



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE
PROVOCADO POR ESCHERICHIA COLI (0157:H7)
VEROCITOTOXICA INOCULADA EN EL APÉNDICE
CECAL DEL CONEJO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MIRELLE ITZE PEREZ ORTIZ

ASESOR: M.C. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

" Efecto sobre la respuesta inmune provocado por

Escherichia coli (0157:H7) Verocitotóxica inoculada
en el apéndice cecal del conejo".

que presenta La pasante: Mirelle Itze Pérez Ortiz
con número de cuenta: 0256744-1 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de Octubre de 2001

PRESIDENTE MVZ. José Margarito Rojo López

VOCAL MVZ. Susana Elvira García Vázquez

SECRETARIO M. C. Guillermo Valdivia Anda

PRIMER SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Enrique Flores Gasca

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos:

- PAPIT IN220596
- PAPIME DO202098 Y CII 8
- CATEDRAS MULTIDICIPLINARIAS 5.2I

Agradezco el apoyo de los proyectos antes mencionados para la realización de este trabajo.

A mi familia: Marys, Humberto, Jorge, Rocío, Diego, Fernanda, Alfredo por ese apoyo incondicional y esa confianza en mi y en este trabajo. Ya que han sido mi mayor motivación.

A mi hermano Alejandro, donde quiera que estés.

A mis amigas y a todas las personas que creyeron en mi y que al igual que yo siempre fueron perseverantes con su disposición y cariño.

A Todos los profesores y compañeros de carrera

A mis sinodales

A la vida por darme la posibilidad de dar un paso más.

GRACIAS

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

1. - CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Escherichia coli</i>1
2. - CLASIFICACION DE LA <i>Escherichia coli</i>5
3. - RESPUESTA INMUNOLOGICA.....	.7
4. - TOXINAS.....	.11
5. - MODELOS ANIMALES.....	.13

OBJETIVO

I.- JUSTIFICACION	
II.- HIPOTESIS DEL TRABAJO	
III.- OBJETIVOS GENERALES	
IV.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16

MATERIAL Y METODO

METODO EXPERIMENTAL

1-METODO PREOPERATORIO.....	18
A.- AYUNO	
B.- PREPARACION Y DESINFECCION	
C.-LAVADO Y DESINFECCION	
D.-ANESTESIA	
2. - METODO OPERATORIO.....	19
3. - METODO POSTOPERATORIO.....	23
4. - DETERMINACION DE LA DOSIS	23
A.- CEPAS DE REFERENCIA	
B.-ORGANIZACIÓN DE GRUPOS Y DOSIFICACION	
5.- PREPARACION DEL INOCULO.....	24
6. - RETO DE LOS ANIMALES.....	25
A.- VACUNACION	
B.- MUESTREO	
C.-HISTOLOGIA	

RESULTADOS

MODELO ANIMAL.

1. - EVALUACION DE LA TECNICA QUIRURGICA.....	28
2. - DOSIFICACION.....	28
3. -EVALUACION DEL MODELO ANIMAL.....	30
A.- DATOS CLINICO Y DE PATOLOGIA	
B.- LESIONES A LA NECROPSIA	
4. - RESULTADOS DE LABORATORIO.....	33
A.- BIOMETRIA HEMATICA	
B.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS	
C.- DETERMINACION DE LA RESPUESTA INTRADERMICA	
5.- CORTES HISTOLOGICOS.....	37
6. - ANALISIS ESTADISTICOS.....	44

DISCUSION

MODELO ANIMAL.....	45
A.- TECNICA QUIRURGICA	
B.- ABSORCION DE LA TOXINA	
C.- EFECTOS DE HEMOSTASIS	
D.- EFECTOS DIGESTIVOS	
E.- EFECTOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE	
F.- PATOGENIA EN EL MODELO	

CONCLUSION.....	51
------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	53
--------------------------	-----------

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1.- DOSIFICACION DE <i>E. COLI</i>	24
CUADRO 2.- RESULTADOS DE LAS DISOLUCIONES DE <i>E. COLI</i>	29
CUADRO 3.- PRUEBA HEMATICA GRUPO K12 Y CONTROLES.....	33
CUADRO 4.- PRUEBA HEMATICA GRUPO 933.....	34
CUADRO 5.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA <i>Brucella abortus</i>	35
CUADRO 6.- DETERMINACION DE LA RESPUESTA INTRADERMICA.....	36
CUADRO 7.- ANALISIS HISTOLOGICOS EN CORTES DE APENDICE DEL GRUPO K12 Y CONTROLES.....	37
CUADRO 8. ANALISIS HISTOLOGICOS EN CORTES DE APENDICE DEL GRUPO 933.....	38
CUADRO 9. - ANALISIS HISTOLOGICOS EN CORTES DE PIEL DE CONEJOS INOCULADOS CON BCG.....	38
CUADRO 10 Y 11. - PRUEBAS ESTADISTICAS DE HIPOTESIS.....	44
CUADRO 12.- VALORES NORMALES EN CONEJOS.....	46
FIG 1.- ANATOMIA DEL APARATO DIGESTIVO EN CONEJOS.....	17
FIG 2.- REGION CECAL TRABAJADA EN LOS CONEJOS.....	19
FIG 3.- OCLUSION DE LA IRRIGACION.....	20
FIG 4.- SEPARACION DEL SEGMENTO.....	20
FIG 5.- INOCULACION DE LA CEPAS.....	21
FIG 6.- APENDICECTOMIA.....	22
FIG 7.- MICROFOTOGRAFIAS DE IMÁGENES DE CORTES DEL APENDICE CECAL K12.....	39
FIG 8.- MICROFOTOGRAFIAS DE IMÁGENES DE LAS CELULAS DEL APENDICE CECAL 933.....	40
FIG 9.- MICROFOTOGRAFIAS DE IMÁGENES DE LA PIEL.....	41
FIG 10.- MICROFOTOGRAFIAS DE IMÁGENES DE LAS CELULAS DE LA PIEL GRUPO K12.....	42
FIG 11.- RESPUESTA CELULAR EN LA PIEL GRUPO 933.....	43
TABLA 1.- ABREVIATURAS UTILIZADAS	

RESUMEN

La toxina Shiga toxin (STx) producida por *Escherichia coli*, se han asociado con daño a los linfocitos, esto se ha estudiado poco en un modelo en conejos para el Síndrome Uremico Hemolítico (SUH) donde se detectaron lesiones en el apéndice cecal de los conejos inoculados, principalmente en los linfocitos de la región.

El objetivo fue demostrar la disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral en los conejos inoculados experimentalmente con cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina STx.

Para el desarrollo del modelo se formaron cuatro grupos de conejo. El primer grupo se integró con cuatro conejos a los cuales se les inoculo la cepa 933 de *Escherichia coli* productora de STx, el segundo grupo fue inoculado con la cepa K12C600 no productora de STx, al tercer grupo se le practicó la cirugía de apendicectomía, y al último grupo se le practicó la técnica quirúrgica de laparatomía, cada uno de los grupos fue dividido en dos subgrupos, al primero de ellos se les inoculo la cepa de *Brucella abortus* muerta por formol el segundo subgrupo fue inoculado con una cepa de *Mycobacterium bovis* (BCG).

Los animales fueron muestreados de sangre de la siguiente forma:

A los 15 y 30 días postoperatorios se tomaron muestras de sangre, para la realización de pruebas de Biometría Hemática, determinación de anticuerpos anti *Brucella*, a los animales del segundo subgrupo se les practicó un muestreo a los 30 y 45 días postoperatorios para la pruebas de Biometría Hemática y de Intradermorreacción con la prueba de PPD. Los conejos fueron evaluados clínicamente y patológicamente.

El grupo inoculado con la cepa 933 demostró una disminución en la respuesta inmunológica humoral y celular estadísticamente.

Los resultados indican que las cepas de *Escherichia coli* productora de (STx), afectan en la respuesta inmune, probablemente por la destrucción de los linfocitos a nivel sistémico.

TABLA 1
ABREVIATURAS USADAS.

STx	“Shiga toxin”
SUH	Síndrome Uremico Hemolítico
BCG	Bacilus de Calmette y Guerin
PPD	Derivado Proteico Purificado
LPS	Lipopolisacáridos
VT1	Verotoxinas 1
VT2	Verotoxinas 2
VT	Verotoxinas
ECTV	<i>Escherichia coli</i> verocitotóxica
CH	Colitis Hemorrágica
PTT	Púrpura trombocitopénica
GET	Gastroenteritis transmisible del cerdo
LT	Toxinas termolábiles
ST	Toxina termoestable
CFN	Factor Citotóxico Necrotizante
SNC	Sistema Nervioso Central
ECEH	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ufc/ml	Unidad formadora de colonias
SSF	Solución Salina Fisiológica
HP	Cambios Histopatológicos
NP	Lesiones en la necropsia
SCPA	Sin cambios patológicos aparentes
BH	biometría Hemática
HE	Tinción hematoxilina eosina
QS	Química Sanginea.

INTRODUCCIÓN

1. - CARACTERÍSTICAS GENERALES

La *Escherichia coli* es un microorganismo que puede encontrarse en varios lugares y es abundante en la naturaleza. Es un bacilo Gram - negativo, la mayor parte de los *E.coli* patógenos son móviles por flagelos peritricos; sin embargo, las cepas de *E.coli* intero invasivo tienden a ser inmóviles, es Oxidasa-negativo, fermentativo de glucosa con la producción de gas. La bacteria es anaeróbica facultativa siendo la más numerosa del tracto gastrointestinal de los animales domésticos sanos. Algunas de las cepas de *Escherichia coli* son patógenas y la base de las serovariedades es una fórmula antigénica que reúne los diferentes antígenos O (somáticos), K (capsulares), y H (flagelares). Los antígenos O (somáticos) se basan en la antigenicidad de los lipopolisacáridos (LPS), los que tienen antígeno K son los polisacáridos capsulares y se consideran como extensiones superficiales de los antígenos O. Se puede diferenciar tres tipos de antígenos K según su estabilidad en varias pruebas físicas. En cada cepa sólo está presente un antígeno K (L, A o B). Los antígenos K no siempre está presente. Los antígenos H son proteínas flagelares. Si las cepas son inmóviles se designa NM. Las fimbrias son antígenos proteicos que se utilizan para la clasificación serológica de algunas serovariedades patógenas. Las fimbrias pueden actuar como factores de virulencia en enfermedades intestinales y extraintestinales, pudiendo ser en sus propiedades adhesivas de especie y específicas de órganos. Se han descrito dos tipos de fimbrias basados en su capacidad de hemoaglutinación.

- (1) Las fimbrias de tipo 1 se caracterizan porque la manosa inhibe la hemoaglutinación (HA). La HA es manosa-sensible. Se denomina antígenos F1.
- (2) Las fimbrias de tipo 2 se caracterizan por que la HA no es inhibida por manosa. La hemoaglutinación es manosa -resistente. Los antígenos fimbriales K88 y K99 se denominan F4 y F5 respectivamente.

La colibacilosis forma un grupo de enfermedades producidas por *Escherichia coli* en las que el lugar primario de infección es el intestino delgado, algunos tipos de *Escherichia coli* habitan la parte más distal del ileon y todo el colón. Es el habitante normal desde las primeras horas de vida afectando a todas las especies y a cualquier edad, aunque básicamente son enfermedades de animales jóvenes. Las cepas de *Escherichia coli* presentan una considerable variación con respecto a sus mecanismos patógenos.

- a. La producción de enterotoxinas está determinada por plásmidos.
- (1) Se han descrito dos tipos de enterotoxinas. Una toxina es una proteína, sensible al calor e inmunogénica; la otra toxina es de bajo peso molecular, termoestable y no inmunogénica. Estas enterotoxinas producen pérdida de fluidos y electrolitos hacia la luz intestinal.
- b. La bacteria penetra y se multiplica en el epitelio mucoso.
- c. La bacteria penetra en la mucosa intestinal y se multiplica en los tejidos subepiteliales.

La *Escherichia coli* produce una serie de toxinas como las enterotoxinas y las citotoxinas. La citotoxinas producida por *Escherichia coli* (ECVT) han sido también llamadas Verocitotóxicas por su efecto citotóxico sobre las células Vero (VT), toxina tipo Shigella (STx) o también como toxinas semejantes a Shiga por la relación antigénica que presenta con la toxina de *Shigella dysenteriae*(SLT), así también con, *Streptococcus pneumoniae* y *Campylobacter*. (35)

La *Escherichia coli* productora de VT y especialmente las enterohemorrágicas altamente virulentas del serotipo O157:H7, son importantes patógenos emergente que pueden provocar enfermedades en los seres humanos. (32)

Estas citotoxinas son las más estudiadas y se asocian a enfermedades como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual afecta fundamentalmente a los niños y se caracteriza por presentar una anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda, así como con la colitis hemorrágica (CH) siendo la presentación clínica más común y caracterizada por cuadros severos de dolor abdominal, púrpura trombocitopenia PTT, diarrea no sanguinolenta e incluso infecciones asintomáticas. 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, la cual se le asocia como un de las causantes más frecuentes de SUH en Norteamérica.

En el SUH las infecciones provocadas por ECVT 0157:H7 no siempre son agudas ya que en algunos casos son autolimitadas y no requieren de ningún tipo de tratamiento habiéndose detectado incluso infecciones totalmente asintomáticas (4).

Del mismo modo se han involucrado otras situaciones clínicas diferentes a las infecciosas como causa del SUH. Se ha implicado al bovino como reservorio del principal serotipo asociado al SUH, habiéndose aislado frecuentemente cepas citotóxicas a partir de la leche, carne fresca de bovino, cerdo, aves y carnero, y se ha demostrado que en algunas de las cepas aisladas de bovinos tiene los genes y producen la toxina VT1 y VT2. La asociación de la producción de VT con factores de adherencia no se ha dado en forma sostenible. (35)

La CH se diferencia de la clásica disentería en que generalmente cursa en ausencia de fiebre y pueden producirse graves complicaciones y aproximadamente el 10 % de los pacientes terminan desarrollando el SUH (4).

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 leve de enterocitos, infiltrado mononuclear y polimorfonuclear en la región y, a veces, con fusión de las vellosidades intestinales (5).

Dichas lesiones pueden ser confundidas con las producidas por algunos agentes virales tales como gastroenteritis transmisible del cerdo GET o el rotavirus en diversas especies. Este último agente al ser muy frecuente como causa de la infección en animales domésticos y por producir lesiones semejantes, puede causar interferencia en el análisis de la patogenia, por ello cuando se desarrolla un modelo animal, es por tanto importante describir algunas de las particularidades de la infección. (16)

Un problema adicional está representado por el tratamiento con antibiótico, en general no es efectivo e incluso algunas observaciones indican que puede agravar el estado del enfermo ya que podría potencializar la producción de Verotoxinas. (5)

Aunque la mayoría de los brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica han sido provocado por VT del serotipo 0157:H7, esto no quiere decir que la producción de Verotoxinas (VT1 y VT2) se restrinja a las cepas del citado serotipo. La diferencia en la presentación depende de la virulencia de las cepas, edad, estado inmunológico, dosis del inóculo, estrés ambiental, así como infecciones asociadas (35).

Pese a su evidencia, debe recordarse que el conejo es un animal mamífero y que en su anatomía y fisiología del aparato digestivo tiene las características de un roedor, a pesar de que la longitud del intestino y su volumen, principalmente el ciego, lo acercan a las características de los herbívoros. La digestión de los alimentos presenta en este animal unas características particulares y específicas, de tal modo que si anatómicamente determinadas regiones de su tubo digestivo han sido comparadas a las de los équinos, su fisiología parece recordar, aunque sólo sea de una manera remota, a la de los rumiantes. Después de la digestión el alimento pasa al intestino delgado. El duodeno presenta un desarrollo considerable, con una longitud total que a menudo sobrepasa los 50 cm en los individuos de gran talla. Está situado en la mitad derecha del abdomen, su diámetro bastante uniforme es de 1 cm. El yeyuno-íleon, ciego y colon forman una masa estrechamente unida, situada como si hubiera sufrido un movimiento de torsión sobre su eje, de derecha a izquierda. El ciego presenta un volumen considerable, con 20 cm de longitud y 2-3 cm de diámetro, terminando en un apéndice enorme. El colon principal o grueso, tiene de 1,5 cm de diámetro. Al colon terminal sigue el recto. El residuo no absorbido, a través del intestino delgado y grueso, llega al ciego, donde permanece unas 12 horas y sufre la acción de la flora bacteriana que en el mismo se desarrolla. El estudio de la flora digestiva del conejo durante las primeras semanas de vida revela que en los animales lactantes el contenido digestivo es a menudo estéril. Posteriormente se observa una colonización por *Escherichia coli*, *Clostridium welchii* y estreptococos. (26)

2. - CLASIFICACIÓN DE *Escherichia coli*:

Tradicionalmente se han dividido a las cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea en cinco grupos:

A.- Enterotoxigénica (ETEC). -que se caracteriza por producir enterotoxinas termolábiles (LT), termoestable (ST) o ambas, la información genética para ambas enterotoxinas se encuentra en el plásmido. 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 disentería, 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, en un grupo involucrado en brotes de diarrea en niños, hay estudios que sugieren que las adherencias a la mucosa intestinal pueden ser los mecanismos que causen daño a los tejidos, este grupo se ha subdividido de acuerdo al patrón de adherencias que presentan en cultivos celulares.

D.- Enterohemorrágica (ECEH): en la cuales la producción de citotoxinas (con capacidad de destruir células eucarióticas) es el mecanismo de patogenicidad, además que no producen enterotoxinas ST ni LT y no son invasoras , causan cuadros como colitis hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el serotipo 0157:H7 fue el primero involucrado, pero actualmente se han relacionado a los serotipos 0111:H-y 026:H11.

E.- Enteroadherente (EAEC). - se ha identificado por su capacidad única de adherencia a células Hep-2, no elaboran enterotoxinas, ni 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 problema gastrointestinal se clasifican como Enteropatógena, independientemente del mecanismo de patogenicidad que presenten. (35)

3. - RESPUESTA INMUNOLOGICA:

La producción de citotoxinas también se ha relacionado con el efecto sobre la respuesta inmune humoral y celular. La inmunidad es un conjunto de mecanismos de defensa que le permiten a un organismo protegerse de los antígenos que se encuentran en su medio ambiente como virus, bacterias y parásitos. El soporte de la inmunidad son los linfocitos y los órganos linfoides responsables de la producción de éstos tales como: timo, bolsa de Fabricio, médula ósea, el sistema inmune esta integrado también por órganos linfoides secundarios como bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos.

La inmunidad se caracteriza por cuatro factores:

1. - Puede generar inmunidad inducida por medio de la vacunación y al estar en contacto con microorganismos patógenos.
2. - la inmunidad es específica
3. - la inmunidad tiene memoria que esta dada por los linfocitos
4. - la inmunidad puede ser transferida.

La inmunidad puede desarrollarse de dos tipos, inmunidad celular e inmunidad humoral, los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular, en donde participan los mecanismos de rechazo y su función es el control y la destrucción de células alteradas. La inmunidad humoral esta determinada por la producción de linfocitos B, y es la responsable de la producción de anticuerpos, es importante hacer notar que ambas están muy relacionadas y casi siempre se estimulan los dos tipos de células B y T. Ambas son miembros de un grupo de células denominado linfocitos, las cuales poseen una proteína denominada linfocina, que permite a los linfocitos reconocer y unirse a las áreas linfáticas locales o a los nódulos linfáticos. Microscópicamente las células B y T se observan idénticas, debido a que provienen de un precursor común y se requieren de pruebas específicas para diferenciarlas. No obstante estas células tienen funciones muy diversas dentro del sistema inmune, como la respuesta inmune específica que esta determinada por el lugar donde las células B y T ejercen su función primaria, ya sea en el ámbito local (mucosa o secretora) o en el ámbito circulatorio (sistémica).

Los mecanismos de defensas son los factores humorales en donde se encuentran las enzimas que tienen un efecto bactericida: la lisozima, la properdina y el complemento. El complemento es un complejo sistema de enzimas ligadas y proteínas aglutinantes que se activan por diversos factores, en particular con la interacción antígeno - anticuerpo y produce una gran variedad de reacciones biológicas, como la lisis de la membrana celular y la opsonización. La formación de los complejos inmunitarios puede conducir a diferentes reacciones: la aglutinación y la degranulación plasmática, la degradación de células cebadas y basófilos, la quimiotaxis y fagocitosis por neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, y la citotoxicidad mediada por células. (11).

Con relación al efecto que tiene las citotoxinas y Verotoxinas de la *Escherichia coli* sobre la respuesta inmune, se han realizado experimentos para estudiar los mecanismos de patogenicidad así como para evaluar la respuesta inmune estos se han desarrollado en animales del laboratorio específicamente en conejos inoculados en el apéndice cecal por medio de una intervención quirúrgica con cepas citotóxicas y Verocitotóxicas de *Escherichia coli* (K12,933).(35)

A.- Inmunidad mediada por células:

La inmunidad mediada por células está involucrada en el control de parásitos, virus, bacterias y células tumorales. Como se mencionó antes está regulada por los linfocitos T, y hay básicamente dos tipos de células implicadas en esta protección: las células T cooperadoras (CD4+) y las T asesinas (células T citotóxicas, CD8+ citotóxicas). Los linfocitos T cooperadores están divididos en Th1 y Th2 y se encargan de activar los linfocitos T citotóxicos y/o células B. Y también se encuentran células de memoria para los linfocitos. Las células T cooperadoras actúan como mediadores reguladores de todo el sistema inmune, incluyendo la producción de anticuerpos. Las células Th1 actúan primariamente como células cooperadoras para la respuesta de la inmunidad mediada por células, por lo tanto promueven la resistencia hacia organismos intracelulares. Las células Th2 estimulan la proliferación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas, pero no tiene efecto sobre la inmunidad mediada por células.

Una gran proporción de células CD4+ en bovinos y humanos son similares a un tercer grupo de células T denominado Th0, estas células secretan diversas citocinas que son representativas para los grupos Th1 y Th2 y al parecer son precursores de las células o bien, están en transición entre las dos poblaciones. Esta función la llevan a cabo mediante la liberación de sustancias llamadas citocinas, las cuales actúan como mensajeras en otras células del sistema inmune, atrayéndolas y haciéndolas más eficientes. Para que las células CD4+ se activen se debe presentar el antígeno; es decir, estas células no tienen la habilidad de responder a antígenos desnudos o libres. Para tal efecto intervienen las células fagocíticas mononucleares conocidas como células presentadoras de antígeno (CPA), las cuales pueden presentar el antígeno a los linfocitos T cooperadores. En cuanto el antígeno es fagocitado una pequeña porción del mismo es separada y transportada a la superficie de la célula. Este es movilizado a la superficie por medio del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II), el cual es el encargado de activar las células B. Una vez que se activan las células CD4+ llevan la información a los linfocitos B y liberan citocinas que intervienen también en la activación de las células B. Los linfocitos CD8+ citotóxicos son activados por CMH I.(11)

B.- Inmunidad mediada por anticuerpos:

La inmunidad mediada por anticuerpos o humoral del sistema inmune tiene que ver con la producción y secreción de anticuerpos (inmunoglobulinas o gamaglobulinas), las cuales se llevan a cabo por las células B: Cuando las células B son estimuladas por antígenos y leucocinas de las células T cooperadoras pueden convertirse en células de memoria o células plasmáticas. Las células plasmáticas son las encargadas de producir y secretar los anticuerpos. En la circulación sanguínea existen cuatro tipos básicos de anticuerpos: inmunoglobulinas G (IgG), M (IgM), A (IgA) e E (IgE). La IgG es el anticuerpo predominante en sangre y puede salir fácilmente hacia áreas o tejidos infectados. Se pueden localizar en bazo, en los nódulos linfáticos, en la médula ósea y en las secreciones. La IgM es el anticuerpo más grande y el primero en ser producido en la respuesta inmune. Su gran tamaño le dificulta salir a la circulación sanguínea. Tiene importancia en la activación del complemento y se encuentra en el bazo, en los nódulos linfáticos y en la médula ósea.(11)

C.- Citocinas:

Son proteínas o glucoproteínas, de bajo peso molecular, sintetizadas por diversos tipos celulares, que actúan como mensajeros químicos u hormonales, regulando la respuesta inflamatoria e inmune tanto inespecífica como específica. Dependiendo del tipo de células que las producen han recibido distintos nombres, como las linfocinas producidas por linfocitos; pero en general se maneja sólo en nombre de citocinas, ya que diversas células pueden secretar la misma sustancia.

Su actividad puede ser controlada de diferentes formas: mediante la regulación de la expresión de receptores, por antagonistas del receptor, unión específica a proteínas u otras citocinas que ejercer efectos opuestos. Debido a su función que desempeña es funcionalmente su presencia para el adecuado desarrollo de la respuesta inmune. Los macrófagos pueden sintetizar interleucinas 1 (IL-1), IL-6, IL-12. Las células TH1 pueden producir IL-2. Las células Th2 son capaces de sintetizar IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17. Esta citocinas pueden ser producidas por otras células, por ejemplo las IL-1 pueden ser sintetizadas por las células de Langerhans, células T, B, NK, endotelios vasculares, fibroblastos y queratinocitos. La IL-1 es un coestimulador de las células Th2, junto con el antígeno y estimula la respuesta de la fase aguda. La IL-2 activa las células T, B, NK y los macrófagos. La IL-4 favorece el crecimiento y diferenciación de las células B. La IL-5 estimula el crecimiento de las células B y ayuda al crecimiento y la activación de los eosinófilos. La IL-6 promueve la diferenciación de las células B y la respuesta de la fase aguda. La IL-10 inhibe la función de las células Th1 y suprime la función de los macrófagos. La IL-12 es un coestimulador de las células Th1, junto con el antígeno. La IL-13 estimula el crecimiento de las células B y suprime la función de los macrófagos.(11)

4. - TOXINAS

Escherichia coli produce una serie de toxinas bien caracterizadas como las enterotoxinas, las citotoxinas y también otro tipo llamadas Factor Citotóxico Necrotizante (CFN 1 y CFN 2), el cual causa necrosis en la piel del conejo y células multinucleadas, con redondeamiento, en cultivos de tejidos (células HeLa, CHO o Vero) las cepas productoras de este CNF se han aislado en niños y bovinos enfermos. La producción de enterotoxinas esta determinada por los plásmidos, y se han descrito dos tipos de ellas:

1. - sensible al calor e inmunogénica (LT)
2. - termoestable y no inmunogénica (ST)

Las citotoxinas producidas por *Escherichia coli* han sido llamadas Verotoxinas por su efecto citotóxico sobre la células Vero o también por su semejanza antigénica con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, de tal forma que es común la denominación de VT o SLT (Shiga Like Toxin). (29) Estas toxinas VT son codificadas en el genoma bacteriano por la lisogenización con bacteriófagos, de los cuales se han situado principalmente dos tipos que son diferentes tanto morfológicamente como genotípicamente al medir dos toxinas con diferencias antigénicas, estos dos fagos, al igual que sus toxinas, se han llamado VT1 (SLT I) y VT2 (SLT II). Los fagos citados anteriormente han sido extraídos de una cepa del serotipo 0157:H7 aislada de un brote de enfermedad en el humano y nombrada como 933 y ha sido introducida en una cepa de *Escherichia coli* del laboratorio llamada K12 C600 con lo cual se obtuvieron las lisogenizadas 933J y 933W productoras de VT1 y VT2 respectivamente. La citotoxina VT2v esta codificada en el ámbito de cromosoma (35).

En la actualidad se asocia a todas las diferentes toxinas VT descritas como una familia con relaciones antigénicas entre ellas. De tal forma se han descrito los siguientes tipos de toxinas: VT1, VT2, VT2v, VT2e, VTE, VT2ha y VT2hb. Las ECVT de los serotipos 026:H11,0123; H12 y 0111:H- son las que adquieren mayor importancia después del serotipo 0157:H7. Estas toxinas inhiben la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. Las ECVT, además de producir Verotoxinas, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno. Así, los ECVT se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias plasmicas codificadas en el gen CDV419 y posteriormente barren el microvilli intestinal por la acción de una proteína presente en su membrana externa que esta controlada por un gen cromosómico eae y reciben el nombre de intiminas. (28)

Aunque las ECVT se unen íntimamente a los enterocitos, no llegan a invadirlos intracelularmente. El gen eae se ha asociado claramente con la virulencia, detectándose en la mayoría de las cepas causantes del SUH. (2)

En cuanto a la patogenesis las Verotoxinas son liberadas en el intestino, pasan a la sangre y causan daños en el epitelio vascular, inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el SNC, en el tubo digestivo y en los riñones. Estos eventos pueden conducir a un daño intestinal, renal, cerebral o multisistémico. (5,20).

La inoculación con *Escherichia coli* productora de citotoxinas, presenta una respuesta principalmente en ciego y colon distal, en forma de erosiones y ulceraciones en el sitio de unión, los enterocitos se presentan cuboides, edema extenso, hemorragia, así como una zona de cicatrización y la formación de adherencias. (35)

5. - MODELOS ANIMALES:

Se han realizado experimentos para estudiar los mecanismos de patogenidad, así como la respuesta inmune de las citotoxinas y Verotoxinas producidas por la bacteria de *Escherichia coli*. Cuando fue empleado el conejo como modelo para los experimentos descritos por Sherman en 1988, en los cuales se inocularon diferentes serotipos de *Escherichia coli* productoras de VT por vía intragástrica, en algunos casos se presentó diarrea no hemorrágica a los siete días postinoculación, los resultados no mostraron evidencia relacionada con enfermedades como el SUH. En la utilización del conejo como modelo en el cual se administró VT vía parenteral, se observó el daño a células epiteliales y efectos en la respuesta inmunológica celular y humoral, así como la selectividad de los tejidos involucrados, con ello se fundamenta la hipótesis de que estos daños y respuesta inmune se produce por acción directa de la toxina. Además las células endoteliales sintetizan el factor de coagulación VIII, cuya anomalía parece conducir la trombocitopenia. En un modelo en caninos desarrollado previamente, se administraron cultivos de cepas citotóxicas en un segmento aislado del intestino delgado y se mantuvo durante 14 días, los animales desarrollaron diarrea, en algunos casos hemorragias, coagulación intravascular y fenómeno de Shawrz, baja de la haptoglobina libre, hemosiderosis, cilindriuria, necrosis hepática y lesiones 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 0157:H7 inoculada en cerdos gnotobiontes produjeron una diarrea secretora, observando que las bacterias colonizan el colon y el ciego en forma difusa con "attaching and effacement" y demostrando que los enterocitos se afectan en grados diferentes, así como el desprendimiento de la mucosa; además el mesenterio se encontraba con edema marcado e infiltración supurativa en la mucosa y submucosa. El mismo modelo presenta cepas ECEH penetrando a la mucosa y la lámina propia del intestino. Al administrar intragástricamente extracto del sobrenadante de cepa 0157:H7, en cerdos se produjo diarrea de tipo secretor y se observa cambios histológicos como apoptosis. Estos mismos cambios se observaron en asas ligadas del conejo inoculado con el serotipos 0157:H7. Contradictoriamente, cuando se inocularon cepas VT1 y VT2 (obtenidas por mutación Espontanea) o una cepa VT(-) silvestre, en cerdos gnotobiontes se produjeron las mismas lesiones que las paternas por lo que la VT1 y VT2 aparentemente no son esenciales para desarrollar diarreas "attaching and effacement" lo que hizo poco claro el papel de la toxina en enfermedades como SUH (21).

Algunos autores concluyeron que en el cerdo no fue un modelo útil para reproducir las lesiones al utilizarlo con cepas 0157:H7 (36).

Se han utilizado modelos en ratones que permiten medir el efecto de la Verotoxinas de *Escherichia coli*, productora de VT2, en el cual se midió la distribución de linfocitos inmunes después de la inoculación intravenosa de VT2 (50mg/Kg dosis letal) a los ratones de 4 semanas de edad, en los cuales se presentó una disminución de las células T después de 24 horas, así como de esplecnocitos a las 45 horas posteriores a la administración. En el timo también se observó una disminución en sus células. Estos resultados sugieren que la infección de ECVT puede eliminar células T y B, disminuyendo la producción de anticuerpos afectando así su supervivencia. (17)

Se han realizado métodos de cultivo para obtener toxinas de Shiga-like 1 y Shiga-like 2 y medir así la afinidad que tienen con las ECVT. En las soluciones de los cultivos se han utilizado análogos sintéticos de la toxina teniendo un rendimiento de 2 a 3 mg de la toxina de Shiga-like por litro de cultivo. (27,38)

OBJETIVO

I.- JUSTIFICACIÓN:

En la actualidad se cuenta con un modelo animal en conejos para estudiar el SUH en el se presentan las lesiones entéricas y sistémicas, así como las lesiones histológicas, parecidas al SUH en humanos, sin embargo en este modelo no se ha evaluado la relación que tienen las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 con respuesta humoral y celular.

II.- HIPÓTESIS DEL TRABAJO:

Es posible desarrollar un modelo animal en conejos inoculados con *Escherichia coli* (VT) que permita evaluar el efecto sobre la respuesta inmunológica. Demostrando que la inoculación en conejos con *Escherichia coli* por medio de una técnica quirúrgica en el apéndice cecal previamente descrita tiene un efecto sobre la respuesta inmune.

III.- OBJETIVO GENERAL:

Establecer y evaluar un modelo animal por medio del cual pueda ser observado el efecto de *Escherichia coli* (EHEC) sobre la respuesta humoral y celular.

VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. - Desarrollar y evaluar un modelo animal en conejos para el estudio del efecto crónico y subletal del SUH con las cepas citotóxicas de *Escherichia coli* 0157:H7.
2. - Analizar las lesiones macro y microscópicas del apéndice cecal por efecto de la cepa citotóxicas (VT) 933 y K12 de *Escherichia coli*
3. - Evaluar el efecto sobre la inmunidad humoral y celular por la inoculación de la cepa de *Escherichia coli* 0157:H7 en el apéndice cecal del conejo.
4. - Analizar las lesiones macro y microscópicas en la piel de los conejos como respuesta a la prueba intradérmica.
5. - Analizar la relación entre las lesiones histológicas, celulares y de la respuesta inmune de los conejos inoculados.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la elaboración de esta tesis se utilizaron 16 conejos de la raza Nueva Zelanda con un peso de 1.5 a 2.0 Kg. Estos fueron obtenidos de la granja de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan FES-C. En la medida que los animales fueron adquiridos, estos permanecieron en jaulas especiales por cinco días previos a la cirugía, para su observación y evaluación. Los conejos fueron alimentados con preparados de tipo comercial (Purina) y con libre acceso de agua. Antes de que los animales formaran parte de los grupos experimentales y se les practicara cualquiera de la cirugía, fueron puestos previamente en ayuno de 24 horas.

METODO EXPERIMENTAL

El modelo experimental consistió básicamente en la inoculación de una cepa citotóxica en el apéndice cecal de los animales mediante una técnica quirúrgica de acuerdo a lo descrito por Valdivia A.G. 1995. (36)

Es importante mencionar que el modelo fue desarrollado en los conejos por las particularidades que presenta en la anatomía y fisiología del aparato digestivo, especialmente en el apéndice cecal, como se muestra en la siguiente figura.



ANATOMÍA DEL APARATO DIGESTIVO

DEL CONEJO Fig.1

1. -METODO PREOPERATORIO

1. - *Ayuno de los animales:* 24 horas

2. - *Preparación y desinfección de la área quirúrgica:*

Consistió en la desinfección del quirófano utilizando una disolución de Hipoclorito, las personas que participaron en la cirugía, utilizaron ropa esterilizada, para lo cual se utilizó el método de calor húmedo y el lavado de manos con jabón quirúrgico (Dermoclin). El material e instrumental de cirugía fue esterilizado por medio de calor húmedo, durante la misma estos fueron desinfectados con una solución de Cloruro de Benzalconio (Surgiqrit) diluyendo la cantidad de 10 ml en 1 litro de agua.

3. - *Lavado y desinfección de la zona quirúrgica en el animal:*

Una vez localizada el área de la cirugía, esta fue lavada utilizando jabón quirúrgico (Dermoclin) y se rasuró la zona.

4. - *Anestesia:*

Los animales fueron inducidos a la anestesia utilizando una combinación de Propionilpromazina (Combelen) a una dosis de 0.3 ml y ketamina (Ketamina) a una dosis de 1.2 ml a 1.5 ml, estas dosis se modificaban con relación al peso del animal, obteniendo una dosis total de 1.5 a 1.8 ml, la vía de administración empleada fue intramuscular profunda.

5. - *Área quirúrgica:*

Los conejos fueron colocados decúbito dorsal en la mesa de cirugía, sujetos por las extremidades, en el área de cirugía se empleó una técnica aséptica utilizando torundas impregnadas con una solución de Tintura del Benzal; esta fue delimitada con campos estériles.

2. -METODO OPERATORIO:

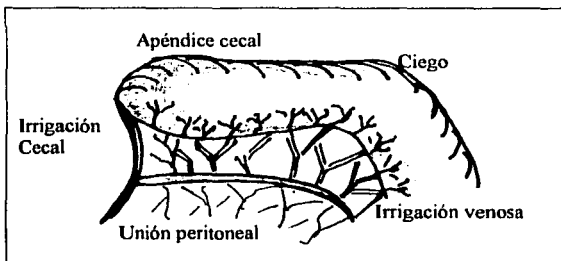
1. - Localización de área:

Se localizó el área quirúrgica tomando como referencia la cicatriz umbilical y considerando unos cm hacia abajo de la punta del esternón.

2. - Desarrollo de la cirugía:

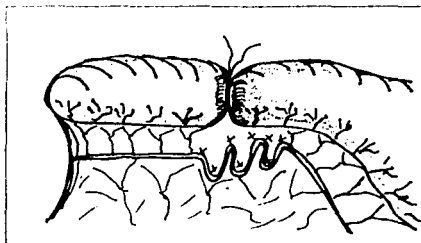
A) animales a los que se les inoculo las cepas K12 y 933:

La cirugía inició realizando una incisión por línea media ventral de aproximadamente 4 cm de longitud y en dirección posterior; enseguida se realizaron los cortes por estratos (piel, tejido subcutáneo, músculo y peritoneo) llegando de esta forma hasta la cavidad abdominal. Una vez en esta se localizó el apéndice cecal del animal en el cuadrante derecho posterior del abdomen, el cual se diferencia del resto de las asas intestinales ya que este es un saco ciego. Una vez identificado fue exteriorizado, se le protegió para ser aislado del resto del tracto intestinal y de la cavidad; para prevenir la contaminación se emplearon compresas abdominales humedecidas con solución salina fisiológica (gasas), adicionalmente el segmento aislado fue irrigado en forma intermitente con solución salina fisiológica estéril, el apéndice cecal fue tomado con los dedos pulgar e índice de una mano, en la manipulación también se utilizaron las compresas para que fuera esta menos traumática. Una vez aislado el segmento se identificó la irrigación anatómicamente.

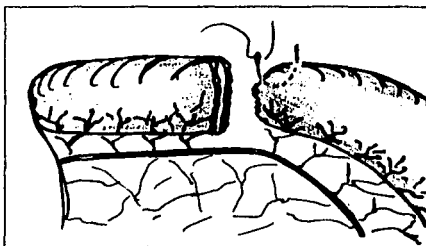


REGION CECAL TRABAJADA EN LOS CONEJOS Fig.2

Una vez seleccionada el área en el segmento para la inoculación, se consideró de 2 a 3 cm aproximadamente de la punta del apéndice hacia atrás, primero se identificó en el sitio las ramas de las arterias, considerando una región de 1 cm, estas fueron ligadas doblemente y seccionadas entre las ligaduras, se hizo un amarre con seda antes del corte como se muestra en el siguiente figura 3. Una vez que fue ocluida la irrigación en la zona determinada, por delante del amarre de seda se corto transversalmente el segmento, lo cual permitió que fuera separado el apéndice cecal en dos secciones. El amarre de seda negra, permaneció en la parte posterior del saco ciego y se inició a cerrar utilizando una técnica de jareta primero Conell y terminando con Lemberth, el material de la sutura utilizada fue reabsorbible (Vicryl 2-0), como se muestra en la figura 4. Por otro lado el segmento anterior fue aislado y protegido con compresas húmedas antes de vaciar su contenido para evitar una posible contaminación en cavidad, durante el cierre del segmento posterior.

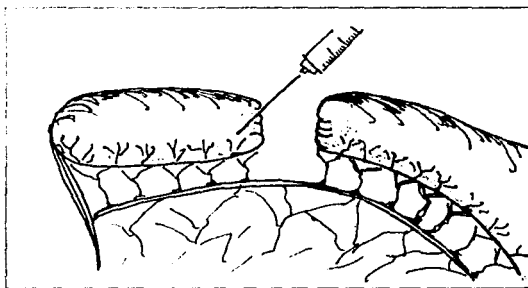


OCLUSION DE LA IRRIGACION fig. 3



SEPARACION DEL SEGMENTO Fig. 4

En el segmento anterior del apéndice se continuo primero con el vaciado de su contenido y posteriormente el lavado en su interior con solución salina estéril (SSF) con la ayuda de una sonda conectada a una jeringa de 20 ml para introducir la solución y con un frasco estéril para recolectar el contenido de los lavados, una vez preparado el segmento este fue cerrado, primero con un amarre de seda negra para reforzar, el siguiente paso fue inocular las cepas bacterianas experimentales o de control (933 o K12), por medio de una jeringa estéril con una dosis total de 1 ml para, terminar de cerrar el segmento se utilizó la técnica de jarreta, utilizando el mismo tipo de material reabsorbible . Como se muestra en el siguiente figura.

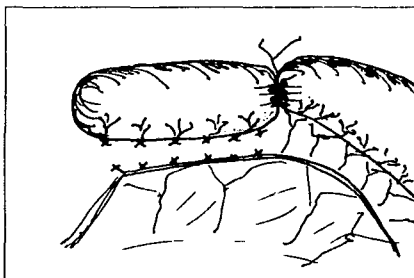


INOCULACION DE CEPAS Fig. .5

Al terminar de inocular la cepa correspondiente , y terminar el cerrado de los segmentos a este momento se le considero como un tiempo séptico, por lo cual se hacia el cambio de guantes, para evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez inoculado el segmento del apéndice cecal, este fue regresado a la cavidad abdominal, regresando el omento al sitio de incisión. El abdomen fue cerrado en forma rutinaria, empleando en el peritoneo y músculo, la técnica de surgete continuo, mientras que para la piel y el tejido subcutáneo fue empleada la técnica de tipo subcuticular, para lo cual fue utilizado un material de tipo reabsorbible .

B) Animales que se les practicó la técnica de apendicectomía:

La cirugía inició como en lo descrito anteriormente hasta la identificación del apéndice cecal, este se exteriorizó, se identificó su anatomía e irrigación. Una vez seleccionada la región a extraer las arterias mesentericas fueron ocluidas por medio de dos ligaduras, cada una de ellas fue ocluida utilizando una sutura de tipo reabsorbible y se corto entre estas, posteriormente en el extremo anterior se hizo un cierre inicial con la seda negra para reforzar y un corte transversal delante del mismo, desprendiendo así el apéndice cecal una vez obtenido el muñón con la seda fue cerrado con una la técnica de tipo "jareta", posteriormente fue colocado en la cavidad y cerrada como fue descrita anteriormente.



APENDICECTOMIA FIG. 6

C) Animales que se les practicó Laparatomía:

La llegada hasta la cavidad fue como en los casos anteriores, una vez que fue localizado el apéndice cecal, este fue exteriorizado y colocado nuevamente en la cavidad. El abdomen se cerro en forma rutinaria.

3. -METODO POSTOPERATORIO:

Una vez terminada la cirugía a los animales de todos los grupos se le aplicó en forma local un cicatrizante Negasunt (Bayer), se dio un período de recuperación de cinco días para continuar con la parte experimental del trabajo.

Los animales fueron puestos en sus jaulas y se observó su recuperación.

4. -DETERMINACION DE LA DOSIS SUFICIENTE PARA TENER UN MODELO DE INFECCION CRONICA:

1. - Cepas de referencia:

Se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

- a) Cepa K 12 (apatógena)
- b) Cepa 933 (productoras de VT1 y VT2) del serotipo 0157:H7.

2. - Organización de grupos y dosificación:

-El primer grupo estuvo formado por 4 animales a los que solo se les practicó la técnica quirúrgica de laparatomía exploratoria y este fue el primer grupo control.

- El segundo grupo se formó por 4 animales los cuales fueron sometidos a la técnica quirúrgica del modelo experimental y se les inoculó la cepa de *Escherichia coli* K 12 (apatógena) en el segmento del apéndice cecal en una dosis de 1×10^8 ufc/ml.

- El tercer grupo estuvo formado por 4 animales a los que se les practicó la técnica quirúrgica del modelo experimental y se les inoculó la cepa de *Escherichia coli* 933 (productora de VT1 y VT2) en el segmento del apéndice cecal, la dosis usada fue 1×10^2 ufc/ml.

- El cuarto grupo estaba formado por 4 animales a los que se les practicó la Técnica quirúrgica de apendicectomía conformando el segundo grupo control.

5. - PREPARACION DEL INOCULO:

Dosificación:

Para la obtención de la dosis que fue utilizada en los grupos inoculados con las cepas K12 (apatógena) y los inoculados con la cepa 933 (productoras de VT1 y VT2), se estandarizo mediante la utilización de dosis iniciales, las cuales les provocaban la muerte a los animales en un lapso muy corto de tiempo de 24 a 48 horas, de esta forma se llevo a establecer la dosis utilizada que permita la sobrevivencia de los animales por lo menos de 45 días para así obtener los resultados. La estandarización de la dosis se muestra en el cuadro No 1.

CUADRO 1
Dosificació E.coli 933
En el apéndice cecal

CEPA	DILUCIÓN	DOSIS
933	SIN	1 ml
933	0.5 en 1 ml	0.5 ml
933	0.5 en 3 ml	0.5 ml
933	0.2 en 3 ml	0.2 ml

6. -RETO DE LOS ANIMALES:

Los animales fueron estimulados inmunologicamente por medio de la utilización de vacunas *Brucella abortus* y BCG o triple infantil. Para la obtención de los resultados y así poder valorar la respuesta inmune y el manejo de estas vacunas fue de la siguiente manera:

a) Vacunación:

Cinco días posteriores a la cirugía se seleccionaron aleatoriamente dos animales de los cuatro grupos, a los cuales se les aplicó una dosis de 0.5 ml de la vacuna de *Brucella abortus* RB51, de laboratorio Litton de México, la cual fue diluida con S.S.F., hasta completar una dosis de 1 ml. La vía de administración utilizada fue intramuscular profunda.

A los dos animales restantes de cada grupo se les aplicó la vacuna de BCG o triple infantil (SSA clave 3801), la cual fue obtenida en el centro de Salud de Cuautitlan México, esta vacuna fue diluida con S.S.F. y colocada en viales de 5 dosis. Solo se utilizó $\frac{1}{4}$ de la dosis recomendada en niños y fue administrada en los animales por vía intramuscular profunda en una dosis total 1ml.

b) Muestreo:

Los animales fueron muestreados de la siguiente manera:

1. - Los animales vacunados con *Brucella abortus*, al cumplir los 15 días posteriores a la vacunación, se les tomó una muestra de sangre por vía intracardiaca, la cual fue trabajada en el laboratorio para obtener suero y de esta forma realizar la prueba de aglutinación en placa, urea y creatinina, con el resto de la muestra se realizó la prueba de y Biometría Hemática , posteriormente a los 30 días se tomo nuevamente la muestra con el mismo fin, una vez cumplido este tiempo los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de los tejidos como apéndice cecal, intestino delgado, bazo y riñón para ser trabajadas posteriormente en el laboratorio para su análisis histológico.

2. -Los animales vacunados con BCG o triple infantil, una vez que cumplieron 30 días se les tomaron muestras de sangre por vía intracardiaca para la evaluación posterior en el laboratorio con pruebas como aglutinación en placa, Serología, Biometría Hemática, posteriormente al cumplir los 45 días de la aplicación de la vacuna se les tomó una segunda muestra de sangre utilizando la vía antes mencionada, para la realización de las pruebas de laboratorio correspondientes. En este caso al cumplir los 45 días los animales no fueron sacrificados, antes se les realizó la prueba de Intradermorreacción, para esta se utilizó el reactivo para la prueba de tuberculina PPD-Bovina.

El área en donde se realizó la prueba fue en la parte dorsal del animal, la cual fue previamente seleccionada, lavada y rasurada, una vez identificada el área, esta fue marcada con un círculo, enseguida se aplicó en el centro de este la dosis de 0.1 ml de la tuberculina de forma intradérmica utilizando una jeringa de insulina. Los animales fueron evaluados a la 24,48,72 y 96 horas; con el fin de observar la presentación de reacciones tales como induración./ eritema. La medida de estas reacciones fueron tomada utilizando un vernier.

Posteriormente a la toma de estas lecturas los animales fueron sacrificados y se obtuvieron las muestras de tejido como apéndice cecal (según el grupo del animal), intestino delgado, bazo y piel para un análisis histológico posterior.

b) histología:

Una vez sacrificados los animales, se les tomó muestras a los siguientes tejidos: riñón, intestino delgado, bazo, apéndice (según el grupo) y piel (animales vacunados con BCG), estas fueron colocadas en recipientes estériles en una solución de formalina amortiguada como fijador, posteriormente se realizaron los cortes en zonas específicas de cada muestra y colocadas en las cajas perfectamente identificadas, para así continuar con la inclusión en parafina. una vez preparadas las laminillas se tiñeron con hematoxilina - eosina para su observación al microscopio.

C) Serología:

Para la realización de esta prueba de determinación ant-Brucella, se empleo el método de Rivanol, en donde las globulinas son precipitadas en foema selectiva quedando en suspensión solo las IgG. Para dicha prueba se utilizó el reactivo Antígeno de Brucella (4%), y la solución de Rivanol (1%), la técnica se realizó se la siguiente manera. En un tubo de ensayo se agrego 0.4 ml de suero y 0.4 ml de reactivo de Rivanol (1%), se dejo reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo a 2,000 rpm, durante 5 minutos, con el sobrenadante se realizó la prueba de aglutinación en placa, colocando las diluciones 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 y una gota del antígeno *Brucella* (Pronavive), se dejo reposar por 3 minutos, durante este tiempo se movió en círculos finalmente se hizo la lectura con una luz debajo, de esta forma se identificaron aquellas disoluciones que presentan una respuesta de aglutinación. Esta prueba fue realizada en los animales que fueron vacunados con *Brucella abortus* y los que fueron vacunados con BCG o Triple infantil.

RESULTADOS

1. - EVALUACION DE LA TECNICA QUIRURGICA.-

La inducción de la anestesia fue por medio la combinación de productos como Combelen y Ketamicina, la vía de administración utilizada fue intramuscular profunda. La zona destinada para la cirugía en el apéndice cecal fue la región terminal. La técnica de sutura que dio mejor resultado para la parte distal del ciego, fue la anudación completamente con seda antes del corte transversal y sobre esta una sutura invaginante tipo "jareta", se utilizó una sutura invaginante tipo Lembeth y después una tipo Connell. El material utilizado fue Vicryl 2-0.

La recuperación de los animales fue de 2 horas aproximadamente posteriores a la cirugía, mostrando una recuperación favorable así como una cicatrización rápida. La alimentación con sólidos se inició al segundo día con buena aceptación.

2. - DOSIFICACION:

Para el desarrollo del modelo de infección crónica la dosificación se realizó de la siguiente manera:

A) grupo inoculado con cepas K12 de *Escherichia coli* (apatógenas):

En este grupo control la cantidad suministrada de la cepa fue de 1 ml, colocado en un segmento preparado del apéndice cecal, con esta dosis se logro la sobrevivencia de los animales provocándoles solo signos clínicos pasajeros, hasta completar el tiempo de experimentación que fue de 30 días.

B) Grupo inoculado con la cepa patógena 933 de *Escherichia coli* productora de citotoxinas .

Para el desarrollo del modelo de infección crónica, primero se estandarizó la dosis que permitió que los animales sobrevivieran por más de 45 días, y así tener una continuidad del desarrollo experimental. La estandarización de la dosis se muestra en el cuadro No.2.

CUADRO 2
RESULTADO DE LAS DISOLUCIONES DE E.COLI
INOCULADAS EN EL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO.

CEPA	CONCENTRACION BACTERIANA ufc/ml	DOSIS	SOBREVIVENCIA
933	1×10^8	1 ml	24 horas
933	1×10^6	0.5 ml	3 o 4 días
933	1×10^4	0.5 ml	6 a 10 días
933	1×10^2	0.2 ml	más de 45 días

ufc.- unidad formadora de colonias.

3. – EVALUACION DEL MODELO ANIMAL:

A.- Datos Clínicos y de patología.

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

Testigos negativos: grupo controles:

Los animales presentaron buena recuperación a la anestesia, la ingestión de agua fue prácticamente inmediata y la ingestión de alimento fue al segundo día postoperatorio. No se presentó sinología durante el período de observación que fue de un mes.

Grupo K12 (cepas no patógenas):

Los animales presentaron una buena recuperación a la anestesia e inició el consumo de agua y alimento aproximadamente a los 2 días de la cirugía sin embargo, los animales que fueron inoculados con estas cepas después de 6 a 7 días presentaron una ligera inflamación en ojos, lesiones en la piel, así como ligeros problemas respiratorios. A los 15 días presentaron diarrea moderada de color amarillento teniendo un período corto de duración, pasando este período los animales se recuperaron y sobrevivieron hasta cumplir los 30 días.

Es importante mencionar que no presentaron alteraciones en el sistema nervioso.

Grupo 933 (productoras de VT1 y VT2):

Los animales mostraron buena recuperación a la anestesia, el consumo de alimentos y agua fue aceptada a los dos días después de la cirugía, los animales presentaron signos clínicos pasajeros los cuales consistieron en diarrea leve de color amarillenta de 3 días, indicándonos la lesión de la toxina hacia el intestino delgado y grueso, después de 6 o 7 días presentaron signos de depresión leve, emaciación y deshidratación moderada, aumento de urea y creatinina a niveles de 70 mg/dl y 1.9 mg/dl respectivamente y por un lapso no mayor a 7 días lo que correlaciona con el daño al riñón y la insuficiencia renal pasajera esperada, problemas respiratorios leves y no se observaron las lesiones en el sistema nervioso central es importante mencionar que cuando se ponía la dosis completa estos desarrollaron lesiones provocando la muerte en un período de 5 a 7 días. Por ello la importancia de estandarizar la dosis.

B.- Lesiones a la necropsia:

Grupos control:

No se encontraron lesiones en estos animales ya que a un grupo de ellos se le practicó una laparotomía y otros fueron apendicectomizados.

Grupo K12 (cepa apatógena):

Las lesiones a la necropsia observadas en este grupo de animales se encontró únicamente en el segmento aislado el cual mostró a los 30 días una atrofia marcada (disminución de su tamaño), adquiriendo una consistencia más firme de lo normal pero manteniendo el aspecto de saco ciego. En todo el peritoneo la irrigación no se perdió y el contenido encontrado fue de un líquido seroso y levemente estratificado a los 30 días.

El apéndice cecal aislado presentó una histología propia, conteniendo una mucosa del epitelio cubico simple, que en algunas regiones se aplana y presenta proyecciones.

Grupo 933 (productoras de VTI y VTII)

El apéndice cecal aislado presenta un aumento en su tamaño, congestión, y al momento del corte en el interior la presencia de líquido de color blanco amarillento espeso y abundante, líquido sanguinolento en la cavidad abdominal, vasos mesentéricos congestionados, hemorragias petequiales a difusas asas intestinales con presencia de gas. Hígado con bordes irregulares, el corazón con cambios de coloración, el riñon al corte con salida de líquido sanguinolento, siendo poco evidente la zona medular y corteza renal.

4. - RESULTADOS DE LABORATORIO:

A los animales del grupo control y K12 , se les tomaron muestras de suero a los 15 días y 30 días posteriores a la cirugía para realizarles pruebas de laboratorio tales como BH, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro No.3

CRUADRO 3

PRUEBA HEMÁTICA GRUPO K12 Y CONTROLES

INTRODUCCION	GR m /mm ³	HB g/dl	SED mm/h	HTO %	VGM fl	CHGM %	HGM pg	GB %	L %	M %	N %	E %	B %	BD %	S %
M3 LAP 15 DIAS	5.08	13.1	0	44.1	86.8	29.7	25.7	8500	78	0	22	0	0	1	21
M3 LAP 30 DIAS	5.95	13.7	0	14.2	74.2	30.9	23.0	12600	72	4	24	0	0	0	0
M4 LAP 15 DIAS	6.85	14.1	0	45.5	66.3	31.0	20.6	4200	54	2	42	1	1	1	41
M4 LAP 30 DIAS	4.95	9.5	13	33.8	68.9	28.0	19.3	21400	40	3	84	0	0	0	0
M2 S/A 15 DIAS	5.86	15.9	0	50.0	85.3	31.8	27.1	8500	55	2	43	0	0	2	41
M2 S/A 30 DIAS	5.80	14.6	1	46.0	79.3	31.7	25.5	9800	40	1	59	0	0	0	0
M10 S/A 15 DIAS	6.11	12.5	1	40.6	66.4	30.7	20.4	7450	ND	ND	ND	0	0	0	0
M10 S/A 30 DIAS	5.89	13.4	0	39.3	66.9	34.1	22.8	10900	ND	ND	ND	0	0	0	0
M6 K12 15 DIAS	6.51	13.6	0	41.5	67.5	32.7	22.1	10250	46	1	53	0	0	4	49
M6 K12 30 DIAS	8.96	18.6	0	50.5	55.0	37.0	20.8	9780	40	0	60	0	0	0	0
M7 K12 15 DIAS	6.0	13.2	0	42.1	69.5	31.3	21.8	12150	54	1	45	0	0	3	42
M7 K12 30 DIAS	5.53	13.8	0	44.4	80.2	31.0	24.9	9650	37	7	56	0	0	0	0
M2 LAP 30 DIAS	5.14	13.0	1	40.3	78.4	32.2	25.5	6700	0	0	0	0	0	0	0
M2 LAP 45 DIAS	5.86	15.9	0	50	85.3	31.8	27.1	8500	55	2	42	0	0	1	41
M4 LAP 30 DIAS	6.05	14.1	0	38.3	63.3	36.8	23.3	7100	0	0	0	0	0	0	0
M4 LAP 45 DIAS	6.85	14.1	0	45.5	66.3	31.0	20.6	6850	55	2	42	0	0	1	41
M1 S/A 30 DIAS	6.01	15.6	0	52.5	87.1	29.7	25.9	9600	0	0	0	0	0	0	0
M1 S/A 45 DIAS	7.25	12.9	1	44.6	61.5	28.7	17.7	11400	37	4	59	0	0	1	58
M6 S/A 30 DIAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	ND
M6 S/A 45 DIAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	ND
M3 K12 30 DIAS	4.58	10.3	4	31.7	64.2	32.4	22.4	7100	0	0	0	0	0	0	0
M3 K12 45 DIAS	5.08	13.1	0	44.1	86.8	29.7	25.7	7850	78	0	22	0	0	0	21
M7 K12 30 DIAS	5.44	11.4	0	34.4	63.2	33.1	20.9	6050	56	0	43	0	0	0	42

GR: GLOBULOS ROJOS
 HB:HEMOGLOBINA
 SED:SEDIMENTADOS
 HTO:HEMATOCRITO
 VGM,VOLUMEN MEDIO DE ERITROCITOS
 CHGM:CONCENTRACION DE ERITROCITOS
 HGM:CANTIDAD DE HEMOGLOBINA EN ERITROCITOS
 GB: GLOBULOS BLANCOS
 L:INFOCITOS
 M:MONOCITOS
 N:NEUTROFILOS
 E:EOSINOFILOS
 B:BASOFILOS

A los animales del grupo 933 se les tomaron muestras de suero a los 30 días y a los 45 días para realizarles pruebas de BH los resultados obtenidos se muestran en el cuadro No 4.

CUADRO 4 PRUEBA HEMÁTICA GRUPO 933

IDENTIFICACION	GR m/mm ³	HB g/dl	SED mm/h	HTO %	VGM μ	CHGM %	HGM g	GB %	L %	M %	N %	E %	B %	BD %
M15 933 30 DIAS	6.01	14.6	1	50.4	87	29.7	25.9	9600	59	2	41	0	0	1 40
M15 933 45 DIAS	7.25	12.9	1	43.6	61.5	27.6	0	10500	37	4	59	0	0	2 28
M22 933 30 DIAS	6.13	12.1	0	44.5	0	0	0	0	84	2	14	0	0	1 13
M22 933 45 DIAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0
M24 933 15 DIAS	5.85	13.1	0	42.3	72.3	30.9	22.4	64500	30	0	69	1	0	2 67
M24 933 30 DIAS	6.3	18.6	0	50.3	52	30	ND	8500	47	3	50	3	0	0 50
M25 933 25 DIAS	6.15	12.1	0	40.9	66.5	29.6	19.6	2100	27	3	72	2	0	2 72
M25 933 30 DIAS	6.83	12.5	0	55.5	ND	ND	ND	0	31	1	62	3	0	42 69

GR: GLOBULOS ROJOS

HB: HEMOGLOBINA

SED: SEDIMENTADOS

HTO: HEMATOCRITO

VGM: VOLUMEN MEDIO DE EROTROCITOS

CHGM: CONCENTRACION DE ERITROCITOS

GB: GLOBULOS BLANCOS

L: LINFOCITOS

M: MONOCITOS

N: NEUTROFILOS

E: EOSINOFILOS

B: BASOFILOS

A los cuatro grupos de animales se les realizó la prueba de aglutinación en placa para determinar anticuerpos contra *Brucella abortus*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en el cuadro No. 5.

CUADRO 5
DETERMINACION DE ANTICUERPOS
CONTRA *Brucella abortus* EN LOS CONEJOS
EXPERIMENTALES

IDENTIFICACION	TRATAMIENTO	15 DIAS	30 DIAS
M3 B	LAPARATOMIA	I: 400	I: 50
M2 B	LAPARATOMIA	I: 400	I: 200
M2 B	S/ APÉNDICE	I: 200	I: 200
M10 B	S/ APÉNDICE	I: 200	I: 50
M6 B	CEPA K 12	I: 400	I: 50
M7 B	CEPA K 12	I: 200	I: 200
M24 B	CEPA 933	I: 50	NEGATIVO
M25 B	CEPA 933	I: 50	NEGATIVO

A los animales que fueron inmunizados con la vacuna de BCG, se les realizó la prueba de Intradermorreacción (PPD), obteniendo los siguientes resultados como se muestran en el cuadro No.6.

CUADRO 6
DETERMINACION DE LA RESPUESTA INTADERMICA
CONTRA BCG EN LOS CONEJOS EXPERIMENTALES

IDENTIFICACION	LECTURA (mm)						INTERPRETACION
	1 día		2 día		3 día		
	E	I	E	I	E	I	
M2 BCG LAPARATOMIA	0	0	5	ND	10	ND	POSITIVA
M4 BCG LAPARATOMIA	0	0	13	13	17	17	POSITIVA
M1 BCG S/ APÉNDICE	0	0	12	10	14	10	POSITIVA
M6 BCG S/APÉNDICE	0	0	20	2	20	5	POSITIVA
M3 BCG CEPA K 12	0	0	5	5	10	5	POSITIVA
M7 BCG CEPA K 12	0	0	5	5	10	5	POSITIVA
M15 BCG CEPA 933	0	0	S/C	S/C	S/C	S/C	NEGATIVA
M22 BCG CEPA 933	0	0	S/C	S/C	S/C	S/C	NEGATIVA

E: ERITEMA

I: INDURACION

ND: NO DETERMINADA

S/C: SIN CAMBIOS

5. -CORTES HISTOLÓGICOS

Las muestras obtenidas durante la necropsia del apéndice cecal y la piel fueron preparada y teñidas con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio. Los resultados obtenidos en estos cortes se muestran en el cuadro No. 7,8,9.

CUADRO 7
ANÁLISIS HISTOLÓGICO EN CORTES DE APÉNDICE
DE CONEJOS DEL GRUPO K12 Y CONTROL

IDENTIFICACIÓN CONEJO	TIPOS DE CÉLULAS				
	MONOCITOS	LINFOCITOS	CÉL PLASMÁTICAS	MACROFAGOS	GRANULOCITOS
M3 B LAPARATOMIA	+	+	++	++	-
M4 BCG LAPARATOMIA	+	++	+++	+++	-
M2 B S/APÉNDICE	-	-	-	-	-
M5BCG S/APÉNDICE	-	-	-	-	-
M7 B K12 APATOGENA	+++	++	+++	++	+
M7 BCGK12APATOGENA	+	+++	+	++	+

CUADRO 8
ANÁLISIS HISTOLÓGICO EN CORTES DE APÉNDICE
DE CONEJOS DEL GRUPO 933

IDENTIFICACION	TIPOS DE CELULAS				
CONEJOS	MONOCITOS	LINFOCITOS	CEL. PLASMATICAS	MACROFAGOS	GRANULOCITOS
M25 B CEPA 933	+	+++	+++	++++	+++
M15 BCG CEPA 933	+	+++	+++	++++	+++

CUADRO 9
ANALISIS HISTOLOGICO EN CORTES DE PIEL
EN CONEJOS INOCULADOS CON BCG

IDENTIFICACION	TIPOS DE CELULAS			
TRATAMIENTO	LINFOCITOS	MACROFAGOS	POLIMORFO NUCLEAR	FIBROBLASTOS
LAPARATOMIA	+++	+++	+++	+++
APENDICECTOMIA	+++	+++	+++	+++
CEPA K 12C600	++	++	++	++
CEPA 933 O STx	+	+	+	+

- = NEGATIVO
+ = ESCASAS
++ = MODERADO /PRESENTE
+++ = ABUNDANTE
++++ = MUY ABUNDANTE

**CORTES HISTOLÓGICOS DEL APÉNDICE CECAL
GRUPO INOCULADO CON LA CEPA DE E.COLI K 12.**

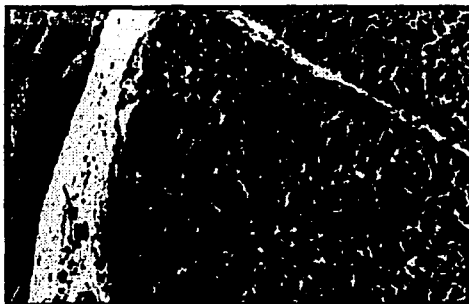


Fig.7-a



Fig 7-b

Fig7.- Microfotografías de las imágenes histológicas del apéndice cecal, tinción H.E:

- a) muestra Túnica muscular(A), submucosa(B) y nódulos linfáticos(C). a 400x
- b) muestra un aumento celular linfocitos (A), células plasmáticas(B). a 100x

**CORTES HISTOLOGICOS DE DE APENDICE CECAL
GRUPO EXPERIMENTAL 933**

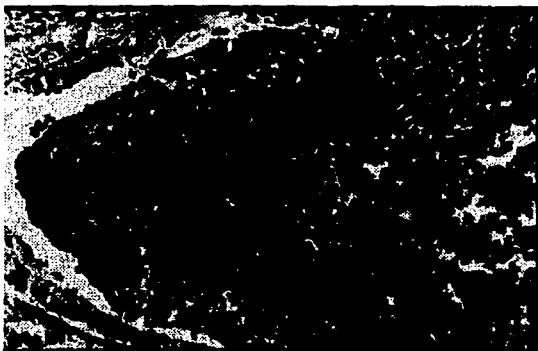


Fig 8-a

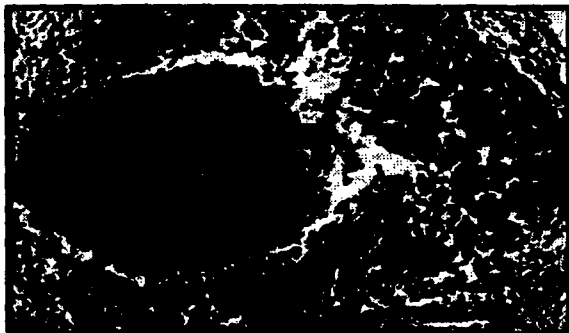


Fig 8-b

Fig.- 8.-Microfotografías de las imágenes del apéndice cecal tinción H+E;

a) Muestra los acumulos linfoides (A) . a 400x

b) Muestra zona de necrosis cuagulatava , área linfocítica. (A) . a 400x

CORTES HISTOLÓGICOS DE LA PIEL
GRUPO DE LAPARATOMIA



Fig 9-a

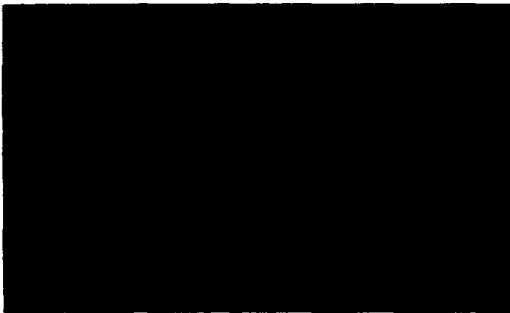


Fig 9-b

Fig .9.-Microfotografías de la piel tinción H.E: Respuesta de hipersensibilidad positiva
a) Piel se observa epidermis(A),dermis(B) tejido subcutáneo(TC),infiltrado celular linfocitos (C). a 400x
b) Respuesta inflamatoria, aumento de las células gigantes,células plasmáticas (A,B,C).a 100x

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**CORTES HISTOLOGICO DE PIEL RESPUESTA CELULAR
GRUPO INOCULADOS CON LA CEPA DE E.COLI K12.**

Fig 10-a

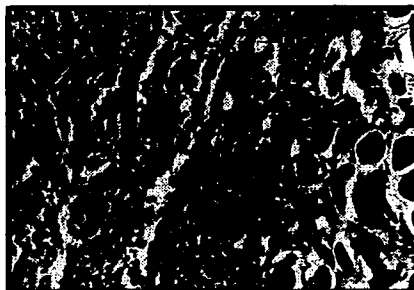


Fig 10-b

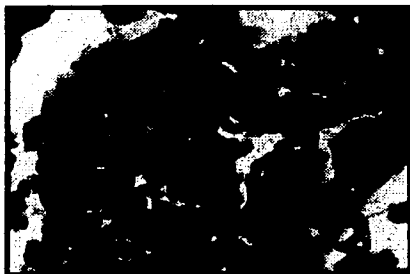


Fig 10-c

Fig .10.- Microfotografias de la respuesta celular en piel tinción H.E.

Las imágenes a,b,c muestran una reacción inflamatoria positiva como respuesta a la prueba de hipersensibilidad . Las imágenes son de la zona de aplicación de la prueba intradérmica

RESPUESTA CELULAR EN EL
GRUPO INOCULADO CON LA CEPA DE E.COLI 933.

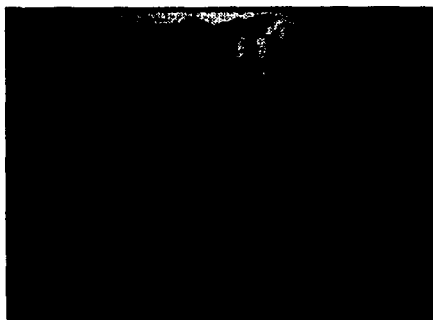


Fig 11-a

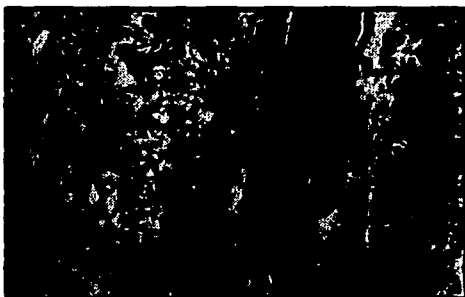


Fig 11-b

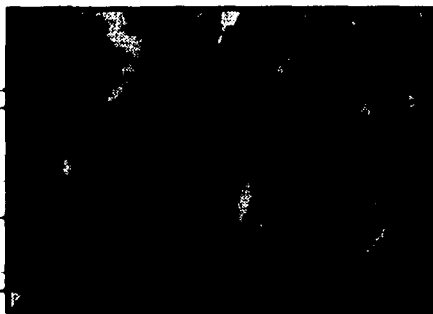


Fig 11-c



Fig 11-d

Fig.11.- Microfotografías de la piel tinción H:E: Las imágenes muestran una respuesta negativa con moderada a escasas células inflamatorias, las imágenes muestran la zona de realización de la prueba de hipersensibilidad. a - b a 400x y c-d a 100x.

6.—ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:

Los resultados obtenidos a partir de la prueba de Biometría Hemática e Intradermorreacción para los grupos, K12 y 933 respectivamente fueron analizados estadísticamente obteniendo los siguientes datos :

CUADRO 10
PRUEBAS DE HIPOTESIS

	K12 Y C *	GR	HB	HTO
MEDIA	933 **	6.00 5.56	1.35 1.19	4.21 4.09
VALOR TABULAR	(t)	0.53	0.81	0.19
VALOR CALCULADO	(p)	0.59	0.41	0.84

CUADRO 11

	1/ DILUCION***		DIAMETRO INDURACION (mm).	DIAMETRO ERITEMA (mm).
	15 DIAS	30 DIAS		
MEDIA K12 Y C *	320	80	13.5	9.17
MEDIA 933 **	50	0	0	0
VALOR TABULAR (t)	5.51	2.66	7.73	4.42
VALOR CALCULADO(p)	0.02	0.04	0.02	0.04

° GRUPO INOCULADO CON K 12 Y CONTROLES

** GRUPO INOCULADO CON 933.

*** INVERSO DE LA DILUCION MAXIMA PARA LOS Ac. AGLUTINANTES CONTRA BRUCELLA ABORTUS.

LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS FUERON REALIZADAS CON EL PROGRAMA NWAS (3)

DISCUSIÓN

En el modelo de infección descrito previamente por Valdivia y colaboradores (35) se desarrollaron las lesiones y se indujo la muerte de los animales en un periodo de 5 a 7 días, por ello en el presente trabajo fue necesario inducir un modelo de infección crónica, los resultados mostrados en la tabla N° 1 demuestran que empleando una dosis de 1×10^2 ufc/ml se logró la sobrevivencia de los animales provocándoles solo signos clínicos pasajeros los cuales consistieron en diarrea leve a los 3 días indicándonos la lesión de la toxina hacia el intestino delgado y grueso, aumento de urea y creatinina a niveles de 70 mg/dl y 1.9 mg/dl respectivamente y por un lapso no mayor a 7 días lo que correlaciona con el daño al riñón y la insuficiencia renal pasajera esperada y no se observaron las lesiones en el sistema nervioso central como las reportadas previamente (35,18,31).

Los datos anteriores nos indicaron que sí se produjeron lesiones e insuficiencias en los animales, sin embargo al ser más leves e incompletas con respecto a lo reportado previamente, no condujeron a la muerte de los animales, por ello quedo claramente establecido el modelo de infección crónica. La dosis infectiva para la infección natural de colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se ha establecido en 10 bacterias de las cepas citotóxicas administradas por vía oral (18); sin embargo en otro trabajo en el que emplearon lechones se requirieron 10^{10} ufc para desarrollar las lesiones (8) en el modelo desarrollado se aprecia que la dosis mínima para lograr las lesiones completas fue mayor; esto pudo ser debido a que los mecanismos inespecíficos de destrucción de la bacteria son más eficientes en el apéndice cecal que en el intestino grueso dado su característica de órgano linfóide, o a que el modelo permite el efecto local y encerrado de los fenómenos celulares inflamatorios siendo más eficientes de esta manera.(35)

En este mismo punto, Melton (24) postulan que una diferencia en la virulencia de las cepas observada en los diversos modelos animales se puede deber a una diferente activación de la toxina en el microambiente tisular. Otra probable explicación es la disminución en virulencia que tienen las cepas de *Escherichia coli* mantenidas en el laboratorio por resiembras continuas(7,8); en cualquier caso las lesiones desarrolladas nos permitieron identificar que la toxina se produjo en el apéndice cecal, se absorbió por vía sanguínea y pudo tener efecto en el intestino, riñón y eritrocitos pero con una recuperación subclínica en los conejos.

Estos efectos se demostraron al comprar los valores de BH y QS con los valores encontrados como normales para estos conejos cuadro No. 12. Debido a que los animales fueron seleccionados del modulo agropecuario de FES-C. de la raza Nueva Zelanda y que a la par del trabajo se determinaron los valores normales para la determinación de BH y QS, se utilizaron los mismos valores mencionados en dicho trabajo Valdivia 1995 (35)

CUADRO 12
VALORES NORMALES EN LOS CONEJOS PARA
LA DETERMINACION DE SANGRE

DERMINACION	RANGO NORMAL	UNIDADES
ERITROCITOS	5.12 - 6.27	millones /mm ³
HEMOGLOBINA	7.7 - 9.5	g/ dl
HEMATOCRITO	25.6 - 31.9	%
PLAQUETAS	225 - 598	Miles / mm ³
LEUCOCITOS	6.24 - 9.21	Miles / mm ³
LINFOCITOS	35 - 74	%
MONOCITOS	0 - 2	%
NEUTROFILOS	24 - 59	%
N. SEGMENTADOS	23 - 57	%
N. EN BANDA	0 - 3	%
EOSINOFILOS	0 - 3	%
BASOFILOS	0 - 1	%
UREA	22.0 - 32.2	mg/ dl
CREATININA	0.30 - 0.73	mg / dl
HEMOG. PLASMATICA	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

Tomado de Valdivia AG 1995

N: NEUTROFILOS

TGP: TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA

LDH: DESHIDROGENASA LACTICA

CPK: CREATIN FOSFOQUINASA

En este contexto es importante considerar algunas apreciaciones epidemiológicas respectivas a la infección por estas cepas en los niños y ancianos, en las cuales se sabe que el 15% de los enfermos de colitis hemorrágica desarrollan Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y de éstos sólo un porcentaje de 30% mueren (18), por lo que la virulencia de la bacteria en personas es baja.

Los resultados mostrados en la tabla N° 5 indican que la inoculación con la cepa 933 disminuyó significativamente la respuesta de anticuerpos hacia una cepa de *Brucella abortus* muerta, este efecto no se desarrolló con la cepa K12 (la cual no produce toxina). La inducción de anticuerpos por un animal, requiere una previa presentación de antígenos por parte de los macrófagos, la clonación y replicación de linfocitos B inducida por la mediación de las linfocinas producidas por el linfocito T y la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos (20) por inducción genética selectiva produciéndose primero los anticuerpos de la clase M y posteriormente los de la clase G, siendo los primeros de un mayor poder aglutinante. En todo el proceso se requieren de 10 a 15 días (dependiendo del inmunógeno, ruta de administración y presencia de adyuvantes); en el modelo desarrollado esperamos hasta 45 días para ir midiendo la respuesta, como se puede observar en la tabla N° 5 la respuesta de anticuerpos aglutinantes de los animales inoculados previamente con la cepa 933 fue menor que el de los otros grupos experimentales, estos datos fuertemente sugieren un efecto sistémico de la toxina sobre alguno de los tipos de linfocitos involucrados, pudiendo ser el T cooperador (CD4), el efecto T "supresor" o el linfocito B.(15)

Por otro lado, como puede observarse en la tabla N°6, se produjo una disminución en la respuesta de los conejos hacia un antígeno que previamente se sabe que induce primordialmente una respuesta celular, el fenómeno fue medido mediante una intradermorreacción y comprobado mediante análisis histológico, como se pudo observar, no existió una respuesta mediada por células en el sitio de inoculación de la tuberculina, fenómeno observado sólo en los animales desafiados con la cepa verocitotóxica. De nueva cuenta, la explicación esta dada por una reacción de la toxina hacia alguno de los componentes participantes, incluyendo además a los linfocitos T "citotóxicos" CD8.

En ambos experimentos anteriormente mencionados se descarto un efecto local (a nivel del apéndice cecal) debido a que la reacción fue normal en los conejos apendicectomizados, a pesar de que este órgano se ha considerado como una zona eminentemente linfoide (1, 35, 14), así mismo se descartó un efecto inmunosupresor asociado al LPS (14,40) debido a que el efecto no se presentó con la cepa de *Escherichia coli* K12, que aunque es una cepa rugosa, contiene completa la fracción lípido A, responsable del efecto endotóxico.

Valdivia A.G. y col 1997,(36) previamente reportaron un efecto de destrucción de linfocitos tanto a nivel local como a nivel de bazo, mencionan que dicho efecto puede ser una lisis asociada a la expresión de los receptores Gb3 o bien ser un fenómeno indirecto.

Aunque es comprensible que para poder tener una claridad de cual es la (las) células afectadas se requiere hacer un estudio del tipo de linfocitos afectados en los conejos con infección crónica y aguda por la cepa 933 empleada, a continuación intentaremos deducir el hecho a través de los estudios reportados previamente por otros autores con respecto al efecto de la toxina sobre los linfocitos. Se ha demostrado que el receptor para las toxinas VT1 y VT2 (Gb3) se localiza en las células inmaduras de los centros germinales y en los linfocitos B activados (cél. Plasmática) productoras de IgG. Otros trabajos demuestran que el linfocito T, las células preT y las B maduras, no tienen receptor para la toxina (18). Así mismo se encontró que la toxina VT1 inhibe la proliferación in vitro de los linfocitos T y B de bovino (25) teniendo el mismo efecto in vivo sobre los cerdos y en los terneros pero por la VT2. La toxina VT2 disminuyó la respuesta mitogénica de las células B y T in vivo de los ratones conduciendo a una disminución de la producción de anticuerpos, disminución del número de linfocitos CD4, CD8 y B; así como la disminución de la reactividad de los CD4 y CD8; en este mismo trabajo se informa del efecto de la administración endovenosa de la toxina Stx2 disminuyo la cantidad de células T y B circulantes, así como las presentes en el bazo y el timo (33). Lingwood C.A. 1994 (21), menciona que el antígeno CD19 es el marcador de las células B humanas que aparece más temprano y está involucrado en la regulación de algunas partes de la diferenciación, incluyendo la estimulación antigénica y el parecido estructural a la toxina VT1B, por lo que el CD19 se puede unir directamente al receptor Gb3; por ello la unión de las VT sobre el receptor Gb3 interferirá con el CD19 y/o señalización vía IF 2.

En un brote de SUH en Japón afectando niños de menos de 10 años de edad, se observaron bajos niveles de anticuerpos contra la toxina VT2 y en otros países se observa que en los adultos con infecciones por VTs existen títulos de anticuerpos contra VT1 bajísimos. En un modelo animal empleando cerdos gnotobiontes, se indujeron cerdos inmunocomprometidos. La toxina VT1 fue capaz de suprimir la respuesta inmune a nivel de mucosas.(33)

Con los datos anteriormente presentados se deduce que la toxina con mayores efectos sobre las células del sistema inmune es la VT2, sin embargo se observan datos contradictorios en los efectos, los cuales dependen del sistema de prueba. Esta situación probablemente tenga una relación directa a la expresión del receptor Gb3 sobre las células, el cual es diferente de acuerdo a la especie animal usada en el ensayo (10,21,31, 37).

Así mismo, en nuestro modelo desarrollado, se pudo confirmar un efecto depresor de la respuesta tanto humoral como celular, por lo que es evidente que en los conejos existen receptores para la toxina en los diferentes tipos de linfocitos, observándose este efecto a nivel tisular y no a nivel circulatorio dado que en el modelo en conejo previamente descrito no se obtuvieron datos de leucopenias o linfocitopenias (36).

Otra probable explicación al efecto encontrado puede estar relacionada a una modulación alterada de la respuesta vía interleucinas o vía citocinas; en el primer caso un buen candidato sería la IL-10 puesto que esta se ha involucrado con los fenómenos de tolerancia intestinal y la regulación de los linfocitos Th3, los cuales a su vez abaten la respuesta de los Th1 y Th2. La IL-10 es producida por los macrófagos en respuesta a una estimulación directa por el LPS (10), el que proviene de una lisis de bacterias Gram negativas (como E.coli) (13), se demostró que los neutrófilos de respuesta tisular local al tratar de actuar sobre la bacteria, induce en ella el sistema de respuesta SOS, teniendo como consecuencia la inducción del fago codificante de la toxina y colateralmente el aumento de la lisis bacteriana provocada por el ciclo lítico del fago (10). Así mismo Torpe y colaboradores (34) han implicado la secreción de IL-8 y de IL-1 por células del epitelio intestinal después de que estas han sido tratadas con verotoxinas aunque inicialmente esta IL aumentaría la respuesta inflamatoria local con un aumento de la secreción de IL-10 secundaria (9,12).

Como en el modelo en conejo desarrollado se inocula la bacteria completa y viable,. Es posible que algún otro factor, además de las toxinas STxs, esté presente en las cepas O157:H7 y le permita interactuar alterando la función del linfocito. Un probable candidato es el (los) productos de los genes ubicados en el plásmido grande ORFL7095 , localizado en la cepa utilizada para la inoculación (6); el producto ha sido nombrado linfostatina por su efecto de disminuir las células mononucleares periféricas y tisulares , por un mecanismo independiente a la apoptosis , así como de bloquear la proliferación de los linfocitos en los centros germinales (6,19). Aunque en este trabajo no descartan totalmente la participación de las Verotoxinas. Algunos otros productos liberados por E. coli pueden influir la función linfocitaria a nivel de mucosas o del bazo en los ratones (14) conduciendo a una inhibición del efecto mitogénico de los linfocitos (23) A la fecha no es posible diferenciar si el efecto de las toxinas es de forma directa sobre los linfocitos , o se requiere de una cadena de eventos que conducen a la destrucción de los linfocitos en bovinos; aunque estudios in vitro han demostrado que es citotóxico para los linfocitos B humanos (25).

CONCLUSION

Por medio de la estandarización de la dosis de la cepa 933 se pudo establecer un modelo de infección crónica que les permitió la sobrevivencia de los animales por más de 45 días, provocando en estos lesiones e insuficiencia, sin embargo se obtenían una recuperación subclínica de estos. Las lesiones desarrolladas nos permitieron identificar que la toxina se produjo en el apéndice cecal, la cual se absorbió por vía sanguínea y presentó un efecto en el intestino, riñón y eritrocitos. Con estos datos se pudo establecer que los mecanismos inespecíficos de destrucción de la bacteria son más eficientes en el apéndice cecal que en el intestino grueso dado a su característica de órgano linfoide. La dosis mínima para la infección crónica fue de 1×10^2 ufc/ml

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la hipótesis planteada es aceptada ya que en el modelo desarrollado en los conejos, se demostró que tras la inoculación con cepas de *Escherichia coli* Verocitotóxicas (933) por medio de una técnica quirúrgica en el apéndice cecal, los animales inoculados presentaron un efecto en la respuesta inmunológica, tanto celular como humoral la cual se caracterizó por la disminución en la respuesta de los linfocitos, el modelo permitió observar las alteraciones en el efecto local de los fenómenos de inmunidad celular.

El modelo demostró que los animales inoculados con la cepa 933 presentaron una respuesta de anticuerpos aglutinantes menor que en de los grupos inoculados con la cepa K12.

Se estableció que los animales inoculados con la cepa 933 presentaron una disminución en la respuesta celular hacia los antígenos de *Mycobacterium bovis*.

En nuestro modelo desarrollado, se pudo confirmar un efecto depresor de la respuesta humoral como celular, por lo que es evidente que en los conejos existe un receptor para la toxina en diferentes tipos de linfocitos, observándose este efecto a nivel tisular principalmente .

Hasta este momento no es posible diferenciar si el efecto de las toxinas es de forma directa en los linfocitos, o si se requiere de una cadena de eventos que conducen a la destrucción(apoptosis) de los linfocitos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Archer O.K. and Pierce J.C. 1954. The developmental biology of the lymphoid tissue in the rabbit. Lab. Invest. 13, 259.
- 2.-Anon 1995, Paton et al 1999. *Escherichia coli* verotoxigenicas (ECVT) importantes patógenos emergentes.
3. - Baños BL, Gómez ECH. Manual de uso del paquete estadístico "NWA STATPAK" un enfoque a la biomedicina. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Cuautitlan Izcalli, edo de México, 1994.
4. - Blanco et al 1993 a 1995, Karmili 1989, Slutsker et al 1997. Presentación clínica colitis hemorrágica (CH) y el Síndrome Urémico Hemolítico
- 5.- Beutin et al 1998,1999, Golvater&Bettethaim 1998, Karmili et al 1989, Paten et al 1996,1999.
- 6.- Burland V., Y. Shao, N.T. Perna, G. Plunkett, H.J. Sofia and F.R. Blattner. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7 , Nucleic Acids Research, 26:18: 4196-4204. 1998.
- 7.-Ebel F., C. Deibel, A.U. Kresse, C.A. Guzman and T. Chakr. Aborty, temperature and medium dependent secretion of proteins by Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Infect. And Immun. 1996, 64(11): 4472-4479 .
- 8.-Enami M., N. Nakasone, Y. Honma, S.Kakinohana, J. Kudaka, M. Iwanaga. FEMS Microbiology Letters 179 (1999) 467-472
- 9.-Foss D.L., M.J. Zilliox and M.P. Murtaugh Differential Regulation of Macrophage Interleukin-1 , IL-12 and CD80-CD86 by Two Bacterial Toxins , Infect. Immun. 1999, 67 (10) : 5275-5281.
- 10.-Foster G.H., C.S. Armstrong, R. Sakiri and V.L. Tesh , Shiga Toxin Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Expression : Requirement for toxin Enzymatic Activity and Monocyte Protein Kinase C and Protein Tyrosine Kinases. Infect. Immun. 2000, 5183-5189 68:9.

11. -Hernandez AG; edit Pfizer s.a de c.v., manual de inmunología. , México 1999.
- 12.-Hessle C., B. Andersson, and A.E. Wold. Gram Positive Bacteria are Potent Inducer of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infect. And Immun.* 2000, 68 (6): 3581-3586 .
- 13.-Heumann D, Y. Adachi, D. Le Roy, N. Ohno, T. Yadomae, M.P. Glauser and T. Calandra. Role of Plasma, Lipopolysaccharide-Binding Protein and CD4 in Response of Mouse Peritoneal Exudate Macrophages to Endotoxin. *Infect. Immun.* 2001 , 378-385.
- 14.-Huang L.Y., A.M. Krieg, N.Eller, and D.E. Scott Induction and Regulation of Th1 Inducing Cytokines by Bacterial DNA, Lipopolysaccharide , and Heat-Inactivated Bacteria.. *Infect. And Immun.* 1999, 67(12): 6257-6263
- 15.-Hubertus P.A. J., Ch. S.T. Hii, G.L. Hodge and A. Ferrante, Synthesis and surface expression of CD4 by human endothelial cells. 2001, *Infect. Immun.* 69: 479-485.
- 16.-Hughes R.A., Widdicombe J. 1962. The output of lymphocytes from the lymphatic system of the rabbit. *J.Physiol. (london)*, 132: 384
- 17.-Junko S, Takash y, Massahiko S, Tatsuhiko Y, Tae T, Masao M. Disorders in the immune responses of T -and B cell in mice administrared. intravenous Verotoxin 2.Life sciences including. *Pharmacology litters*, vol: 62, Issue: 9,pp 1059-1072, july 21,2000.
- 18.-Karmali M.A., A.G.G. Goglio 1994. Editores, Recent Advances in Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* Infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin)-producing *Escherichia coli* infections, Bergamo Italy , Elsevier
- 19.-Klapproth J.M.A., I.C.A. Scaletsky, B.P. McNamara, L.C. Lai, C.Malstrom, S. P. James and M.S. Donnenberg. A Large Toxin From Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Inhibits Lymphocyte Activation. *Infect. Immun.* 68 (4): 2148-2155 2000.

20.-Larsson R. , D. Rocksén, B. Lilliehöök, A. Jonsson, A. Bucht. Dose-Dependent Activation of Lymphocytes in Endotoxin Induced Airway Inflammation , *Infect. Immun.* 2000, 6962-6969, 68:12.

21.-Lingwood C.A. Verotoxin Recognition of its Glycolipid Receptor, Globotriaosylceramide: Role in Pathogenesis , in, *Recent Advances in Verocytotoxin Producing Escherichia coli Infections*. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga like toxin)-producing *Escherichia coli* infections, Bergamo Italy , Elsevier, : Karmali M.A., A.G.G. Goglio 1994. Editores

22.-Luna L. General References in Histopathologic Techniques in : *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*, Mc Graw Hill Inc, USA, 1968.

23.-Malstrom C; and S. James Inhibition of Murine Splenic and Mucosal Lymphocyte Function by Enteric Bacterial Products, *Infect. And Immun.* 1998 66 (7): 3120-3127.

24.-Melton C.A.M. , J.E. Rogers and A.O. Brien Virulence of Shiga Toxin producing *E. coli*(STEC) in a mouse model correlates with toxin activation, 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections , Baltimore , Maryland USA , 1997

25.-Menge C., L.H. Wieler, T. Schlapp, and G. Baljer . Shiga Toxin 1 from *Escherichia coli* Blocks Activation and Proliferation of Bovine Lymphocyte Subpopulations In Vitro. *Infect. And Immun.* 1999, 67 (5): 2209-2217.

26.-Monroy C.M.L. Consideraciones Anatómicas Macro y Microscópicas del Apéndice cecal del conejo, Tesis de Licenciatura , UNAM, Méx. 1973.

27.-Mulvey G, Vanmaele R, Mrazek M, Cahill M, Armstrong G D. Affinity purification of Shiga-like toxin 1 and Shiga-like toxin II . *Journal of Microbiological Methods* 32 (1998) 247-252.

28.-Orden J.A., J.A. Ruiz Santa-Quiteria, D. Cid, S. García, R. Sanz y R. De la Fuente Verotoxin- producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non VTEC in 1-30 days old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology* 63 (1998) 239-248

- 29.-Paton A.W., E. Voss, P.A. Manning, J.C. Paton 1998 Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin Producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Microb. Pathog.* 1998 24(1): 57-63.
- 30.-Pospisil R., G.O. Young-Cooper, R.G. Mage. 1996. Superantigen-like unconventional Ag-Ab interaction: "positive" Selection of rabbit appendix B-cells. *Vet. Immunology and Immunopathology* 54: 21-22
- 31.-Ren J., I. Utsunomiya, K. Taguchi, T. Ariaga, T. Tai, Y. Ihara, T. Miyatake. Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Research* 825 (1999) 183-188
- 32.-Richardson S.E., Karmali M.A., Becker L.E., CR. Smith. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol* 1988, 19(9) 1102-108.
- 33.-Sugatani J., T. Igarashi, M. Shimura, T. Yamanaka, T. Takeda and M. Miwa. Disorders in the immune response of T- and B- Cells in mice administered intravenous verotoxin 2. *Life Sciences* 67 : 1059-1072 , 2000.
- 34.-Thorpe C.M., B.P. Hurley, L.L. Lincicome, M.S. Jacewicz, G.T. Keusch and D.W.K. Acheson. Shiga Toxin Stimulate Secretion of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial cells. *Infect. Immun.* 67 (11) : 5985-5993 1999.
- 35.-Valdivia A.G. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de Verocitotoxinas de *Escherichia coli* , Tesis de Grado , FESCuautilan UNAM, Méx. 1995
- 36.-Valdivia A.G., J.A. Montaraz C. And J.L. Tortora -Perez Lymphotoxic effects of verocytotoxin producing *E. coli* in rabbit caecum . 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections , Baltimore , Maryland USA , 1997
- 37.-Van de Kar NC, L.A. Monnens, M.A. Karmali and V.W. van Hinsbergh. Tumor necrosis factor and interleukin -1 induce expresión of the verotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the patogénesis of the hemolytic uremic síndrome. *Blood*, 80 (11) : 2755-2764. 1992

38.-Wagner P.L., D.W.K. Acheson and M.K. Waldor , Human Neutrophils and their products Induce Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2001 Infect. Immun. 69(3): 1934-1937 USA

39.-Wolski V.M., A.M. Soltyk and J.L. Brunton. Mouse Toxicity and Cytokine Release by Verotoxin IB Subunit Mutants, Infect. Immun. 2001 , 69(1): 579-583

40.-Zhang H., D.W. Niesel, J.W. Peterson and G.R. Klimpel. Lipoprotein Release by Bacteria: Potential Factor in Bacterial Pathogenesis, Infection and Immunity 1998, 66(11): 5196-5201 .