virulencia con otras cepas isogénicas ColV\* y ColV en ratones. Las cepas portadoras del plásmido ColV no productoras de colicina V fueron más virulentas que las cepas ColV\*. La mortalidad que produjeron fue similar a la producida por las cepas ColV\* colicina V\*, por lo que quedó demostrado que la colicina V por sí misma no es esencial para el incremento de la virulencia, aunque los genes determinantes de la virulencia podrían estar relacionados con los genes de la colicina V. Otros investigadores han encontrado resultados similares (5, 51,

74).

La habilidad de las cepas de *E. coli* ColV\* para invadir el torrente circulatorio y causar infecciones extraintestinales, ha generado otras investigaciones que lo relacionan con la evasión o la resistencia a las defensas del hospedero. Así, se ha encontrado que las cepas ColV\* presentan una mayor resistencia a la actividad bactericida del suero (2, 5, 7, 39, 57), inclusive se ha identificado a un fragmento del plásmido ColVI-K 94 independiente de la síntesis y al de inmunidad a la colicina V, que contiene genes que incrementan la virulencia y la supervivencia al suero (locus iss) y se ha propuesto que dichas actividades se relacionan con un bloqueo de la fracción terminal del complemento (5, 6, 56).

Además del plásmido ColV se han asociado también otros elementos como otros plásmidos, al antígeno K 1, la capacidad de producir hemolisina y a diversos serogrupos O (1, 2, 7, 10, 17, 26, 39, 44, 45, 54, 66, 74, 75, 86, 87).

En los últimos años se ha demostrado que el plásmido ColV codifica para la síntesis de un sideróforo de tipo hidroxamato, similar a la aerobactina, que les permite a las cepas ColV\* competir con proteínas séricas como la transferrina, para la captación de hierro, mineral esencial para el metabolismo de *E. coli*. Aunque este proceso es independiente del sistema de enteroquelina mediado por genes cromosomales, se han clonado genes del cromosoma que determinan las funciones para la captación de la aerobactina, por lo que se ha sugerido que se requiere de la participación de ambos (4, 8, 9, 12, 88).

El plásmido ColV parece ser partícipe en la patogenicidad de las cepas septicémicas de *E. coli*, tanto en aves domésticas (38) como en algunas

**especies de mamíferos.**

## INTRODUCCION GENERAL.

El síndrome colisepticémico, se presenta frecuentemente en el hombre, becerros, corderos y aves, siendo una infección generalizada por ciertas cepas de *E. coli* (17, 55, 66, 73).

Poco se sabe de la manera cómo *E. coli* es capaz de evadir o neutralizar las defensas del hospedero durante la colisepticemia, sin embargo en los últimos años se han incrementado las investigaciones para tratar de entender los mecanismos de patogenicidad que intervienen en esta enfermedad. Así, se ha descrito que muchas de las cepas septicémicas son portadoras del plásmido ColV (1, 19, 55, 70, 71, 73). A este plásmido se le ha asociado con la virulencia (1, 22, 51, 62, 73, 74, 93), con la resistencia a la actividad bactericida del suero (5, 6, 39, 56, 93), y con el secuestro de hierro (4, 12, 88, 89), metal esencial para el metabolismo bacteriano.

Por otro lado, se ha encontrado que las cepas septicémicas son más resistentes a la fagocitosis, que las cepas enteropatógenas de *E. coli* (50, 73). La resistencia de *E. coli* a la fagocitosis se ha relacionado con la virulencia de la bacteria (65) y con diversas estructuras bacterianas como el antígeno capsular K (7), la pared celular (49), y la fimbria (76).

Existe la posibilidad de que la colicina V, codificada por el plásmido ColV participe en la resistencia a la fagocitosis (58, 59).

Planteamos la posibilidad de que las cepas de *Escherichia coli* que poseen el plásmido ColV son más virulentas y más resistentes a la fagocitosis

que aquellas que no lo poseen.

El objetivo general es contribuir a determinar el efecto del plásmido ColV sobre la virulencia de *E. coli* y sobre la relación fagocito-bacteria.

Los objetivos específicos son primeramente detectar al plásmido ColV en una población limitada de cepas septicémicas aviares, medir la virulencia de cinco de éstas cepas que sean ColV<sup>+</sup>, seleccionar las que muestren más virulencia para construir las cepas isogénicas de campo y de laboratorio ColV<sup>+</sup> y ColV<sup>-</sup> para determinar su DL<sub>50</sub> y para medir su interacción con los macrófagos peritoneales de pollo in vitro.

## Capítulo 2.

### Detección del plásmido ColV en cepas septicémicas aviáres

Se decidió detectar la presencia del plásmido ColV en una población limitada de cepas septicémicas de *E. coli*, para estudiar posibles asociaciones epidemiológicas y al mismo tiempo obtener cepas silvestres portadoras de este plásmido para ser utilizadas en nuestros estudios de virulencia y sobre la relación fagocito-bacteria.

#### Materia y Métodos.

**Bacterias.** Se utilizaron 35 cepas septicémicas de *E. coli* aisladas en el Dpto de Producción Animal: Aves de la FMVZ UNAM. Las cepas fueron caracterizadas bioquímicamente de acuerdo a las pruebas recomendadas por Edwards (21). Para detectar a las cepas colicinogénicas, se utilizó *E. coli* K12 711 (F(-), lac-28, his-15, trp-30, proC-23, Nal<sup>r</sup>) sensible a todas las colicinas y su isogénica K12 mutante resistente a la colicina V obtenida mediante el procedimiento descrito mas adelante. Como cepas testigo se utilizaron las cepas de referencia *E. coli* B88 ColV\* y *E. coli* B88 ColV-. Las cepas se mantuvieron en un medio de cultivo semisólido (Apéndice 1), en viales herméticamente cerrados y guardados a temperatura ambiente en la oscuridad.

**Medio de cultivo rico en colicina V.** Este medio se utilizó para obtener a la cepa

K12 mutante resistente a la colicina V, se preparó un medio de cultivo rico en colicina V, de acuerdo a la técnica descrita por López-Alvarez (45): La cepa E.coli B88 ColV\* se cultivó en 10 ml de caldo nutritivo y se incubó a 37°C durante 12 a 18 hs en baño maría con agitación. Alicuotas de 0.1 ml de este cultivo se sembraron en placas de LTC sólido (apéndice 1), extendiendo el inóculo sobre toda la superficie con una asa de vidrio. Las placas se incubaron a 37°C durante 12 a 18 hs. La cepa de crecimiento bacteriano se inactivó con vapores de cloroformo durante 15 minutos. Se aereó otros 15 minutos para permitir la eliminación del cloroformo. Cada placa con bacterias inactivadas fue cubierta con 5 ml. de agar LTC semisólido (apéndice 1) licuado y conservado en baño maría a 50- 55° y una vez que solidificó la sobrecapa, las placas se refrigeraron por 24 hs para que la colicina V difundiera.

**Selección de cepas mutantes resistentes a la colicina V** La cepa 711 se cultivó en caldo nutritivo y se incubó en baño maría con agitación a 37°C durante 12 a 18 hs. De este cultivo se depositaron alicuotas de 0.1 ml en placas de agar con colicina V, se extendieron con una asa de vidrio y se incubaron a 37°C durante la noche para permitir el desarrollo de mutantes resistentes a la colicina V.

**Detección de cepas productoras de colicina V.** Las bacterias se aislaron en cultivo puro en agar de MacConkey y su capacidad para producir colicina V fué evaluada mediante el método de la sobrecapa (45): Cinco a diez clones de cada cepa se transfirieron con palillos de dientes a placas de agar LTC sólido por triplicado y se incubaron a 37°C durante la noche. Las células de dos de las placas se inactivaron con vapores de cloroformo. La tercera placa sirvió para recuperar

a los clones ColV\*. Cien microlitros de cada una de las cepas indicadoras se suspendió en 2.5 ml de agar LTC semisólido, licuado y conservado a 45°C. A una de las placas tratadas con cloroformo se le agregó una sobrecapa de la cepa 711 sensible; a la otra placa tratada, se le agregó la cepa 711 resistente a la colicina V.

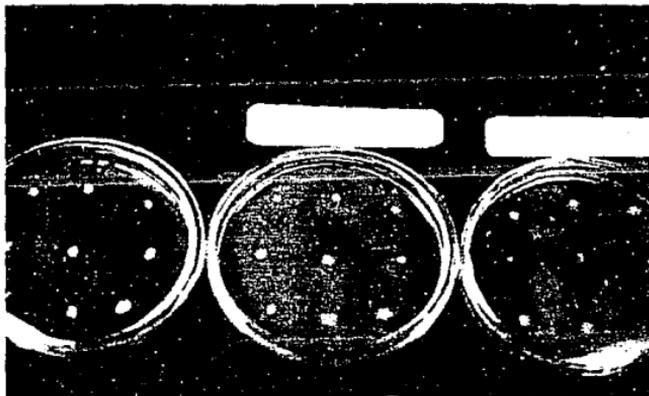
Las cepas productoras de colicina V se detectaron por una zona de inhibición de crecimiento de la cepa sensible alrededor de la colonia, y por la ausencia de un halo de inhibición alrededor de la colonia en la placa con la cepa 711 mutante resistente (fig. 2.1).

## **Resultados**

De las 35 cepas estudiadas, veinticinco (71 %) produjeron colicina V.

## **Discusión**

Los resultados coinciden con los de otros autores en otras partes del mundo (19, 51, 71) y refuerzan el concepto de que la mayoría de las cepas septicémicas de *E. coli* son portadores del plásmido ColV.



**Figura 2.1** Detección de la colicina V por el  
método de la sobrecapa.

### Capítulo 3.

#### Determinación de la virulencia de cinco cepas de *Escherichia coli* ColV+

En los últimos años varios investigadores han analizado algunas características relacionadas con la patogenicidad de las cepas invasivas de *Escherichia coli*. Aunque poco frecuente, en algunas cepas se ha detectado el plásmido Vir, que codifica para la síntesis de una toxina que es letal para conejos, ratones y especialmente para pollos y para un antígeno de superficie (45, 46). Otras características que se han relacionado con la virulencia de estas cepas, son la producción de hemolisina (87), la capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de humano o de pollo (54), la presencia de plásmidos R y del plásmido CcIV (6, 39, 51, 55). La prevalencia del plásmido ColV parece ser más elevada en *E. coli* de origen animal que de origen humano y parece ser que este plásmido juega un papel importante de la virulencia (73, 74). Minshew et al (55) al probar la virulencia de 22 aislamientos extraintestinales de *E. coli*, encontraron diferentes grados de virulencia, ya que hubo 13 que causaron una mortalidad mayor al 60% en embriones de pollo y de éstas, cuatro cepas eran ColV+, mientras que nueve se consideraron avirulentas, por causar una mortalidad menor al 50%, y de éstas, dos fueron ColV\*.

Con la finalidad de comparar la virulencia entre cepas ColV\* y seleccionar a las más virulentas para los siguientes estudios que conlleven al análisis de la interacción del plásmido ColV con los fagocitos, se seleccionaron

cinco cepas aviares ColIV\* que mostraron ser buenas productoras de colicina V y se les determinó su virulencia para pollos de engorda, mediante la  $DL_{50}$  por el método de Reed y Muench (63). Adicionalmente se detectaron los marcadores de resistencia antimicrobiana.

## **Material y Métodos**

### **Bacterias**

Las cepas de E.coli invasiva utilizadas fueron la YA4, YA10, YA12, YA16 y la YA21 (denominación usual, por iniciales del autor), las cuales son buenas productoras de colicina V.

**Susceptibilidad a los antimicrobianos.** Esta se determinó por el método de difusión en agar (47) utilizando agar de Mueller Hinton y diferentes discos de papel filtro impregnados con estreptomomicina (Sm, 10  $\mu$ g), cloramfenicol (Cm, 10  $\mu$ g), eritromicina (E, 15  $\mu$ g), neomicina (Nc, 10  $\mu$ g), tetraciclina (Tc, 10  $\mu$ g), Kanamicina (Km, 30  $\mu$ g), gentamicina (Gm, 10  $\mu$ g), sulfameracina (Su, 25  $\mu$ g), penicilina (Pe, 10  $\mu$ g), ampicilina (Ap, 25  $\mu$ g) y ácido nalidixico (Nal, 30  $\mu$ g).

**Curva de crecimiento bacteriano.** Las cepas se inocularon por separado en 10 ml de caldo nutritivo (CN) contenido en matraces de Erlenmeyer de 50 ml de capacidad. Se incubaron durante 12 a 18 hs a 37°C en baño maría con agitación continua a 250 oscilaciones por minuto. Alícuotas de 0.1 ml de estos cultivos se inocularon en 72 ml de CN contenidos en matraces de 125 ml de capacidad y se

Incubaron en las mismas condiciones. A intervalos de 30 minutos se tomaron alícuotas de 3 ml y se midió su densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 620 nm. Esta determinación se suspendió una vez que se obtuvieron tres lecturas iguales, interpretándose éstas como la fase de crecimiento estacionaria. El experimento se repitió de dos a cuatro veces para cada una de las cepas.

**Estandarización del Inóculo en la fase log para las pruebas de virulencia.** La cepa a probar se cultivó durante la noche en 10 ml de CN a 37°C en baño maría con agitación continua a 250 oscilaciones por minuto durante cuatro horas (fase de crecimiento logarítmico, determinada previamente). El cultivo se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos a 8°C. El paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos con 0.01% de gelatina nutritiva (PBSgel). Se centrifugó en iguales condiciones y se resuspendió nuevamente el paquete celular en 3 ml de la misma solución; se midió su D.O. a 620 nm de longitud de onda y se ajustó a 1.5 de absorbancia para garantizar una elevada cantidad de microorganismos. De este concentrado de bacterias, se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-9}$  y de cada dilución se sembraron cuatro alícuotas de 20  $\mu$ l en placas de agar de MacConkey. Las placas se incubaron durante la noche y se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar el número de bacterias por ml presentes en la suspensión sin diluir.

**Animales de experimentación.** Para cada prueba de virulencia se usaron 60 pollos de engorda de tres semanas de edad mantenidos en baterías con alimento iniciador no medicado y agua ad libitum.

**Prueba de virulencia.** Esta prueba se basó en la determinación de la  $DL_{50}$  por el método de Reed y Mueneh (63). Por cada cepa a probar se formaron 10 grupos de seis aves cada uno y se inocularon por vía endovenosa con volúmenes de 1 ml de una serie de nueve diluciones decimales. A un grupo testigo se le inoculó únicamente PBS adicionado con 0.15 de gelatina nutritiva (PBSgel). La mortalidad se determinó durante 72 horas.

## **Resultados**

**Susceptibilidad a los antimicrobianos.** Las cinco cepas probadas mostraron resistencia a por lo menos dos quimioterapéuticos. A la cepa YA21 se le detectó resistencia a ocho de los 11 quimioterapéuticos probados, la cepa YA12 fue resistente a siete de ellos, la YA4 mostró resistencia a seis, mientras que las cepas YA10 y la Ya16 fueron susceptibles a la mayoría de los quimioterapéuticos utilizados (cuadro 3.1).

**Curva de crecimiento bacteriano.** Las curvas de crecimiento de cada cepa se muestran en el apéndice 2. Puede observarse que en todos los casos, la fase logarítmica de crecimiento quedó comprendida entre la primera y seis horas de incubación. Con base en esto se escogieron cultivos de 4 horas de incubación para garantizar la utilización de bacterias en fase log para las pruebas de virulencia.

**Estandarización del Inóculo.** Utilizando suspensiones bacterianas en fase de crecimiento log, ajustadas a un D.O. de 1.5 de absorbancia fue posible ajustar el

Cuadro 3.1. Virulencia y patrones de resistencia detectados en cinco cepas de E. coli ColV+ aviaries

Cepa	DL50	Resistencias
YA4	$1.6 \times 10^7$	Sm, Cm, Km, Su, Pe, Ap
YA21	$6.8 \times 10^7$	Sm, Cm, E, Tc, Km, Su, Pe, Ap
YA16	$8.0 \times 10^7$	Su, Pe
YA10	$2.8 \times 10^8$	Su, Ap
YA12	$1.4 \times 10^9$	sm, Cm, Tc, Km, Su, Pe, Ap

\* Método de Reed y Muench.

inóculo a  $1.5 \times 10^9$  bacterias por ml.

**Pruebas de virulencia.** La  $DL_{50}$  de las cinco cepas probadas se muestra en el cuadro 3.1. Existe una notoria diferencia en el grado de virulencia entre las cinco cepas ColV\* probadas, siendo la cepa YA12 la menos virulenta, con una  $DL_{50}$  de  $1.4 \times 10^9$  y la YA4 la mas virulenta, con una  $DL_{50}$  de  $1.6 \times 10^7$ .

### **Discusión**

A pesar de que todas las cepas de E.coli fueron ColV\* se observaron diferentes grados de virulencia encontrándose diferencias hasta de dos logaritmos entre la cepa de menor virulencia (YA12) y la de mayor virulencia (YA4). Con estos resultados se cumplió el objetivo de seleccionar a las dos cepas de mayor virulencia (YA4 y YA21) para continuar con nuestro estudio.

## Capítulo 4

### Manipulación del plásmido ColV

Con la finalidad de obtener cepas isogénicas ColV\*, ColV' y ColV\* colicina V', para su posterior análisis en la virulencia se sometieron las cepas de E.coli YA4 ColV\* y la YA21 ColV\* a diversos tratamientos. También se ensayó la transferencia del plásmido ColV a una cepa receptora de E.coli K12 cepa 711. Asimismo, se inactivó la producción la colicina V en la cepa YA21 mediante la inserción del trasposón Tn 1.

#### Material y métodos.

**Bacterias.** Se usaron las cepas de E.coli YA4 ColV\* y la YA21 ColV\* seleccionadas con anterioridad (cap. 3).

En los experimentos de transferencia de plásmido ColV se utilizó como cepa receptora a la cepa K12 711 (F<sup>-</sup> ( ), lac- 28, his-15, trp-30, pro-23, Phe, Nal<sup>r</sup>). La cepa de E.coli UB1636, portadora del plásmido termosensible pMR5 se utilizó como donadora de los trasposones Tn 1 que codifica para la resistencia a la ampicilina y Tn 5, con un marcador de resistencia a la kanamicina.

**Eliminación del plásmido ColV.** Para curar a la cepa de E.coli YA4 ColV\* del plásmido ColV, se sometió a los tratamientos de: a) Incubación a 43°C (79) manteniendo una baja densidad de población bacteriana para evitar la reinfección

del plásmido ColV en las células curadas; b) aplicación de dodecil sulfato de sodio (SDS) en una concentración de 10% (45, 84); c) y aplicación de naranja de acridina (52) en un gradiente de concentraciones. La cepa de E.coli YA21 ColV<sup>+</sup> se sometió únicamente al tratamiento de 43°C.

**A) Incubación a 43°C.** Se usó el método descrito por Staider y Adelberg (79) y por López-Alvarez (45). Las cepas a probar se inocularon en 1 ml de CN y se incubaron a 37°C sin agitación durante la noche; en estas condiciones se obtiene una concentración aproximada de  $8 \times 10^8$  bacterias por ml. Posteriormente se hicieron diluciones decimales en CN precalentado a 43°C para tener una concentración de aproximadamente  $8 \times 10^3$  microorganismos por ml; esta dilución se incubó a 43 °C. A fin de mantener la densidad celular inferior a  $5 \times 10^4$  organismos por ml y evitar la reinfección de las células curadas, al cultivo se le adicionó un volumen igual de CN, precalentado a 43°C (dilución 1:2 v/v) a intervalos de 20 minutos. Después de seis y medio intervalos, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-7}$ . De cada dilución se tomaron alícuotas de 0.1 ml, se sembraron en placas de agar MacConkey y se incubaron toda la noche. A las colonias desarrolladas se les clonó a fin de hacerles la prueba de la colicinogenia (Capítulo 2) y determinar la pérdida del plásmido ColV.

**B) Tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS).** Para este fin se utilizó el procedimiento descrito por Tomoeda *et al* (84) y por López-Alvarez (45). La cepa a curar se inoculó en un ml de CN y se incubó a 37°C durante la noche. Posteriormente se obtuvieron alícuotas de 50 µl de este cultivo, se inocularon en 5 ml de CN adicionado con SDS a una concentración final de 10% (P/V) y se

incubaron en las condiciones antes mencionadas. Al cabo de la incubación, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^9$  en PBS gel y de cada una de estas se hicieron siembras en agar de MacConkey. Colonias individuales fueron transferidas a placas de LTC para hacerles la prueba de la colicinogenia.

**C) Tratamiento con naranja de acridina.** La cepa YA4 ColV<sup>+</sup> se inoculó en un ml de CN y se incubó durante 12 horas a 37°C en baño maría con agitación. Alícuotas de 20 µl de este cultivo se inocularon en tubos con 5 ml de CN que contenían 25, 50, 75, 100 y 125 µg de naranja de acridina por ml y se incubaron durante 24 horas a 37° sin agitación. Pasado este tiempo se hicieron diluciones decimales hasta  $10^9$ , se sembraron alícuotas de 0.1 ml en placas de agar de MacConkey y de las colonias aisladas que se desarrollaron, se determinó la pérdida del plásmido ColV mediante la prueba de la colicinogenia.

**Obtención de la cepa transconjugante 711 ColV<sup>+</sup>.** Las cepas donadoras YA4 y YA21 [ColV<sup>+</sup>, Nal<sup>r</sup>, lactosa positiva (lac<sup>+</sup>)] así como la receptora 711 (ColV<sup>-</sup>, Nal<sup>r</sup>, lac<sup>-</sup>) se inocularon por separado en 1 ml de CN y se incubaron a 37°C sin agitación durante la noche. Alícuotas de 20 µl de una cepa donadora y de la receptora se mezclaron en 1 ml de CN y se incubaron a 37°C sin agitación durante la noche se hicieron diluciones decimales hasta  $10^9$ , y alícuotas de 0.1 ml de cada dilución fueron sembradas en placas de agar MacConkey rico en colicina V (Capítulo 2) y adicionado con ácido nalidíxico (30 µg/ml) para seleccionar a las células 711 ColV<sup>+</sup>. A las colonias que se desarrollaron (lac<sup>-</sup>, colicina V<sup>r</sup>, Nal<sup>r</sup>) se les probó su capacidad de producir colicina V (capítulo 2) para corroborar la presencia del plásmido ColV.

**Obtención de mutantes ColV\* colicina V\*.** Se trabajó con base en la metodología descrita por Quackenbush y Falkow (62). Se utilizaron las cepas de E.coli YA21 ColV\* Ap\*, YA21 ColV\* Ap\* y E.coli UB1636, las características de estas tres cepas se describen en el cuadro 4.1.

A la cepa YA21 ColV\* se le sometió el tratamiento de 43°C para curarla de plásmidos R con marcadores de resistencia a la ampicilina y a la kanamicina, pero cuidando de no perder al plásmido ColV, para lo cual se hicieron clonaciones por triplicado en placas de agar de MacConkey, MacConkey-ampicilina (5µg/ml) y MacConkey-kanamicina (30µg/ml) y posteriormente la prueba de colicinogenia (capítulo 2) para detectar el plásmido ColV.

Las cepas derivadas YA21 ColV\* Ap\* y YA21 ColV\* Km\* se inocularon separadamente en CN y se incubaron a 37°C durante la noche. Al mismo tiempo la cepa UB1636 (pMR5) se sembró en CN y se incubó durante la noche a 30°C. Esta temperatura es necesaria para la replicación del plásmido pMR5. Cien µl del cultivo de UB1636 se mezclaron con 100 µl de cada uno de los cultivos de YA21 ColV\* Ap\* y YA21 ColV\* Km\* en 1 ml de CN y se incubaron a 30°C durante la noche sin agitación para favorecer la transferencia del plásmido pMR5 a las cepas YA21 ColV\* Ap\* y YA21 ColV\* Km\*. Posteriormente, se hicieron diluciones decimales de los cultivos, y de estas diluciones se sembraron 0.1 ml en placas de agar mini-mac-ampicilina (agar mínimo con ampicilina) (apéndice 1) para el caso de la cepa YA21 ColV\* Ap\* y en agar mini-mac-kanamicina (apéndice 1) para la cepa YA21 ColV\* Km\* y se incubaron a 30°C toda la noche para seleccionar a las transconjugantes prototofas que hubieran aceptado al plásmido pMR5. Las

clonas obtenidas se inocularon en CN y se incubaron a 37°C para que al inhibirse la replicación del plásmido pMR5, se forzara la transposición Tn1 o Tn5 y de esta manera buscar mutantes lac<sup>+</sup>, ColV<sup>+</sup>, colicina V<sup>+</sup>, resistente a la colicina V y resistente a la ampicilina o a la kanamicina por la inserción del transposón Tn1 o Tn5. Las mutantes se seleccionaron en los medios de cultivo selectivos mini-mac-kanamicina-ampicilina-colicina V (apéndice 1) o en mini-mac-kanamicina-colicina V (apéndice 1). La pérdida de la capacidad para la producción de la colicina V fué demostrada mediante la prueba de la colicinogenia (capítulo 2).

## Resultados

Con los tratamientos para eliminar el plásmido ColV de las cepas YA4 ColV<sup>+</sup> y YA21 ColV<sup>+</sup> se obtuvieron resultados diferentes (cuadro 4.1). Así, la cepa YA4 ColV<sup>+</sup> que mostró ser la más virulenta en experimentos anteriores, tuvo una mayor resistencia para la eliminación del plásmido ColV, ya que al someterla al tratamiento de 43°C no se pudo curar de dicho plásmido. Con el agente "curante" SDS al 10% si se logró la eliminación del plásmido ColV (cuadro 4.1), pero las clonas curadas mostraron un cambio fenotípico en su morfología de colonias ya que éstas se transformaron en mucoides y extramadamente grandes en comparación con su isogénica YA4 ColV<sup>+</sup> no tratada. Con el tratamiento de naranja de acridina, a partir de la concentración de 75 µg/ml se pudieron observar resultados. La cepa YA21 ColV<sup>+</sup>, en contraste, fue fácilmente "curada" del plásmido ColV con el tratamiento de 43°C, por lo que los demás tratamientos fueron

Cuadro 4.1 Manipulación del plásmido ColV de dos cepas de E. coli aisladas de septicémia aviar.

Tratamiento	<u>E. coli</u> YA4	<u>E. coli</u> YA21
1.- Curación del plásmido ColV:		
43 C	-	+ ( <u>E. coli</u> YA21 ColV-)
SDS	+ ( <u>E. coli</u> YA4 ColV-)*	nr
Naranja de acridina	+ ( <u>E. coli</u> YA4 ColV-)	nr
2.- Capacidad conjugativa		
	+	-
3.- Curación de plásmido R responsable de resistenc. a la Ap.		
	nr	+ ( <u>E. coli</u> YA21 ColV+ Ap s)
4.- Mutagenesis del locus responsable de la síntesis de colicina V		
	nr	+ ( <u>E. coli</u> YA21 ColV+ Colicina V-)

\*La cepa de E. coli YA4 ColV- obtenida por tratamiento con SDS mostró cambios morfológicos muy acentuados.

nr = No se realizó el experimento.

innecesarios.

**Obtención de la transconjugante 711 ColV<sup>+</sup>.** La cepa 711 ColV<sup>+</sup> se obtuvo después de cruzar a *E. coli* 711 con *E. coli* YA4 ColV<sup>+</sup>. No se detectó la transferencia del plásmido ColV cuando la cepa YA21 fue utilizada como donadora.

**Obtención de cepas mutantes ColV<sup>+</sup> colicina V negativa.** Al "curar" a la cepa YA21 ColV<sup>+</sup> de la resistencia a la ampicilina, ésta se volvió sensible también a la tetraciclina y a la carbenicilina; en tanto que al curarla de la resistencia a la kanamicina, se hizo sensible también al cloranfenicol, a la neomicina, a la gentamicina, la furadantina, la estreptomina, al trimetropin, el sulfametoxazol y a la polimixina. Sin embargo, no fue posible curarla simultáneamente de la resistencia a la ampicilina y a la kanamicina sin que perdiera el plásmido ColV, por lo que para intentar obtener la mutante ColV<sup>+</sup> no colicinogénica se trabajó con las cepas obtenidas YA21 ColV<sup>+</sup> Ap<sup>s</sup> y YA21 ColV<sup>+</sup> Km<sup>s</sup>.

En la cepa YA21 ColV<sup>+</sup> Km<sup>s</sup> no se logró detectar la inserción del transposón Tn5 para la inactivación del locus responsable de la codificación para la síntesis de la colicina V. Sin embargo, en la cepa YA21 ColV<sup>+</sup> Ap<sup>s</sup> aparentemente sí hubo transposición del Tn1 en el locus que codifica para la síntesis de la colicina V, o en un locus asociado con la regulación de su expresión, ya que cepas prototróficas con características ColV<sup>+</sup>, colicina V<sup>-</sup>, resistentes a la colicina V y resistentes a la ampicilina se obtuvieron en el medio de cultivo altamente selectivo mini-mac-amp-colicina V. El desarrollo de estas colonias fue muy lento (más de 24 h para su visualización).

## Discusión.

Dado que el tratamiento a 43°C es considerado como el menos dañino, se escogió a la cepa YA21 ColV\* para compararla con su isogénica YA21 ColV en los siguientes experimentos de este trabajo, por lo que se le sometió también a dicha cepa al tratamiento de mutagénesis por transposición en el locus de la colicina V. La cepa Ya4, aunque fue la más virulenta (capítulo 3), no se escogió, ya que al someterla a 43°C no se pudo curar del plásmido ColV; con el tratamiento de SDS sufrió cambios en su morfología de colonias, lo cual la imposibilitaba para compararla con su isogénica ColV\*; y, aunque el naranja de acridina sí curó a las células del plásmido ColV, se descartó la posibilidad de usar esta cepa, ya que por considerarse el tratamiento altamente mutágeno existía el riesgo de que se hubieran afectado otros genes con efecto sobre la virulencia o sobre el comportamiento bacteriano in vivo. A diferencia de las cruces con *E. coli* YA21, se pudo obtener fácilmente la transconjugante *E. coli* 711 ColV\* cuando la cepa donante fue *E. coli* YA4.

Quackenbush y Falcow (62) encontraron que cuando las cepas de *E. coli* que portan el plásmido pMR5 crecen a temperaturas superiores a los 32°C, en presencia de penicilina o de carbenicilina, la replicación del pMR5 se inhibe, favoreciéndose el crecimiento de las células en las cuales el transposón Tn1 se haya insertado en otras moléculas de ADN. La transposición del Tn1 del pMR5 a otros plásmidos ocurre aproximadamente 1000 veces más frecuentemente que las inserciones del Tn1 en el cromosoma. La inserción del transposón Tn1, que resultó

en la inactivación de la colicina V en la cepa YA21 ColV\* Aps, apoyan las anteriores aseveraciones. Desgraciadamente, el lento desarrollo de la cepa YA21 ColV\* colicina V\*, sugiere la presencia de cambios genotípicos adicionales, lo que imposibilita su utilización en experimentos posteriores, dado que no podría considerarse una cepa isogénica de la cepa YA21 ColV\*.

Se obtuvieron la cepa isogénica YA21 ColV\*, derivada de la cepa silvestre *E. coli* YA21 ColV\*, así como la cepa transconjugante *E. coli* 711 ColV\*, mediante la conjugación de la cepa donadora silvestre *E. coli* YA4 con la cepa de laboratorio *E. coli* 711, para los siguientes experimentos.

## CAPITULO 5.

### El plásmido ColV en la virulencia bacteriana.

A pesar de que es frecuente la presencia del plásmido ColV en aislamientos de *E. coli* septicémica, puede haber diferentes grados de virulencia entre estas cepas (ver capítulo 3).

Con la finalidad de poder continuar con esta serie de experimentos cuya meta es analizar la interrelación de *E. coli* portadora del plásmido ColV con los macrófagos peritoneales de pollo in vitro, se corroboró la participación de este plásmido en la virulencia para pollos y en un modelo murino\*, comparando a dos cepas diferentes de *E. coli* con sus respectivas isogénicas: la cepa silvestre aislada de colisepticemia aviar denominada *E. coli* YA21 ColV\*, con la cepa derivada de esta, la *E. coli* YA21 ColV y, la cepa avirulenta de laboratorio, la *E. coli* K12 711 con *E. coli* K12 711 ColV\*.

### Material y métodos.

**Bacterias.** Se escogió a la cepa virulenta (ver capítulo 3) *E. coli* YA21 portadora del plásmido ColV aislada de un caso de colisepticemia aviar. Se le sometió a un tratamiento "curante" por incubación a 43°C (capítulo 4) para obtener su isogénica libre del plásmido ColV. Se utilizó también a la cepa de laboratorio *E. coli* K12 711

---

\* Modelo murino realizado en el Centro de Biología Experimental, UAZ.

(F<sup>-</sup>), lac-28, his-15, trp-30, pro-23, Phe, Nal<sup>r</sup>), y su isogénica, la cepa *E. coli* K12 711 ColV<sup>+</sup>, obtenida por conjugación (capítulo 4), utilizando como donadora del plásmido ColV a la cepa septicémica de origen aviar *E. coli* YA4 ColV<sup>+</sup>, a la cual previamente se le demostró su virulencia (capítulo 3).

**Inóculo.** Para el modelo aviar, éste se ajustó para contener 2X DL<sub>50</sub> / ml de bacterias, obtenido de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento.

Dado que por experimentos previos (Capítulo 3) se encontró que la DL<sub>50</sub> es de  $6.8 \times 10^7$  bacterias/ml, el cálculo teórico para 2 DL<sub>50</sub> fué de  $1.37 \times 10^8$  bacterias/ml, por lo que para garantizar esta cantidad de bacterias en los inóculos, cada una de las cepas a probar se inocularon en 10 ml de caldo nutritivo CN y se incubaron durante la noche a 37°C. Posteriormente, en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad conteniendo 300 ml de CN, se inocularon con alícuotas de 0.4 ml en el caso de las cepas YA21 ColV<sup>+</sup> y YA21 ColV<sup>-</sup>, y 0.8 ml de las cepas 711 y 711 ColV<sup>+</sup> de *E. coli* crecidas previamente durante la noche, se incubaron en baño maría con agitación a 250 oscilaciones por minuto durante 5 a 6 horas; los cultivos se centrifugaron a 17,700 xg durante 10 minutos a 8°C, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos conteniendo 0.01% de gelatina nutritiva (PBSgel), se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones y posteriormente cada una de las cepas se ajustó en el espectrofotómetro a una densidad óptica (D.O.) de 1.5 de absorbancia (a 620 nm). Experimentos previos (capítulo 3) mostraron que a esta D.O. se obtienen aproximadamente  $3 \times 10^9$  bacterias sin diluir, por lo que se hizo una dilución de 1:6 en PBSgel de cada uno de los concentrados de las cepas para obtener un número teórico aproximado de  $5 \times 10^8$  bacterias por ml. Este cálculo se

verificó posteriormente determinando el número de UFC.

Para el modelo murino, el procedimiento fue similar, salvo que a las cepas 711 y 711 ColV\* se les ajustó su densidad a 2.2 de absorvancia y de los concentrados se hicieron diluciones decimales.

**Animales de experimentación.** Se utilizó un lote de 30 pollos de engorda de 22 días de edad, mantenidos en baterías, con alimento no medicado y agua ad libitum. En el modelo murino se usaron ratones Balb/c de 23 días de edad con un peso promedio de 11 a 15 g.

#### **Pruebas de virulencia.**

**Pollos.** Se formaron cuatro grupos de seis a ocho animales y a cada grupo se les inoculó 1 ml de la suspensión bacteriana a probar por vía endovenosa. Se observó la mortalidad durante 72 horas. Las cepas se consideraron virulentas cuando la mortalidad observada fue mayor al 60% de acuerdo a Minshew et al (54, 55).

**Ratones.** Con lotes de 20 a 24 ratones se formaron de cinco a seis grupos de cuatro ratones cada uno. Se inoculó 0.7ml intraperitonealmente del concentrado y hasta la dilución  $10^{-4}$  de la cepa a probar. A un grupo control se le inoculó únicamente PBSgel. La mortalidad se contó durante 72 hs y la virulencia se determinó por el método de Reed y Muench (63).

## **Resultados**

#### **Pruebas de virulencia.**

**Pollos.** Las cepas de E.coli portadoras del plásmido ColV E.coli YA21 ColV\* y

*E. coli* 711 ColV\* mostraron una mayor virulencia en contraste con sus respectivas isogénicas *E. coli* YA21 ColV y *E. coli* 711. Así, la cepa silvestre, aislada de colisepticemia aviar, *E. coli* YA21 ColV\*, causó un 100% de mortalidad, en tanto que su isogénica *E. coli* YA21 ColV, causó sólo un 12.5% de mortalidad; la cepa de laboratorio, *E. coli* K 12 711 portadora del plásmido ColV, causó un 83% de mortalidad, en tanto que su isogénica *E. coli* 711, causó un 50% de mortalidad (cuadro 5.1). La mayoría de estas muertes transcurrió dentro de las 24 horas postinoculación. A partir de los animales muertos se realizó en el laboratorio la *E. coli* respectiva inoculada.

Ratones. La DL<sub>50</sub> de las respectivas cepas de *E. coli* con y sin el plásmido ColV se muestran en el cuadro 5.2. Se requirieron 10 y 100 veces más microorganismos para la DL<sub>50</sub> de las cepas YA21 ColV y 711 que sus isogénicas portadoras del plásmido ColV.

## Discusión

En ambos modelos (aviar y murino) existe una clara influencia del plásmido ColV en la virulencia. En el modelo aviar, la *E. coli* YA21 ColV\* aislada de colisepticemia aviar hubo un 100 % de mortalidad, encontrándose una marcada diferencia con su isogénica *E. coli* YA21 ColV que causó apenas un 12 % de mortalidad.

Por otro lado, con la cepa de laboratorio *E. coli* K12 711 portadora del plásmido ColV proveniente de la cepa virulenta *E. coli* YA4 ColV\* hubo un 83 %

Cuadro 5.1 Virulencia en pollos por E. coli ColV+ y ColV-

Cepa de <u>E. coli</u>	Inoculo (No de moos)	Pollos muertos (%)
YA21 ColV+	$5.7 \times 10^{-8}$	8/8 (100)
YA21 ColV-	$1.2 \times 10^{-8}$	1/8 (12.5)
711	$6 \times 10^{-8}$	4/8 (50)
711 ColV	$9.7 \times 10^{-8}$	5/6 (83.3)

**Cuadro 5.2 Dosis Letal 50 de *E. coli* ColV\* y ColV  
(modelo murino).**

Cepa	DL50
<i>E. coli</i> YA21 ColV*	$2.8 \times 10^7$
<i>E. coli</i> YA21 ColV	$1.9 \times 10^9$
<i>E. coli</i> 711 ColV*	$3.1 \times 10^7$
<i>E. coli</i> 711	$1.2 \times 10^9$

de mortalidad, mientras que su isogénica *E. coli* K12 711 no portadora del plásmido ColV, mostró un 50 % de mortalidad .

A pesar de que se observa una clara influencia del plásmido ColV en la virulencia bacteriana, los resultados en la cepa de laboratorio pudieran deberse al mayor tiempo de incubación al que fueron sometidas por mostrar un crecimiento más lento, ésto probablemente por ser una cepa auxotrófica.

En el modelo murino se observó que se requieren de 10 a 100 veces menos bacterias para tener una  $DL_{50}$  en las cepas Ya21 ColV\* y en la 711 ColV\* respectivamente, en relación con sus isogénicas.

Estos hallazgos corroboran que el plásmido ColV juega un papel importante en la virulencia, como ha sido reportado por otros investigadores (1, 5, 55, 71, 74).

## CAPITULO 6.

### **El plásmido ColV en la interrelación de *Escherichia coli* con macrófagos peritoneales de pollo.**

Se ha propuesto que las cepas de *Escherichia coli* septicémica pueden tener mecanismos de patogenicidad que les permite evadir o neutralizar las defensas del hospedero para causar una infección generalizada (1, 2, 3, 5, 6, 39, 54, 55). Estos mecanismos pueden estar relacionados con la presencia de plásmidos.

Se han detectado dos plásmidos de importancia en la virulencia de *E. coli* invasiva: El plásmido Vir, que se le asocia con la síntesis de una toxina que es letal especialmente para pollos (toxina CLT) y con la síntesis de un antígeno de superficie, pero que es poco frecuente (45, 46, 70); y el plásmido ColV, que codifica para la síntesis de una bacteriocina, la colicina V, y que frecuentemente se le encuentra en *E. coli* extraintestinal (1, 2, 19, 51, 71, 74).

La presencia del plásmido ColV se ha relacionado principalmente con el aumento de la virulencia (51, 54, 70), la cual es asociada con la capacidad de resistir la acción bactericida del suero y del complemento (5, 6, 39, 56) y con la capacidad incrementada de captación de hierro, esencial para la supervivencia de *E. coli* (4, 8, 9, 12, 88).

En este experimento se analiza el papel que pudiera tener el plásmido ColV en la relación de *E. coli* con macrófagos peritoneales de pollo in vitro.

## **Material y métodos.**

**Microorganismos.** Se utilizó la cepa de *E. coli* YA21 CoIV\* aislada de un caso de colisepticemia aviar y su isogénica YA21 CoIV. La cepa se "curó" del plásmido CoIV por la técnica de incubación a 43°C (79) descrita en el capítulo 4. Se usó también la cepa de laboratorio *E. coli* 711 y la transconjugante *E. coli* 711 CoIV, obtenida de la cruce de *E. coli* 711 con *E. coli* YA4 CoIV+, la metodología de la conjugación se describe en el capítulo 4.

La cepa de *Candida albicans* obtenida del cepario de éste Departamento se utilizó como testigo en los experimentos de fagocitosis (27).

**Animales.** Se usaron pollos de engorda de tres semanas de edad, mantenidos en baterías con agua ad libitum y alimento no medicado.

**Inducción de macrófagos peritoneales de pollo.** Esta se llevó a cabo con base en las técnicas descritas por López-Alvarez (45), y por van Furth et al (27). A los pollos se les retiró el alimento y el agua cuatro horas antes de la inducción. Se les aplicó anestesia ligera con cloroformo y se les estimuló de dos maneras:

A). Se les inoculó intraperitonealmente 15 ml de caldo Tioglicolato; a las 48 h se repitió la operación y se cosecharon los macrófagos a las 24 h después de la segunda inoculación.

B). Inoculación de 15 ml de caldo Tioglicolato intraperitonealmente y, 24 h después se colectaron los macrófagos.

**Colección de macrófagos.** Cada pollo se trabajó separadamente de la siguiente manera: Se les retiró el agua y el alimento cuatro horas antes de su obtención y se

les sacrificó por tracción de las vertebras cervicales. Inmediatamente después, se desinfectó la región abdominal con alcohol etílico al 70 %, de manera aséptica se expuso la cavidad peritoneal luego de diseccionar los musculos abdominales. La cavidad peritoneal se bañó con 40 ml de solución balanceada de Hank (SBH) mantenida a 4°C adicionada con 50 UI de heparina, 100 UI de penicilina G y 100 µg de sulfato de estreptomycin por ml. La solución de Hank se inoculó fraccionada en dos partes y después de dar un ligero masaje se recolectó con una pipeta Pasteur el líquido rico en macrófagos. En seguida se centrifugó a 30 x g durante 10 minutos a 4°C con la finalidad de eliminar la grasa. El líquido sobrenadante se colectó en otro tubo y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. Cuando los paquetes celulares colectados mostraban contaminación con eritrocitos, se resuspendían en 1 ml de solución hipotónica de cloruro de amonio y se incubaban a temperatura ambiente durante dos minutos e inmediatamente después se les agregaba SBH adicionada con 10 UI de heparina por ml, con penicilina, estreptomycin y 2 % de suero fetal bovino (SFB). La suspensión celular se centrifugó una vez más a 300 x g durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 3 ml de SBH y se determinó el número de macrófagos viables por medio de la técnica de tinción de azul de tripán (53).

**cultivo de macrófagos.** Una vez determinado el número de macrófagos viables en la suspensión, se agregó suficiente medio de cultivo RPMI adicionado con un 10 % de SFB, penicilina G (100 UI/ml) y sulfato de estreptomycin (200 UI/ml) (RPMI con antibióticos), para obtener una densidad de  $5 \times 10^5$  macrófagos por ml. Se

distribuyeron alicuotas de 2 ml de la suspensión de macrófagos en una serie de 20 viales de centrifugación que contenían un cubreobjetos en el fondo y se incubaron a 41°C en una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante tres horas, para permitir que los macrófagos se adherieran al cubreobjetos. Después de este tiempo el cultivo se lavó dos veces con el medio de cultivo RPMI sin antibióticos, succionándolo con una bomba de vacío conectada por una manguera a un matraz de Kitasato, el cual a su vez tenía otra manguera conectada a una pipeta Pasteur; éste sistema permitió evacuar fácilmente el líquido.

**Inóculo.** Las cepas bacterianas a probar se cultivaron en 200 ml de caldo nutritivo durante 6 horas a 37°C, se centrifugaron a 17 000 x g durante 10 minutos a 4°C. El paquete bacteriano se resuspendió en 12 ml de PBSgel para ajustarlo a una densidad óptica de 1.5 de absorción de luz (con una longitud de onda de 620 nm), que corresponde a una densidad bacteriana teórica de  $2 \times 10^9$  / ml. Esta suspensión bacteriana se diluyó en medio de cultivo RPMI para tratar de ajustar el inóculo a  $4 \times 10^7$  bacterias por ml.

La levadura *Candida albicans* que se utilizó como testigo para el experimento de la fagocitosis, se cultivó en gelosa sangre durante 48 horas a 37°C. Las colonias se suspendieron en PBS ajustando su densidad con el nefelómetro de MacFarland al tubo 0.5 (47). Posteriormente, se inactivaron sometiéndolas a 56°C durante una hora y se calculó su número contando con un hemocitómetro después de tñirlas con azul de tripán. Se ajustó la densidad de las levaduras a  $4 \times 10^8$  / ml con el medio RPMI sin antibióticos.

**Fagocitosis.** Esta se realizó con base en la técnica descrita por Pérez Martínez

(60). Para cada cepa a probar se utilizaron seis viales de cintilación: dos de éstos se usaron para medir bacterias asociadas (adheridas y/o ingeridas) y no asociadas a macrófagos; otros dos viales fueron para calcular la resistencia a la fagocitosis, contando las bacterias viables en el sobrenadante y las bacterias viables intracelulares después de lisar a los macrófagos; finalmente, como control en dos viales mas que no contenían macrófagos, se inocularon únicamente bacterias, para checar el número de bacterias viables después del experimento. Los viales se inocularon con 0.5 ml de la suspensión de bacterias y se incubaron a 41°C en una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos. La relación macrófago : levadura fue de 1 : 4.

**Microorganismos asociados y no asociados a macrófagos.** Después de 90 minutos de incubación, dos replicas de cada tratamiento (cepa a probar incluyendo la levadura), se lavaron dos veces con el medio RPMI de la manera descrita anteriormente y se fijaron con el fijador de Bowins. Posteriormente, los cubreobjetos se tñieron con Giemsa y se contó el número de bacterias asociadas (ingeridas y/o adheridas) por 100 macrófagos y su relación con bacterias no fagocitadas.

**Resistencia a la fagocitosis.** A dos réplicas de cada tratamiento se les homogenizó el sobrenadante y se hicieron diluciones decimales; de cada dilución se inocularon tres gotas de 20 µl en placas de agar de MacConkey y se incubaron durante la noche, para posteriormente calcular el número de unidades formadoras de colonias (ufc) y determinar de esta manera el número de bacterias extracelulares.

Para determinar el número de bacterias viables asociadas a

macrófagos, los viales se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI sin antibióticos y se les aplicaron 500  $\mu$ l del detergente NP-40 al 0.05 % y se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos para lisar a los macrófagos. En seguida se hicieron diluciones decimales y plaqueo en agar de MacConkey.

Para tener un control del número de bacterias viables independientemente de la fagocitosis, dos viales sin macrófagos fueron inoculados con la suspensión de bacterias a probar y se les dió el mismo tratamiento que a los viales destinados al experimento de la fagocitosis, incubándolos en las mismas condiciones. Después del experimento, se calculó el número de bacterias viables por diluciones y plaqueo.

**adherencia al vidrio.** Cada una de las cepas bacterianas se inocularon en 2 ml de CN y se incubaron durante la noche. Dos décimas de mililitro de cada cultivo se inocularon en 250 ml de CN y se incubaron a 37°C en agitación durante 5 h. Las células se concentraron centrifugando a 17000 xg durante 10 minutos a 8°C. Se lavaron con PBSgel y se centrifugaron en iguales condiciones. El paquete celular se ajustó a una Densidad Optica (620 mn) de 1.5 de absorción para obtener una densidad teorica de  $4 \times 10^9$  bacterias por ml. Se hicieron diluciones en el medio de cultivo RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino para obtener una densidad bacteriana de  $4 \times 10^7$ /ml. Se inocularon 0.5 ml de esta suspensión en viales de cintilación que contenían un cubreobjetos. Se incubaron a 41°C, con una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos. Posteriormente, el cultivo se eliminó rápidamente y se hicieron tres lavados con PBS utilizando el sistema de

---

\*Experimento realizado en el Centro de Biología experimental, UAZ.

evacuación ya descrito para el cultivo de macrófagos. Los cubreobjetos se trataron con fijador de Bowin durante 10 min. Se lavaron tres veces con agua destilada y se tiñeron con Giemsa. Por cada cepa se hicieron cuatro réplicas y a cada una de éstas se le contaron 10 campos.

## **Resultados.**

**Inducción de macrófagos** . En la inducción por el método A se obtuvo un promedio de 10 millones de macrófagos por pollo, mientras que por el método B se obtuvo apenas un promedio de dos millones de macrófagos por pollo. Para el experimento de fagocitosis se optó por trabajar con los macrófagos obtenidos por el método A únicamente.

**Microorganismos asociados y no asociados a macrófagos** El promedio de bacterias asociadas a los macrófagos fue de 100 con la cepa de *E. coli* YA21 ColV\*, mientras que con su isogénica *E. coli* YA21 Col<sup>-</sup> fue de 28.5 . En las cepas de *E. coli* 711 con y sin el plásmido ColV no se encontraron diferencias (cuadro 6.1).

Por otro lado, se observaron un promedio de 98 bacterias extracelulares en la cepa silvestre YA21 ColV\*, en contraste, su isogénica YA21 Col<sup>-</sup> apenas se observaron tres. Hallazgos similares se encontraron en las cepas de *E. coli* 711 con y sin plásmido ColV. Así, se observó un promedio de 20 bacterias extracelulares con la cepa *E. coli* 711 ColV+, mientras que en la cepa 711 no se observaron bacterias extracelulares.

Cuadro 6.1 Interacción de *E. coli* ColV+ y ColV- con macrófagos peritoneales de pollo in vitro.

Cepa	réplica	Bacterias asociadas a macrófagos	Bacterias extracelulares
YA21 ColV <sup>+</sup>	1	124	124
	2	79	71
YA21 ColV <sup>-</sup>	1	40	0
	2	17	5
711 ColV <sup>+</sup>	1	39	35
	2	20	4
711	1	39	0
	2	ND	ND

ND = No determinado.

La función fagocítica se verificó al encontrar un promedio de 52 levaduras asociadas a macrófagos. No se observaron extracelularmente.

**Resistencia a la fagocitosis.** Estos resultados se esquematizan en el cuadro 6.2. A los 90 minutos postincubación, el número de las bacterias del sobrenadante de la cepa *E. coli* YA21 ColV<sup>+</sup> fué similar a su tubo control que contenía únicamente bacterias, mientras que en contraste, su isogénica *E. coli* YA21 ColV<sup>-</sup> mostró una disminución hasta de dos logaritmos en relación a su control.

El número de bacterias detectadas después de lisar a los macrófagos fue similar en ambas cepas de *E. coli* YA21 con y sin el plásmido.

Los hallazgos en las cepas de *E. coli* 711 y 711 ColV, no mostraron diferencias significativas después de su conteo en el sobrenadante en relación a sus controles. Asimismo, después de lisar a los macrófagos no se encontraron diferencias.

**Adherencia al vidrio.** En la cepa de *E. coli* YA21 ColV<sup>+</sup> se observó un promedio de 334.2 bacterias adheridas, mientras que en su isogénica *E. coli* YA21 ColV<sup>-</sup> fue de 30.7 bacterias. El promedio de bacterias adheridas de la cepa *E. coli* 711 ColV<sup>+</sup> fue de 15.3, en contraste, la cepa de *E. coli* 711 fue de 2.15 bacterias. En ambos casos, la diferencia de adherencia al vidrio (medida por la prueba estadística de T) entre las cepas portadoras del plásmido ColV y sus isogénicas que carecían de éste fue altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

Cuadro 6.2 Microorganismos extracelulares e intracelulares después de 90 min. de incubación con MQ peritoneales de pollo

Cepa	Testigo (UFC/ml postexp.)	Bacterias en sobrenadante (UFC/ml)	Bacterias del lisado de MQ (UFC/ml)
YA21 ColV+	2 X 10 <sup>8</sup>	2 X 10 <sup>8</sup>	6 X 10 <sup>5</sup>
	1 X 10 <sup>8</sup>	1 X 10 <sup>9</sup>	7 X 10 <sup>5</sup>
	x = 1.5 X 10 <sup>8</sup>	x = 6 X 10 <sup>8</sup>	x = 6.5 X 10 <sup>5</sup>
YA21 ColV-	2.5 X 10 <sup>8</sup>	2 X 10 <sup>6</sup>	6 X 10 <sup>5</sup>
	2.1 X 10 <sup>8</sup>	9 X 10 <sup>7</sup>	8 X 10 <sup>5</sup>
	x = 2.3 X 10 <sup>8</sup>	x = 4.6 X 10 <sup>7</sup>	x = 7 X 10 <sup>5</sup>
711 ColV+	2 X 10 <sup>7</sup>	3 X 10 <sup>7</sup>	8 X 10 <sup>5</sup>
	3 X 10 <sup>6</sup>	1 X 10 <sup>7</sup>	4 X 10 <sup>5</sup>
	x = 1.1 X 10 <sup>7</sup>	x = 2 X 10 <sup>7</sup>	x = 6 X 10 <sup>5</sup>
711	2 X 10 <sup>7</sup>	2.8 X 10 <sup>7</sup>	3 X 10 <sup>4</sup>
	5 X 10 <sup>6</sup>	3 X 10 <sup>8</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>
	x = 1.2 X 10 <sup>7</sup>	x = 1.6 X 10 <sup>8</sup>	x = 6.5 X 10 <sup>4</sup>



Figura 6.1 Interacción fagocito-bacteria usando *E. coli* YA21 ColV<sup>+</sup> (100X).



Figura 6.2 Interacción fagocito-bacteria usando *E. coli* YA21 ColV<sup>-</sup> (100X).

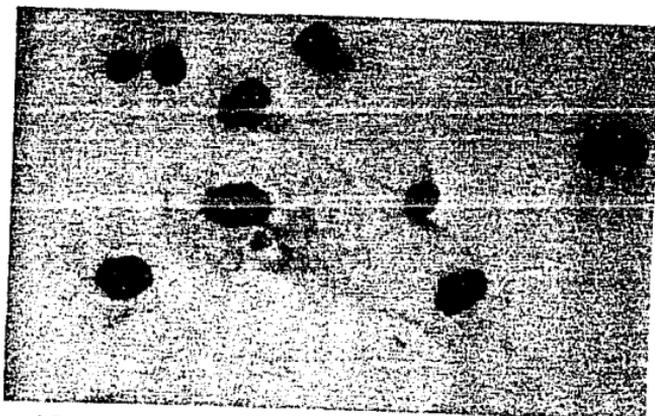


Figura 6.3 Relación fagocito-bacteria con la cepa *E. coli* 711 ColV+ (100X).

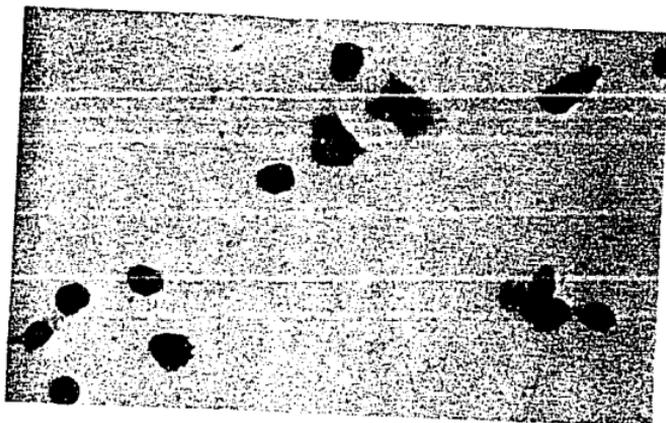


Figura 6.4 Relación fagocito-bacteria usando la cepa de *E. coli* 711 (40X).



Figura 6.5 Adherencia al vidrio de *E. coli* YA21 ColV<sup>+</sup> (100X).

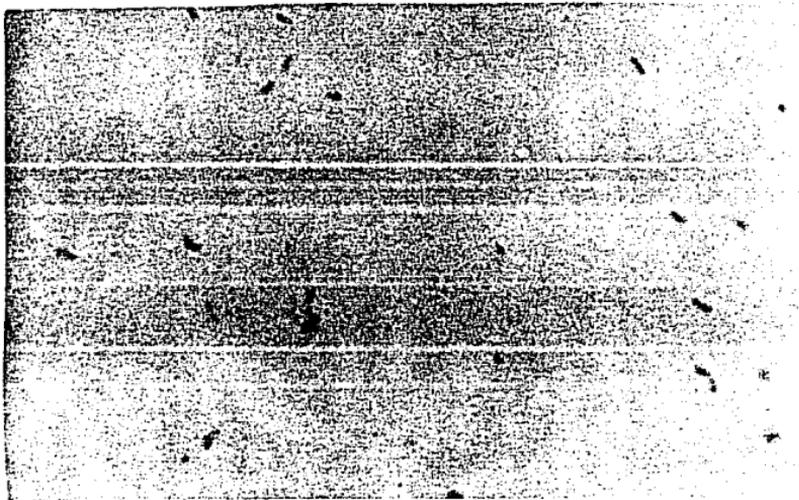


Figura 6.6 Adherencia al vidrio por *E. coli* YA21 ColV<sup>-</sup> (100X).

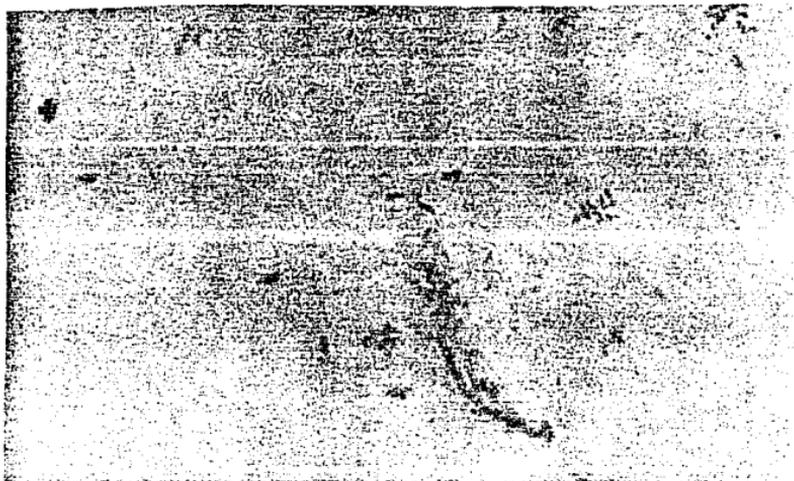


Figura 6.7 Adherencia al vidrio por *E. coli* 711 ColV<sup>+</sup> (100X).



Figura 6.8 Adherencia al vidrio por *E. coli* 711 (100X).

## **Discusión.**

A los 90 minutos postinoculación a los macrófagos peritoneales de pollo *in vitro*, la cepa septicémica de origen aviar, *E. coli* YA21 CoIV\*, mostró una mayor capacidad de supervivencia que su isogénica, la *E. coli* YA21 CoIV. En la primera, además de observarse un número similar de bacterias asociadas a macrófagos y de bacterias extracelulares, fue capaz de adherirse al vidrio de manera significativa; asimismo, se recuperó en el sobrenadante en un número similar a su control. En contraste, los hallazgos en su isogénica CoIV, muestran que el número de bacterias asociadas a macrófagos fue mucho menor y prácticamente nulo el de bacterias extracelulares. Por otro lado, su capacidad de adherirse al vidrio disminuyó marcadamente y su número en el sobrenadante se redujo hasta 10 a 100 veces en relación a su control. El número de bacterias recuperadas después de lisis a los fagocitos fue similar en ambas cepas.

Al comparar la cepa de *E. coli* 711 CoIV' con la cepa de *E. coli* 711, también se detectaron diferencias en la capacidad de adherirse al vidrio, pero hubo poca o nula diferencia en el número de bacterias recuperadas del sobrenadante y después de la lisis de los fagocitos; además, solamente en una de las dos réplicas el número de bacterias asociadas a macrófagos fue similar al número de bacterias extracelulares.

Las diferencias encontradas entre la cepa silvestre y la de laboratorio, son indicativos de que los mecanismos de patogenicidad son multifactoriales y de que se requiere de otros atributos de virulencia, presentes en la cepa silvestre pero

no en la de laboratorio.

Se sugiere la posibilidad de que el plásmido ColV y probablemente otros genes relacionados codifiquen para la síntesis de adhesinas y / u otra substancia estructural que por un lado, le permitan a *E. coli* septicémica, adherirse a receptores de membrana de células blanco, tales como los macrófagos, y por otro lado, le pudieran conferir cierta resistencia a ser ingeridos. La ocurrencia de eventos similares han sido reportados en el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, se ha demostrado que estos microorganismos tienen la capacidad de atacar la membrana celular de los macrófagos alveolares, pero que para ser endocitados se requiere de la opsonización por anticuerpos (14). Rottini et al (65), tuvieron hallazgos similares a los nuestros al exponer diferentes cepas de *E. coli*, tanto de laboratorio como enteropatógenas y de flora normal a leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Las cepas de laboratorio fueron fácilmente fagocitadas, mientras que en las otras cepas varió su susceptibilidad a ser destruidas de moderada a insensibles, proponiendo que *E. coli* se une a la superficie fagocítica por una estructura tal como el antígeno K, que al mismo tiempo pudiera inhibir los cambios conformacionales que ocurren en la membrana plasmática para dar lugar a la internalización o bien que alterara su hidrofilia, lo cual la haría mas resistente a la fagocitosis. También es posible asimismo, que las cepas ColV\* al presentar otras ventajas adicionales, como son un metabolismo mas acelerado, una mayor resistencia a la acción bactericida del suero y una mayor capacidad para adquirir Fe<sup>3+</sup>, compitan mas eficazmente contra las defensas del hospedero.

Parece ser que *E. coli* una vez que ha sido fagocitada es fácilmente

destruida, por lo que es importante continuar estudiando la interrelación de sus mecanismos de patogenicidad con la respuesta del hospedero en la colisepticemia aviaria, para acercarnos a un modelo de control de esta enfermedad.

## DISCUSION GENERAL.

El conjunto de hallazgos nos permiten proponer al plásmido ColV como un elemento genético que les proporciona a las células que lo portan, características tales como una mayor capacidad de supervivencia, posiblemente evitando una eficaz fagocitosis, aunado a otras características ya descritas.

El plásmido ColV fue fácilmente detectado y, aunque se analizó un número limitado de cepas septicémicas de *E. coli*, se demostró que la mayoría de éstas lo portan, tal como lo han demostrado otros autores (19, 51, 71).

Dado que se ha reportado (55) que las cepas extraintestinales de *E. coli* pueden mostrar diferentes grados de virulencia, independientemente de si portan el plásmido ColV, se eligieron cinco cepas capaces de producir una buena cantidad de colicina V para comparar su virulencia, encontrándose hasta dos logaritmos de diferencia; también se detectaron diferentes marcadores de resistencia entre éstas, y en dos de ellas, se probó su capacidad conjugativa, siendo en una positiva y en la otra negativa, lo cual indica la gran complejidad que pueden mostrar como factores individuales, como ha sido señalado por Waters et al (91). El análisis de éstas características nos permitió seleccionar a las dos cepas ColV\* más virulentas para construir isogénicas ColV\* y ColV\* silvestre y de laboratorio.

Se midió el efecto del plásmido ColV en la virulencia y en mecanismos de patogenicidad específicos tales como su interacción con macrófagos peritoneales de pollo y en la capacidad de adherencia al vidrio de las bacterias que lo portan.

El plásmido ColV mostró una clara participación en la virulencia, tanto en el modelo aviar como en el murino, observándose en éste último, que con las bacterias ColV se requieren hasta dos logaritmos más que sus isogénicas ColV\* para obtener la  $DL_{50}$ , coincidiendo éstos resultados con las aseveraciones de otros investigadores (1, 5, 17, 62, 71-74), hecho que nos permitió sentar las bases para continuar analizando su patogenicidad.

Dada la gran capacidad de diseminación y supervivencia en sangre y líquido peritoneal de las cepas septicémicas de E. coli, desde hace tiempo que se viene cuestionando el papel que pudieran jugar ante los fagocitos, posibles mecanismos de patogenicidad probablemente localizados en pared celular (49), cápsula (1), fimbria (76) y en la colicina V (58, 59). Un elemento genético mediador podría ser el plásmido ColV .

Al analizar la asociación de nuestras cepas a los macrófagos, la cepa silvestre ColV\* mostró una mayor capacidad de unión a los fagocitos que su isogénica ColV, pero también se observó un número similar de bacterias extracelulares, y el número de bacterias recuperadas del sobrenadante fue similar a su control; mientras que en los macrófagos con la cepa ColV\* su asociación fue comparativamente menor, prácticamente no se observaron bacterias extracelulares y el número de bacterias recuperadas del sobrenadante disminuyó de uno a dos logaritmos

un relación a su control. No se observaron diferencias en el número de bacterias recuperadas después de lisar a los fagocitos. Una réplica con la cepa 711 ColV\* mostró resultados similares que la silvestre ColV\*, mientras que la otra, aunque se

observaron bacterias asociadas no se detectaron extracelularmente. No hubo diferencias en el número de bacterias recuperadas tanto del sobrenadante como despues de la lisis de los fagocitos en las cepas 711 y 711 CoIV\*.

La explicación de éstos eventos podría estar en una adhesina, por lo que se procedió a comparar la capacidad de adherencia al vidrio de nuestras cuatro cepas, encontrando que tanto la cepa de campo como de laboratotrio portadoras del plásmido CoIV tuvieron una capacidad de adherencia mucho mayor que sus isogénicas libres de éste plásmido. Planteamos la posibilidad de que el plásmido CoIV codifique para la síntesis de una adhesina que permite una mayor asociación de las bacterias con los macrófagos, pero que también le confiere a la bacteria cierta resistencia de ser ingerida.

Asimísimo, al comparar la cepa de campo con la de laboratorio se hace evidente de que los mecanismos de patogenicidad son multifactorales.

Al plásmido CoIV se le han propuesto otros mecanismos importantes de patogenicidad como son la resistencia a la acción bactericida del suero, la posible inactivación del complemento, el secuestro de hierro y el efecto de la colicina V en la supervivencia en cavidad peritoneal. El análisis del conjunto de éstos elementos, podría ayudar a explicar la mayor capacidad de supervivencia de las cepas septicémicas de *E. coli* en el hospedero.

## CONCLUSIONES

- 1.- Hay una elevada prevalencia del plásmido ColV en las cepas septicémicas aviares estudiadas.
- 2.- Hay diferente grado de virulencia entre las cepas colicinogénicas V estudiadas.
- 3.- Las cepas que portan el plásmido ColV son más virulentas que sus isogénicas que carecen de éste.
- 4.- Las cepas estudiadas portadoras del plásmido ColV mostraron tener una mayor capacidad de adherencia al vidrio, a diferencia de sus isogénicas libres de éste plásmido.
- 5 .- Las cepas probadas portadoras del plásmido ColV, tuvieron una mayor capacidad de supervivencia en presencia de macrófagos peritoneales de pollo.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Aguero, M.E. and Cabello, F.: Relative contribution of ColV plasmid and K-1 antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*. Infect. Immun., **40**: 359-368 (1983).
- 2.- Aguero, M.E., Aaron, L., Deluca, A.G., Timmis, K.N. and Cabello, F.C.: A plasmid encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. Infect. Immun., **46**: 740-746 (1984).
- 3.- Arp, L. and Jensen, E.: Piliation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent for turkeys. Avian Dis., **24**: 650-657 (1981).
- 4.- Bbindereif, A., Braun, V. and Hantke, K.: The coloaicin receptor of ColV-bearing *Escherichia coli* is part of the Fe<sup>3</sup>-aerobactin transport system. J. Bacteriol., **150**: 1472-1475 (1985).
- 5.- Binns, M.M., Davies, D.L. and Hardy, K.G.: Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specefing virulence and serum resistance. Nature, **279**: 768-781 (1979).
- 6.- Binns, M.M., Mayden, J. and Levine, R.P.: Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmids genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. Infect. Immun., **35**: 654-659 (1982).
- 7.- Bortolussi, R., Ferrieri, P., Bjorkstén, B. and Quié, P.: Capsular K1 polysaccharide of *Escherichia coli*: Relationship to virulence in newborn rats and resistance to phagocytosis. Infect. Immun., **25**: 293-298 (1979).
- 8.- Braun, V.: *Escherichia coli* cells containing the plasmid ColV produce the iron ionophore aerobactin. FEMS Microbiol. letters, **11**: 225-228 (1981).
- 9.- Braun, V., Groos, R., Koster, W. and Zimmerman, L.: Plasmid and chromosomal mutants in the iron (III)-aerobactin transport system of *Escherichia coli* use of streptonigrin for selection. Mol. Gen. Genet., **192**: 131-139 (1983).
- 10.- Brée, A., Dho, M. and Lafont, J.P.: Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. Avian Dis., **33**: 134-139 (1989).
- 11.- Broun, N.L., Misra, T.K., Winnie, J.N., Smith, A., Seiff, M. and Silver, S.: The nucleotide sequence of the mercurie resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn 50: Further evidence for mer genes which enhance the activity of the mercurie ion detoxification system. Mol. Gen. Genet., **202**: 143-151 (1986).

- 12.- Carbonetti, N. and Williams, P.: A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV- K30. Infect. Immun., **46**: 7-14. (1984).
- 13.- Clancy, J. and Savage, C.S: Another colicin V phenotype: in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. Infect. Immun., **32**: 343-350 (1981).
- 14.- Collier, A.M. : Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to respiratory epithelium. Bacterial adherence. Edited by Beachey, E. H. Series B Vol 6, 159-183. Chapman and Hall. London. 1980.
- 15.- Chopin, M.Ch., Chopin, A., Rouavalt, A. and Simon, D.: Cloning in *Streptococcus lactis* of plasmid-mediated UV resistance on prophage stability. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 233-237 (1986)
- 16.- Das, A., Stachell, Evert, P., Allenza, P., Montoya, A. and Nester, E.: Promotor of *Agrobacterium tumefaciens* TI-plasmid virulence genes. Nucl. Acids Res. **14**: 1355-1364 (1986).
- 17.- Dassouli-Mrani-Belkebir, A., Contrepols, M., Girerdeau, J. and Vartanian, M.: Characters of *Escherichia coli* O78 isolated from septicemic animals. Vet. Microbiol., **17**: 345-356 (1988).
- 18.- Davies, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. y Ginaberg, H.S.: Tratado de microbiología, 3a ed. Salvat, Barcelona, 1985.
- 19.- Davies, D.L., Falkner, F.R. and Hardy, K.G.: Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. Infect. Immun., **31**: 574-579 (1981).
- 20.- Duncle, L.M., Blair, L.L. and Fortune, K.P.: Transformation of a plasmid encoding an adhesin of *Staphylococcus aureus* into a nonadherent staphylococcal strain. Infect. Dis., **153**: 670-675 (1986).
- 21.- Edwards, P.R. and Ewing, W.H: Identification of enterobacteriaceae. Burgess . , Minneapolis, 1972.
- 22.- Elwell, L.P. and Shipley, P.L.: Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. Ann. Rev. Microbiol., **34**: 465-496 (1980).
- 23.- Falkow, S.: Infectious multiple drug resistance. Pion Limited. London, 1985.
- 24.- Fredericq, P.: Colicins. Ann. Rev. Microbiol., **11**: 7-22 (1957).
- 25.- Frick, K., Quackenbush, R. and Konisky, J.: Cloning of immunity and structural genes for colicin V. J. Bacteriol., **148**: 498-507 (1981).

- 26.- Frommer, A., Freidlin, P., Heller, E.D., Bock, R., Drabkin, N. and Samberg, Y. : Adherence-associated characteristics and pathogenicity of *Escherichia coli* from avian colibacillosis. Avian Dis., 19: 547-554 (1990).
- 27.- Furth, R. van, Zwet, T.L. van and Leish, P.C.: in vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. Handbook of experimental immunology. Edited by Weir, D.M. Volume 2, 32.1-32.19. Blackwell Scientific Publications. London 1979.
- 28.- Gemsky, P., Lazere, J.R. and Casey, T: Plasmid associated pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica* . Infect. Immun.27: 682-685 (1980).
- 29.- Green, B.D., Battisti, L., Kochler, T.M., Thorne, C.B. and Ivins, B.E.: Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. Infect. Immun., 49: 291-297 (1985).
- 30.- Gyles, L.L., So, M. and Falkow, S.: The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 130: 40-49 (1974).
- 31.- Hale, T.L., Daks, E.V. and Formal, S.B.: Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid coded proteins of *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun., 50: 620-629 (1985).
- 32.- Hale, T., Sansonetti, P., Schad, P. Austin, S. and Formal, S.: Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. Infect. Immunol., 40: 340-350 (1983).
- 33.- Heeseman, J., Gross, V., Schmidt, N. and Lausf, R.: Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia sp* grown in calcium-deficient media. Infect. Immunol., 54: 561-567 (1986).
- 34.- Helnski, D.R.: Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R factors. Ann. Res. Microbiol., 27:437-470 (1970).
- 35.- Henderson, M. and Thomson, J.A.: Expression of an agrocin-encoding plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* in *Rhizobium meliloti*. J. Appl. Bacteriol., 60: 147-154 (1986).
- 36.- Herrington, D.A., Tzipori, S., Robins-Browne, R.M., Tall, B.D. and Levine, M.M.: in vitro and in vivo pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. Infect. Immun., 55: 979-985 (1987).
- 37.- Hirooka, T., Rogowsky, P.M. and Kado, C.: Characterization of the virE locus of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi C58. J. Bacteriol., 169: 1529- 1536 (1987).
- 38.- Hofstad, M. , Reid, W., Yoder, H. and Calnek, B.W.: Diseases of poultry. 7th ed. Iowa University Press. Iowa, USA. 1978.

- 39.- Hughes, C., Phillips, R. and Roberts, A.P.: Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and carriage of hemolysin, colicin and antibiotic resistance determinants. Infect. Immun., **35**: 270-275 (1982).
- 40.- Knudson, G.B.: Photoreactivation of ultraviolet-irradiated, plasmid-bearing and plasmid free strains of *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol., **52**: 444-449 (1986).
- 41.- Komari, T., Halperin, W. and Nester, W.: Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTi Bo542. J. Bacteriol., **166**: 88- 94 (1986).
- 42.- Levine, M.M., Natero, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L. and O'Brien, A.D.: The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis., **152**: 550-559 (1985).
- 43.- Lian, Ch. and Pai, Ch. H.: Inhibition of human neutrophil chemiluminescence by plasmid-mediated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., **49**: 145-151 (1985).
- 44.- Lock, R., Dahlgren, C., Lindén, M., Stendahl, O., Suensbergh, A. and Ohman, L.: Neutrophil killing of two type 1 fimbria-bearing *Escherichia coli* strains: Dependence on respiratory burst activation. Infect. Immunol., **58**: 37-42 (1990).
- 45.- López-Alvarez, J.: Genetic and molecular characterization of the Vir plasmid of septicemic *Escherichia coli*. Ph. D. thesis. University of Guelph. 1978.
- 46.- López-Alvarez, J. and Gyles C.L.: Occurrence of the Vir plasmid among animal and human strains of invasive *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res., **41**: 769-774 (1980).
- 47.- López-Alvarez, J. y Barajas, R.J.: Manual de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias.. F.M.V.Z. U.N.A.M.. 1981.
- 48.- MacConell, M. M., Smith, H., Willshaw, G. A., Scotland, S. M. and Rowe, B.: Plasmid coding for heat-labile enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* O78: comparison of properties. J. Bacteriol., **143**: 158- 167 (1980).
- 49.- Medearis, D., Camitta, B. and Heath, E.: Cell wall composition and virulence in *Escherichia coli*. J. Exp. Med. **128**: 399-414 (1968).
- 50.- Medearis, D. and Kenny, J.: Observations concerning the pathogenesis of *E. coli* infections in mice. J. Immunol., **101**: 534-540 (1968).
- 51.- Milch, H., Nikolnikov, S. and Cziorók, E.: *Escherichia coli*: ColV plasmids and their role in pathogenicity. Acta Microbiol. Hung., **31**: 117-124 (1984).

- 52.- Miller, J.H. : Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Lab, New York, 1972.
- 53.- Mishell, B.B. and Silghi, S. M.: Selected methods in immunology Cellular. W. H. Freeman . Sn Francisco. 1980.
- 54.- Minshew, B.H., Jorgensen, J., Counts,G.W. and Falkow, S.: Association of haemolysin production, Hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. Infect Immun., 20: 50-54 (1987).
- 55.- Minshew, B.H., Jorgensen, J., Swanstrum, M., Grootes-Reuvecamp,G. A.,and Falkow, S.: Some characteristics of *Escherichia coli* strains isolates from extraintestinal infections of humans. J. Infect. Dis., 137: 648-654 (1978).
- 56.- Montenegro, M. A., Bitter-Suerman, D., Timmis, J. K., Agüero,M.E., Cabello, F.C., Sanyal, S.C. and Timmis, K.N.: TraT gene sequences serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolated of coli and other Gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol.,131: 1511-1521 (1985).
- 57.- Ogata, R. and Levine, R. : Characterization of complement resistance in *Escherichia coli* conferred by the antibiotic resistance plasmid R100. J. Immunol., 125: 1494-1498 (1980) .
- 58.- Ozanne, G., Mathieu, L.G. et Baril, J.P.: Production de colicines V et V in vitro et in vivo etude de leve action inhibitrice sur la phagocytose par des macrophages peritone. Rev. Can. Biol., 36: 307-316 (1977).
- 59.- Ozanne, G., Mathieu, L. G. and Baril, J.P.: Production of colicin V in vitro and in vivo observations on its effects in experimental animals. Infect. Immun., 17: 497- 503 (1977).
- 60.- Pérez-Martínez, J.A.: Antigenic diversity and cultural behavior of *Chlamydia psittacy* of mammalian origin. Ph. D. thesis. Lousiana State University and Agricultural and Mechanical Collage. 1985.
- 61.- Portnov, D.A., Moselev, S.L. and Falkow, S.:Characterization of plasmid and plasmid associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infec. Immun., 31: 775-782 (1981).
- 62.- Quackenbush, R. and Falkow, S.: Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. Infect. Immun., 24: 24 562-564 (1979).
- 63.- Reed, L. J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty cent and points. Am. J. Hyg., 27:483-497 (1938).
- 64.- Reeves, P.: The bacteriocins. Bacteriol. Rev.,20: 24-45 (1965).

- 65.- Rottini, G., Dri, P., Soranzo, M. and Patriarca, P.: Correlation between phagocytic activity and metabolic response of polymorphonuclear leukocytes toward different strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun., **11**: 417- 423 (1975).
- 66.- Said, A., Contrepois, M., Vartanian, M. and Girardeau, J: Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from calves with bacteremia. Am. J. Vet. Res., **49**:1657- 1660 (1988).
- 67.- Sakai, T., Sasakawa, Ch., Marino, S. and Yoshikawa, M.: DNA sequence and product analysis of the VirF locus responsible for Congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. Infect. Immun., **54**: 395-402 (1986).
- 68.- Sasakawa, Ch., Kumata J., Sakai, T., Murayama, S.Y. Makino, S. and Yoshikawa, M.: Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri* infect. Immun., **51**: 470-475 (1986).
- 69.- Sasakawa, Ch., Makino, S., Kumata, J. and Yoshikawa, M.: Isolation, characterization and mapping of Tn5 insertions into the 140-megadalton invasion plasmid defectiva in the mouse Sereny test in *Shigella flexneri* 2a. Infect. Immun. **54**:32-36 (1986).
- 70.- Smith, H.W.: A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: The discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. J. Gen. Microbiol., **83**: 95-111 (1974).
- 71.- Smith, H.W.: Transmissible pathogenic characteristic of invasive strain of *Escherichia coli*. J. Am. Vet. Med. Asc., **73**:601-607 (1978).
- 72.- Smith, W. and Halls, S. : The experimental infection of calves with bacteriaemia-producing strains of *Escherichia coli*: The influence of colostrum. J. Med. Microbiol. **1**: 61-78 (1968).
- 73.- Smith, H.W. and Huggins, M.B.: Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. J. Gen. Microbiol., **92**: 335- 350 (1976).
- 74.- Smith, H.W. and Huggins, M.B.: The association of the O18, K1 and H7 antigens and the ColV plasmid of a strain of *Escherichia coli* with its virulence and immunogenicity. J. Gen. Microbiol., **121**: 387-400 (1980).
- 75.- Smith, W. and Huggins, M.: Treatment of experimental *Escherichia coli* infection in mice with colicine V. J. Med. Microbiol., **10**: 479-482 (1977).
- 76.- Silverblat, F., Dreyer, J. and Schavers, S.: Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis. Infect. Immunol., **24**: 218-223 (1979).

- 77.- So, M., Dallas, W. S. and Falkow, S.: Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: Molecular cloning of the toxin determinant. Infect. Immun., 21: 405-411 (1978).
- 78.- Stachel, S.E. and Zambrayski, P.C.: VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell, 46: 325-333 (1986).
- 79.- Staider, J. and Adelberg, E. A.: Temperature dependence of sex factor maintenance in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol., 109: 447-449 (1972).
- 80.- Summers, A. and Silver, S.: Microbial transformations of metals. Annu. Rev. Microbiol., 32: 637-672 (1978).
- 81.- Tauxe, R., Cavanagh, T. and Cohen, M.: Interspecies gene transfer in vivo producing an outbreak of multiply resistant shigellosis. J. Infect. Dis., 160: 1067-1070 (1989).
- 82.- Tippetts, M. and Robertson, D.: Molecular cloning and expression of the *Bacillus anthracis* edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylate cyclase. J. Bacteriol., 170: 2263-2266 (1988).
- 83.- Tolmasky, M., Salinas, P., Actis, L. and Crosa, J.: Increased production of the siderophore angulobactin mediated by pJMI-like plasmids in *Vibrio anguillarum*. Infect. Immunol., 56: 1608-1614 (1988).
- 84.- Tomoeda, M., Inuzaka, M., Kubo, N. and Nakamura, S.: Effective elimination of drug resistance (R) and sex (F) factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol., 95: 1078-1089 (1968).
- 85.- Uchida, M. I., Hashimoto, K. and Terafado, N.: Virulence and immunogenicity in experimental animal of *Bacillus anthracis* strains harbouring or lacking 110 MDa and 60 MDa plasmids. J. Gen. Microbiol., 132: 557-559 (1986).
- 86.- Verweij-Van Vught, A., Namavar, F., Pearbooms, P., Sparrius, M. and Maclaren D.: The role of different K antigens of *Escherichia coli* phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. J. Med. Microbiol., 17: 141-150 (1984).
- 87.- Waalwijk, C. and Graaff, J.: Inactivation of haemolysin production in *Escherichia coli* by transposon insertion results in loss of virulence. Antonie Van Leeuwenhoek, 49: 23-30 (1983).
- 88.- Warner, P.J., Williams, P., Bindereif, A. and Neilands, J.: ColV plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 33: 540-545 (1981).
- 89.- Warren, R., Rogolsky, M., Wiley, B. and Glasgow, L.: Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 118: 980-985 (1974).

- 90.- Watanabe, H. and Nakamura, A.: Identification of *Shigella sonnei* form I plasmid genes necessary for cell invasion and their conservation among shigella species and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun. 53:352-358 (1986).
- 91.- Waters, V. and Crosa, J.: Colicin V virulence plasmids. Microbiol. Rev., 55: 437-450 (1991).
- 92.- Willey, B.B. and Rogolsky, M.: Molecular and serological differentiation of Staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. Infect. Immun., 18:487-494 (1977).
- 93.- Wolf-Wats, H., Portnoy, D., Bolin, I. and Falkow, S.: Transfer of the virulence plasmid of *Yersinia pestis* to *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun., 48: 241-243 (1985).
- 94.- Zink, D.L., Feeley, J.C., Wells, J.G., Venderzant, C., Vickery, J.C., Roof, W.D., and O'Donovan, G.A.: Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. Nature, 283: 224-226 (1980).

## APENDICE 1: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

## APENDICE 1 : MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

### 1.1 Medio para conservar cepas de *E. coli*.

Caldo nutritivo <sup>1</sup>	10 g.
Cloruro de sodio <sup>2</sup>	5 g.
Bacto-agar <sup>1</sup>	6 g.
agua destilada	1000 g.

Disolver los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición y distribuir en viales de cintilación. Esterilizar por autoclave. Dejar enfriar los tubos en posición vertical.

### 1.2 Caldo LT

Triptona <sup>3</sup>	10 g.
Extracto de levadura <sup>1</sup>	5 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

Disolver los ingredientes en el agua destilada y ajustar a pH 7.6 con tris<sup>3</sup> al 12 %.

### 1.3 Caldo LTC

Al caldo LT adicionarle  $5 \times 10^{-3}$  M de cloruro de calcio<sup>2</sup>.

### 1.4 Agar LTC.

---

<sup>1</sup>Difco Lab., Detroit, Michigan, USA.

<sup>2</sup>J.T. Backer, Xalostoc, México.

<sup>3</sup>Merck, Darmstadt, Alemania.

Al caldo LTC adicionarle 1% de agar.

### 1.5 Agar LTC semisólido.

Al caldo LTC se le adiciona 0.6 % de agar.

### 1.6 Solución Buffer de fosfatos con 0.01 % de gelatina (PBSgel).

#### Solución A

Fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	11 g.
Agua destilada	1000 ml.

#### Solución B

Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	9.08 g
agua destilada	1000 ml.

Para 100 ml de buffer pH 7.2 : Mezclar 72 ml de la sol. A y 28 ml. de la sol.

B. Checar el pH, agregar 0.01 % de gelatina nutritiva<sup>1</sup>, calentar ligeramente, distribuir en tubos y esterilizar por autoclave.

### 1.7 Agar Mini-Mac (MacConkey mínimo)

Preparar la siguiente fórmula:

Bactoagar	7.5 g.
Lactosa <sup>2</sup>	5.0 g.
Sales biliares No 3 <sup>2</sup>	0.75 g.
Rojo neutro <sup>3</sup>	0.015 g.
Cristal violeta <sup>*3</sup>	0.0005 g.

---

<sup>1</sup> Difco Lab., Detroit, Michigan, USA.

<sup>2</sup> Merck, Alemania.

<sup>3</sup> Sigma., St. Louis, Mo. USA

Agua destilada                      400 ml.

Esterilizar por autoclave.

\* Pesar 0.05 g. de cristal violeta y diluirlos en 100 ml de agua destilada. Un ml de esta solución contiene 0.0005 g de cristal violeta.

Mezclar en condiciones de esterilidad:

Agar líquido (formula anterior)    400 ml.

Sales M9 (5X)<sup>1</sup>                      100 ml

CaCl<sub>2</sub> 0.01M<sup>1</sup>                      5 ml.

MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>                      0.5 ml

### 1.8 Agar mini-mac-ampicilina-kanamicina-colicina V.

Preparar tubos con 20 ml de mini-mac y autoclavear enfriar a 45°C y agregar las sales y los antibióticos que quedan a una a concentración de 8 µg/ml cada uno. Homogeneizar y vaciar en cajas de petri esteriles permitir que solidifique y sembrar 0.1 ml de una cepa colicina V<sup>\*</sup> resistente a ampicilina y a Kanamicina (previamente crecida en caldo nutritivo durante toda la noche) e incubar a 37°C durante 12 a 18 horas. Someter a vapores de cloroformo 15 minutos y otros 15 minutos a que se evaporen. Colocar una sobrecapa de 5 ml de mini-mac que contenga la misma concentración de antibióticos. Refrigerar toda la noche para permitir que difunda la colicina V.

### 1.9. Solución Balanceda de sales de Hank modificada (10 X).

Solución A

---

<sup>1</sup> J.T. Backer, Xalostoc, México.

NaCl	80 g
KCl <sup>1</sup>	4 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	1 g
MgCl. 6H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	1 g

Disolver en 400 ml de agua deionizada.

Solución B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	1.5 g
--	-------

Disolver en 400 ml de agua deionizada

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	0.6 g
--	-------

Disolver y aforar a 500 ml con agua deionizada.

La solución A y la solución B se esterilizan separadamente por autoclave y posteriormente se mezclan de manera estéril.

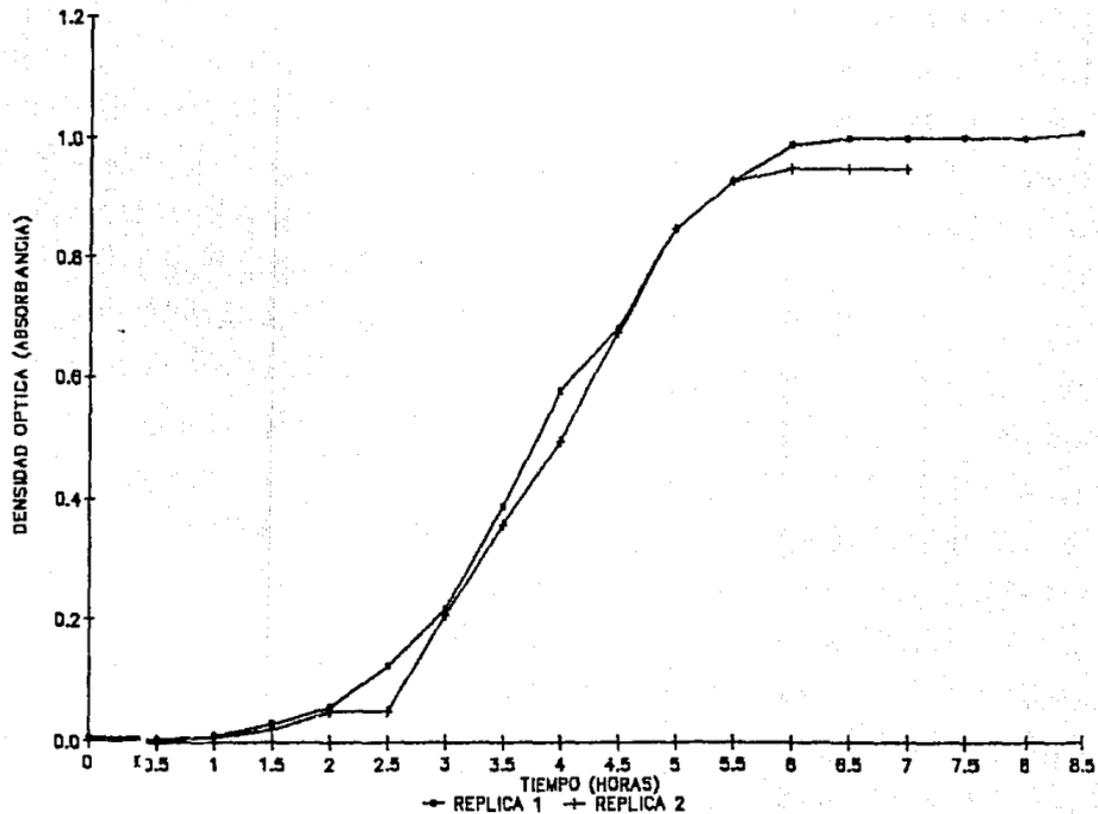
---

<sup>1</sup> J.T. Backer, Xalostoc, México.

**APENDICE 2: CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE CINCO  
CEPAS AVIARES DE *E. coli* CoIV\***

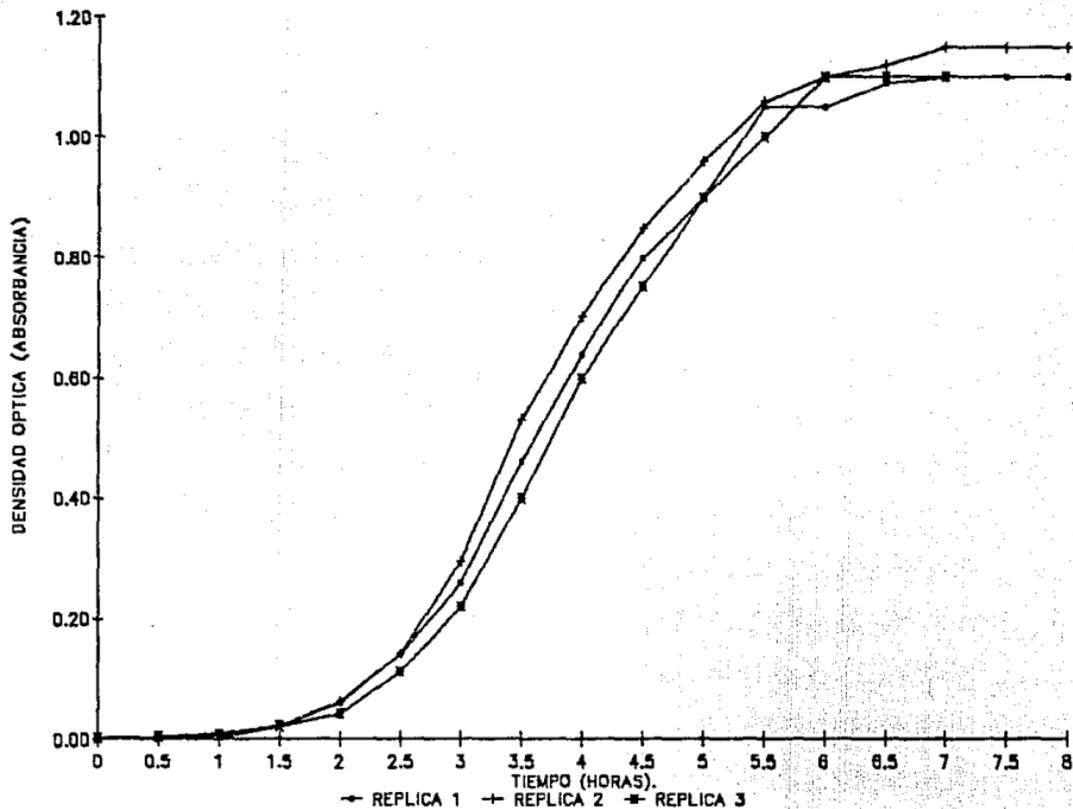
# CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

*E. coli* cepa YA4 colV+



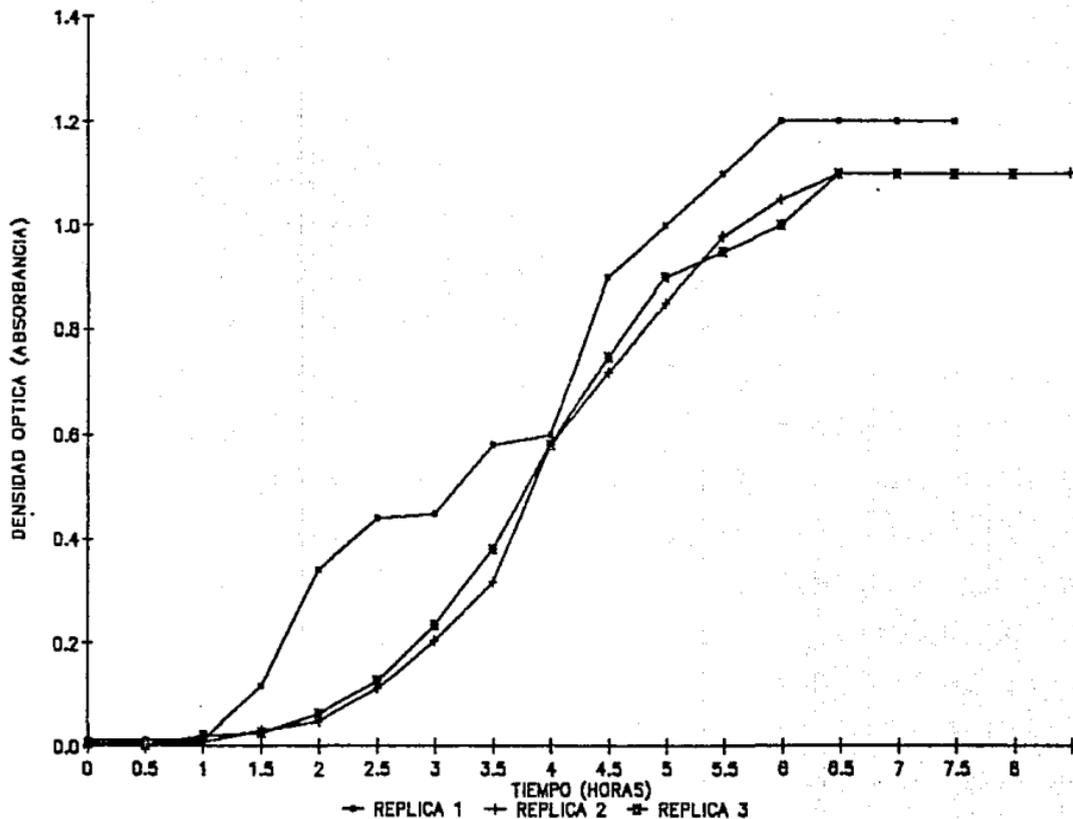
# CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

*E. coli* cepa YA10 ColV+.



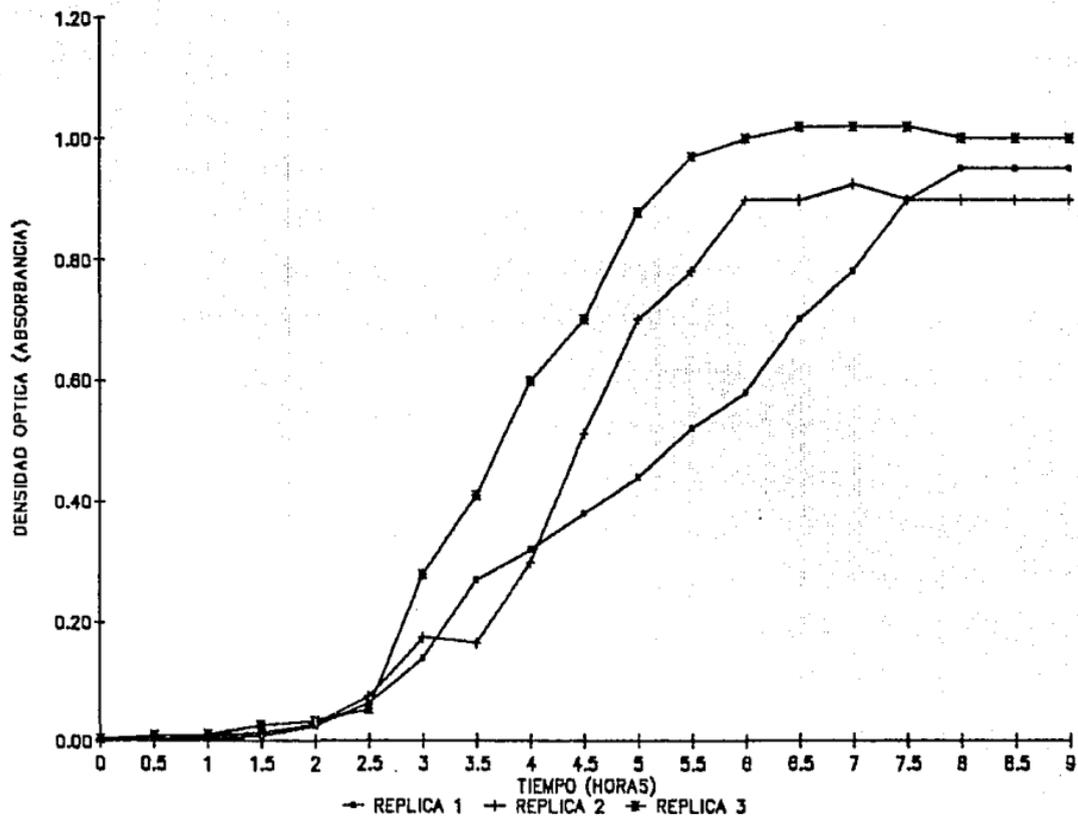
# CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

E. coli cepa YA12 CoIV+



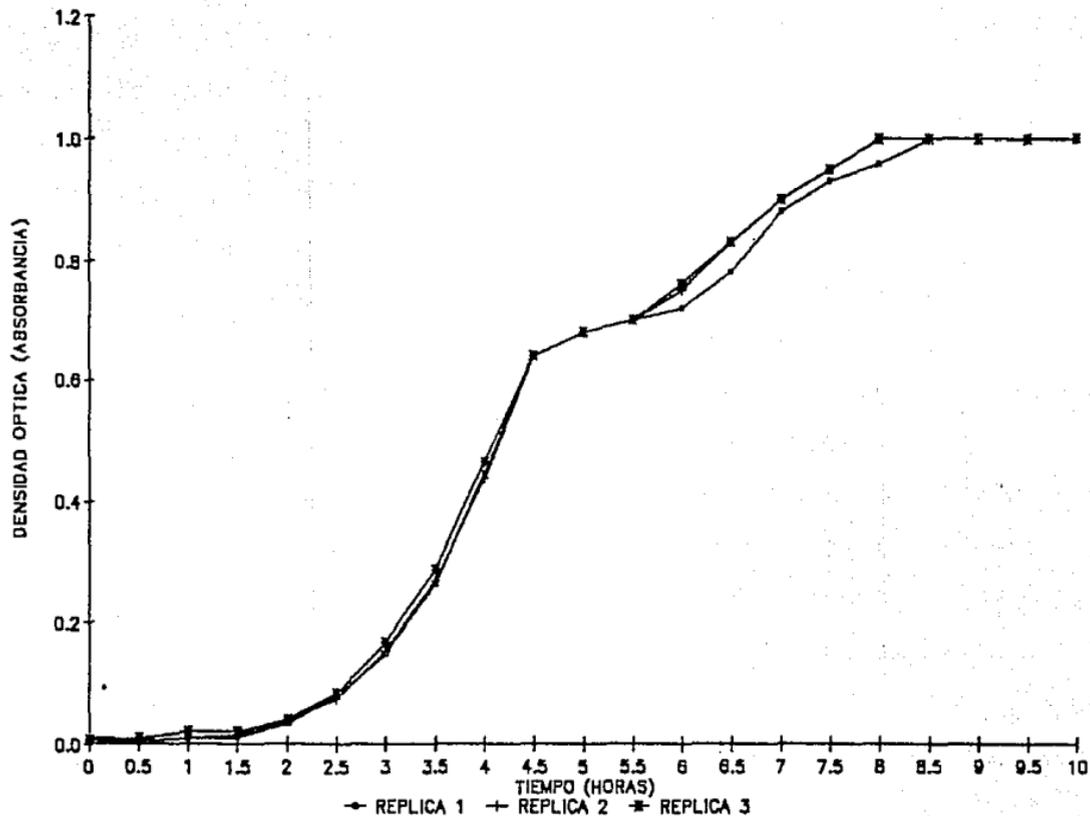
# CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

*E. coli* cepa YA18 colV+



# CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

E. Coli cepa YA21 ColV+



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 79 -

**APENDICE 3: DL<sub>50</sub> DE CINCO CEPAS AVIARES DE *E. coli*  
CoIV\* POR EL METODO DE REED Y MUENCH UTILIZANDO UN  
MODELO DE POLLO DE ENGORDA.**

DOSIS LETAL 50 DE E. coli YA4 ColV+

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	PORCENTAJE
S.D	4X10 <sup>9</sup>	6/6	6	0	17	0	17/17	100
10 <sup>-1</sup>	4X10 <sup>8</sup>	6/6	6	0	11	0	11/11	100
10 <sup>-2</sup>	4X10 <sup>7</sup>	5/6	5	1	5	1	5/6	83
10 <sup>-3</sup>	4X10 <sup>6</sup>	0/6	0	6	0	7	0/6	0
10 <sup>-4</sup>	4X10 <sup>5</sup>	0/6	0	6	0	13	0/7	0
10 <sup>-5</sup>	4X10 <sup>4</sup>	0/6	0	6	0	19	0/13	0
PBSgel	0	0/6	0	6	0	25	0/25	0

1.-  $d.p. = h \ 83 - 50 / 83 - 0 = h \ 33 / 83 = h \ (0.3976)$   
 $h = \log. 1 / 10 = -1$   
 $d.p. = (-1) (0.3976) = - 0.3976$

2.-  $\log. 1 / 100 = -2$   
 $-0.3976 + (-2) = -2.3976$

3.- antilog. de 2.3976 = 249.80

4.-  $DL50 = 4 \times 10^9 / 249.8 = 1.6 \times 10^7$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli Y1A10 ColV+

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	PORCENTAJE
S.D	1.2X10 <sup>9</sup>	6/6	6	0	13	0	13/13	100
10 <sup>-1</sup>	1.2X10 <sup>8</sup>	5/6	5	1	7	1	7/8	87
10 <sup>-2</sup>	1.2X10 <sup>7</sup>	2/6	2	4	2	5	2/7	28
10 <sup>-3</sup>	1.2X10 <sup>6</sup>	0/6	0	6	0	11	0/11	0
10 <sup>-4</sup>	1.2X10 <sup>5</sup>	0/6	0	6	0	17	0/17	0
10 <sup>-5</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	0/6	0	6	0	23	0/23	0
10 <sup>-6</sup>	1.2X10 <sup>3</sup>	0/6	0	6	0	29	0/29	0
10 <sup>-7</sup>	1.2X10 <sup>2</sup>	0/6	0	6	0	35	0/35	0
10 <sup>-8</sup>	1.2X10 <sup>1</sup>	0/6	0	6	0	41	0/41	0
PBSgel	0	0/6	0	6	0	47	0/47	0

1.-  $d.p. = h \cdot 87 - 50 / 87 - 28 = h \cdot 37 / 59 = h (0.6271)$

$h = -1$

$d.p. = (-1) (0.6271) = -0.6271$

2.-  $\log. 1 / 10 = -1$

$\log. DL50 = (-0.6271) + (-1) = -1.6271$

3.-  $\text{antilog. de } 1.6271 = 42.37$

4.-  $DL50 = 1.2 \times 10^9 / 42.37 = 2.8 \times 10^7$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli YA12 ColV+

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	PORCENTAJE
S.D	5.7X10 <sup>9</sup>	6/6	6	0	7	0	7/7	100
10 <sup>-1</sup>	5.7X10 <sup>8</sup>	1/6	1	5	1	5	1/6	16
10 <sup>-2</sup>	5.7X10 <sup>7</sup>	0/6	0	6	0	11	0/11	0
10 <sup>-3</sup>	5.7X10 <sup>6</sup>	0/6	0	6	0	17	0/17	0
10 <sup>-4</sup>	5.7X10 <sup>5</sup>	0/6	0	6	0	23	0/23	0
10 <sup>-5</sup>	5.7X10 <sup>4</sup>	0/6	0	6	0	29	0/29	0
10 <sup>-6</sup>	5.7X10 <sup>3</sup>	0/6	0	6	0	35	0/35	0
10 <sup>-7</sup>	5.7X10 <sup>2</sup>	0/6	0	6	0	41	0/41	0
10 <sup>-8</sup>	5.7X10 <sup>1</sup>	0/6	0	6	0	47	0/47	0
PBSgel	0	0/6	0	6	0	53	0/53	0

1.-  $d.p. = h \frac{100 - 50}{100 - 16} = h \frac{50}{84}$   
 $h = -1$   
 $d.p. = (-1) (0.5952) = -0.5952$

2.-  $\text{Log. de DL50} = (-0.5952) \div (0) = -0.5952$

3.-  $\text{Antilog. de } 0.5952 = 3.9373$

4.-  $DL50 = 5.7 \times 10^{-9} / 3.9373 = 1.4 \times 10^{-9}$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli YA16 ColV4

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	RELACION	MORTALIDAD PORCENTAJE
S.D	4.5X10 <sup>9</sup>	6/6	6	0	14	0	14/14	100
10 <sup>-1</sup>	4.5X10 <sup>8</sup>	6/6	6	0	8	0	8/8	100
10 <sup>-2</sup>	4.5X10 <sup>7</sup>	2/6	2	4	2	4	2/6	33
10 <sup>-3</sup>	4.5X10 <sup>6</sup>	0/6	0	6	0	10	0/10	0
10 <sup>-4</sup>	4.5X10 <sup>5</sup>	0/6	0	6	0	16	0/16	0
10 <sup>-5</sup>	4.5X10 <sup>4</sup>	0/6	0	6	0	22	0/22	0
PBSgel	0	0/6	0	6	0	28	0/28	0

1.-  $d.p. = h \ 100 - 50 / 100 - 33 = h \ 50 / 67 = h \ (0.7462)$   
 $h = -1$   
 $d.p. = (-1) \ (0.7462) = -0.7462$

2.-  $\text{Log. } 10 \text{ de DL50}$   
 $(-0.7462) + (-1) = -1.7462$

3.-  $\text{Log. } 1.7462$   
 $\text{Antilog. de } 1.7462 = 55.74$

4.-  $DL50 = 4.5 \times 10^9 / 55.74 = 8.1 \times 10^7$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli YA21 ColV+

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES		ACUMULADOS	
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	MORTALIDAD PORCENTAJE
S.D	2.7X10 <sup>9</sup>	6/6	6	0	13	0	13/13	100
10 <sup>-1</sup>	2.7X10 <sup>8</sup>	6/6	6	0	7	0	7/7	100
10 <sup>-2</sup>	2.7X10 <sup>7</sup>	1/6	1	5	1	5	1/6	16
10 <sup>-3</sup>	2.7X10 <sup>6</sup>	0/6	0	6	0	11	0/11	0
10 <sup>-4</sup>	2.7X10 <sup>5</sup>	0/6	0	6	0	17	0/17	0
10 <sup>-5</sup>	2.7X10 <sup>4</sup>	0/6	0	6	0	23	0/23	0
10 <sup>-6</sup>	2.7X10 <sup>3</sup>	0/6	0	6	0	29	0/29	0
10 <sup>-7</sup>	2.7X10 <sup>2</sup>	0/6	0	6	0	35	0/35	0
10 <sup>-8</sup>	2.7X10 <sup>1</sup>	0/6	0	6	0	41	0/41	0
PBSgel	0	0/6	0	6	0	47	0/47	0

1.-  $d.p. = h \ 100 - 5 / 100 - 16 = (-1) \ 50 / 84$   
 $-1 (0.5952) = -0.5952$

2.-  $\text{Log } 10 \text{ de DL50}$   
 $(-0.5952) + (-1) = -1.5952$

3.-  $\text{Antilog. de DL50}$   
 $-1.5952 = 39.37$

4.-  $DL50 = 2.7 \times 10^9 / 39.37 = 6.8 \times 10^7$

^ = exponencial

**APENDICE 4: DL<sub>50</sub> DE *E. coli* ColV\* y ColV\* POR EL METODO DE REED Y MUENCH USANDO UN MODELO MURINO.**

DOSIS LETAL 50 DE *E. coli* 1A21 ColV+  
 MODELO MURINO

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	MORTALIDAD PORCENTAJE
S.D	$1.3 \times 10^9$	4/4	4	0	9	0	9/9	100
$10^{-1}$	$1.3 \times 10^8$	4/4	4	0	5	0	5/5	100
$10^{-2}$	$1.3 \times 10^7$	1/4	1	3	1	3	1/4	25
$10^{-3}$	$1.3 \times 10^6$	0/4	0	4	0	7	0/7	0
PBS	0	0/4	0	4	0	11	0/11	0

1.-  $d.p. = -1 \quad 100-50 / 100-25 = -1 \quad 50 / 75 = -1 \quad (0.666) = -0.666$

2.-  $\log 1 / 10 = -1$   
 $(-0.666) + (-1) = -1.666$

3.-  $\text{antilog. de } 1.666 = 46.40$

4.-  $DL50 = 1.3 \times 10^9 / 46.40 = 2.8 \times 10^7$

\* = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli YA21 ColV-  
 MODELO MURINO

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	PORCENTAJE
SD	1.3 X 10 <sup>9</sup>	4 / 4	4	0	6	0	6 / 6	100
10 <sup>-1</sup>	1.3 X 10 <sup>8</sup>	1 / 4	1	3	2	3	1 / 5	40
10 <sup>-2</sup>	1.3 X 10 <sup>7</sup>	1 / 4	1	3	1	6	1 / 7	14.28
10 <sup>-3</sup>	1.3 X 10 <sup>6</sup>	0 / 4	0	4	0	10	0 / 10	0
10 <sup>-4</sup>	1.3 X 10 <sup>5</sup>	0 / 4	0	4	0	14	0 / 14	0
PBS	0	0 / 4	0	4	0	18	0 / 18	0

1.-  $d.p. = -1 \ 100 - 50 / 100 - 40 = -1 \ 50 / 60 = -1 \ (0.8333) = -0.8333$

2.-  $\log. 0 = 0$

$(-0.8333) + (0) = -0.8333$

3.-  $\text{antilog. de } 0.8333 = 6.8112$

4.-  $DL50 = 1.3 \times 10^9 / 6.8112 = 1.9 \times 10^9$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli 711 ColV+  
 MODELO MURINO

DILUCIÓN	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	MORTALIDAD RELACION	PORCENTAJE
SD	1 X 10 <sup>8</sup>	4 / 4	4	0	10	0	10 / 10	100
10 <sup>-1</sup>	1 X 10 <sup>7</sup>	4 / 4	4	0	6	0	6 / 6	100
10 <sup>-2</sup>	1 X 10 <sup>6</sup>	2 / 4	2	2	2	2	2 / 4	50
10 <sup>-3</sup>	1 X 10 <sup>5</sup>	0 / 4	0	4	0	6	0 / 6	0
10 <sup>-4</sup>	1 X 10 <sup>4</sup>	0 / 4	0	4	0	10	0 / 10	0
PBS	0	0 / 2	0	2	0	12	0 / 12	0

1.-  $d.p. = -1 \cdot 100 - 50 / 100 - 0 = -1 \cdot 50 / 100 = -1 (0.5) = -0.5$

2.-  $\log. 1 / 10 = -1$

$(-0.5) + (-1) = -1.5$

3.-  $\text{antilog. de } 1.5 = 31.62$

4.-  $DL50 = 1 \cdot 10^8 / 31.62 = 3.1 \cdot 10^7$

^ = exponencial

DOSIS LETAL 50 DE E. coli 711  
 MODELO MURINO

DILUCION	NUMERO DE BACTERIAS	RELACION DE MORTALIDAD	MUERTOS	VIVOS	VALORES ACUMULADOS			
					TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	RELACION MORTALIDAD	PORCENTAJE
SD	4 X 10 <sup>9</sup>						6 / 6	100
10 <sup>-1</sup>	4 X 10 <sup>8</sup>	4 / 4	4	0	6	0	2 / 4	50
10 <sup>-2</sup>	4 X 10 <sup>7</sup>	2 / 4	2	2	2	2	0 / 6	0
10 <sup>-3</sup>	4 X 10 <sup>6</sup>	0 / 4	0	4	0	6	0 / 60	0
10 <sup>-4</sup>	4 X 10 <sup>5</sup>	0 / 4	0	4	0	10	0 / 14	0
FBS	0	0 / 4	0	4	0	14		

1.-  $d.p. = -1 \ 100 - 50 / 100 - 0 = -1 \ 50 / 100 = (-1) (0.5) = -0.5$

2.-  $\log. 0 = 0$

$-0.5 + 0 = -0.5$

3.-  $\text{antilog de } 0.5 = 3.1622$

4.-  $DL50 = 4 \times 10^9 / 3.1622 = 1.2 \times 10^9$

^ = exponencial