

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

3  
20j



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL EN EL  
CONEJO PARA EL ESTUDIO DE VEROCITOTOXINAS  
( VT ) DE Escherichia coli

**T E S I S**

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA  
P R E S E N T A:  
Q.B.P. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



## **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.

El presente trabajo fue desarrollado en:

-Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET)  
-Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN  
-Unidad de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM.

Agradezco a todo el Personal que labora en los sitios antes mencionados por su desinteresado y atinado apoyo en la realización del presente trabajo.

A Gloria Elena, Brenda Elena y Edgar Guillermo por ser mi motivación mas fuerte.

A mi Padre, por su apoyo eterno.

Al MVZ Dario Güiris A. por su amistad, enseñanzas y participación en los aspectos quirúrgicos del trabajo.

Al Dr. Jorge Tórtora P. por su atinada asesoría y consejos.

A todos los profesores y compañeros del Posgrado de la FES-C

A mis SINODALES:

DR. JORGE TORTORA PEREZ  
M en C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE  
M en C. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON  
M en C. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
M en C. ANDRES ROMERO ROJAS.

por sus correcciones y consejos.

A TI, donde quiera que te encuentres.

GRACIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVÁNAMA DE  
MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES - Cuautitlán  
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL EN EL CONEJO PARA EL ESTUDIO DE VEROCITOTOXINAS (VT) DE *Escherichia coli*"

que presenta el (la) alumno (a) GUILLELMO VALDIVIA ANDA

con Núm. de cuenta 9181051-7 N° Exp. 100911010  
para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 19 \_\_\_\_\_

#### NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. JORGE TORTORA PEREZ

VOCAL: MC. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

SECRETARIO MC. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

1er. SUPL. MC. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

2do. SUPL. MC. ANDRES ROMERO ROJAS

*Jorge Tortora Pérez*  
*Clara Inés Álvarez Manrique*  
*Alma Virginia Lara Sagahon*  
*Susana E. Mendoza Elvira*  
*Andrés Romero Rojas*

## INDICE

### RESUMEN

#### INTRODUCCION

I. CLASIFICACION DE <i>Escherichia coli</i> .....	1
II. TOXINAS .....	2
III. EL SINDROME UREMICO HEMOLITICO.....	2
IV. ENFERMEDADES EN ANIMALES.....	3
V. MODELOS ANIMALES.....	3
VI. LESIONES PRINCIPALES.....	4
VII. ROTAVIRUS.....	5

#### OBJETIVO

I. JUSTIFICACION	
II. HIPOTESIS DE TRABAJO	
III. OBJETIVO GENERAL	
IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6

#### MATERIAL Y METODOS

I. MODELO ANIMAL	
A. Anestesia.....	7
B. Cirugía.....	7
C. Cepas de Referencia.....	8
D. Diseño experimental.....	9
1.- Obtención del inóculo	
2.- Lotificación	
3.- Evaluación experimental	
E. Pruebas de Patología Clínica.....	10
1.- Biometría Hemática	
2.- Haptoglobina Sérica	
3.- Hemoglobina sérica	
4.- Urea sérica	
5.- Creatinina sérica	
6.- Transaminasa Glutámico Pirúvica	
7.- Creatinfosfoquinasa	
8.- Deshidrogenasa láctica	
F. Valores Normales de las determinaciones en sangre.	11
G. Métodos estadísticos.....	11

II. OBTENCION DE MUESTRAS A PARTIR DE BOVINOS.....	12
A. Datos de Patología	
B. Exámen coproparasitológico	
C. Aislamientos bacteriológicos	
D. Caracterización de las cepas aisladas	

III. OBTENCION DE LA TOXINA.....	13
A. Identificación de la toxina semejante a Shiga	
B. Cuantificación de la Verotoxina	

IV. IDENTIFICACION DE ROTAVIRUS.....	14
A. Extracción del RNA viral	

B. Corrimiento electroforético  
C. Análisis gráfico del Gal.

**RESULTADOS**

I. MODELO ANIMAL.....	16
A. Evaluación de la técnica quirúrgica	
B. Rangos normales para las determinaciones	
C. Evaluación del modelo animal	
D. Análisis estadístico	
II. BOVINOS TRABAJADOS .....	32
A. Signos y lesiones en los bovinos	
B. Histopatología	
C. Aislamientos bacteriológicos	
D. Identificación de hemolisinas	
E. Evaluación de Verocitotoxinas	
F. Identificación de Rotavirus	

**DISCUSION**

I. MODELO ANIMAL.....	40
A. Técnica quirúrgica	
B. Absorción de la toxina	
C. Efectos en Hemostasia	
D. Efectos hemolíticos	
E. Efectos sobre el Sistema Nervioso	
F. Efectos digestivos	
G. Efectos sobre el riñón	
H. Signos de anemia	
I. Patogénesis en el modelo	
II. ENFERMEDAD EN LOS BOVINOS.....	47
A. Cuadro por ECVT	
B. Rotavirus	

BIBLIOGRAFIA.....	52
-------------------	----

**INDICE  
DE CUADROS Y FIGURAS**

CUADRO Nº 1.- Valores normales encontrados en los conejos para las determinaciones en sangre.....	17
CUADRO Nº 2.- Resultados de las pruebas en sangre practicas después de la cirugía.....	25
CUADRO Nº 3.- Análisis estadístico de los resultados para las determinaciones sanguíneas practicadas a los conejos...	31
CUADRO Nº 4.- Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas.....	33

<b>CUADRO Nº 5.- Frecuencia de cepas de Escherichia coli Beta hemolíticas aisladas en terneros.....</b>	<b>33</b>
<b>CUADRO Nº 6.- Cuantificación de las citotoxinas producidas por las cepas empleadas .....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA Nº 1.- Esquema de la región cecal en los conejos....</b>	<b>8</b>
<b>FIGURA Nº 2.- Esquema de la estructura histológica del apéndice cecal en los conejos.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA Nº 3.- Valores promedio para las determinaciones de Urea y creatinina posteriores a la cirugía.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA Nº 4.- Valores promedio para las determinaciones de hemoglobina plasmática y haproglobina posteriores a la cirugía .....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA Nº 5.- Valores promedio para las determinaciones de la biometría hemática posteriores a la cirugía .....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA Nº 6.- Frecuencia de cepas positivas a la producción de citotoxinas.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA Nº 7.- Frecuencia de casos positivos a al menos una cepa citotóxica.....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA Nº 8.- Electroferotipo de los corrimientos de heces para rotavirus.....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA Nº 9.- Frecuencia de rotavirus bovino en la sala de lactancia .....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA Nº 10.- Frecuencia mensual de rotavirus identificados por PAGE .....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA Nº 11.- Relación de la presentación de rotavirus con cepas citotóxicas en terneros.....</b>	<b>38</b>

## RESUMEN

*Escherichia coli* puede producir diversos tipos de citotoxinas, entre ellas las que tienen efecto sobre células Vero (VT) son de las más estudiadas y han sido asociadas a enfermedades como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), la Colitis hemorrágica, la Enfermedad Edematosa Porcina (EEP) y la Enfermedad Edematosa Bovina. La patogenia de los problemas antes mencionados no ha podido ser deducida en su totalidad, principalmente por no contar con un modelo animal que reproduzca las enfermedades adecuadamente.

El objetivo general del trabajo fue establecer un modelo animal en el laboratorio para el estudio de cepas citotóxicas de *Escherichia coli* asociadas al SUH y a un brote de diarreas en terneros.

Se lograron reproducir la mayor parte de los signos asociados a Colitis hemorrágica y SUH en el modelo en conejo mediante el aislamiento "in situ" del apéndice cecal. Los signos se desarrollaron rápidamente, 2-5 días, en forma severa y consistieron primordialmente en diarrea hemorrágica, deshidratación, daño renal y anemia por destrucción intravascular. Las cepas inoculadas provocaron destrucción de linfocitos, edema, congestión, hemorragia e infiltración linfocitaria en el sitio de inoculación.

El modelo permitió deducir la patogenia de las ECVT como una absorción de la toxina a nivel intestinal con diseminación sanguínea teniendo efectos citotóxicos en el tejido intestinal, en riñón y provocando una hemólisis intravascular.

En el trabajo se aislaron cepas ECVT de bovinos y se asociaron a enteritis y colitis hemorrágica en los terneros, no existió asociación con la infección con Rotavirus bovino detectada con una frecuencia de 32.5% ; comportándose la infección por *Escherichia coli* como una probable infección primaria.



## INTRODUCCION

### I. CLASIFICACION DE *Escherichia coli*

Tradicionalmente se ha dividido a las cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea en cinco grupos: (6,16,63,64,65,67).

**A. Enterotoxigénica (ETEC).**- que se caracteriza por producir enterotoxinas termolábil (LT) , termoestable (ST) o ambas, la información genética para ambas enterotoxinas se encuentra en plásmidos, se incluyen varios serotipos y son causa principal de diarrea del viajero y diarrea en lactantes en los países subdesarrollados.

**B. Enteroinvasiva (EIEC).**- invaden la mucosa intestinal de manera semejante a *Shigella dysenteriae*, provocando disenteria , esta capacidad invasiva depende de un plásmido de aproximadamente 140 MDa, el cual codifica para la producción de varias proteínas de Membrana Externa (OMP) involucradas en la invasión.

**C. Enteropatógena (EPEC).**- el mecanismo de patogenicidad no está aún bien establecido, es un grupo involucrado en brotes de diarrea en niños, hay estudios que sugieren que la adherencia a la mucosa intestinal puede ser el mecanismo por medio del cual se causa daño a los tejidos, este grupo se ha subdividido de acuerdo al patrón de adherencia que presentan en cultivos celulares.

**D. Enterohemorrágica (EHEC).**- en las cuales la producción de citotoxinas (con capacidad de destruir células eucarióticas) es el mecanismo de patogenicidad, además de que no producen ST ni LT y no son invasivas (16). Causan cuadros como colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), el serotipo O157:H7 fué el primero involucrado, pero actualmente se han relacionado a los serotipos O111:H- y O26:H11.

**E. Enteroadherente (EAEC).**- se han identificado por su capacidad única de adherencia a células Hep-2, no elaboran enterotoxinas, citotoxinas, no invaden células epiteliales y sus propiedades de adherencia se han relacionado con la presencia de plásmidos.

En el área veterinaria las cepas de *Escherichia coli* productoras de problemas gastrointestinales se clasifican como Enteropatógenas, independientemente del mecanismo de patogenicidad que presenten (5,27,29).

Los cuadros clínicos que suelen presentarse en bovinos son: Septicémico, Enterotóxico y Enterotoxémico (Enfermedad edematosa bovina)

## II. TOXINAS

*Escherichia coli* produce una serie de toxinas bien caracterizadas como las enterotoxinas, las citotoxinas y también otro tipo de exotoxinas llamadas Factor Citotóxico Necrotizante (CFN 1 y CFN 2), el cuál causa necrosis en piel de conejo y células multinucleadas, con redondeamiento, en cultivo de tejidos (células HeLa, CHO o Vero) las cepas productoras de este CNF se han aislado de niños y bovinos (30,62).

Las citotoxinas producidas por *Escherichia coli* han sido llamadas Verotoxinas por su efecto citotóxico sobre células Vero o también como toxinas semejantes a Shiga por su semejanza antigénica con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo I, de tal forma que es común la denominación de VT o SLT (Shiga Like Toxin) (51).

Estas toxinas VT son codificadas en el genoma bacteriano por la lisogenización con bacteriófagos, de los cuales se han estudiado principalmente dos tipos que son diferentes tanto morfológicamente como genotípicamente al mediar dos toxinas con diferencias antigénicas, estos dos fagos, al igual que sus toxinas, se han llamado VT1 (SLT I) y VT2 (SLT II) (14). Los fagos anteriores han sido extraídos de una cepa del serotipo O157:H7 aislada de un brote de enfermedad en el humano y nombrada como 933 y han sido introducidos en una cepa de *Escherichia coli* de laboratorio llamada K12 C600 con lo cual se obtuvieron las lisogenizadas 933J y 933W productoras de VT1 y VT2 respectivamente (50). La citotoxina VT2v esta codificada a nivel de cromosoma (79).

En la actualidad se asocia a todas las diferentes toxinas VT descritas como una familia con relaciones antigénicas entre ellas (50). De tal forma que se han descrito los siguientes tipos de toxinas: VT1, VT2, VT2v (VT2e, VTE), VT2ha y VT2hb (28,77).

## III. EL SINDROME UREMICO HEMOLITICO (SUH)

Es una enfermedad que ataca en la niñez y que se caracteriza por provocar falla renal aguda, anemia hemolítica microangiopática, uremia y trombocitopenia ( 20,32,75). Existe una fuerte correlación entre el SUH y la infección con ciertos serotipos de *Escherichia coli* que tienen como característica común la producción de una potente citotoxina VT (2,31,32,47,48,75,77). Otras bacterias productoras de toxinas semejantes, también han sido involucradas, como *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Campylobacter*. Del mismo modo se han involucrado otras situaciones clínicas diferentes a las infecciosas como causa del SUH. (47).

La aparición del SUH se considera como una de las manifestaciones de enfermedad producidas por cepas de *Escherichia coli* productoras de VT y se les asocia como una de las causas mas frecuentes de SUH en Norteamérica (7).

Se ha implicado al bovino como un reservorio del principal serotipo asociado al SUH, habiéndose aislado frecuentemente cepas

citotóxicas a partir de leche (5), carne fresca de bovino, cerdo, aves y carnero (14,15) y se ha demostrado que algunas de las cepas aisladas de bovinos tienen los genes y producen las toxinas VT1 y VT2 (30,65,77).

La asociación de la producción de VT con factores de adherencia bacteriana no se ha dado en forma sostenible, por ejemplo en Brasil se han determinado prevalencias altas de bovinos que tuvieron cepas productoras de VT, sin embargo no presentaron factores de adherencia clásicos (F41, K99) y se demostró un factor de adherencia nombrado EAF 44 (80). En otros casos de aislamientos a partir de bovinos no se ha podido correlacionar con algún factor de adherencia específico (14).

#### IV. ENFERMEDADES EN ANIMALES

En animales infectados, naturalmente o en el laboratorio, la infección con *Escherichia coli* productora de citotoxinas se ha asociado principalmente a ciego y colon distal; observándose erosión y úlceras al sitio de unión, los enterocitos se presentan cuboidales y no parece haber predisposición por algún tipo de célula. También se aprecia edema extenso y erosión, úlceras y hemorragias en el sitio, el aspecto de la diarrea ha sido llamado "disenteriforme" (30,28).

En bovinos se estudió una diarrea disenteriforme en infecciones por cepas EPEC que no produjeron VT, y no existió respuesta a la terapia de líquidos, transfusiones de plasma antibióticos y electrolitos en 4 animales observados (43). Existe sólo un reporte de enfermedad en bovinos, de la cual se aisló una cepa O157:H7 pero en otros casos de bovinos con diarrea, positivos a cepas productoras de VT, se han identificado diferentes serotipos involucrados (14).

#### V. MODELOS ANIMALES

Se han realizado experimentos para estudiar los mecanismos de patogenicidad de las bacterias que participan en el SUH en los que se ha pretendido reproducir la enfermedad en animales de laboratorio y domésticos.

El empleo del conejo como modelo parte de los experimentos descritos por Sherman en 1988 en los cuales se inocularon diferentes serotipos de *Escherichia coli* productoras de VT por vía intragástrica, aunque los resultados no mostraron evidencias de SUH, en algunos casos se presentó diarrea no hemorrágica a los siete días postinoculación (64).

Las observaciones de daño a células endoteliales y microangiopatía, similares a las observadas en humanos, desarrolladas después de la inyección parenteral de VT en conejos, así como la selectividad de los tejidos involucrados, fundamentan la hipótesis de que estos daños se producen por acción directa de la toxina sobre ciego y encéfalo. Además las células endoteliales

sintetizan el factor de coagulación VIII , cuya anomalía parece conducir a trombocitopenia (33,52,56,75).

En un modelo en caninos desarrollado previamente (24), se administraron cultivos de cepas citotóxicas en un segmento aislado de intestino delgado y se mantuvo durante 14 días, los animales desarrollaron diarrea, en algunos casos hemorrágica, coagulación intravascular y fenómeno de Shwartz, baja de la haptoglobina libre, hemosiderosis, cilindruuria, necrosis hepática y lesión en el segmento intestinal . El fenómeno fue más aparente al inocular la cepa 933 y la cepa productora de VT2 (933W) que al utilizar la cepa productora de VT1.

Las cepas O157:H7 inoculadas en cerdos gnotobiontes produjeron una diarrea secretora (33,43), observándose que las bacterias colonizaban el colon y el ciego en forma difusa con "attaching and effacement" y demostrándose que los enterocitos se afectaban en grados diferentes y sufrían desprendimiento de la mucosa; además el mesenterio se encontraba con edema marcado e inflamación supurativa en la mucosa y submucosa (21). El mismo modelo presentó algunas cepas ECEH penetrando a la mucosa y la lámina propia del intestino (76).

Al administrar intragástricamente extractos del sobrenadante de cepas O157:H7 en cerdos, se produjo diarrea de tipo secretor y se observan cambios histológicos como apoptosis (21). Estos mismos cambios se observaron en asas ligadas de conejo inoculadas con el serotipo O157:H7 (66). Contradictoriamente, cuando se inocularon cepas VT1 y VT(-) (obtenidas por mutación espontánea) o una cepa VT(-) silvestre, en cerdos gnotobiontes se produjeron las mismas lesiones que las paternas por lo que VT1 y VT2 aparentemente no son esenciales para desarrollar diarrea ni "attaching and effacement" lo que hizo poco claro el papel de las toxinas en el SUH (21).

Algunos autores concluyeron que el cerdo no fue un modelo útil para reproducir las lesiones al utilizarlo como modelo de SUH con cepas O157:H7 (74).

Por otro lado se ha sugerido (6) que la uremia posterior a daño renal severo, puede causar trastornos en la función de las plaquetas y de otros factores involucrados en la hemostasis, por lo que una secuencia de eventos asociados al SUH puede ser asociada a un daño directo sobre las plaquetas y después efectos hemostáticos, o bien a un daño previo renal con uremia y secundariamente cambios en hemostasis.

## VI. LESIONES PRINCIPALES

Las lesiones identificadas en la CH producida en condiciones naturales en el humano y las observadas en los diferentes modelos animales desarrollados, se encuentran inicial y predominantemente a nivel del intestino, con destrucción de enterocitos leve, infiltrado mononuclear y polimorfonuclear en la región y , a veces, con fusión de las vellosidades intestinales. Dichas lesiones pueden ser confundidas con las producidas por algunos agentes virales tales como la Gastroenteritis transmisible del cerdo (GET) o el Rotavirus en diversas especies. Este último agente al ser muy

frecuente como causa de infección en animales domésticos y producir lesiones semejantes, puede causar interferencia en el análisis de la patogenia, cuando se desarrolla un modelo animal; es por tanto importante describir algunas de las particularidades de la infección.

#### VII. ROTAVIRUS

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, contienen una doble cadena de RNA que consiste de 11 segmentos. Esta estructura ha servido como método de identificación puesto que al correr electroforéticamente al RNA, este se separa en once segmentos con corrimientos definidos, siendo este método el que ha servido como diferenciación taxonómica y epidemiológica en infecciones en animales domésticos (1).

La superficie antigénica es muy compleja y se han clasificado en:

Serotipos.- en función de pruebas de neutralización de virus y el antígeno responsable de las diferencias observadas es una Glicoproteína de superficie.

Grupos.- tomando en cuenta antígenos de superficie y corrimiento electroforético, existen actualmente del grupo A al E.

Subgrupos.- la especificidad antigénica está asociada al gen 6.

Las infecciones en animales domésticos están restringidas al tracto intestinal dando consecuencias de falta de absorción al producir disminución del tamaño de la vellosidad y fusión de las mismas (30).

En el caso de los bovinos, se han descrito infecciones en las cuales todos los diagnósticos realizados pertenecen al mismo electroferotipo, o a patrones diferentes lo que depende del autor. Así mismo existen reportes de una mayor prevalencia del grupo A en casos de bovinos. En los bovinos pueden causar infecciones asintomáticas o verdaderas diarreas con una pérdida abundante de líquido y desbalance electrolítico. La diferencia en presentación depende de la virulencia de las cepas, edad del bovino, estado inmunológico, dosis del inóculo, estrés ambiental, así como infecciones asociadas. En un estudio de 35 explotaciones, la prevalencia de infecciones por Rotavirus fue de un 23% y se determinó que en terneros de una semana de edad fue común encontrar infecciones asociadas incluyendo la presencia de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (30).

## OBJETIVO

### I. JUSTIFICACION:

En la actualidad no se cuenta con un modelo animal en el que se presente las lesiones entéricas y sistémicas asociadas con el SUH del ser humano.

Las lesiones en bovinos producidas por cepas citotóxicas de *Escherichia coli*, no han podido ser analizadas, observandose al bovino tan sólo como un reservorio para la infección en el humano. Al mantener los mismos serotipos y tipos de VT que el humano es posible que en ambos se presenten lesiones parecidas al ser mediadas por las mismas toxinas.

### II. HIPOTESIS DE TRABAJO:

- Es posible desarrollar un modelo en conejos que permita evaluar y reproducir el efecto toxigénico que media las lesiones de *Escherichia coli* citotóxicas aisladas de humanos con SUH y de bovinos con Colitis hemorrágica. El efecto toxigénico se observara por la evaluación de:

La formula roja y las plaquetas en la biometría hemática para el proceso de Anemia y trombocitopenia respectivamente.

La haptoglobina serica y hemoglobina plasmática para la hemólisis intravascular.

La urea y creatinina serica para el daño Renal

La necropsia e histología para las lesiones asociadas al SUH, colitis hemorrágica y enteritis bovina.

- Existe asociación en las lesiones intestinales producidas por la infección por Rotavirus y cepas citotóxicas de *Escherichia coli* en un brote de enfermedad en terneros en una explotación.

### III. OBJETIVO GENERAL:

Establecer un modelo animal en el laboratorio para el estudio de cepas citotóxicas de *Escherichia coli* asociadas al SUH y a un brote de diarreas en terneros.

### IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1.-Desarrollar y evaluar un modelo animal en conejo para el estudio del efecto de las cepas citotóxicas asociadas al Síndrome Urémico Hemolítico en humanos y a la infección intestinal en los bovinos.

2.-Analizar la asociación entre las lesiones Macro y Microscópicas del intestino y la presencia de *Escherichia coli* citotóxicas en el modelo en conejo .

3.-Determinar la presencia de *Escherichia coli* citotóxicas y de Rotavirus en un brote de diarrea en terneros de una explotación.

4.-Analizar la relación entre la presentación de *Escherichia coli* citotóxicas y Rotavirus como factor de riesgo y como causantes de las mismas lesiones intestinales en los bovinos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. MODELO ANIMAL

Se utilizaron 21 conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 1.5 Kg de peso obtenidos de la Granja de Cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM.

Los animales se mantuvieron en jaulas durante 7 días previos a la operación para su observación y evaluación. Se alimentaron con alimento comercial (Purina) y agua a libre acceso durante todo el experimento.

Los conejos fueron rasurados en la región abdominal, se les administró 0.2 mg de atropina por vía intramuscular y 0.3 ml de Antihistamínico (Histafin) por vía subcutánea

#### A. Anestesia.-

Los animales se anestesiaron mediante tres formas diferentes para seleccionar la mejor y más útil :

- 1) Pentobarbital con una dosis de 0.8-1.0 ml por vía intraperitoneal y se dosificaron en el transoperatorio de acuerdo al comportamiento clínico.
- 2) Cloroformo por vía respiratoria hasta efecto anestésico
- 3) Rompum (2 mg/Kg) y Ketamina (10 mg/Kg) por vía endovenosa

#### B. Cirugía.-

Se realizó una incisión medial, por línea blanca, a 4 cm de la punta del esternón de aproximadamente 4 cm de largo. Se localizó el ciego y se expuso depositándolo sobre gasas humedecidas, se delimitó el extremo final del saco ciego y respetando la irrigación se le hizo un corte transversal (Figura 1).

El extremo proximal del saco ciego se suturó mediante una técnica invaginante de "jarreta" empleando primero una técnica de sutura tipo Cushing y posteriormente una tipo Conell (61).

El extremo distal, que se mantuvo con su irrigación y unión a peritoneo, se lavó utilizando solución salina estéril hasta que el contenido del saco se obtuviera sin residuos, en este momento se cambiaron los campos y el material de cirugía, posteriormente se procedió a realizar una sutura tipo invaginante con doble línea de sutura (Cushing-Conell) . Un poco antes de concluir la segunda sutura se inoculó 1 ml del cultivo bacteriano, conteniendo aprox.  $5 \times 10^7$  u.f.c./ ml. En todo el proceso se respetó la irrigación propia en ambas partes del ciego (Figura 1).

Posteriormente se procedió a lavar y desinfectar la región para cerrar la cavidad abdominal.

No se utilizó tratamiento con antibióticos por vía sistémica, en algunos casos sólo se empleó desinfección local de la incisión.

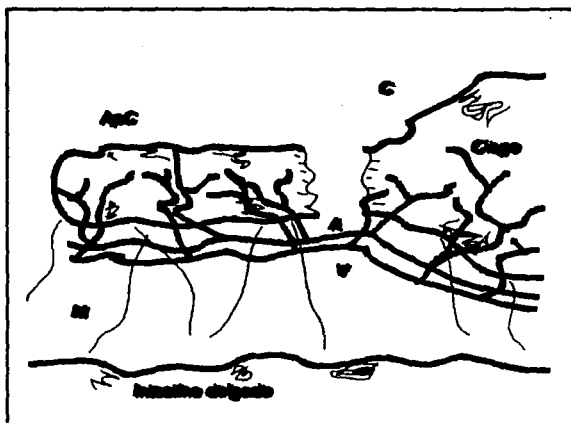


Figura 1.- Esquema de la región cecal trabajada en los conejos. (A) irrigación arterial, (V) venosa, (ApC) extremo cerrado del apéndice cecal, (C) inicio del ciego, (M) unión peritoneal a intestino delgado.

**C. Cepas de Referencia.-**

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

**1.-Escherichia coli:**

H30 (O26:H11) y 933 (O157:H7) productoras de SLTI y SLTII

933J productora de SLTI

933W productora de SLTII

K12 C600 cepa apatógena (11) empleada como un testigo negativo

Todas estas cepas fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB).

**2.-Línea Celular:**

Células Vero (Células de riñón de mono verde africano), pase 146



### 3.-Cepas Virales:

Rotavirus de Simio cepa SA11.  
Donada por el Lab. de Virología de la ENCB

Las cepas bacterianas aisladas y de referencia se conservaron en medio de mantenimiento (agar soya tripticasa, Bioxon) a 4° C hasta su uso.

### D.-DISEÑO EXPERIMENTAL.-

#### 1.-Obtención del inóculo:

Las cepas de *Escherichia coli* de referencia y la 375RPS (obtenida de los bovinos) se inocularon en 5 ml de caldo soya tripticaseína (Bioxon) estéril, se incubaron a 37° C durante 18 h y directamente se tomó un 1 ml para inocular. La concentración celular bajo estas condiciones fue de aprox. 10<sup>8</sup> bacterias por ml. El medio ha sido previamente probado como adecuado para la producción de citotoxinas (57). Posterior a la inoculación de los conejos, los cultivos fueron ensayados sembrándolos sobre agar sangre de carnero al 10% (Bioxon) para corroborar pureza del cultivo y se les cuantificó la cantidad de citotoxina presente. Formación de los Grupos experimentales.-

#### 2.-Letificación:

Se operaron un total de 19 conejos, los cuales fueron seleccionados al azar, para administrarles el tratamiento bajo el siguiente esquema:

Grupo Control: 2 conejos inoculando 1 ml. de caldo soya tripticaseína estéril en el extremo distal, aislado del ciego (segmento ciego)

Grupo Testigo Negativo: 2 animales inoculando un cultivo de la cepa K12 C600, cepa de referencia, apatógena.

Grupo I.- 7 conejos inoculando la cepa 933, cepa de referencia productora de ambas citotoxinas.

Grupo II.- 2 animales inoculando la cepa 933J productora de citotoxina SLTI.

Grupo III.- 4 conejos administrando la cepa 933W, productora de citotoxina SLTII.

Grupo IV.- 2 conejos con la cepa 375RPS citotóxica aislada en el presente trabajo.

#### 3.Evaluación experimental:

Previo a la operación y durante el periodo de 7 días de observación, cada animal fue sangrado por la vena yugular y se realizaron las pruebas siguientes: biometría hemática, cuenta de plaquetas, hemoglobina plasmática, haptoglobina sérica, urea, creatinina, deshidrogenasa láctica, creatinfosfoquinasa y transaminasa glutámico pirúvica.

Los animales fueron diariamente evaluados en forma clínica, en algunos casos se tomaron muestras de sangre y orina durante la fase experimental y en todos los casos se tomaron muestras de

sangre previo a la necropsia y de orina, tejidos y contenido del segmento aislado durante la necropsia.

A partir de las muestras de sangre se realizaron las determinaciones antes mencionadas.

Al contenido del segmento aislado, se le realizó siembra en los medios de agar sangre al 10%, Mac Conkey y EMB, se incubaron a 37° C durante 24h y se realizó la identificación bioquímica de las cepas sospechosas de *Escherichia coli* y la identificación presuntiva de cualquier otro aislamiento.

Los tejidos colectados en la necropsia consistieron en segmento cecal aislado, ciego, intestino delgado porción duodeno ileon, ríñon, bazo y encéfalo. Los órganos se inspeccionaron durante la necropsia y fueron inmediatamente fijados en formalina amortiguada al 10% y posteriormente incluidos en parafina. Los cortes se realizaron de 5u de espesor y se tificaron mediante hematoxilina y eosina para posteriormente montarlos con resina.

## **E. PRUEBAS DE PATOLOGÍA CLÍNICA.-**

### **1.-Biometría Hemática:**

Se realizó la determinación de cuenta de eritrocitos, hemoglobina total, hematocrito, índices de Wintrobe, recuento de plaquetas, recuento de leucocitos y cuenta diferencial de leucocitos utilizando la metodología rutinaria en el laboratorio (72).

### **2.-Haptoglobina sérica:**

Básicamente se siguió la metodología descrita en Sonnenwirth y col. en 1983 (70):

1.-Amortiguador de ácido fórmico 0.5M pH 3.7

2.-Sol. NaCl 0.15M

3.-Sol. de Cianometahemoglobina 60mg/dl.

Técnica:

**Tubo Problema:** 1.8 ml de Sol. de NaCl  
0.2 ml de suero problema  
1.0 ml de Sol. de Cianometahemoglobina  
Se mezcló y dejó reposar 10 min.  
2.0 ml de Amortiguador de Formato

**Tubo blanco:** 1.8 ml de Sol. de NaCl  
1.0 ml de Sol. de Cianometahemoglobina  
2.0 ml de Amortiguador de Formato  
Se mezcló y dejó reposar 10 min  
0.2 ml de suero problema

Cálculos:

Se dejaron reposar los dos tubos durante dos horas a temp. ambiente, se leyó la absorbancia (As) del tubo problema contra el blanco a 407 y 380 nm.

(As407-As380) x 455 = Haptoglobina (mg/dl)

Medidos por equivalentes de Cianometahemoglobina

### **3.-Hemoglobina sérica:**

Se utilizó la técnica descrita en Sonnenwirth 1983 (70).

El plasma se diluyó 1:2 con agua destilada (o una mayor

dilución si los valores eran elevados.)

**4.-Urea sérica:**

Se utilizó la metodología de Diacetil Monoxima (Bioxon) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**5.-Creatinina sérica:**

Se realizó mediante la metodología de Jaffes usando ácido picrico alcalino tal y como se describe en (13,70).

**6.-Transaminasa Glutámico Pirúvica:**

Se utilizó un equipo comercial (SIGMA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**7.-Creatinfosfoquinasa (CPK):**

Se empleó un equipo comercial (Merck) de cinética U.V. optimizada, se utilizó una temperatura de 37° C, cubetas de 1cm y la longitud de onda usada fue 365 nm.

**8.-Deshidrogenasa láctica:**

Se siguió la técnica colorimétrica de SIGMA, leyendo a 550 nm y utilizando una curva de calibración previamente preparada.

**F.VALORES NORMALES DE LAS DETERMINACIONES EN SANGRE.-**

Los valores normales para la población trabajada fueron calculados tomando como base las determinaciones preoperatorias practicadas a cada animal, calculando la media y desviación estandar y expresando el rango normal como la media +/- 1 desv. estandar.

**G.METODOS ESTADISTICOS.-**

El diseño experimental se realizó en forma aleatoria.

Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS para el cálculo de los parámetros de estadística descriptiva, así como para la prueba no paramétrica de Análisis de Varianza en una vía por el Método de Kruskal-Wallis. La interpretación del Análisis de Varianza se realizó de acuerdo a Daniel (12).

## II. OBTENCION DE MUESTRAS A PARTIR DE LOS BOVINOS

Las cepas de *Escherichia coli* aisladas y usadas en el presente trabajo se obtuvieron a partir de muestras de una explotación de bovinos que se dedica a la producción de animales cuya finalidad zootécnica es la producción de ganado de engorda y lechero, además en la explotación se desarrollan los animales hasta su etapa productiva y después son utilizados para la obtención de leche o bien son vendidos como pie de cría. Estos animales son criados en forma cerrada pues prácticamente no hay entrada de animales nuevos a la explotación y en un ciclo completo puesto que en la misma explotación se lleva a cabo todas las etapas de la producción. Así mismo, dentro de las instalaciones se lleva un programa de trasplante de embriones y mejoramiento genético.

El motivo de la consulta fue por un cuadro de diarreas severas con una mortalidad y morbilidad altas que se tenía en la sala de lactancia.

Se utilizaron un total de 96 bovinos pertenecientes a un hato ubicado en el Municipio de Tepetzotlan, Méx. Los animales se encuentran en una explotación de tipo intensivo, existiendo áreas separadas para cada fase del proceso ( lactancia, recría, engorda, gestación y partos), la alimentación es a base de concentrados elaborados en el mismo rancho y henificados comprados fuera.

El área de lactancia tiene instalaciones separadas del resto de la explotación mediante el uso de muros de concreto, tapetes sanitarios y personal exclusivo del área contando con un buen manejo higiénico. En este lugar se reciben los animales el día del parto y se introducen en jaulas levantadas del piso (con separación entre cada una de 1 metro aprox.) y se alimentan durante tres días con calostro, obtenido de la madre o de otras hembras, posteriormente se cambia a leche colectada en la explotación. El calostro se administra tal y como es colectado de las hembras al parto, empleando recipientes lavados y desinfectados con desinfectante comercial a base de compuestos iodados. La leche es separada de la línea de ordeño mecánico a partir del tanque de recolección primario y sin tener ningún tratamiento es administrada a los becerros durante toda la etapa de lactancia.

Se tomaron muestras de heces a un total de 84 animales del área de Lactancia (1-15 días de edad) y 12 animales adultos pertenecientes al área de Recría y desarrollo I ( aproximadamente 1 a 1.5 años de edad)

Las muestras de heces fueron recolectadas en condiciones de asepsia utilizando frascos de vidrio estériles, empleando un hisopo estéril para tomar las muestras directamente del ano del animal y fueron almacenadas en refrigeración hasta su estudio.

### A. Datos de Patología.-

Los datos de los principales hallazgos a la realización de la necropsia fueron obtenidos en algunos casos en forma directa (5 casos) y en otros fueron proporcionados por el Médico Veterinario encargado del área (25 casos).

Los órganos seleccionados a partir de los animales en los que

se presenció la necropsia fueron obtenidos durante la misma y tomando como criterio aquellos que presentaran lesión y en todos los casos intestino, abomaso, y ocasionalmente, bazo y ganglios linfáticos; se cortaron fragmentos de aprox. 1.5 cm<sup>3</sup>. y se depositaron en formol al 10% amortiguado (formalina)

Se realizaron cortes mediante inclusión en parafina, de 5 u de espesor, de los tejidos fijados previamente con formalina amortiguada. Se tiñeron por la técnica de hematoxilina y eosina para posteriormente ser montados con resina (Sigma).

#### **B. Examen coproparasitológico.-**

Las muestras fueron procesadas para su examen directo mediante sedimentación en solución salina o mediante la técnica de flotación (25) para su evaluación microscópica en busca de parásitos.

#### **C. Aislamientos bacteriológicos.-**

Se utilizaron un total de 49 muestras de excremento provenientes de 37 becerros y de 12 animales adultos.

Las muestras de heces fueron sembradas, sin ningún tratamiento previo, sobre placas con agar Eosina Azul de Metileno, agar Mac.Conkey, agar Campy Bac, agar Verde Brillante, agar Salmonella Shigella y caldo Selenito (BIOXON) los cuales fueron incubados a 37°C durante 24 h, posteriormente se revisaron y se evaluó el crecimiento. O bien se realizó una resiembra a las 18 h de incubación, a partir del caldo Selenito, sobre medio de agar Verde Brillante.

Para la identificación de las bacterias crecidas se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, LIA, Citrato, Urea, MIO, Catalasa, Oxidasa, Voges Proskauer y Rojo de metilo, realizándose e interpretándose en forma rutinaria (17).

#### **D.-Caracterización de las cepas aisladas .-**

##### **1.-Determinación de la capacidad hemolítica de las cepas aisladas:**

La producción de hemolisinas en 100 de las cepas seleccionadas al azar, fue evaluada realizando un cultivo durante 18 h en caldo soya tripticosa de cada una y sembrándolas por estria única sobre cajas con medio de agar sangre de carnero al 5 %, se incubaron durante 24h. y se observó la aparición de la zona de hemólisis tipo Beta alrededor de la estria.

### **III. OBTENCIÓN DE LA TOXINA.**

Básicamente se siguió la metodología descrita por Konowalchuk y col. (36), con ligeras modificaciones:

Una colonia de cada una de las cepas se colocó en 5 ml de Caldo soya tripticaseína (Bioxon) estéril (CST), se incubó durante 24 h a 37°C y el cultivo obtenido se centrifugó a 17000 g durante 30 min. en una centrifuga refrigerada (Sorvall), se separó el sobrenadante el cual fue posteriormente filtrado usando filtros de 0.45 u (Millipore). El filtrado así obtenido se utilizó para los

ensayos subsiguientes.

**A. Identificación de la toxina semejante a Shiga.-**

Se obtuvieron cultivos a un 100% de confluencia de células de riñón de mono verde africano (Vero), pase 146, con Medio Mínimo Esencial (MEM) en botellas de 50 cm<sup>3</sup>, se tripsinizaron (Tripsina, Sigma, al 0.05%) y se resuspendieron en medio MEM, Suero Fetal de Ternera (GIBCO) (SFT) al 10%, ajustando a una concentración celular de 10<sup>5</sup> células por ml, de esta suspensión se colocaron 100 ul en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, las placas se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> hasta tener confluencia del cultivo celular. En este momento se agregaron 100ul de un filtrado obtenido del sobrenadante de las cepas en ensayo crecidas durante 24h a 37°C (57).

Las placas se incubaron durante 72h, realizando observaciones diarias de la posible aparición del efecto citopático. El efecto consistió en destrucción del monoestrato celular (36,57).

**B. Cuantificación de la Verotoxina (VT).-**

Se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita ( 24,42 ), pero el sobrenadante de los cultivos previamente filtrado fue diluido decimalmente en amortiguador de fosfatos (PBS) y posteriormente se agregaron 100 ul de cada dilución por pozo de la microplaca.

Este ensayo se realizó para las cepas testigo y la cepa 375RPS aislada de los bovinos, utilizadas en el modelo animal y seleccionadas por dar un efecto citopático en forma rápida en la prueba de identificación de la toxina.

#### IV. IDENTIFICACION DE ROTAVIRUS

Se utilizó la metodología descrita en el Manual de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN (1).

**A. Extracción del RNA viral.-**

En un tubo Eppendorf se adicionaron aproximadamente 0.2 ml de materia fecal, o del cultivo celular conteniendo el virus y un volumen igual de la solución de liberación ( SDS 6%, EDTA 36mM y Beta Mercaptoetanol al 0.6%) . Se agitó la muestra en un Vortex durante 30 seg. y se agregó 0.3 ml de Fenol saturado haciendo otro ciclo de agitación. Hecho lo anterior se agregaron 0.5 ml de la mezcla cloroformo-alcohol isoamilico (25:1 vol/vol) y se realizó otro ciclo de agitación.

El tubo se centrifugó en una microcentrifuga (Beckman) durante 2 min. para separar la fase acuosa de la orgánica.

La fase acuosa se mantuvo a -20°C hasta su corrimiento electroforético.

**B.-Corrimiento electroforético.-**

Se utilizó un Gel espaciador de Poliacrilamida al 5 % y un Gel concentrador de Poliacrilamida al 3 %

Después de solidificado el gel se procedió a colocar 80 ul de la fase acuosa de la extracción y se le agregaron 20 ul de la mezcla glicerol azul de Bromofenol, se homogenizó y de esta mezcla se colocaron 50ul en cada pozo del gel.

Las condiciones de corrimiento fueron de 20mA/200V hasta la entrada de las muestras al gel espaciador, después se aumentó a 40mA hasta la salida del colorante.

El gel se reveló de la siguiente manera:

- 1.-Se sumergió el gel durante 30 min. en la solución de etanol al 20%, ácido acético al 1% (v/v)
- 2.-Se lavó el gel tres veces con agua desionizada.
- 3.-Se colocó el gel en sol. de hidróxido de sodio 1.5M - formaldehído 0.2M (v/v) hasta la aparición de las bandas de RNA viral.
- 4.-Se eliminó la sol. de revelado y se agregó ácido acético al 1% para detener la reacción.
- 5.- Se secó el gel empleando un secador de geles marca LKB.

#### C.Análisis gráfico del Gel.-

El gel se fotografió con película Kodolith de alto contraste a trans-iluminación .

En otros casos el gel se rastreó mediante un rastreador para computadora y la imagen digitalizada fue analizada sobre el monitor de la computadora para la comparación de los patrones de corrimiento.

## RESULTADOS

### I. MODELO ANIMAL

#### A. Evaluación de la Técnica Quirúrgica.-

El mejor método de anestesia fue el de Pentobarbital por vía intraperitoneal debido a ser fácil de administrar y dosificar y con períodos de anestesia de al menos 30 min. En el caso de cloroformo inhalado, se observó que no se pudo controlar el efecto adecuadamente, pues el animal entró en paro respiratorio fácilmente. La combinación Rompum Ketamina no fue adecuada debido a que el efecto tiene una duración aproximada de 15 min., la redosificación por vía intravenosa es difícil y se tiene que realizar en períodos cortos.

La zona del ciego adecuada para la cirugía fue su región terminal, de aproximadamente 5 cm de longitud, que tiene un aspecto totalmente diferente al del resto del ciego. Esta región va disminuyendo de longitud conforme el animal es de mayor edad, tendiendo a desaparecer en animales de 6 meses o más de vida.

La técnica de sutura que dió mejores resultados para la parte proximal de ciego, fue la de anudación completa antes del corte transversal y sobre esta una sutura invaginante tipo jareta. Para el extremo proximal se utilizó una sutura invaginante tipo Cushing y después una tipo Connell (16).

Los animales se recuperaron en aproximadamente 2 h después de la cirugía y después desarrollaron una cicatrización y evolución postoperatoria adecuada. La alimentación con sólidos se dió al segundo día siendo aceptada rápidamente y los animales testigo se lograron mantener hasta 4 meses después de operados sin cambios clínicos ni patológicos aparentes.

#### B. Rangos normales para las determinaciones sanguíneas practicadas.-

Los resultados de las pruebas de laboratorio preoperatorias se muestran en la Cuadro Nº 1. En dicho cuadro, sólo se muestran los rangos normales, calculados como la media  $\pm$  1 desviación estandar.

Estos valores fueron muy parecidos con los reportados en la bibliografía (19) para los conejos



**CUADRO N° 1**  
**VALORES NORMALES ENCONTRADOS EN LOS CONEJOS**  
**PARA LAS DETERMINACIONES EN SANGRE**

DETERMINACION	RANGO NORMAL*	UNIDADES
Eritrocitos	5.12 - 6.27	millones/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	7.7 - 9.5	g/dl
Hematocrito	25.6 - 31.9	%
Plaquetas	225 - 598	miles/mm <sup>3</sup>
Leucocitos	6.24 - 9.21	miles/mm <sup>3</sup>
Linfocitos	35 - 74	%
Monocitos	0 - 2	%
Neutrófilos	24 - 59	%
N. segmentados	23 - 57	%
N. en banda	0 - 3	%
Eosinófilos	0 - 3	%
Basófilos	0 - 1	%
Urea	22.0 - 32.3	mg/dl
Creatinina	0.30 - 0.73	mg/dl
Hemog.plasmática	2.9 - 14.1	mg/dl
Haptoglobina serica	50.6 - 103.1	mg/dl
TGP	11 - 31	U/ml
LDH	217 - 377	U/ml
CPK	108 - 217	U/l

\* Se refiere a los valores de los conejos (n=19) antes de operados y son expresados como la media +/- 1 desviación estándar  
N.- Neutrófilos, TGP.- transaminasa glutámico pirúvica, LDH.- Deshidrogenasa láctica, CPK.- Creatin fosfoquinasa

### **C. Evaluación del modelo animal.-**

#### **1.- Datos clínicos y de patología.**

A continuación se describen brevemente los datos clínicos y lesiones mas importantes encontrados en los animales inoculados , las principales lesiones a la necropsia (NP) así como en el estudio histológico de los órganos estudiados (HP) . Los aparatos , sistemas u órganos que no presentaron cambios patológicos aparentes (SCPA) no se mencionan.

#### **TESTIGOS NEGATIVO (animales 1 y 2):**

Los animales presentaron buena recuperación de la anestesia, la ingestión de agua fue prácticamente de inmediato a la recuperación de la anestesia y la ingestión de alimento semi-sólido al segundo día post-operatorio, la ingestión del alimento sólido se realizó desde el cuarto día de la operación. No se presentó signología durante el periodo de observación que fue en un caso de un mes y en el otro de dos meses.

#### **Conejo 1.- Testigo negativo**

NP.- Segmento inoculado: color blanco, menor tamaño, irrigado, salida de contenido seroso de color blanco. Resto de los órganos SCPA.

HP.-Segmento inoculado.- Atrofia leve de la mucosa , infiltrado de polimorfonucleares, escasos mononucleares y eritrocitos en la submucosa. En hígado en algunos conductos biliares se apreciaron focos de infiltrado mononuclear, en hígado y riñón congestión leve, en encéfalo congestión leve e infiltrado mononuclear perivascular muy escaso y poco frecuente.

#### **CONEJO 2.- Testigo negativo.**

NP.- Escasa cantidad de adherencias en peritoneo en la región del segmento operado, el segmento estaba de color blanco y con contenido color amarillo ligerante viscoso.

HP.- Segmento igual al caso 1, el resto de los órganos sin cambios patológicos aparentes.

#### **CEPA K12 (Cepa no patógena), animales 3 y 4:**

El comportamiento clínico fue igual a los testigos negativos. El tiempo de Eutanasia fue de 45 días y de tres meses respectivamente.

#### **Conejo 3.- Cepa K12**

NP.- Igual al caso 2

HP.- Igual al caso 2

#### **Conejo 4.- Cepa K12**

NP e HP.- Igual al conejo 2 para el segmento, pero sin adherencias a peritoneo

CEPA 933 (Productora de VT1 y VT2) animales: 7,8,9,10,11,12,21.-  
Los animales mostraron buena recuperación de la anestesia, excepto el N° 8, todos los animales presentaron diarrea hemorrágica entre los dos a cuatro días. Los animales presentaron depresión severa, emaciación y deshidratación severas desde el tercer día y disnea al cuarto día. La cianosis marcada, sobre todo en las orejas, se presentó en cinco de los seis animales que se recuperaron de la anestesia. La muerte se presentó a los 2 (N° 12 y 21), 5 (animales 7 y 10) y 8 días (N° 11) después de operados. No se encontraron variaciones de temperatura rectal durante el experimento, al final, en el período de agonía se presentó hipotermia moderada.

El animal N° 9 sobrevivió hasta 20 días, cuando fue sacrificado, en el día 1 y 2 después de operado mostró signos de diarrea hemorrágica y depresión leve, recuperándose clínicamente a los 5 días de operado.

Conejos 7 y 8.- Cepa 933

NP.- El ciego presentaba petequias en su superficie y el contenido era muy acuoso. se localizó un pequeño absceso, circunscrito en la región del segmento resecaado.

HP.- Encéfalo.- en algunos vasos se encontró material anhisto eosinófilo dentro de los mismos (hemólisis)

Segmento.- Infiltrado de mononucleares abundante, Escasos polimorfonucleares, abundantes eritrocitos, zonas ulceradas en la mucosa. Se observó una disminución de la población celular de linfocitos en forma marcada y un infiltrado perivascular en la submucosa, formado de linfocitos maduros.

Intestino grueso.- Congestión y hemorragia, exudación de PMN, GR, en algunas regiones dilatación de vasos linfáticos y acumulación de mononucleares en la submucosa

Bazo.- En la pulpa roja aumento de macrófagos y pigmento ocre en ellos

Conejo 10.- Cepa 933

NP.- Se presentó diarrea hemorrágica severa 4 días post-operado. Peritonitis grave, ruptura del segmento probablemente en el transquirgico

HP.-Segmento inoculado.-infiltrado de polimorfonucleares en mucosa, submucosa y serosa, disminución de linfocitos en la submucosa (región de las placas) con zonas de ulcera en la mucosa.

Intestino delgado.- congestión severa, escaso infiltrado de linfocitos en la submucosa, dilatación de algunos linfáticos.

Intestino grueso igual que el conejo 7 y 8

Conejo 11.- Cepa 933

NP.- presentó diarrea hemorrágica. El segmento inoculado de color azul, distendido, contenido hemorrágico. Líquido seroso en la cavidad abdominal.

HP.-Segmento inoculado.- congestión y hemorragias severas, infiltrado de polimorfonucleares leve en la mucosa, linfocitos en la submucosa y serosa, dilatación de linfáticos.

Bazo.-igual conejo 9.

Encéfalo.- edema perivascular leve.

**Conejo 12.- Cepa 933**

NP.- Segmento inoculado congestión severa, dilatación, contenido hemorrágico. Manchas petequiales en intestino delgado con predominio en ileon, el ciego con contenido acuoso color verdoso .

HP.- Las lesiones fueron iguales al conejo 9

**Conejo 21.- Cepa 933**

NP.- diarrea sanguinolenta. ciego.-contenido acuoso de color rojizo, segmento cecal con contenido caseoso color blanco Intestino delgado.- la mucosa estaba enrojecida, en algunas zonas contenido hemorrágico. Bazo.- pequeño y de color cobre.

HP.- congestión en la mucosa de intestino delgado.

El resto de los órganos presentaron lesiones similares a los conejos anteriores.

**CEPA 933J ( Cepa K12 Productora de VT1), animales N° 15 y 20 :**

En un animal (N° 20) se presentó depresión , anorexia y diarrea hemorrágica leve desde el segundo día ; la muerte se presentó al cuarto día. El otro animal presentó la misma signología pero desde el cuarto día y la muerte se presentó a los siete días pos-operación.

**Conejo 20.- Cepa 933J**

NP.- diarrea hemorrágica. Ciego : hemorragias petequiales y sufusiones, contenido líquido color verde en el ciego.

Bazo.- de menor tamaño, color rojo intenso.

Segmento cecal.- contenido hemorrágico severo.

HP.- las lesiones en segmento, bazo, duodeno, ciego fueron similares a las descritas para los conejos inoculados con la cepa 933, pero con menor intensidad.

**Conejo 15.- mismas lesiones que el conejo 20**

**CEPA 933W (Cepa K12 productora de VT2), animales 16, 17, 18 y 19:**

Los animales presentaron anorexia severa desde el tercer día.

Se presentó diarrea acuosa: leve en un caso y severa en los otros tres animales. En estos tres casos se observó posteriormente diarrea hemorrágica severa. El otro animal presento desde el tercer día diarrea hemorrágica severa.

Los animales presentaron parálisis del tren posterior en forma severa en tres animales y leve en otro animal que evolucionó en dos casos a parálisis general.

En general los signos fueron más severos que los animales inoculados con las cepas 933J y muy parecidos a los inoculados con la cepa 933.

**Conejo 16.- Cepa 933W**

NP.-Pobre estado de carnes, anorexia, no presentó diarrea aparente.

Contenido amarillento en ano. Aumento de volumen severo a nivel duodenal con contenido acuoso , zonas de hemorragia (sufusiones) en la serosa de todo el duodeno. En estómago había úlceras severas en la mucosa.

Segmento aislado con contenido caseoso blanco.

HP.- Vejiga urinaria.- congestión moderada  
Ciego.- atrofia de vellosidades y congestión.  
Intestino.- congestión, acumulos de mononucleares discretos, destrucción de vellosidades, eritrocitos en la luz.  
Ciego.- congestión leve.  
Riñón y encéfalo.- congestión leve  
Segmento.- Infiltrado mononuclear moderado en la mucosa, atrofia de la mucosa moderada, salida de eritrocitos a la luz.  
Conejo 17.- Cepa 933W

El animal presentó parálisis del tren posterior, diarrea poco abundante sanguinolenta, después parálisis general y problema locomotor.

NP.-Salida de contenido intestinal en la zona del segmento aislado, con ruptura aparente y secuestro por fibrina de la misma región.

HP.- Encéfalo.- vasos sanguíneos con eritrocitos hemolizados (contenido anhiato eosinófilo).

Riñón, Intestino grueso, vejiga congestión leve

Conejo 19.- Cepa 933W

NP.- Diarrea de color ligeramente rojo (sanguinolenta) en la región perianal, intestino delgado con aumento de volumen y contenido acuoso color amarillo, zonas de hemorragia de aproximadamente 1 cm en intestino. Segmento cecal.- contenido blanquecino caseoso.

HP.- Igual que el 16

CEPA 375RPS.-Conejos Nº 5 y 6,

La cepa 375 RPS (5) fue aislada de un caso de bovino con cuadro sugestivo de problema citotóxico.

En ambos animales operados se presentó anorexia y depresión moderada durante tres días posteriores a la cirugía, diarrea acuosa moderada en ambos animales y hemorrágica leve en uno de los conejos. Los animales murieron a los 8 y 10 días postinoculación. Conejos 5 y 6.- Cepa 375RPS

NP.- Moderada cantidad de adherencias en intestino grueso en la región del segmento operado, el segmento estaba muy atrofiado. se observó contenido intestinal semi-diarreico en la región anal.

HP.- el segmento presentó atrofia moderada e infiltrado severo de polimorfonucleares, escasos mononucleares y moderados eritrocitos. Se apreció disminución de la cantidad de linfocitos en la submucosa.

Las lesiones a la necropsia observadas en los animales control negativo se encontraron únicamente en el segmento aislado el cual mostró a los 15 días atrofia leve (disminución del tamaño) que a los 30 días fue más marcada adquiriendo una consistencia más firme de lo normal pero manteniendo el aspecto de saco ciego. En todo el periodo la irrigación no se perdió y el contenido encontrado fue de un líquido seroso (7 días), seromucoso (15 días) o levemente caseificado a los (30 días).

El apéndice cecal aislado presentó una histología propia, conteniendo una mucosa de epitelio cubico simple, que en algunas

regiones se aplanan y que presenta proyecciones, que incluyen a la submucosa y que recuerdan estructuras glandulares (Figura N° 2). En la submucosa se presentan acúmulos de linfocitos que se disponen en estructuras esféricas en dos ubicaciones, unas más profundas y una cercanas a la serosa del órgano.

FIGURA N° 2 .- Microfotografía de las imágenes histológicas del apéndice cecal. Tinción H.E.

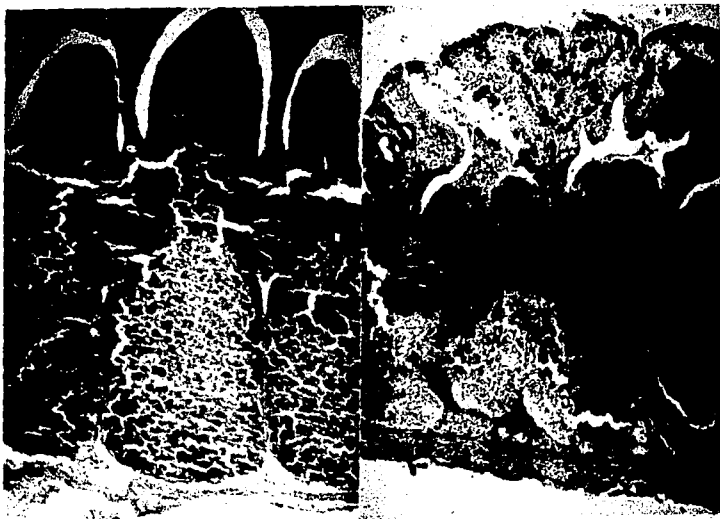
Se observa la Mucosa (M), Submucosa (SM), Acúmulos linfoides (L) y la serosa del tejido (S).

A.- Animal no inoculado (100X).

B.- conejo inoculado con la cepa 933J (50X).

C y D.- Animal inoculado con la cepa 933J (400X) (100X).

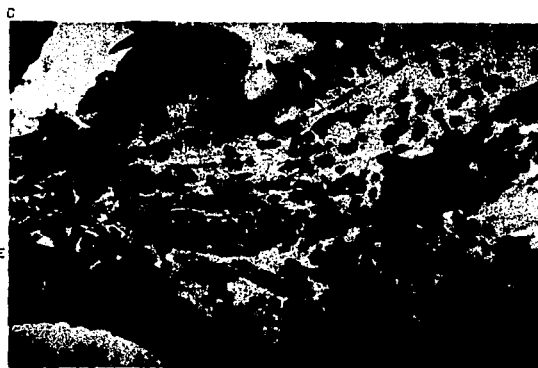
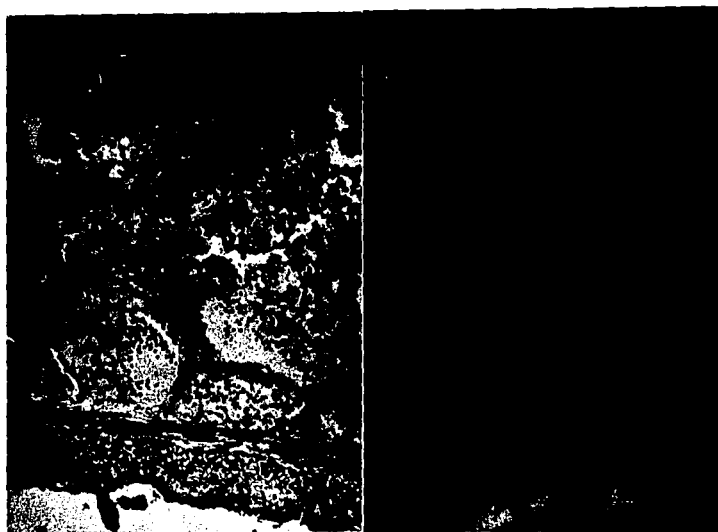
E.- animal inoculado con la cepa 933 (1000X)



A

22

B



D

E

## 2.-Resultados de laboratorio:

Los resultados de los análisis de laboratorio practicados posteriormente a la operación se aprecian en la Cuadro Nº 2

El comportamiento gráfico de los resultados más significativos con respecto al tiempo de experimentación se observa en la Figura Nº 3 para urea y creatinina, en la Figura Nº 4 para hemoglobina plasmática y haptoglobina sérica y en la Figura Nº 5 para los valores de eritrocitos y hemoglobina total.

La agrupación de los datos de urea y creatinina se debió a que estos dos parámetros son indicativos de una insuficiencia renal, en la Figura Nº 3 se aprecia que los promedios de los animales inoculados con las cepas 375RPS, 933, 933W y 933J tienen un aumento gráfico en su comportamiento con respecto a los conejos inoculados con la cepa K12 o a los conejos testigos; además los incrementos son paralelos entre urea y creatinina lo que indica una urémia y creatinemia renal (o post-renal).

En el caso de la Figura Nº 4, se graficaron juntos los valores para la hemoglobina plasmática y la haptoglobina sérica, esto se hizo en función de que estos dos valores son indicativos de una destrucción del eritrocito de tipo intravascular, el comportamiento gráfico fue alterado para los valores de los animales inoculados con las cepas 933, 933J y 933W si se compara con los inoculados con la cepa K12 o los testigos; así mismo se aprecia que los valores de hemoglobina y haptoglobina tienen una relación inversamente proporcional, situación que está de acuerdo al daño hemolítico intravascular.

En la figura Nº 5, sólo se graficó el valor de hemoglobina y cuenta total de eritrocitos por ser los más representativos de las alteraciones observadas en la biometría hemática.

### CUADRO Nº 2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EN SANGRE PRACTICADAS DESPUES DE LA CIRUGIA

#### ABREVIATURAS:

Nº .- Identificación de los conejos

TTO.- tratamiento inoculado en el apéndice cecal

GR.- eritrocitos; Hb.- hemoglobina total; Hto.- hematocrito;

GB.- leucocitos; L.-linfocitos; M.-monocitos; N.- heterófilo

(neutrófilo); E.- eosinófilo; B.- basófilo; Bd.- bandas;

S.- segmentados; CREAT.- creatinina sérica, HbP.- hemoglobina

plasmática; HAPT.- haptoglobina sérica; TGP.- transaminasa

glutámico pirúvica; LDH.- deshidrogenasa láctica; CPK.- creatin

fosfoquinasa.



CUADRO Nº 2  
 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EN SANGRE PRACTICADAS  
 DESPUES DE LA CIRUGIA

Nº	TTO	TIEMPO días	GR x104/mm3	Hb g/dl	Hto %	PLAQUETAS x103/mm3	GB /mm3
1	NEG.	0	520	7.8	26.3	800	6500
		15	559	9.1	34.8	790	9750
		30	539	7.9	26.7	530	8500
2	NEG.	0	630	9.7	31.6	250	5800
		15	595	13	47.1	220	6050
		30	650	10	33.3	320	8000
3	K12	0	550	8.1	27.3	670	8350
		4	490	7.6	25	550	11000
		21	645	11.8	41.5	180	8350
4	K12	0	480	7.3	24.1	350	8000
		4	495	10.3	37.3	340	11400
		21	545	11	36.8	250	7650
5	375RPS	0	620	9.3	31.4	470	9900
		3	310	5.6	16	387	10200
		7	290	5.3	15.5	530	7650
6	375RPS	0	600	9.2	30.4	700	9850
		3	377	6.2	16.6	430	12000
		8	324	5.1	15.9	410	7400
7	933	0	495	7.6	24.8	280	5250
		3	220	5.6	17	170	9000
		5	162	5	15	290	8900
8	933	0	523	7.7	26.3	506	5350
		no se recupero de la anestesia					
9	933	579		8.9	29.1	710	8450
		sobrevivio hasta 20dias					
10	933	0	658	10.1	33.4	309	7850
		3	461	7.1	26.6	200	13950
		5	310	4.8	15	300	12000
11	933*	0	635	9.4	34.5	260	7750
		3	495	9.1	36.2	220	5450
		5	460	8.7	32	350	7000
12	933	7	178	3	12	300	9500
		0	477	7.4	24	530	9350
		2	279	4.2	16	700	9000
21	933	0	518	7.9	25.9	190	9450
20	933J	0	637	9.4	31.6	200	8350
		3	190	4.3	9	800	12000
15	933J	0	567	8.3	28.5	229	7000
		5	422	7.8	22	450	8500
		0	598	9.2	30.2	287	5100
16	933W	3	400	6.3	22	190	12000
		5	320	4.7	18	400	11200
		0	541	8.4	26.9	310	8000
17	933W	3	571	10.8	39.7	250	11050
		4	420	10.2	34.7	560	13000
		0	539	8	27.4	444	7750
18	933W	3	398	6.5	21	120	7500
		5	207	4.3	11.5	341	10000
		0	650	9.9	32.8	320	8800
19	933W	3	396	6.8	19.2	300	9000
		5	208	3.7	10.8	180	6500

**CUADRO N° 2 (continuación)**  
**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EN SANGRE PRACTICADAS**  
**DESPUES DE LA CIRUGIA**

Nº	TTO	TIEMPO dias	GB /mm <sup>3</sup>	L %	M %	N E %	B %	Bd %	S %	
1	NEG.	0	6500	17	0	78	5	0	4	74
		15	9750	16	1	77	6	0	1	76
		30	8500	36	1	70	3	0	0	70
2	NEG.	0	5800	45	0	52	3	0	2	50
		15	6050	56	1	41	2	0	1	40
		30	8000	47	1	50	2	0	1	49
3	K12	0	8350	65	2	32	1	0	0	32
		4	11000	40	1	55	4	0	4	51
		21	8350	33	0	87	0	0	1	86
4	K12	0	8000	29	2	59	0	0	1	58
		4	11400	65	1	34	0	0	0	34
		21	7650	62	0	38	0	0	0	38
5	375RPS	0	9900	54	0	46	0	0	2	44
		3	10200	68	1	26	0	0	5	21
		7	7650	50	0	48	0	0	2	46
6	375RPS	0	9850	59	1	38	2	0	1	37
		3	12000	75	0	22	0	0	3	19
		8	7400	60	2	36	1	0	1	35
7	933	0	5250	67	1	29	3	1	0	29
		3	9000	50	3	45	2	0	0	45
		5	8900	23	8	68	1	0	6	62
8	933	0	5350	79	3	15	3	0	0	15
			no se recupero de la anestesia							
9	933		8450	50	4	42	4	0	3	39
			sobrevivio hasta 20 dias							
10	933	0	7850	49	0	49	2	1	2	47
		3	13950	16	0	83	1	0	4	79
		5	12000	28	2	68	2	0	3	65
11	933*	0	7750	96	0	4	0	0	0	4
		3	5450	63	2	33	2	0	2	31
		5	7000	43	0	51	6	0	3	48
		7	9500	48	2	50	0	0	1	49
12	933	0	9350	66	2	30	2	0	2	28
		2	9000	45	5	50	0	0	4	46
21	933	0	9450	69	0	31	0	0	2	29
20	933J	0	8350	77	1	22	0	0	0	22
		3	12000	65	3	32	0	0	1	31
15	933J	0	7000	39	0	57	4	0	4	53
		5	8500	46	3	50	1	0	0	50
16	933W	0	5100	56	0	42	2	1	2	40
		3	12000	35	2	60	2	1	2	58
		5	11200	40	0	56	4	0	2	54
17	933W	0	8000	33	3	61	3	0	3	58
		3	11050	36	0	64	0	0	4	60
		4	13000	29	1	65	4	1	3	62
18	933W	0	7750	29	1	67	3	0	0	67
		3	7500	20	4	70	6	0	4	66
		5	10000	31	1	68	0	0	0	68
19	933W	0	8800	63	0	36	1	0	0	36
		3	9000	52	2	40	4	2	0	40
		5	6500	31	3	63	3	0	3	60



FIG. 3.-VALORES PROMEDIO PARA LAS DETERMINACIONES DE UREA Y CREATININA POSTERIORES A LA CIRUGIA

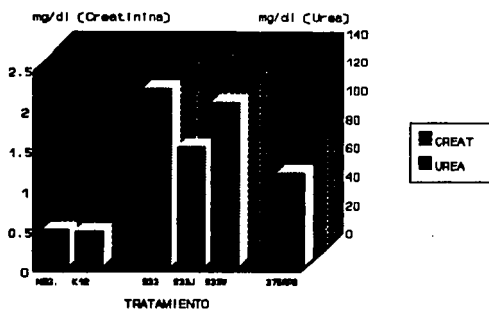
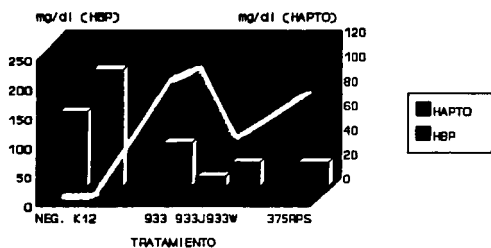
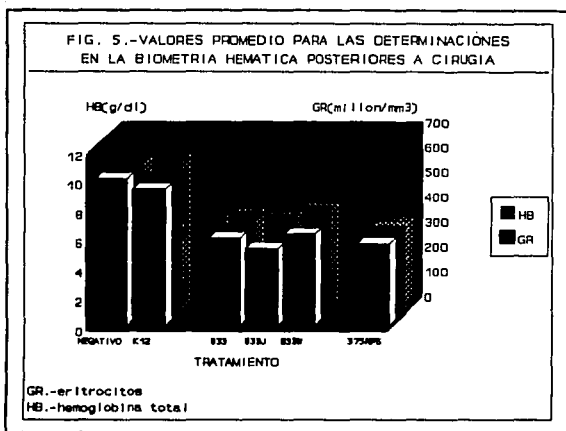


FIG. 4.-VALORES PROMEDIO PARA LAS DETERMINACIONES DE HEMOGLOBINA PLASMATICA Y HAPTOGLOBINA POSTERIORES A LA CIRUGIA



HBP.-Hemoglobina plasmática  
 Los valores son las medias para los diferentes tratamientos y tiempos post-operatorios

FIG. 5.-VALORES PROMEDIO PARA LAS DETERMINACIONES EN LA BIOMETRIA HEMATICA POSTERIORES A CIRUGIA



a) EXAMEN GENERAL DE ORINA.- En la orina de los animales testigo e inoculados con la cepa K12 no se encontraron alteraciones significativas. En los casos inoculados con la cepa 933, 933W y 933J se pudo analizar la orina en la mayoría de los casos a la necropsia por toma directa de la vejiga (por punción con jeringa). En estos casos, la orina presento marcada cantidad de hemoglobina, no se detectaron eritrocitos ni mas de 5 leucocitos por campo en la orina y se encontraron abundantes cilindros granulosos y hialinos así como cantidad moderada de células renales, estos hallazgos fueron mucho mas marcados para los animales inoculados con la cepa 933.

b) BACTERIOLOGIA.- Los resultados del aislamiento bacteriológico practicado al contenido del segmento operado fueron los siguientes:

TESTIGOS NEGATIVO: Se aisló microbiota normal bacteriana en cantidad escasa, compuesta por enterobacterias y escasas colonias sugestivas de *Escherichia coli*.

INOCULADOS CON LA CEPA K12: Se aisló microbiota normal bacteriana con un 15 % aproximadamente de bacterias lactosa negativos, las cuales bioquímicamente fueron *Escherichia coli*, fenotipo de la cepa K12.

INOCULADOS CON LA CEPA 933: En todos los casos se aisló una marcada abundancia de cepas bioquímicamente y morfológicamente

típicas de *Escherichia coli* .

INOCULADOS CON LA CEPA 933J: Se aisló cultivo bacteriano con un 50% de colonias lactosa negativo, bioquímicamente fueron *Escherichia coli*, el resto del cultivo no se identificó pero correspondían a microbiota normal, enterobacterias.

INOCULADOS CON LA CEPA 933W: El 50% del crecimiento bacteriológico correspondió con cepas lactosa negativo con actividad bioquímica de *Escherichia coli* (las cepas 933j y 933W se derivan de la cepa K12, lactosa negativo)

INOCULADOS CON LA CEPA 375 RPS.- El cultivo fue predominantemente de flora normal bacteriana, no se identificó predominio alguno de colonias sospechosas de *Escherichia coli*

Estos resultados sugieren que las cepas inoculadas en el segmento persistieron hasta la necropsia de los animales, excepto en el caso de los animales inoculados con la cepa aislada de bovinos.

#### **D. ANALISIS ESTADISTICO.-**

En el Cuadro N° 3 se resumen los resultados para la diferencia entre medias entre los animales operados y los valores considerados previamente como normales para la población, se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS con un nivel de significancia de 0.05

La prueba se realizó para todas las determinaciones sanguíneas practicadas, sin embargo solo se muestran las que han sido implicadas en el SUH o en los modelos animales previamente trabajados.

**CUADRO N° 3**  
**ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS PARA LAS DETERMINACIONES**  
**SANGUINEAS PRACTICADAS A LOS CONEJOS**

DETERMINACION	ESTADISTICO DE PRUEBA	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
ERITROCITOS	12.8195	0.02513
HEMATOCRITO	11.7634	0.03818
HEMOGLOBINA TOTAL	11.0623	0.05015
LEUCOCITOS TOTALES	2.5374	0.7704
PLAQUETAS	6.4210	0.2673
UREA	20.3408	0.0011
CREATININA	15.6243	0.0080
HEMOGLOBINA PLASMA	18.6088	0.0023
HAPTOGLOBINA	15.4390	0.0086
TGP	7.1796	0.2076
LDH	3.7185	0.5906
CPK	2.3908	0.7928

Las pruebas de Hipótesis fueron realizadas con el paquete STATGRAPHICS, utilizando una prueba de una vía de tipo Kruskal-Wallis y un modelo de  $X^2$  (12).

Los valores de  $p$  0.05, son estadísticamente significativos.

## II. BOVINOS TRABAJADOS

### A. SIGNOS Y LESIONES EN LOS BOVINOS.-

Se trabajaron un total de 84 becerros (1 a 15 días de edad) de la sala de lactación y 12 animales adultos, en un período aproximado de un año.

El cuadro clínico que se presentó en el área de lactancia consistió de diarrea hemorrágica, con casos en los cuales la sangre en las heces era completa, deshidratación severa, en algunos casos signos de pataleo, tortícolis y muerte rápida, afectando animales entre 1 y 20 días de edad. También se observó poca o nula respuesta al tratamiento con antibióticos de amplio espectro.

Las lesiones de los becerros en los 15 casos en que fue posible realizar la necropsia consistieron de: Enteritis hemorrágica (a nivel de ileon y ciego), úlceras en abomaso, intestino grueso y/o intestino delgado (yeyuno ileon).

Algunos animales presentaron distensión de las asas intestinales con acumulación de líquido y sangre (en cantidad escasa) y se observó edema subcutáneo y edema gástrico. Estas lesiones se presentaron en forma aislada o combinadas con las otras lesiones descritas.

### B. HISTOPATOLOGIA.-

Las principales lesiones histológicas encontradas en los bovinos fueron:

Enteritis no supurativa, con destrucción marcada de vellosidades y en algunos casos fusión de las mismas con cantidad variable de infiltrado mononuclear. algunas células de la submucosa presentaron pigmento ocre. A diferentes niveles del intestino delgado.

Úlceras en abomaso e ileon, con infiltrado polimorfonuclear y fibrina en la superficie.

En los exámenes coproparasitológicos realizados, no se observaron formas parasitarias; así mismo en los cortes histológicos no existió evidencia de coccidiosis.

En algunos casos se apreció que la pulpa blanca del bazo estaba con poca cantidad de células linfoides.

En algunos órganos revisados, como riñón, encéfalo, hígado y pulmón, no se encontraron cambios histopatológicos o bien se encontraron lesiones leves, de tipo supurativas, focales, con infiltrado de neutrófilos en forma discreta, que no tuvieron una relación aparente en forma directa con el cuadro clínico entérico observado.

### C. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICOS.-

Los aislamientos bacteriológicos fueron negativos para bacterias patógenas clásicas como *Salmonella*, *Shigella* o *Campylobacter*. En todos los 37 becerros y 12 adultos, se desarrollaron colonias sugestivas de *Escherichia coli* sobre EMB, las cuales tenían brillo metálico, color verde, bordes enteros, umbonadas, superficie lisa y consistencia butirosa. Las colonias



fueron probadas bioquímicamente y se seleccionaron cinco colonias de cada muestra de heces analizadas, las cepas seleccionadas del aislamiento presentaron los resultados mostrados en el cuadro N°4 , estos resultados correspondieron con los reportados para *Escherichia coli* (17).

CUADRO N° 4  
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS A  
LAS CEPAS AISLADAS Y TOMADAS COMO CRITERIO DE SELECCION

PRUEBA	RESULTADO
INDOL	+
ROJO DE METILO	+
VOGES PROSKAUER	-
CITRATO	-
MOVILIDAD	+
LACTOSA	+
UREASA	-
AC. SULFIHIDRICO	-

Las pruebas y lecturas de resultados se realizaron de acuerdo a Edwards y col. (17).

#### D. IDENTIFICACION DE HEMOLISINAS.-

Los resultados de la determinación de hemolisinas en 100 de las 113 cepas de *Escherichia coli* aisladas fueron: 4 cepas beta hemolíticas, entre ellas un 3 fueron cepas que además produjeron citotoxina SLT (citotóxicas) y una dentro de las cepas no citotóxicas. Dado que los porcentajes son similares y bajos, no parece existir una relación aparente entre la producción de citotoxina y la de hemolisina, los resultados se muestran en el cuadro N° 5.

CUADRO N° 5  
FRECUENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* BETA  
HEMOLITICAS AISLADAS EN TERNEROS

	B Hemólisis <sup>(1)</sup>
CEPAS CITOTOXICAS <sup>(2)</sup>	5 † (3/60)
CEPAS NO CITOTOXICAS	2.5 † (1/40)

(1) Evaluado sobre Agar sangre de carnero al 5%

Se muestra el porcentaje en relación a la producción de citotoxina ( cepas hemolíticas/ cepas citotóxicas)

(2) Determinado sobre células Vero.

### E. EVALUACION DE VEROCITOTOXINAS.

El total de cepas de *Escherichia coli* trabajadas en este experimento fue de 113 y los resultados de la identificación de la citotoxina se muestran en la Figura N° 6. En este análisis sólo se consideró las cepas aisladas de la sala de Lactancia dado que en las cepas aisladas a partir de adultos no se encontraron cepas citotóxicas, además de encontrarse clínicamente sanos.

El efecto citotóxico observado sobre los cultivos de células Vero fue de la misma intensidad (destrucción total del monoestrato celular) y rapidez que el de la cepa 933 (productora de SLTI y II) empleada como testigo positivo este efecto se presentó desde las 24 h. de incubación y a las 48 h la destrucción del cultivo celular fue total. En algunos ensayos se pudo apreciar un efecto citotónico (redondeamiento sin lisis) sobre las células a las 24 h de observación, las cuales posteriormente eran lisadas ( efecto citotóxico).

Para evaluar el número de casos (animales) positivos se consideró como positivo si al menos en una de las cepas probadas del aislamiento se detectaba la presencia de citotoxina en el ensayo cualitativo. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura N° 7. Como se aprecia, la frecuencia de animales con cepas citotóxicas fue elevado en la sala de lactancia (86.5 %).

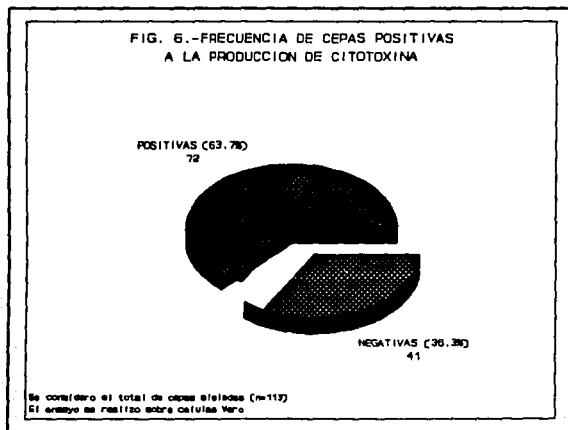
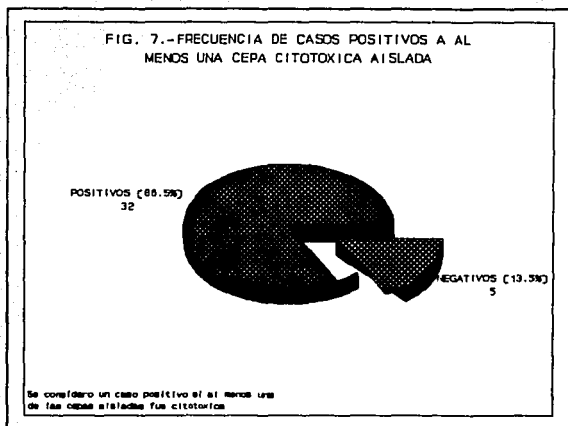


FIG. 7.-FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A AL MENOS UNA CEPAS CITOTOXICA AISLADA



En el cuadro N° 6 , se presentan los resultados de la cuantificación de la toxina para las cepas 933, 933W y la cepa 375RPS (aislada de un caso). Los resultados son promedio de dos determinaciones separadas y se expresan como dosis citotóxicas al 50% en cultivo celular (DC50%/ml), definidas como el inverso de la dilución que aún presenta efecto citopático al menos en el 50% del monoestrato celular bajo las condiciones de la prueba. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros autores para las cepas de referencia (57), para la cepa aislada de bovinos, el resultado fue casi la mitad de producción que para las cepas testigo.

CUADRO N° 6  
CUANTIFICACION DE LAS CITOTOXINAS PRODUCIDAS  
POR LAS CEPAS EMPLEADAS

CEPA	TOXINA PRODUCIDA	TITULO (DC <sub>50%</sub> /ml)
933	VT1 y VT2	5.0 x 10 <sup>3</sup>
933 W	VT2	8.5 X 10 <sup>4</sup>
933 J	VT1	7.0 X 10 <sup>4</sup>
375 RPS	VT1 y/o VT2	1.8 x 10 <sup>4</sup>

DC<sub>50%</sub> .- Dosis citotóxicas al 50% en cultivo de células Vero.  
El título se expresa como el inverso de la dilución máxima que

causó al menos un 50% de lisis del cultivo celular.

**F. IDENTIFICACION DE ROTAVIRUS.-**

En los animales del área de lactancia, en 27 muestras de heces (32.5 %) se identificó un patrón electroforético correspondiente a rotavirus (electroferotipo) ; en la Figura Nº 8 se muestran algunos de los electroferotipos encontrados y que correspondieron al del virus SA11 usado como patrón, con algunas variaciones menores en las bandas de RNA, incluso las variaciones de corrimiento no fueron constantes en los casos ni en los análisis realizados en diferentes tiempos dentro de la explotación.

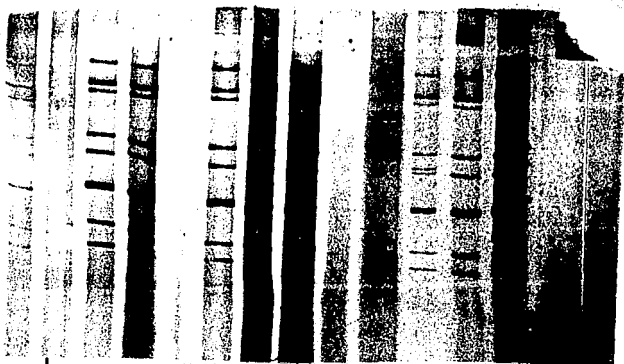
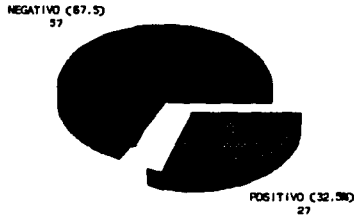


FIGURA Nº 8.- Electroforésis en gales de Poliacrilamida de las muestras de heces de algunos de los bovinos analizados. Se empleó la cepa SA11 de rotavirus como testigo (carril 1).

Por otro lado en la Figura Nº 9, se muestra que en 57 muestras (67.5%) de heces no se observó algún electroferotipo sugestivo de rotavirus . En el caso de las 12 muestras de adultos, resultaron también negativas a la prueba.

FIG. 9.-FRECUENCIA DE ROTAVIRUS BOVINO  
EN LA SALA DE LACTANCIA

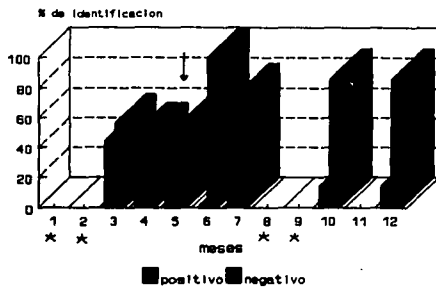


Se utilizó la técnica de electroforesis  
en gel de poliacrilamida a partir de las heces

El análisis de la distribución de casos positivos con respecto al tiempo se observa en la Figura N° 10 , en ella se aprecia que los casos positivos a rotavirus fueron disminuyendo con el tiempo, con el consiguiente aumento de los negativos, así mismo se indica el mes 5, en el que se empezó a utilizar una vacuna a virus inactivado, aplicado por vía intramuscular a las hembras, 15 a 20 días antes del parto.

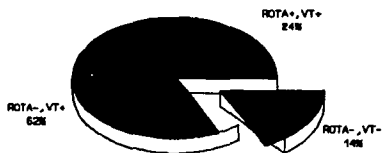
La relación de infección con Rotavirus y presencia de cepas citotóxicas en los bovinos se observa en la Figura N° 11 , se aprecia que el mayor porcentaje de relación lo tienen los casos negativos a rotavirus y positivos a citotoxinas (62% ), y el menor porcentaje los casos en que fueran negativos a ambos agentes.

FIG. 10.-FRECUENCIA MENSUAL DE ROTAVIRUS IDENTIFICADOS POR ELECTROFORESIS EN PAGE



No se realizaron muestras  
La flecha señala el inicio de vacunación en hebras  
pastoriles

FIG. 11.-RELACION DE LA PRESENTACION DE ROTAVIRUS CON CEPAS CITOTOXICAS EN TERNEROS



Solo se consideraron los casos en que se hicieron ambas determinaciones  
ROTA.-Rotavirus por electroforesis en PAGE  
VT.- Citotoxinas efecto en células Vero

El cálculo de las medidas de riesgo para los eventos de que los animales tengan cepas citotóxicas y/o Rotavirus de acuerdo a Morton ( 73 ) fueron:

Riesgo relativo = Rotavirus 0.0 ; ECVT 0.387

Riesgo atribuible = Rotavirus 0.24 ; ECVT 0.380

Esto nos indica que aparentemente no existe relación (factor de riesgo) entre la infección con rotavirus y la infección con cepas citotóxicas, así mismo no encontramos casos en donde sólo se presentará rotavirus sin cepas citotóxicas al mismo tiempo.

## DISCUSIÓN

### I. MODELO ANIMAL:

#### A. Técnica Quirúrgica.-

Los conejos anestesiados mediante pentobarbital por vía intraperitoneal, tuvieron el mejor comportamiento en el quirúrgico. El efecto del cloroformo por vía respiratoria fue severo y condujo a paro respiratorio, existiendo reportes de la susceptibilidad alta al compuesto por los conejos, por otro lado el efecto con Ketamina y Xilacina fue de corta duración, lo que se puede deber al metabolismo más rápido que presenta esta especie con respecto a otros animales.

El tiempo aproximado de cirugía fue de 30 min y el paso de lavado del segmento intestinal, aunque no exhaustivo, si fue adecuado, pues en los animales control no se encontraron evidencias de contaminación en el segmento.

El análisis de los valores obtenidos para las pruebas de laboratorio, realizadas antes de operar a los conejos, indica una concordancia alta con respecto a los valores normales reportados por otros autores (19). El valor normal, promedio, obtenido para la determinación de haptoglobina sérica fue de 50.6-103.1 mg/dl y para la hemoglobina plasmática fue de 2.9-14.1 mg/dl, estos datos no fueron encontrados en la bibliografía consultada por lo que no se pueden realizar comparaciones en la especie, sin embargo concuerda con lo reportado para los caninos en un estudio similar (24).

La patogenia del SUH no está bien establecida, los signos de urémia, anemia microangiopática, trombocitopenia y falla renal que se presentan en conjunto pueden tener un mismo mecanismo de daño el cual se produce al mismo tiempo o bien pueden tener mecanismos secuenciales (uno como consecuencia de otro) (6,38).

La elección del conejo y la técnica quirúrgica como modelo animal fue basado en los siguientes puntos:

a) El conejo es un animal más fácil de manejar y mantener que los caninos.

b) Algunos autores (24) sugieren que en los modelos animales empleados previamente (cerdo y conejo) una influencia pudiera ser el poco tiempo de permanencia de las cepas y/o la toxina en el tracto digestivo, por ello se realizó una cirugía que permitiera la sobrevivencia del animal por períodos de tiempo mayores y que a la vez prolongara el contacto con las toxinas. El modelo se desarrolló en forma parecida al modelo descrito previamente en ratas para ensayar otros fenómenos (59).

c).- En los experimentos anteriores (24), se consideró que se requiere una absorción y transporte sanguíneo de la toxina a los órganos blanco por lo que se decidió que el segmento intestinal debería conservar su irrigación.



## **B. Absorción de la Toxina.-**

Se ha sugerido que las Verotoxinas en el SUH tienen una absorción hacia la sangre (toxemia) que desarrolla trombosis microvascular, por efecto citotóxico o citopático sobre el endotelio o por agregación de las plaquetas (21,42).

En el modelo trabajado, se observó que en varios de los casos se presentó diarrea hemorrágica, considerando que la bacteria fue colocada en un segmento aislado y que la única comunicación hacia el intestino fue por sangre, podemos sugerir que la toxina tuvo que ser absorbida, transportada vía hemática y producir su efecto en las regiones intestinales no inoculadas. La diarrea hemorrágica, comprobada por la reacción del excremento con la benzidina, indica un papel directo de las toxinas en esta signología.

Algunos datos previos que apoyan esta absorción y efecto vascular provienen del modelo descrito en el cerdo (21) en el cual la cepa 933 colonizó el ciego y el colon produciendo necrosis de enterocitos, descamación, inflamación supurativa del ciego y colon y edema del mesocolon, en algunos casos la colonización llegó hasta ileon. En otro trabajo, utilizando cerdos libres de patógenos específicos, los cuales fueron inoculados con dosis diferentes de SLT IIV, purificada y libre de endotoxina, por vía i.v., desarrollaron edema y hemorragia de diferentes partes del tracto gastrointestinal y cerebelo, pero no diarrea, las lesiones microscópicas estuvieron asociadas a daño vascular y el efecto dependió de la dosis administrada (42).

En otro modelo experimental realizado en el cerdo, también se observó que la pérdida de los genes que codifican para SLTII condujo a una pérdida de la capacidad de producir lesiones (21).

## **C. Efectos en Hemostasia.-**

En el modelo desarrollado en el presente trabajo se pudieron observar los signos clínicos de hemorragia, las lesiones de daño endotelial y las hemorragias histológicas; sin embargo la disminución del número de plaquetas circulantes no fue estadísticamente significativo entre los diferentes grupos experimentales trabajados. Las posibles explicaciones a este fenómeno pudieran ser:

- a) Una capacidad mayor de almacén de plaquetas en los conejos que compensan eficientemente la disminución.
- b) Un menor efecto de las toxinas VT sobre las plaquetas en el conejo (susceptibilidad de especie).
- c) La técnica de cuantificación de plaquetas es muy imprecisa lo que genera una mayor variación de los datos, por lo que en grupos pequeños, la prueba estadística sea no significativa. Lo anterior apoyado en que el comportamiento de trombocitopenia se observa gráficamente
- d) La rapidez y gravedad de los signos y lesiones, asociadas a un mayor efecto endotelial que de coagulación intravascular, no permitieron apreciar la trombocitopenia.

#### **D.-Efectos hemolíticos.-**

En eventos hemolíticos intravasculares, la hemoglobina libre (Hb) es captada en primera instancia por la haptoglobina (Hp), la cual es sintetizada en hígado, formándose un complejo Hb-Hp que es llevado al hígado para su degradación, si el proceso de hemólisis intravascular es muy severo o continuo, los niveles de haptoglobina se saturan y se activan simultáneamente otros procesos de compensación para evitar la pérdida de hierro y el acúmulo de hemoglobina en plasma. La hemoglobina libre que no es captada se filtra por vía renal y puede aún ser reabsorbida y catabolizada por las células tubulares, si se excede esta capacidad (90-100mg/dl) aparece hemoglobinuria (34,35,66,68).

En cuadros hemolíticos severos se produce, histológicamente, acúmulos de hemosiderina, principalmente en células del sistema retículo endotelial y tubulos renales. Así mismo, se ha reportado que en las crisis hemolíticas se pueden encontrar cilindruuria (30,61).

En todos los casos inoculados con cualquiera de las cepas productoras de citotoxina se pudo apreciar una baja de la haptoglobina sérica, en realidad la disminución se refiere a la haptoglobina libre, no unida a hemoglobina, que eventualmente queda como tal después de que la mayor parte se une a la hemoglobina libre durante la crisis hemolítica intravascular. Este fenómeno, asociado al aumento de hemoglobina plasmática, sugieren fuertemente un evento hemolítico intravascular severo.

#### **E.-Efectos sobre el Sistema Nervioso.-**

Los conejos trabajados presentaron un cuadro nervioso caracterizado por parálisis del tren posterior y anemia clínica con anorexia y disnea terminal.

En cerdos con VTEC (enf. edematosa) se produce ataxia y confusión mental (65) y en niños afectados por SHU, las lesiones en sistema nervioso central se han relacionado con la mortalidad observada (39,76,78).

Francis y col.(21) describieron signos clínicos y lesiones del SNC de cerdos gnotobiontes infectados con O157:H7 y SLTII que las involucra en la patogénia, sin embargo no en todos los casos desarrollaron este cuadro, pero si en todos los inoculados con la cepa 933 se presentó edema del colon.

Se ha observado efecto citotóxico, enterotóxico, parálisis y letalidad asociados a las toxina VT1 y VT2 purificadas de la enf. del edema (65) y la toxina de Shiga (44), efectos que se ha pensado sean mediados por el receptor Globosil-gangliosido GB3 (44). Aunque en un trabajo se sugirió que parte de los signos son asociados a la producción de toxina ST (49).

En otro estudio, la toxina de Shiga causó efectos enterotóxico y neurotóxico en conejos, mediado por el receptor celular GB3 (44).

En algunos experimentos se han administrado sobrenadantes con toxina VT por vía endovenosa en conejos y ratones, presentándose la muerte a las 30-48 h y a los 2-6 días post-inoculación respectivamente con una manifestación de parálisis de miembros

posteriores (49).

Fujii y cols (23) encontraron un efecto neurotóxico severo al administrar cepas productoras de VT2v por vía intragástrica en ratones.

Para la toxina VT, la secuencia del receptor en intestino es Gal 4Gal 4 Glc Cer; estos receptores se encuentran en el conejo (44) y también se ha determinado que en el conejo el receptor GB3 aparece a los 16 días de edad en el intestino lo que explica el efecto enterotóxico. Observándose que la cantidad de GB3 se incrementa hacia el destete, a diferencia con otras especies animales como el ratón que al nacimiento tiene GB3 pero su cantidad se disminuye al destete, esto probablemente sea regulado por hormonas (68).

Lo anteriormente expuesto fundamenta el hecho de que las lesiones y signos nerviosos encontrados en los conejos en el presente trabajo, se pueden deber a un efecto directo de la toxina sobre el SNC, después de su absorción en el segmento inoculado.

Este efecto sobre el SNC puede estar mediado por una lesión vascular previa como lo sugiere Fujii y col. (23) autores que incluso trabajaron con la cepa 933W usada en el presente trabajo, así mismo notaron efectos directos de la toxina sobre las neuronas posteriormente al daño endotelial e incluso relacionaron la presencia de receptores para VT2 sobre las neuronas.

Nuestros datos sugieren un efecto sobre el SNC de los conejos, observándose lesiones vasculares y las neuronas de aspecto normal, resultado que es debido a las técnicas empleadas para la evaluación del daño neuronal en las cuales no se utilizó inmunocitoquímica ni microscopía electrónica.

#### **F. Efectos digestivos.-**

La administración por vía oral en cerdos gnotobiontes (74), desarrolló diversos grados de diarrea (no hemorrágica) con lesiones de erosión hasta úlceras intestinales sobre todo en intestino grueso. Las bacterias se encontraron proliferando en los focos de necrosis o en la lámina propia asociadas a los vasos sanguíneos, estas lesiones son similares a las producidas por cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (75). En otro modelo en cerdo, inoculando por vía endovenosa la toxina purificada, se observó lesión de destrucción de enterocitos a nivel de ciego y colon asociada a necrosis vascular (42).

La localización de las lesiones a nivel de colon en el SUH y los hallazgos en los experimentos previamente realizados por otros autores (8,14,47,48,74), nos sugieren que en el conejo y otras especies animales el principal sitio de acción de la toxina es el intestino grueso, aunque esta puede ser absorbida en intestino grueso y delgado.

El modelo desarrollado, en el que se observó un efecto a nivel de intestino delgado en un sitio comunicado tan solo por vía circulatoria del sitio de inóculo, sugiere que la toxina es absorbida, llevada por el torrente circulatorio y fijada en receptores intestinales los cuales se encuentran en el lado basal de las células (lámina propia) lo que implicaría una polarización

del enterocito como lo demostrado previamente por Wick (79); con lo que desencadenan una diarrea tipo secretora. Por otro lado deben existir receptores vasculares, que explican el efecto de congestión, hemorragia y diarrea hemorrágica observada en algunos animales.

El efecto local, en el segmento inoculado, fue muy severo existiendo destrucción de la mucosa, proceso supurativo y salida de fibrina a la luz, a diferencia del efecto observado en otras porciones intestinales no inoculados, esto hace pensar que en el efecto local participan no solo el factor toxina VT, sino otros factores que acrecentan la lesión observada. Sobre esto, se ha observado que muchas de las cepas VTEC tienen un efecto directo sobre el enterocito de "attaching and effacement" fenómeno asociado al hecho de adherirse a la célula, así como el posible papel de la endotoxina, otras toxinas o la posibilidad de una penetración a la lámina propia. Fratamico y col (22) observaron, en un modelo en conejo con administración intragástrica, la vacuolización y picnosis nuclear de los enterocitos sobre todo a nivel de intestino grueso, este fenómeno no se apreció en el segmento inoculado pero sí en forma leve en el intestino con secreción.

Al respecto, cabría hacer la pregunta ¿ si la toxina es liberada por la bacteria en la luz intestinal, o se requiere un evento previo de penetración bacteriana hacia la lamina propia con una posterior liberación de la toxina a este nivel ?, en el modelo desarrollado el factor de permanencia en la luz intestinal puede favorecer ambas condiciones al romperse el movimiento típico del intestino y crear condiciones que permiten una cierta atrofia del epitelio, lo que se demuestra por el efecto de atrofia observado en los testigos negativos.

El sitio de inoculación presenta una imagen histológica característica de áreas linfoides, sobresaliendo el hecho de que la conformación recuerda el aspecto de nódulos linfoides en los que se pueden distinguir con facilidad una zona medular y una cortical en contacto íntimo con formaciones del tipo de las criptas, esta agrupación linfoide disminuye en la zona límite con el ciego, después de la cual el aspecto es como placas de Peyer características. (Figura N° 2).

La inoculación provocó una destrucción en las áreas linfoides más profundas, con pérdida de linfocitos pero a la vez existió una afluencia de linfocitos, provenientes aparentemente de otros sitios hacia las travéculas de conjuntivo, espacios perivasculares y la serosa de la región. Además el bazo de algunos de los animales presentó una disminución marcada en el tamaño y en las regiones de pulpa blanca. Estos fenómenos sugieren un efecto citotóxico de la toxina sobre los linfocitos, situación que a la fecha no ha sido reportada.

El elucidar el mecanismo exacto, puede encaminarse por el uso de anticuerpos marcados, dirigidos contra la toxina y contra la bacteria y utilizar una técnica inmunohistoquímica para seguir los eventos en los tejidos de los conejos, en forma parecida a lo realizado por Fujii y col (23).

#### **G. Efectos sobre el Riñón.-**

La lesión renal observada y confirmada por los hallazgos en el exámen general de orina durante el presente trabajo, implica un efecto sobre la parte cortical del riñón, la salida de cilindros y proteína nos indica daño glomerular, por otro lado la salida de hemoglobina libre por la orina se asoció a una hemólisis intravascular previa, así mismo la uremia y creatinemia observada sugieren un fenómeno de insuficiencia renal asociado a la región cortical del riñón, pudiendo ser a nivel de ovillo renal, cápsula o glomerulo. Los hallazgos previos de la existencia de receptores para la toxina en riñón, a nivel glomerular, explicarían este hecho

El daño glomerular no se ha observado en cerdos con EEP ni en cerdos inoculados con cepas O157:H7, lo que les sugirió a los autores que el efecto en el SUH pudiera ser por una trombosis fibrinosa (21).

Koster y col. en 1978 (37) propusieron una secuencia de eventos para explicar el daño renal, consistente en una lesión trombótica microangiopática, coagulopatía intravascular y falla en la microcirculación renal. Dichos daños los justificó como un fenómeno de Shwartzman asociado a la absorción de endotoxinas en intestino, así mismo menciona que no se observaron bacterias a nivel renal ni complejos inmunes o anticuerpos a nivel renal. Por otro lado Chandra y col (8) postulan, además de los fenómenos mencionados anteriormente, la participación de depósitos de fibrina y plaquetas a nivel de endotelio vascular renal como una posible explicación de una falla renal por baja en la perfusión asociada al SUH. El modelo realizado no descarta la posible absorción de endotoxina a nivel intestinal, sin embargo en los estudios histológicos realizados no se identificaron lesiones compatibles con un fenómeno de Shwartzman. Así mismo, las cepas 933W y 933J son derivadas de una cepa K12 C600 apatógena, rugosa (incompleta en LPS) (11,71) lo que descartaría en cierta forma el efecto mediado por LPS, sin embargo la endotoxina, que reside en el Core y Lípido A esta presente en las cepas K12 C600 no pudiendo diferenciar entre este efecto y la posibilidad de algún otro factor (78) que provoquen alguna respuesta como la endotoxina en los conejos.

En los terneros afectados y analizados en el presente trabajo, se observó edema del riñón y vejiga lo que sugiere que en las cepas existan factores que modifican la capacidad de permeabilidad vascular

En otro trabajo (47) se sugiere que en vista de que la corteza del riñón humano expresa la glicoproteína GB3, este órgano es el más afectado por contar con los receptores adecuados para la unión de las verocitotoxinas, este autor sugiere que una vez que se produce el daño celular por la toxina bacteriana, se disparan diferentes mecanismos de daño endotelial generalizado en los órganos involucrados. El daño endotelial "dirigido" puede tener también explicación por existir receptores específicos para la toxina sobre ciertos vasos sanguíneos, como lo sugerido para la toxina SLT IIv y el GB4 (42).

Dentro de este daño pudiera estar involucrado el sistema inmune, sin embargo en el modelo ensayado en este trabajo, las

lesiones fueron muy rápidas, 2-4 días, lo que descartaría un posible papel inmunológico asociado.

La otra explicación de daño endotelial está en el fenómeno de lesión, coagulación intravascular y liberación de sustancias de inflamación, éste efecto se observó en el modelo en caninos descrito previamente (24), sin embargo en el conejo no se pudo apreciar una trombocitopenia ya que la alteración de las plaquetas en los conejos inoculados, no fué estadísticamente significativa ( $p=0.26$ ).

Así mismo, los diferentes efectos sobre el aparato urinario pueden estar basados en la diferente cantidad de GB3 a nivel renal presente en cada especie animal (44,53), fundamentalmente en la zona glomerular, en el modelo desarrollado se pudo apreciar que el conejo dió un efecto renal mas marcado que el reportado para el cerdo y, en base a la bibliografía, que este efecto pudiera ser por la mayor cantidad de GB3 a nivel glomerular, principalmente del lado capilar.

#### **H. Signos de Anemia.-**

La anemia desarrollada en los conejos fue debida a una hemólisis intravascular lo que quedó demostrado por los datos de: disminución de haptoglobina libre, hemoglobinuria y no aparecer evidencias de bilirrubinemia ni ictericia. Esta hemólisis puede estar asociada a:

a) Receptores sobre el eritrocito para la propia toxina dado que se ha demostrado que el receptor GB3 esta en el eritrocito del ser humano (3,44).

b) La absorción, en intestino de algún otra sustancia, diferente a las verocitotoxinas, con actividad hemolítica.

Como se pudo demostrar las cepas 933 y 933W tuvieron el efecto más marcado sobre los conejos. Este resultado es acorde a lo que se observó anteriormente empleando el modelo en canino y a lo reportado por algunos autores que mencionan que la citotoxina VT2 al parecer es la que tiene efectos mayores (23,24,49,66).

En el caso de la cepa 375RPS ensayada, se puede deducir que el efecto fue débil, incluso ligeramente menor al efecto producido por la cepa 933J productora de VT1, además las cantidades de citotoxina producidas por las cepas usadas fueron más bajas en la cepa 375RPS aislada en el trabajo a partir de bovinos, en base a lo anterior se puede sospechar que la cepa 375 RPS produce VT1 o bien que se requiere algún otro factor asociado a la bacteria que está presente en las cepas 933 pero no en la 375RPS.

#### **I. Patogénia en el modelo.-**

En base al análisis anteriormente expuesto es posible deducir una probable patogénia en la infección por *Escherichia coli* enterotoxémica (ECVT, ECEH), de la siguiente manera:

El evento es iniciado por la producción de la toxina en la luz intestinal, evidentemente esto es favorecido por las condiciones microambientales del intestino y es ubicado a nivel de intestino grueso por existir en ese lugar los receptores apropiados para el fenómeno de adherencia bacteriana.

La VT son absorbidas a nivel cecal, probablemente en asociación con una invasión por la bacteria hasta la lámina propia del órgano, de esta forma la toxina alcanza el torrente circulatorio para ser diseminada en todo el organismo. Evidentemente existen receptores para el efecto citotóxico a nivel de Placas de Peyer o nódulos linfoides, endotelio vascular y eritrocito, fundamentalmente.

Las diferencias en la gravedad de los signos encontrados pueden estar explicadas en el tipo de toxina (VT1 o VT2), la cantidad de toxina producida (moderadas o altas productoras) y/o por la asociación con otros productos de la bacteria (LPS, CFN, etc).

## II. ENFERMEDAD EN LOS BOVINOS

En el área de la explotación trabajada se encontró que el cuadro clínico de diarreas, en diferente presentación, era inusualmente severo, debido a que la morbilidad estaba en un 80% y la mortalidad llegaba a alcanzar en algunas semanas tazas de hasta 60% (datos tomados de los registros clínicos en la explotación), por otro lado el índice de letalidad estaba en un 60% lo que demostró la gravedad del problema. Los animales no respondían a la administración de antibióticos, ni a la terapia de restitución de líquidos a la que eran sometidos por vía endovenosa, ello sugería un agente no bacteriano como etiología del problema. Además, tomando en consideración el curso, el período de incubación tan corto y que el problema se presentó primordialmente en los primeros cinco días de edad, sugería una etiología viral o enterotoxémica. El otro factor importante fue el hecho de que las lesiones a la necropsia se ubicaron casi exclusivamente en el aparato digestivo y las lesiones histológicas fueron compatibles con un cuadro de etiología viral con enteritis no supurativa, o en algunos casos de etiología tóxica presentándose enteritis con destrucción de vellosidades pero sin proceso inflamatorio severo, parecido al descrito en la bibliografía (30).

En base a lo anterior se procedió a realizar el diagnóstico diferencial del problema. El eliminar etiologías de patógenos clásicos bacterianos como *Salmonella* (10) fue muy contundente, puesto que en todas las muestras trabajadas en ningún caso se obtuvo desarrollo de este tipo de bacterias. Aunque los animales fueron tratados con antibióticos por vía parenteral y este hecho pudiera interferir con el aislamiento bacteriológico, el crecimiento en las cajas de cultivo en todos los casos incluyó bacterias consideradas de la microbiota normal.

### A. Cuadro por ECVT.-

La posibilidad de un cuadro por Verotoxinas fue deducida de los siguientes factores:

1.-La enteritis hemorrágica severa que ha sido asociada a cepas de *Escherichia coli* productoras de citotoxinas potentes tanto en el humano como en el bovino (24,53).

2.-Los signos nerviosos presentados por los terneros durante el cuadro

3.-La negatividad a pruebas serológicas en busca de anticuerpos anti Diarrea viral bovina o Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) practicadas a los mismos animales en otro estudio paralelo.

4.-Reportes previos (5,9,37) al respecto de que las fuentes de contaminación de cepas de *Escherichia coli* O157 identificadas como causantes de infección para el humano, fueron hamburguesas de carne de bovino, además de que se encontró una correlación alta entre consumo de leche bronca y brotes de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis hemorrágica (CH).

5.-Se han sugerido a los bovinos como reservorios probables de las cepas de *Escherichia coli* O157 productoras de verotoxinas (20,37,40,65,81).

6.-Las VTEC se han asociado con signos de diarrea, disentería y enfermedad del edema (18,65,81).

En el aislamiento bacteriológico se seleccionaron cepas de *Escherichia coli* que presentaran un patrón de pruebas bioquímicas típico (Cuadro N°4). Sin embargo, se debe considerar que este patrón puede variar para algunas de las pruebas, fenómeno que se ha observado en trabajos previos, en donde a partir de cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones se observó una variación en el patrón de pruebas bioquímicas tales como ureasa, movilidad, indol, ornitina (73). Así mismo, el punto anterior es reforzado por lo reportado por Fratamico y col (22) los cuales aislaron cepas de *Escherichia coli* ureasa positivas a partir de cerdos y de bovinos (39) y por la relación que tienen las cepas no fermentadoras del sorbitol con la producción de Verotoxinas (74); contradictoriamente a el aislamiento de cepas sorbitol positivo y productoras de VT (8); o los datos de que en cepas de origen humano aisladas del aparato urinario, la fermentación del Dulcitol puede ser un marcador de patogenidad (60).

Sin embargo, en base a la frecuencia alta (63.7 %) con la que se demostró la producción de citotoxinas en las cepas aisladas durante el presente trabajo, se puede pensar que las cepas citotóxicas de bovinos tienen un comportamiento bioquímico típico de la especie *Escherichia coli*.

Este último dato concuerda con reportes previos (65), en los cuales se ha encontrado una prevalencia alta de cepas VT+ en bovinos que en muchos casos va a la par con la portación de factores auxiliares de virulencia, como el K99, F41 y K88 entre otros, sin describirse comportamientos bioquímicos atípicos en las cepas probadas (54).

Strockbine y col. en 1986 (67) usaron el término SLTI y SLTII para denotar a las toxinas VT1 y VT2 respectivamente. Actualmente se conoce que VT1 y VT2 se codifican en fagos y se han mapeado los genes y creado sondas contra ellas (61,65).

La toxina VT1 se neutralizó con anticuerpos anti-toxina de Shiga y además la citotoxina VT2 se identificó en cepas O157, de casos de SUH y CH, por Scotlan (65).

De bovinos se han aislado cepas productoras de VT1 (demostrado por neutralización con anti-Shiga), aunque después se demostró que



no siempre era VT1 sino también VT2 (65).

Otros autores encontraron que todas las ECVT de bovinos hibridizan con VT1 o VT2 (principalmente VT1) (67) y en el campo se han encontrado que producen una, pero no ambas, toxinas. (61).

Las cepas VT aisladas de bovinos pertenecen a varios serogrupos y se han aislado tanto de enfermos como de sanos (67). Los serogrupos O157, O26, O153 y O111 se han aislado de bovinos y de humano (26,65).

Así mismo se han aislado cepas O157:H7 a partir de cerdos (65,67), aunque algunos otros autores difieren puesto que no las han encontrado con frecuencia en los animales (14).

Un punto a considerar, es el hecho de que el serogrupo no necesariamente tiene una correlación con la virulencia, siendo éste un factor mas bien asociado a una mayor frecuencia de aislamientos de cepas con serogrupos particulares; mas bien existe asociación de ciertos plásmidos presentes dentro de la bacteria con el serogrupo expresado (5).

Al realizar la evaluación de la presencia de citotoxinas mediante cultivo celular y comparar el efecto con los testigos empleados, se pudo apreciar un efecto de la misma intensidad y severidad en las cepas aisladas con respecto a los testigos positivos. Considerando que las cepas empleadas como testigo pertenecen al grupo de altas productoras de citotoxinas se puede asumir que las cepas en estudio fueron altas productoras de VT. Previamente se ha reportado que los títulos de producción de citotoxina están entre 160 y 156,250 unidades citotóxicas por ml. en cultivos celulares (uccc), para aislamientos de bovinos, a diferencia de los porcinos en los que son de 10 a 160 uccc (57). Lo cual esta de acuerdo a los datos encontrados en este trabajo en los que se obtuvieron cerca de  $10^7$  uccc para la cepa aislada de bovinos y en la que se cuantificó la producción de citotoxina.

En bovinos se han aislado cepas que producen un factor citotóxico necrotizante (CNF), aunque se requiere mayor investigación para evaluar su poder patógeno debido a que las cepas productoras de CNF se han aislado tanto de animales enfermos como de sanos (26,63). Este factor causa la aparición de células multinucleadas grandes, sobre cultivos de células HeLa, CHO o Vero (24) y malformaciones en células Vero (26).

Durante el desarrollo de la prueba de efecto citotóxico sobre células Vero se observó en algunos cultivos un efecto citotónico (como el descrito para la enterotoxina LT) con algunas células con malformaciones; dicho efecto pudiera ser debido al factor CNF previamente descrito, o a la producción de LT.

La frecuencia de cepas positivas a la producción de la citotoxina fue de 63.7 % (Figura 6), este valor es alto comparado con lo reportado por varios autores en otros países (14,43,61,65), sin embargo la frecuencia es predecible considerando el tipo de explotación en la que el confinamiento es severo. Para este mismo punto, se ha reportado que las poblaciones microbianas pueden persistir por largos periodos en condiciones que permitan la permanencia con hospederos susceptibles; en el área trabajada

siempre existían animales , debido a que los partos no son programados y el ingreso de lactantes al área es permanente, imposibilitando la despoblación e higiene completa en el lugar.

Si consideramos el número de casos positivos, tomando en cuenta que al menos una de las cepas aislada produce toxina, existió un alto número de animales (86.5%) infectados (86.5% Figura 7). Este fenómeno no necesariamente indica enfermedad en cada animal del cual se logró aislar las cepas citotóxicas, puesto que incluso algunos autores (54) mencionan que las cepas citotóxicas se aíslan de animales aparentemente sanos. Sin embargo, asociándolo a los signos clínicos predominantes en los animales se puede deducir su implicación en el cuadro de diarrea hemorrágica con pobre respuesta al tratamiento de antibióticos.

### **B. Rotavirus.-**

Los datos obtenidos en el presente trabajo, con relación al diagnóstico de rotavirus, indican que no se encontraron casos de positividad sólo al agente viral y que el mayor porcentaje de casos correspondió al de Rotavirus negativo/ VT positivos. Los datos anteriores parecen indicar la posibilidad de que al menos en la explotación de bovinos analizada, la infección por cepas VT positivas no requiere una infección previa por rotavirus, fenómeno muy interesante debido a que muchos autores (4,20,29,30) implican una infección viral previa a una infección bacteriana, observándose que existió un factor de riesgo pequeño, calculado según Morton (45), por la infección por rotavirus y que el factor de riesgo es mayor con una infección por cepas productoras de VT que así puede predisponer a la infección viral.

La relación entre la presentación de rotavirus y las cepas citotóxicas aisladas de los terneros fue predominantemente de casos con cepas VT+ sin evidencias de rotavirus, con un 62%, en contraste con la frecuencia en la que se encontraron ambas etiologías que fué de un 24% . Los cálculos del Riesgo atribuible (RA), del Riesgo relativo (RR) y del índice de riesgo entre ambos factores nos indican que :

a).- El porcentaje de riesgo de presentar infección con Rotavirus, atribuible a presentar cepas citotóxicas es del 100%

b).- No existió Riesgo de tener cepas VT , si se tiene Rotavirus. Estos datos sugieren que el cuadro clínico observado pudo deberse a la presencia de cepas citotóxicas solamente, sin existir una infección viral primaria y por otro lado al no encontrarse animales positivos sólo a rotavirus y a los cálculos de RR y RA, se puede deducir que la infección por rotavirus bovino puede ser secundaria a la infección con cepas citotóxicas. Relacionando este hecho, con el fenómeno del efecto citolítico sobre los linfocitos intestinales observado en los conejos, se podría pensar en algún papel inmunosupresor de las toxinas VT sobre el intestino que a su vez fuera el responsable de una mayor susceptibilidad a la infección con los agentes virales que en ese momento circulen en la explotación.

En la explotación trabajada se tuvo la oportunidad de realizar algunas técnicas de control después de conocer este diagnóstico.

Para ello se administró vacuna de rotavirus bovino y anacultivo de cinco cepas de *Escherichia coli* citotóxicas aisladas a las hembras gestantes, con ello se pudo observar, posteriormente, que se presentó una disminución altamente significativa de la morbilidad y mortalidad generales en el área de lactancia. Estos resultados confirmaron la participación de cepas VT+ asociadas a rotavirus en el cuadro clínico observado.

Sin embargo, dado que se realizó el manejo de vacunación y bacterinización prácticamente al mismo tiempo, no fue posible separar el efecto etiológico de ambos agentes.

Estos antecedentes sugieren que las cepas citotóxicas son agentes primarios de infección y toxemia neonatal en bovinos y a la vez refuerza el posible papel de los bovinos como reservorios de cepas citotóxicas que afectan al humano produciendo SHU como lo reportado previamente (5).

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barrón , R.B.L., M.C. López, P.G. Bañuelos, H.G. Cuervo, J.S. González y M.V. Maya. 1992. Rotavirus en: Manual del Laboratorio de Virología, ENCB, IPN ed.
- 2.- Bitsan, M., H. Karch, H. Altrogge, J. Strehav, and F. Blaker 1988. Haemolytic Uremic syndrome associated with a variant Shiga-like cytotoxin of *Escherichia coli* O111.J. Pediatr. Infect. Dis. 7 : 128-132.
- 3.- Bitsan, M., S. Richardson, S. Huang, B. Boyd, M. Petric, and M.A. Karmali. 1994. Evidence that verotoxins (Shiga like toxins) from *Escherichia coli* bind to P. blood group antigens of human erythrocytes in vitro. Infection and Immunity. :3337-3347.
- 4.- Blanco, J., E.A. Gonzalez, Z.I. Bernard and B. Rogueiro. 1983. Role of nutrition in the pathogenesis of porcine *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol. Lett. 20:167-170
- 5.-Borcsyk, A.A.,M.A. Karmali,H. Lior and L.M.C. Duncan. 1987. Bovine reservoir for Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, Lancet 1:98.
- 6.- Brassard, J.A., K.M. Meyers, M. Person, and C.R. Dhein., 1994. Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model of uremic bleeding. J.Lab.Clin.Med. 124: 48-54.
- 7.- Brook, M.G., H.R. Smith, B.A. Bannister, N. MacConnell, H. Chart, S.M. Scotland, A. Sawyer, M. Smith, and B. Rowe. 1994. Prospective study of verocytotoxin-producing, enteroaggregative and diffuse adherent *Escherichia coli* in different diarrhoeal states. Epidemiol. Infect. 112: 63-67
- 8.- Chandra L., B.T.G. Obrig.1992. Shiga Toxin- Asociated haemolytic Uremic Syndrome combined Cytotoxic efect of shiga toxin an LPS (Endotoxin) on human vascular endothelial cell in vitro. Infect. Immun. 60:1536-1543.
- 9.- Clarke R.C., S.A. McEwen, V.P. Gannon, H.Lior and C.L. Gyles. 1989. Isolation of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* from milk filters in South Western Ontario. Epidem. Inf. 102: 253-260
- 10.-Cowan S.T. 1974. Enterobacteriaceae In: Manual for identification of Medical Bacteria, 2a ed. Cambridge University, p.163.USA.

- 11.- Cross A., S.M. Opal, J.C. Sadoff, and P. Gemski. 1993. Choice of bacteria in Animal models of sepsis. *Infect. Immun.* 61: 2741-2747
- 12.- Daniel W.,W. 1982. *Biostatística: Base para el análisis de las Ciencias de la Salud.* Ed. Limusa Méx. p. 377-383
- 13.- Davidsohn I., S.Wells and T. Sanford. 1966. *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio* ed. Marin S.A. Barcelona España.p.410-462.
- 14.- Dora C.R., S.M. Scotland, H.R. Smith, G.A. Willshaw and B. Rowe. 1989. Properties of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. *Epidem. Inf.* 103: 83-95
- 15.- Doyle, M.P., and J. Shoani.1987. Isolation of *Escherichia coli* O157 from retail fresh meats and Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2394-2396.
- 16.- Edlich R., and G. Rodeheaver. 1987. Considerations in the choice of sutures for wound closure of the genitourinary tract. *The Journal of Urology.* 137: 373-378.
- 17.- Hwing W.A., P.R. Bavors. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3a ed. Burgess Publishing Co. Atlanta USA.
- 18.- Farmer, J.J., L.W.Riley, P.A.Blake, G.K.Morris y col.1983. Animal models to study *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients with haemorrhagic colitis. *The Lancet* 26:702-703.
- 19.- Finco, D.R. 1980. Kidney Function In: *Clinical Biochemistry of domestic animals.* Kaneko J.J. Ed., 3a ed. Academic Pres, USA. p. 358-402.
- 20.- Finlay, B.B., S. Falkow. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological Reviews.* 53: 210-230
- 21.- Francis, D.H., R.A. Moxley and C.Y. Andraos.1989. Edema disease- like Brain lesions in Gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. and Immun.* 57: 1339-1342
- 22.- Fratanico F., R.L. Buchanan, and P.E. Cooke. 1993. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 Sorbitol-Positive mutant. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4245-4252.
- 23.- Fujii, J., T. Kita, S. Yoshida, T. Takeda, H. Kobayashi, W. Tanaka, K. Ohsato and Y. Misuguchi. 1994. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with Verotoxin-Producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 62: 3447-3453.

- 24.-García C.L.A. 1990. Empleo del perro como modelo en el síndrome Urémico Hemolítico, Tesis Profesional FESC, UNAM. Méx.
- 25.-Georgi J.R.1992. Parasitología Animal. ed. Interamericana .1a ed. Méx.
- 26.- González E. and J. Blanco. 1989. Serotypes and antibiotic resistance of Verotoxigenic (VTEC) and Necrotizing (NTEC) *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea. FEMS Microbiology Letters. p.31-36
- 27.- González E.A. and J. Blanco. 1985 . Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and non- enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. FEMS Microbiol. Lett. 26:127-130
- 28.- Mitchins, A.D., F.Feng, W.D. Watkins, S.R. Rippey, and L.A. Chandler. 1992. *Escherichia coli* and the coliform bacteria, In FDA Bacteriological analytical Manual. 7th. Ed. Chapter 4,p 27-49, USA.
- 29.- Holland R.B. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clinical Microbiology Reviews. 3:345-375.
- 30.- Jubb, K.V.F., P.C. Kennedy, and N. Palmer.1985. Pathology of Domestic Animals. (vol. 2) 3th ed. Academic Press, Orlando, Florida. USA.
- 31.-Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.O. Fleming, G.S. Arbus, and E. Liot. 1985.The Association between Idiopathic Haemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. J.Infect.Dis. 151:775-782.
- 32.-Karmali, M.A., B.T. Steele,M. Petric, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic Uraemic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1:619-620.
- 33.-Kavi, J., I. Chant, M. Maris, and P.E. Rose.1987. Cytopathic effect of Verotoxin on Endothelial cells. Lancet 2:1035.
- 34.- Kitagawa, H., Y. Sasaki, A. Matsui, K.Ishihara, and T. Uchiyama.1987. Serum Haptoglobin Levels in canine Dirofilariasis." Jpn. J. Vet. Sci. 49:261-266.
- 35.- Kitagawa, H., Y. Sasaki, and K. Ishihara. 1986. Clinical Studies on Canine Dirofilarial Hemoglobinuria: Relationship between the presence of Heartworm Mass at the Tricuspid Valve Orifice and Plasma Hemoglobin Concentration. Jpn. J. Vet. Sci. 48:99-103.

- 36.- Kenowalchuk, J., J.I. Speirs and S. Stavric. 1977. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.
- 37.- Koster F., J. Levin, L. Walker, K.E.K. Tung, R.N. Gilman, M.M. Babanan, M.A. Majid, S. Islam, and R.C. Williams Jr. 1974. Hemolytic-Uremic Syndrome after Shigellosis. *The new England Journal of Medicine* 17:928-933.
- 38.- Law, D. 1988. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 26:1-10.
- 39.- Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389.
- 40.- Lindahl M. 1989. Binding of F41 and K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* to Glycoproteins from bovine and porcine calostrum. *Microbiol.Immunol.* 33: 373-379.
- 41.- Lupski, J.R. and R.D. Feigin. 1988. Molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 157: 1120-1123.
- 42.- MacLeod D.L., C.L. Gyles and B.P. Wilcock . 1991. Reproduction of Edema disease of Swine with Purified Shiga- like toxin-II variant. *Vet. Pathol.* 28:66-73.
- 43.- Mainil, J.G., C.J. Duchesnes, S.C. Whipp, L.R.M. Marques, A.D. O'Brien, T.A. Casey, and H.W. Moon. 1987. Shiga like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 48: 743-748.
- 44.- Mobassaleh, M., S.K. Gross, R.N. Mccluer, A. Donohue-Rolfe and G.F. Keusch. 1989. Quantitation of the rabbit intestinal Glycolipid receptor for Shiga toxin; Further evidence for the developmental regulation of Globotriaosylceramide in microvillus membranes. *Gastroenterology.* 97:384-391.
- 45.- Morton R.F., J.R., Nebel. 1985. *Biocestadística y Epidemiología.* 2a ed. Ed. Interamericana, Méx.
- 46.- Mühlendorfer, J., and J. Hacker. 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* 16: 171-181.
- 47.- Muñoz A.R., L. Velasquez-Jones. 1991. Fisiopatogénia del síndrome hemolítico urémico. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 48:901-906.

- 48.- Neil M.A., J. Agosti, and H. Rosen. 1985. Haemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult haemolytic Uremic Syndrome. Arch. Inter. Med. 145: 2215-2217.
- 49.- Noda, M.T., K. Yutsudo, M. Nakabayashi, T. Hirayama and Y. Takeda. 1987. Purification an some properties of Shiga-Like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. Microb. Pathog. 2:339-349.
- 50.- O'Brien, A.D., J.W. Newland, S.F. Miller, and R.E. Holmes. 1984. Shiga Like toxin converting Phages from *Escherichia coli* Strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226 :694-696.
- 51.- O'Brien, A.D., G.D. Laveck, M.R. Thompson, and S.B. Formal. 1983. Production of *Shigella dysenteriae* Type 1 Like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 146:763-789.
- 52.- O'Brig, T.G., P.J. Del Vecchio, M.A. Karmali, M. Petric, T.P. Moran, and T.K. Judge. 1987. Pathogenesis of haemolytic Uremic Syndrome. Lancet 2: 697.
- 53.- Okerman, L. 1987. Enteric Infections caused by non-Enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals: Occurrence and Pathogenicity Mechanisms. a Review. Veterinary Microbiology 14:33-46.
- 54.- Orskov, F., I. Orskov, and J.A. Villar. 1987. Cattle as reservoir of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 2:276.
- 55.- Osborne, W.R.A., H.J. Deeg, and S.J. Slichter. 1986. A canine model of induced purine nucleoside phosphorilase deficiency. Clin. Exp. Immuno. 66:166-172.
- 56.- Pai, C.H., J.K. Kelly, and G.L. Meyers. 1986. Experimental infection in infant rabbits with a Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 51:16-23.
- 57.- Palacios M.M.A. 1992. Deteccion de Citotoxina (SLTIIIV) en cepas de *Escherichia coli* de origen porcino, Tesis ENCB, IPN, México.
- 58.- Pérez, N., P. Lasarte, M. Bibiloni, C. Dejean, F. Spissirri . 1991. Linfocitos T, B, y Células NK en el síndrome urémico hemolítico. Medicina. 51:233-237.



- 59.- Pike W.J., A. Cockayne, C.A. Webster, R.C.B. Slack, A. P. Shelton, and J.P. Arbuthnott. 1991. Development and design of a novel in vivo chamber implant for the analysis of microbial virulence and assessment of antimicrobial therapy. *Microbial Pathogenesis*. 10: 443-450.
- 60.- Reid, G., A.W. Bruce, J.A. McGroarty, K.J. Cheng and J.W. Costerton. 1990. Is there a role for Lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infection? . *Clinical Microbiology Reviews*. 3:335-344.
- 61.- Rietra, J.G.M., G.A. Willshaw, H.R. Smith, A.M. Field, S.M. Scotland and B. Rowe. 1989. Comparison of Vero cytotoxin encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J. Gen. Microbiol.* 133:2307-2318.
- 62.- Robbins, S.L., and R.S. Cotran. 1984. *Patología Estructural y Funcional*. 2a ed. Interamericana México.
- 63.- Robins-Browne, R.M. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* 9:28-53.
- 64.- Ryeke J., E.A. Gonzales, J. Blanco, E. Oswald, M. Blanco and R. Beivin. 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli* . *J. of Clin. Microbiol.* 28:694-699.
- 65.- Scotland S.M., G.A. Willshaw, H.R. Smith and B.Rowe. 1990. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or Enterohemorrhagic classification. *J. of Infect. Dis.* 162:1069-1074.
- 66.- Sherman, P., R. Soni, and M. Karmali. 1988. Attaching and Effacing Adherence of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* to Rabbit Intestinal Epithelium in vivo" *Infect. Immun.* 56:756-761.
- 67.- Smith H.R., S.M. Scotland, G.A. Willshaw, C. Wray, I.M. McLaren, T. Cheasty and B. Rowe. 1988. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in *Escherichia coli* strains of animal origin. *J. Gen. Microbiol.* 134:829-834.
- 68.- Smith, H.W., P. Green, and E. Parsell. 1983. Vero Cell Toxins in *Escherichia coli* and Related Bacteria : Transfer by Phago and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs. *J.Gen. Microbiol.* 129:312-317.

- 69.- **Sodeman, W.A. and T.M. Sodeman.** 1988. *Fisiopatología Clínica.* 6a Ed. Interamericana. México. p.132-178.
- 70.- **Sonnenwirth, A.C. and L. Jarett.** 1983. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.* (Volumer. one) Eighth ed. Mosby Company USA.
- 71.- **Strockbine, M.A., L.R.M. Márquez, J.W. Newland, M.W. Smith, R. K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1986. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* 53: 135-140.
- 72.- **Tello V.G.** 1987. *Manual de Laboratorio Clínico Veterinario.* Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán UNAM.
- 73.- **Torres H.J.** 1992. Estudio sobre el uso del vinagre como preventivo de diarrea colibacilar en cerdos, ensayando su efectividad para controlar a *Escherichia coli* Enteropatógena (K88, K99, 987P). Tesis de licenciatura, FES Cuautitlan UNAM, Méx.
- 74.- **Tsipori, S., K.I. Wachsmuth, C. Chapman, R. Birner, J. Brittingham, C. Jackson, and J. Hogg.** 1986. The Pathogenesis of Hemorrhagic Colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Gnotobiotic Piglets. *J. Infect. Dis.* 154:712-716.
- 75.- **Tsipori, S., H. Karch, K.I. Wachsmuth, R.M. Robins-Browne, A.D. O'Brien, M. Lior, M.L. Cohen, J. Smithers, and M.M. Levine.** 1987. Role of a 60 Megadalton Plasmid and Shiga-Like Toxins in the Pathogenesis of Infection Caused by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Gnotobiotic Piglets. *Infect. Immun.* 53:3117-3125.
- 76.- **Tsipori, S., C.W. Chow, and H.R. Powell.** 1988. Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. *J. Clin. Pathol.* 41:1099-1103.
- 77.- "Unravelling HUS" .1987. *Lancet* 2:1437-1440.
- 78.- **Upadhyaya, K., K. Barwick, M. Fishaut, M. Kashgarian, and M.J. Siegl.** 1980. The importance of norenal involvement in hemolytic uremic syndrome . *Pediatrics* 65: 115-120
- 79.- **Wick, M.J., J.L. Madara, B.N. Fields, and S.T. Normark.** 1991. Molecular Cross Talk Between Epithelial Cells and Pathogenic Microorganisms. *Cell.* 67: 651-659

- 80.- Woodward M.J., P.J. Carroll and C. Wray . 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 31:251-261.
- 81.-Yano T., M. Garcia, D.S. Leite , J.B. De Camargo, and A.P.P. De Castro. 1988. Fimbria-like adhesive factor (EAF 44) from verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. *Res. Vet. Sci.* 45:418-419.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA