



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETECCIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA
(EHEC) A PARTIR DE CANINOS DE LA ZONA METROPOLITANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ELENA ESTRADA ARANDA

**ASESOR: DR: GUILLERMO VALDIVIA ANDA
COASESOR: M. en C JUAN CARLOS DEL RIO GARCÍA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue apoyado por los siguientes proyectos:

Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN216005-3, Efecto sobre el sistema inmune de cepas Enterohemorrágicas de *Escherichia coli*.

Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), Patología Veterinaria EN208304.

Cátedra de Investigación: Mecanismos de Patogenicidad Microbianos Clave IN2-14.

El trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones de:

Unidad de Investigación Multidisciplinaria En Salud Animal (UIMSA), de la FESC campo IV.

Laboratorio de Diagnostico Integral Veterinario (DIVET®).

AGRADECIMENTOS

A DIOS: Por acompañarme siempre en todo momento de dificultad y permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios.

A LA FAMILIA: Rojano Díaz por la amistad y el apoyo que siempre me han brindado.

A MI CUÑADO: José Guadalupe Trujillo por su apoyo en los momentos difíciles.

A MIS AMIGOS: Roberto Orozco, Roberto Jiménez, Claudia Becerra, Daniel Terrones, Alicia Aguilar y Rafael Arietta gracias por todo el apoyo para este trabajo y por ofrecerme su amistad sincera.

A MI ASESOR Y COASESOR: Por su gran apoyo, su asesoría, su interés, tiempo y apoyo.

A MIS COMPAÑEROS: Ángeles Romero, Claudia Vázquez, Patricia Aranguré, Néstor Cuenca, Laksmi Sosa, Abd Elghany Hefnawy por su valiosa ayuda.

A LOS ACADÉMICOS: MVZ María R. Pichardo y a todos los pertenecientes a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A MIS SINODALES: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, MVZ María de Lourdes Jara Ramírez, Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, M.C. Javier Alejandro Buendía Jiménez por su orientación hacia este trabajo.

DEDICATORIAS

A MI MADRE: Por su paciencia, sabiduría, amor, ejemplo y apoyo incondicionales.

A MI PADRE Y HERMANO: Que ya no están con nosotros pero sé que se encuentran en un lugar mejor, por su amor, sabiduría y por enseñarme a ser fuerte en los momentos difíciles.

A MIS HIJOS: Mercedes y Roberto sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerles en esta vida de lucha y superación constante, deseo expresarles que mi amor, ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos.

A MI HERMANA: M. Adriana Porque gracias a tu cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí depositaste y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales, gracias gorda te quiero mucho.

A MI SOBRINA: Victoria gracias por hacerme reír con tus anécdotas, quiero ser mejor para darte un buen ejemplo a seguir, te quiero.

"No existen suficientes experimentos que puedan
demostrar que tengo razón, pero basta uno
sólo para demostrar que estoy equivocado"

Albert Einstein

ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	34
BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1.- IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Escherichia coli</i> 2
Cuadro 2.- FACTORES DE VIRULENCIA 3
Cuadro 3.- INICIADORES UTILIZADOS PARA LA TÉCNICA DE PCR 13
Cuadro 4.- REACTIVOS EMPLEADOS PARA UNA REACCIÓN TOTAL DE 25 µl 14
Cuadro 5.- SUEROS POLIVALENTES UTILIZADOS 15
Cuadro 6.- BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS 16
Cuadro 7.- BIOTIPOS DE LAS 94 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> 17
Cuadro 8.- EFECTO CITOPÁTICO SOBRE CELULAS VERO DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> 19
Cuadro 9.- RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX EN LOS GRUPOS DE <i>Escherichia coli</i> 21
Cuadro 10.- GENOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i> ENCONTRADOS POR LA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX 22
Cuadro 11.- DATOS DE ARCHIVO DE DIVET® DE LOS CASOS 23
Cuadro 12.- CUANTIFICACIÓN DE Stx PRODUCIDAS POR LAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> SOBRE CÉLULAS VERO 24
Cuadro 13.- SEROGRUPOS DE <i>Escherichia coli</i> ENCONTRADOS 25
Cuadro 14.- CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS, FENOTÍPICAS Y SEROTIPOS DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i> TRABAJADAS 26
Cuadro 15.- NÚMERO Y PORCENTAJE DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i> CORRELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE DIARREA 27
Cuadro 16.- TOXINAS INVOLUCRADAS EN LOS EFECTOS TÓXICOS SOBRE LÍNEA CELULAR VERO CUBIERTA CON AGAR 29

Cuadro 17.- ELEMENTOS GENÉTICOS QUE CODIFICAN PARA
FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS EHEC

..... 33

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRAFICA

	PÁGINA
FIGURA 1.- IMÁGENES DEMOSTRATIVAS DE LA PRUEBA PARA PRODUCCIÓN DE TOXINA EN LÍNEA CELULAR VERO CUBIERTA CON AGAR 20
FIGURA 2.- PCR MULTIPLEX DE ALGUNAS DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i> ENSAYADAS 22
GRAFICA 1.- ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA CON LA PRESENCIA DE DIARREA 27

ABREVIATURAS USADAS

933J	Cepa productoras de Stx1
A/E	Adherencia y barrido (attaching and effacing)
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
BFP	Pili con forma rizada
CDT	Toxina Dilatadora Citoletal
CFA	Factor antigénico de colonización
CH	Colitis Hemorrágica
CHO	Célula de Ovario de Hámster Chino
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
CNF	Factor Ciotóxico de Necrosis
EAF	Factor de adherencia de EPEC
EAST	Toxina ST de cepas enteroagregativas
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EMB	Eosina Azul de Metileno
Gb3	Globotriacil Ceramida
LIA	Agar Lisina Hierro
LPS	Lipopolisacaridos
LT	Toxina termolábil
MEM	Medio Esencial Mínimo
MIO	Motilidad Indol Ornitina
MR- VP	Rojo de Metilo – Voges Proskauer
OMP	Proteína de membrana externa
PBS	Solución fosfatada buffer
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ST	Toxina termo estable
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga
STX	Toxina shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TSI	Triple azúcar hierro
Vero	Células de riñón de mono verde africano
VGRC	Vasculopatía Glomérulo Renal y Cutánea
VT	Verotoxina
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verocitotóxica

RESUMEN

En México no hay estudios sobre aislamientos de las cepas *Escherichia coli* productora de Shiga toxina (STEC) o *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) en caninos; dichas cepas están involucradas con la vasculopatía glomérulo renal y cutánea (VGRC) en galgos de los Estados Unidos de Norteamérica. El objetivo del presente trabajo fue aislar, identificar y tipificar *E. coli* STEC o EHEC y correlacionar los aislamientos con el estado clínico de los caninos.

Se realizó un muestreo a 25 caninos del alberge el Rosado y se utilizaron cepas previamente aisladas por el laboratorio DIVET®. Con las cepas de *E. coli* se realizaron las pruebas de: PCR multiplex; producción de toxinas sobre línea celular Vero cubierta con agar; cuantificación de la toxina en línea celular Vero y serología.

Se trabajaron 43 cepas del muestreo y 15 cepas de casos clínicos remitidos al laboratorio DIVET®, un total de 58 cepas de *E. coli* que contenían alguno de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*).

De los 25 caninos 19 resultaron ser portadores de *E. coli* que contenían cualquiera de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*). Dos de las cepas aisladas resultaron positivas a la serología con los sueros utilizados (STEC/EPEC; EHEC y EHEC O157:H7) la primera resultó ser positiva a *E. coli* productora de shiga toxina (STEC) y la segunda resultado positiva a *E. coli* enterohemorrágica no O157 (EHEC-no O157).

Al realizar el análisis estadístico el porcentaje más alto para los perros con diarrea, fue para los portadores de cepas que contenían la combinación de genes *stx1* y *stx2*, por lo tanto la combinación de los genes y el cuadro clínico son significativamente dependientes ($p < 0.01$).

INTRODUCCIÓN

Características generales

El género *Escherichia* comprende cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris*. La especie tipo es *E. coli*. De las cinco especies solamente *E. coli* tiene significancia clínica. No obstante, *E. hermannii* y *E. vulneris* se han aislado raramente de infecciones extraintestinales (Blanco y col. 2001).

La *Escherichia coli* fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán *Theodore Escherich*, quien la denominó bacteria *Coli Comune* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos. En 1964, el género *Escherichia* fue definido como organismo móvil o inmóvil de la familia *Enterobacteriaceae* con las siguientes características: bacilo asporógeno Gram-negativo, con frecuencia móvil, con flagelos peritricos son fácilmente cultivables en los medios ordinarios de laboratorio, aerobio y facultativamente anaerobio, todas las especies fermentan la glucosa con formación de ácido o de ácido y gas. Oxidasa-negativos y catalasa-positivos (Bell 1998), las principales características bioquímicas de *Escherichia coli* se muestran en el cuadro 1. Son bacilos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, son pequeños, oblongos y finos; con unas dimensiones de 0.5 x 1.0 a 3.0 micras y se mueve por medio de flagelos peritricos, algunas cepas pueden tener cápsulas y ser inmóviles (López y col. 2002).

La mayoría de las cepas de *E. coli* poseen flagelos y por lo tanto son móviles. Las cepas lisas forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser subcultivadas repentinamente en medio artificial se convierten en cepas rugosas. Las variantes capsuladas producen colonias mucoides, especialmente si son incubadas a bajas temperaturas, si crecen en medios con una baja concentración de nitrógeno y de fósforo y con una elevada concentración de hidratos de carbono (Mandell y col. 2002).

Es una bacteria de la microbiota normal del intestino de los animales y el humano, actuando como uno de los patógenos más importantes cuando se llegan a presentar las condiciones ideales para su crecimiento, causando múltiples complicaciones siendo las más comunes: infecciones del tracto digestivo (colibacilosis), tracto urinario, septicemia y

mastitis. En el caso de las infecciones llamadas colibacilosis, que son las más frecuentes en animales domésticos tenemos: la enfermedad edematosa porcina, enfermedad edematosa bovina y en los perros vasculopatía cutánea y renal conocida comúnmente como Alabama Rot (Valdivia y col. 2000; Wieler y col. 2002).

CUADRO 1
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Lisina descarboxilasa	90
Ornitina descarboxilasa	65
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de lactosa	95
Hidrólisis de urea	1

Modificado de Rodríguez, 2002

Clasificación

La *E. coli* productora de diarrea es aquella con características de virulencia que le permite lesionar las células intestinales o alterar la función del intestino.

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, en la actualidad se ha clasificado en 6 grupos principales que ocasionan diarreas (López y col. 2002):

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).
- *E. coli* enteropatógena (EPEC).
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).
- *E. coli* con adherencia difusa (ADEC).
- *E. coli* enteroagregativa (EA_gEC)

Estructura Antigénica

Para determinar el grupo antigénico al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 60 capsulares (K), 112 flagelares (H) y alrededor de 12 antígenos de fimbrias (F). El antígeno “O” es el responsable del serogupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez 2002).

Factores de virulencia

El mecanismo patogénico que ocasiona la diarrea es variable, y está en dependencia del grupo de *E. coli* que infecte al individuo (Fernández y col. 2003).

Así podrá existir:

- Invasividad.
- Adherencia a la superficie de la mucosa.
- Producción de enterotoxinas.
- Producción de citotoxinas.

En base a lo anterior se presentan en el cuadro 2 los principales factores de virulencia de los 6 grupos de *E. coli*.

CUADRO 2
FACTORES DE VIRULENCIA

Grupo	Factores de virulencia
ETEC	ST, LT y CFA
EHEC	Stx, A/E, Intimina, pO157 y CDT
EIEC	Invasividad y Plásmido de 140MDa
EPEC	A/E, BFP y Plásmido EAF de 50-70 MDa
EAEC	Fimbria AAFI y II, EASTI, Proteínas Per y Pic, OMP, Plásmido de 60 MDa y Citotoxina
DAEC	Fimbria F1845 y OMP

LT= toxina termolábil

EAF= factor de adherencia de EPEC

ST= toxina termo estable

OMP= proteína de membrana externa

CFA= factor antigénico de colonización

Stx= toxina shiga

BFP= pili con forma rizada

EAST= toxina ST de cepas enteroagregativas

CDT= Toxina Dilatadora Citoletal

pO157= plásmido de 60 MDa que codifica una enterohemolisina

E. coli posee y utiliza diferentes estructuras como factores de virulencia:

La membrana externa, que es un lipopolisacárido (LPS), estimula a los macrófagos y otras células a producir citocinas y mediadores inflamatorios, incluidos los interferones, la interleucina-1 y la interleucina-6 (entre otras) y el factor de necrosis tumoral, pueden producir muchas manifestaciones de la sepsis causando graves daños al hospedero (Mandell y col. 2002).

La cápsula es un polisacárido que puede evitar que la bacteria sea fagocitada y presenta pocos antígenos al sistema inmune del hospedador, sin embargo, pocas cepas patógenas la producen (Mandell y col. 2002).

Las fimbrias, existen dos tipos: la Tipo 1 (F1) que se caracterizan por que la D-manosa inhibe la hemoaglutinación y la Tipo 2 no inhibida por la D-manosa (Brenes y col. 2003). Las fimbrias del Tipo 1 potencian en gran medida la capacidad de las cepas de *E. coli* ya que algunas de estas cepas contienen toxinas que liberan contra las células eucariotas susceptibles (Mandell y col. 2002).

Virtualmente todas las cepas de *Escherichia coli*, presentan fimbrias de adherencia, sin embargo las cepas diarreicas poseen antígenos fimbriales específicos que permiten la colonización de la mucosa del intestino delgado, en la cual no hay normalmente colonización (García, 2004).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

E. coli enterohemorrágica se describió y se relacionó con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poca o nula fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada en todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. En 1983, se asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llamó verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) (Rodríguez 2002).

Es conveniente señalar que los términos VTEC y STEC son equivalentes, ya que ambos se refieren a cepas de *E. coli* productoras de una o más toxinas de la familia Stx; sin embargo, no está claro que la sola posesión de los genes stx confiera virulencia, dado que puede persistir la ausencia de otros factores de virulencia. Adicionalmente, el término “*E. coli* enterohemorrágica” (EHEC) fue acuñado para referirse a las cepas que ocasionan colitis hemorrágica (CH) y síndrome uremico hemolítico SUH, sintetizan Stx, causan lesiones de tipo “*attaching and effacing*” (A/E) sobre células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa. En ese sentido, EHEC podría pertenecer a un subgrupo de STEC e incluye una connotación clínica que no está implicada en esta última, mientras no todas las STEC son patógenas, las EHEC sí lo son (Garza y col. 2001).

ANTECEDENTES

La *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), es un patógeno emergente transmitido a través de los alimentos. Desde su identificación como patógeno en 1982, STEC O157:H7 ha ocasionado una serie de brotes, especialmente en Canadá, Japón, Reino Unido y Estados Unidos. Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC, el ganado ovino es también excretor de estos microorganismos. Distintos alimentos como carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, lácteos no pasteurizados, mayonesa, jugos de manzana no pasteurizados y vegetales tales como lechuga, brotes de soja y alfalfa, entre otros, han sido señalados como fuente de contaminación en casos esporádicos o brotes asociados a STEC, la bacteria es resistente a los ácidos y puede sobrevivir en alimentos fermentados. El ganado vacuno no es un hospedero específico de STEC, en heces de animales sanos se pueden aislar distintos serotipos de STEC O157 y no-O157 y un mismo animal puede portar más de un serotipo. Otras formas de transmisión son: contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con animales, y persona a persona, por la ruta fecal-oral, debido a las bajas dosis infectivas que posee este grupo bacteriano, ya que menos de 100 bacterias por gramo de alimento puede causar enfermedad (Cicuta y col. 2006).

Las toxinas de *shiga* (Stx)

Según la Organización Panamericana de la Salud, las cepas STEC o VTEC son un grupo heterogéneo de *E. coli* capaces de producir verotoxinas, es decir, citotoxinas (toxina de *Shiga* y sus variantes) activas sobre células Vero. Las cepas STEC tanto de origen humano como animal pertenecen a un amplio espectro de serotipos O:H y se ha descrito la producción de verotoxinas (VTs) en más de 40 serogrupos. El serotipo O157:H7 es el más frecuentemente aislado en casos de CH y SUH en U.S.A. y en otros países desarrollados. Las *E.coli* de este serogrupo, a diferencia del resto, no utilizan habitualmente el sorbitol; por lo tanto son fáciles de reconocer en medios sólidos que contienen este azúcar, como el agar MacConkey sorbitol. Las toxinas de “*Shiga*” (Stx) o Verotoxina (VT) están

codificadas en un bacteriófago inserto en el cromosoma bacteriano. Son fundamentalmente dos: Shiga toxina 1 (Stx1) y Shiga toxina 2 (Stx2), (de esta última existen múltiples variedades), no presentan reacción cruzada entre ellas y una cepa de STEC puede expresar una de estas toxinas o ambas (OPS/OMS; 2001). Son una familia de citotoxinas activas sobre distintas líneas celulares, relacionadas antigénica y funcionalmente con la toxina de Shiga producida por cepas de *Shigella dysenteriae*. Pertenecen a 2 grupos antigénicos diferentes: el grupo 1 incluye a las Stx neutralizadas por anticuerpos anti toxina de Shiga; el grupo 2 incluye aquellas Stx que no son neutralizadas por dicho antisuero. Al igual que otras toxinas bacterianas de naturaleza proteica, las Stx están formadas por 2 subunidades: una subunidad A (activa) responsable de la actividad enzimática y cinco subunidades B (Ligasa), responsables de la unión de la toxina con su receptor funcional. Los receptores de Stx en las células eucariotas sensibles a la acción citotóxica son glicolípidos complejos como Gb3 o Gb4. La subunidad B entra en contacto con el glicolípido de membrana, las Stx son internalizadas por endocitosis y translocadas al citoplasma de la célula, donde la subunidad A se rompe en 2 fragmentos, A1 y A2. El fragmento A1 es transportado en sentido inverso en el aparato de Golgi y alcanza su sitio blanco que es el ribosoma, esta toxina hidroliza un residuo adenina de la unidad ribosómica 28S, produciendo la inhibición del factor de elongación 1 (EF-1), que es responsable de la inhibición de la síntesis proteica en la célula blanco. Estas citotoxinas son sintetizadas en la luz intestinal por STEC (Nataro y Kaper 1998). Las bacterias no ingresan a las células epiteliales ni al medio interno. Las toxinas, en cambio, son transportadas a través de las células epiteliales del intestino, que no poseen receptores funcionales en cantidad significativa, promueven la secreción por estas y otras células de Interleucina 8 y otras citocinas, promueven el aflujo de polimorfonucleares y otros fenómenos inflamatorios, además ejercen su efecto tóxico sobre las células endoteliales de la microvasculatura intestinal y sistémica, rica en receptores específicos. La Stx2 y sus variantes, son las principales protagonistas de los casos de SUH, se fijan pobremente sobre los endotelios entéricos, pero tienen una capacidad tóxica mucho mayor que Stx1, capacidad que se expresa a distancia sobre otros parénquimas como el renal o el nervioso, ricos también en receptores. Se cree actualmente que las Stx son transportadas en la sangre y llegan a los tejidos blanco adhiriéndose a receptores singulares

de los leucocitos y neutrófilos que operan como transportadores de estas proteínas tóxicas (OPS/OMS; 2002).

El gen *eaeA*

Otro de los principales factores de virulencia de las STEC es su sistema de adherencia al epitelio intestinal, a través de una proteína de membrana externa conocida como intimina, codificada por el gen *eaeA*, localizado en una región del cromosoma conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*). Este gen no es exclusivo de las STEC, sino que ya había sido descrito anteriormente en otras especies que causan lesiones del tipo “*attaching and effacing*” (A/E), adherencia y barrido de las microvellosidades y son responsables de diferentes tipos de diarrea como la causada por las cepas EPEC (García A. 2004).

Detección y aislamiento

Se sabe que la detección de bacterias productoras de Stx no pertenecientes al serotipo O157:H7 se hace difícil debido al elevado número de serotipos STEC existentes (que sigue aumentando) y a la ausencia de una característica fenotípica diferencial que los unifique. Un método adecuado para el aislamiento de cepas no-O157 tendría que basarse en la detección de las toxinas Stx o de los genes que las codifican, ya que hasta el momento es la característica común más frecuente para todas ellas. Es por tal motivo que las pruebas concluyentes para la detección de ECEH son el cultivo celular o la detección del gen que codifica la toxina Shiga y otros factores de virulencia típicos de ECEH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (García A. 2004; Huguet T. 2002).

PCR multiplex: Es una modificación de la técnica básica. Fue desarrollada para la detección rápida de genes que codifican *Stx1*, *Stx2*, y *eaeA*. Las técnicas de PCR son altamente sensibles y específicas cuando se usan sobre colonias.

Identificación de citotoxinas (Stxs): Es una técnica laboriosa y que requiere tiempo e infraestructura que no es accesible a la mayoría de los laboratorios de microbiología, pero se considera el estándar de oro para la detección de Stx. Se utilizan las líneas celulares Vero y HeLa, y es de sensibilidad elevada (OPS/OMS; 2001).

Vasculopatía glomérulo renal y cutánea (VGRC)

En los caninos el síndrome de la enfermedad se reconoció por primera vez a mediados de los años 80's en el sureste de los Estados Unidos como una enfermedad potencialmente fatal afectando la piel y los riñones de los galgos de carreras (Carpenter y col. 1988).

En 1993, el equipo de investigadores de la universidad de Kansas y el consejo americano de galgos realizo un estudio basado en el pobre conocimiento de la enfermedad de los galgos de carreras conocida médicamente como VGRC. Para los dueños y entrenadores de los galgos de carreras, la enfermedad es conocida como Alabama Rot. La enfermedad se reconoció por primera vez en Alabama, una característica en algunos perros es la dermatitis ulcerativa, la cual da la impresión de que la piel esta literalmente pudriéndose; de ahí el seudónimo que se le da (Fenwick y Cowan, 1998).

La presentación clínica en los galgos con VGRC se caracterizan por presentar: eritema cutáneo multifocal agudo y múltiple, se demarcan úlceras cutáneas que en su mayoría implican el abdomen y las extremidades distales, sobre todo las piernas traseras, estas lesiones pueden extenderse de una pequeña úlcera focal a grandes áreas de necrosis de gran espesor exponiendo el tejido conectivo, el edema de las extremidades es muy marcado con o sin ulceraciones también es común. Notablemente los perros con VGRC no presentan fiebre, con excepción de los perros uremicos, su comportamiento es normal (Fenwick y Cowan, 1998).

Los perros con VGRC desarrollan de moderada a marcada anemia hemolítica microangiopática. Al igual que los seres humanos, hay una buena evidencia de que la toxina Stx tiene el potencial de causar diarrea sanguinolenta hasta una colitis necrohemorrágica en galgos. Muestras de heces fecales de galgos normales y galgos con VGRC han sido colectadas y examinadas para la presencia de STEC y la actividad de Stx por métodos estándares, cepas STEC (incluyendo O157:H7) han sido aisladas de muestras fecales de galgos con VGRC y menos frecuente de galgos sanos (Fenwick y Cowan, 1998).

JUSTIFICACIÓN

En México no se han hecho estudios en perros para saber si son portadores de cepas STEC, tampoco se han reportado casos de perros con vasculopatía glomérulo renal y cutánea (VGRC), dada la similitud de SUH en humanos con la vasculopatía glomérulo renal y cutánea de los galgos, debido a que las rutinas de laboratorio para el estudio del examen de coprocultivo en perros no involucran la identificación de cepas STEC. Por lo que es conveniente realizar este tipo de estudios para considerar si el perro podría ser un reservorio del microorganismo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de *Escherichia coli* productora de toxina de shiga (STEC) en canideos de la zona metropolitana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar *Escherichia coli* a partir de perros sanos y enfermos con cuadros de diarrea hemorrágica.
2. Evaluar la producción de verotoxinas en las cepas aisladas.
3. Tipificar para el antígeno “O” las cepas aisladas.
4. Relacionar los aislamientos de cepas patógenas con el estado clínico de los animales.

MATERIAL Y MÉTODO

1.- TRABAJO DE CAMPO

Se obtuvieron 20 muestras de caninos, 12 hembras y 8 machos, sus edades oscilaron entre 4 meses y 14 años, las razas muestreadas fueron: 8 French Poddle, 3 Maltes, 3 Cocker Spaniel, 2 Schnauzer, 2 Criollos, 1 Dachshund y 1 Beagle, del Albergue "Rosada" ubicado en Hidalgo lote 27, Av. Bosques Izcalli municipio de Cuautitlán Izcalli en el Estado de México. Se observó que las jaulas tenían espacio suficiente, se encontraban limpias y en buenas condiciones, los caninos son alimentados con alimento comercial seco y cuenta con la atención permanente de un veterinario, dos de los caninos muestreados presentaban el tren posterior manchado de excremento, ojos hundidos, mucosas secas, a la piel le faltaba su elasticidad normal, estos signos coinciden con el cuadro clínico de diarrea y deshidratación; los demás no presentaban signos clínicos aparentes.

Las muestras de heces se recolectaron con hisopos estériles directamente del ano de los caninos y fueron depositadas en tubos de ensaye estériles, conteniendo caldo Soya Tripticaseina (Bioxon), identificadas con el número progresivo que les fue asignado según el turno de recolección de la muestra a cada canino.

Se obtuvieron 5 cepas provenientes de otros tantos casos clínicos remitidos al laboratorio DIVET®, que contaban con la siguiente reseña: hembra pastor Alemán de 8 años, hembra Bóxer de 2 meses de edad, macho Pastor Alemán de 10 años de edad, macho Dogo de Burdeos 8 meses de edad y hembra Beagle.

2.- TRABAJO DE LABORATORIO

El sembrado, pruebas bioquímicas, producción de toxina mediante líneas celulares Vero cubiertas con agar, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), Cuantificación de la toxina en línea celular Vero y serología se realizaron en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación en Salud Animal UMISA de la siguiente forma:

2.1 Aislamiento

1.- En el primer aislamiento las muestras de heces recolectadas y las cepas que fueron proporcionadas por el laboratorio DIVET® se sembraron directamente en Agar Eosina

Azul de Metileno (EMB) (Bioxon) dejándose incubar a 37°C por 24 h.

2.- El segundo aislamiento fue seleccionando cinco colonias con las características sugestivas de *Escherichia coli* y se sembraron en Agar Soya Trypticaseina (Bioxon) dejándose incubar a 37°C durante 24 h, a cada colonia se le asignó una clave para identificarlas posteriormente.

2.2 Pruebas bioquímicas

A cada una de las cinco colonias sembradas se les realizó la tinción de Gram, prueba de la Catalasa (Difco), Oxidasa (Bioxon) y las siguientes pruebas bioquímicas:

- a) TSI (Merck)
- b) MIO (Difco)
- c) LIA (Bioxon)
- d) MR- VP (Bioxon)
- e) Urea (Bioxon)
- f) Citrato (Difco)
- g) Sorbitol (Sigma)

Incubándose todas a 37°C por 24 h, con las cuales se determinó el género y especie mediante la ubicación en las tablas de clasificación de Enterobacterias (Cowan S. 1979; Krieg N. 1984; Mac Faddin, 1993) y se desecharon las que no poseían características de *Escherichia coli*.

2.3 Conservación de cepas

Las cepas identificadas bioquímicamente como *Escherichia coli* fueron sembradas por duplicado, en tubos de ensaye estériles con agar soya tripticaseina y con tapón de hule, identificándose con el número y letra progresivo que les fue asignado a cada cepa.

2.4 Técnica en líneas celulares Vero cubiertas con agar para producción de toxina

De las cepas que resultaron identificadas como *Escherichia coli* en las pruebas bioquímicas que se realizaron, estas fueron seleccionadas para determinar la producción de toxina en células Vero. Tomando grupos de diez cepas para la detección de la toxina, siguiendo el procedimiento descrito por Zamora y col., 2000, células Vero cultivadas en MEM, suplementado con suero fetal bovino al 10%, empleando microplacas de 12 pocillos. La línea celular Vero fue donada por el laboratorio de Citología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan a continuación se describe la técnica:

- Se inocularon 2ml de cultivo celular por pocillo,
- La incubación de la microplaca se realizó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 - 48h hasta la formación de la monocapa celular.
- A continuación se removió el medio de cultivo.
- Luego se cubrió la monocapa celular con 2ml de una solución compuesta de Medio Esencial Mínimo (MEM), suero fetal bovino al 10% y agar purificado al 1%. Este paso se realizó a una temperatura de 45° C
- Una vez solidificada y enfriada la capa de agar arriba mencionada a temperatura ambiente, se sembró en cada pocillo una colonia de *E. coli* se procedió a incubar a 37°C con el método de tensión parcial de CO₂ por 72h.
- Cada 24h se observaron con microscopio invertido para determinar la presencia de lesiones en las células Vero
- Como control positivo se utilizo la cepa EDL933 Δ ler y como control negativo la cepa K12 C600 ambas donadas por el Dr. Guillermo Valdivia de la FES-C.

2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

Se realizo la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR multiplex con cada uno de los diez grupos, esto se hizo con el objetivo de que si alguno de los grupos resultaba negativo a los genes incluidos (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) se descartarían las diez cepas pertenecientes a dicho grupo. Ahorrando de este modo tiempo y reactivos, a los grupos que resultaron positivos se procedió a realizar el PCR individual a cada una de las cepas, la técnica utilizada fue siguiendo la metodología de López y col. 2003, la cual se describe a continuación:

- Las cepas se sembraron en agar soya tripticaseina (24h a 37°C)
- Como control positivo se uso la cepa EDL 933Δ ler y como control negativo la cepa K12 C600.
- Se procedió a tomar de la siembra una asada considerable del cultivo y se deposito en tubos Eppendorf con 1 ml de agua destilada
- La liberación del ADN se realizó por lisis celular mediante ebullición en baño

maría durante 10 minutos

- Se colocaron durante 10 minutos en hielo para precipitar las proteínas
 - Se centrifugaron a 14000 rpm/2min. Se agregaron los primers y reactivos en concentraciones adecuadas como se muestra en el cuadro 4.
 - Se colocaron en el termociclador PTC – 100 (MJ Research, Inc).
 - Se dejaron correr los ciclos en el termociclador y los parámetros utilizados fueron los siguientes:
 1. 5 min a 94°C desnaturalización
 2. 2 min a 50°C alineación
 3. 0.45 min a 72°C extensión
 4. 0.45 min a 94°C desnaturalización
 5. 0.45 min a 50°C alineación
 6. 10 min a 72° extensión
- } 35 repeticiones (3, 4 y 5)
- Se preparo el gel de agarosa al 2%
 - Se deposito el amplificado en el gel
 - Se dejo correr a 87 amperes durante 30 min
 - Se retiro de la cámara y se deposito en bromuro de Etidio a una concentración de 10mg/ml durante 15 min.
 - Por último se visualizo en trasluminador.

En el cuadro 3 se muestran las secuencias utilizadas para la técnica de PCR multiplex.

CUADRO 3

INICIADORES UTILIZADOS PARA LA TÉCNICA DE PCR

Gen	Primers	Pares de bases	Amplificación
<i>eaeA</i>	F:5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3' (6) R:5' CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3' (6)	20 20	384
<i>Stx1</i>	F:5' CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3' (6) R:5' AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3' (6)	22 21	150
<i>stx2</i>	F:5' GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3' (6) R:5' TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3' (6)	21 22	255

CUADRO 4

REACTIVOS EMPLEADOS PARA UNA REACCIÓN TOTAL DE 25 μ l

Reactivo	Concentración	Cantidad para una reacción (Mezcla final 25 μ l)
Buffer (10mM Tris HCl, 50 mM KCl)	10X	2.5 μ l
MgCl ₂	50mM	1 μ l
dNTPs (Mix)	200 μ M	2 μ l
*Oligos	-----	3.5 μ l
H ₂ O (pPCR)	-----	13.8 μ l
Tac pol	-----	0.2 μ l
DNA (Probl.)	-----	2 μ l
Total		25 μ l

2.6 Técnica en líneas celulares Vero para cuantificación de la toxina

De las cepas positivas a cualquiera de los tres genes solo fueron seleccionadas diecinueve, esto se hizo al tomar una cepa por canino muestreado a las cuales se les realizo la cuantificación de las toxinas en líneas celulares Vero, se procedió según la técnica empleada por Valdivia A. G. 1995, con ligeras modificaciones:

- Se inocularon las cepas de *E. coli* en 5 ml. de caldo soya tripticaseina.
- Se incubaron 18h a 37°C
- Se centrifugaron a 10° C a 5000 rpm por 20 min.
- El sobrenadante fue filtrado. Se utilizó un filtro de 0.22 μ de poro (Millipore).
- Con este filtrado se hicieron diluciones en fosfatos (PBS) de 10⁻¹ a 10⁻⁶
- En microplacas de Elisa de 96 pozos fueron agregados 100 μ l de MEM al 5% conteniendo células Vero las cuales se incubaron en una atmósfera húmeda con una inyección de CO₂, hasta tener una confluencia de cultivo celular al menos del 80% a estas células posteriormente se les retiró el medio y se inocularon adicionando 100 μ l del filtrado, dejando 1 pozo control negativo con fosfatos (PBS) y un control positivo con la cepa EDL933 Δ ler.
- En todos los pozos se adicionó una gota de MEM con 2.5% de suero fetal bovino
- Se incubaron 24h en tensión parcial de CO₂ a 37° C y posteriormente se leyeron

los efectos de la toxina a las 24 ,48 y 72 h.

2.7 Serología

Para la serología se utilizo la técnica de aglutinación directa. A las 19 cepas seleccionadas se les realizó la prueba, la técnica fue la siguiente:

- Se inocularon las cepas de *E. coli* en 5 mL de caldo soya tripticaseina.
- Se incubaron 18h a 37°C
- Se centrifugaron a 10° C a 5000 rpm por 20 min.
- Se retiro el sobrenadante
- Se tomaron 0.2 µl del sedimento
- Posteriormente se utilizaron placas de aglutinación en las cuales se les agregó 0.2 µl del sedimento y 0.2 µl del suero polivalente (cuadro 5). Por último se observo la aglutinación en el microscopio compuesto.

CUADRO 5

SUEROS POLIVALENTES UTILIZADOS

Serunam Polivalente anti <i>Escherichia coli</i> STEC/EPEC	Serunam Polivalente anti <i>Escherichia coli</i> EHEC	Suero anti- <i>Escherichia coli</i> O157:H7
026 0103 0111 0145 0157	02 05 026 0103 0111,0145,0157	O157

Donados por el Dr. Alejandro Cravioto y el M en C Armando Navarro del laboratorio de Serologia de Medicina de la UNAM.

2.8 Análisis Estadístico

Se realizó la prueba estadística de chi cuadrada (χ^2) a las cepas que resultaron positivas a alguno de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) correlacionados con la presencia de diarrea en los caninos muestreados. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Plus versión- 4

RESULTADOS

1.- Aislamiento

Del primer aislamiento resultaron un total de cien cepas y de estas se descartaron siete cepas por estar contaminadas y no poder recuperarse.

Dando como resultado de los aislamientos, noventa y tres cepas del muestreo más veinticinco cepas que se obtuvieron de casos clínicos que fueron remitidos a DIVET®, arrojando un total de ciento dieciocho cepas.

2.- Pruebas Bioquímicas

Resultando solo noventa y cuatro cepas positivas a *Escherichia coli*, las veinticuatro cepas restantes fueron *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, como se puede observar en el cuadro 6.

CUADRO 6

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Bacterias	Número de cepas	Porcentaje de cepas
<i>Escherichia coli spp</i>	94	79.7
<i>Klebsiella spp</i>	10	8.5
<i>Enterobacter spp</i>	9	7.6
<i>Proteus spp</i>	5	4.2
Total	118	100

Las noventa y cuatro cepas de *Escherichia coli* fueron agrupadas de acuerdo a las características más importantes como se muestra en el cuadro 7.

CUADRO 7

BIOTIPOS DE LAS 94 CEPAS DE *Escherichia coli*

Sorbitol	Descarboxilación Lisina	Descarboxilación ornitina	Motilidad	Número de cepas (%)
+	+	+	+	32 (34.0)
+	+	+	-	21 (22.4)
+	-	+	+	6 (6.4)
+	-	+	-	4 (4.3)
-	+	+	+	0
+	+	-	+	18 (19.1)
+	-	-	+	0
+	+	-	-	10 (10.6)
+	-	-	-	1 (1.1)
-	+	-	+	2 (2.1)
Total de cepas				94 (100)

3.- Resultados de producción de toxina.

A las noventa y cuatro cepas *Escherichia coli* se les realizó la prueba para producción de toxina en líneas celulares Vero como se puede observar en el cuadro 8, tomando grupos de diez con excepción del grupo diez que solo contaba con cuatro cepas. Se observó que veintiséis (27.6%) no mostraron ningún efecto toxico quedando, treinta y cuatro con efecto citolítico (36.2%) y treinta y cuatro con efecto citotónico (36.2%).

4.- Reacción en Cadena de la Polimerasa en grupos de 10

En esta prueba se trabajó con las noventa y cuatro cepas, se tomaron grupos de diez de los cuales todos resultaron tener los tres genes de la toxina o alguno de los tres (*stx1*, *stx2* y *eaeA*), dos de los grupos contenían los tres genes y los ocho restantes solo contenían dos de cualquiera de los tres genes de la toxina como se puede observar en el cuadro 9, lo anterior se hizo con el afán de ahorrar tiempo, pero los resultados obtenidos no permitieron descartar ningún grupo ya que todos resultaron contener alguno de los tres genes por lo que los resultados que se obtuvieron no fueron del todo concluyentes, por lo tanto se procedió a realizarles el PCR multiplex a cada una de las noventa y cuatro cepas.

5.- Resultados del PCR Multiplex por cepa

Posteriormente se realizó la técnica de PCR multiplex de manera individual para cada cepa obteniendo que de noventa y cuatro cepas treinta y seis no poseían ninguno de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*), quedando positivas a los tres o a uno de los tres genes solo cincuenta y ocho cepas, con dichos resultados se procedió a calcular los porcentajes y el número de cepas positivas a los genes como se muestra en el cuadro 10.

6.- Datos de archivo de los casos clínicos de DIVET®

De los cinco casos clínicos solo cuatro cepas resultaron positivas a *Escherichia coli* portadora de cualquiera de los tres genes, las muestras se obtuvieron de las pruebas que se realizaron en DIVET® una de un coprocultivo y las tres restantes de necropsias, obteniendo las muestras directamente de intestino delgado, en el cuadro 11 se muestran datos obtenidos de los archivos, de cada caso clínico.

7.- Cuantificación de la toxina

De las cincuenta y ocho cepas positivas a cualquiera de los tres genes solo fueron seleccionadas diecinueve, y la selección se hizo de la siguiente manera: de los quince caninos que resultaron positivos a cepas *Escherichia coli* portadoras de cualquiera de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*), solo se seleccionó una cepa representativa por cada canino y de los cuatro casos clínicos de DIVET® se seleccionó una cepa de cada uno, siendo evaluadas quince cepas de caninos muestreados más cuatro cepas de los casos clínicos de DIVET®, dando un total de diecinueve cepas a las cuales se les realizó la cuantificación de la toxina, como se muestra en el cuadro 12.

8.- Resultados de la Serología

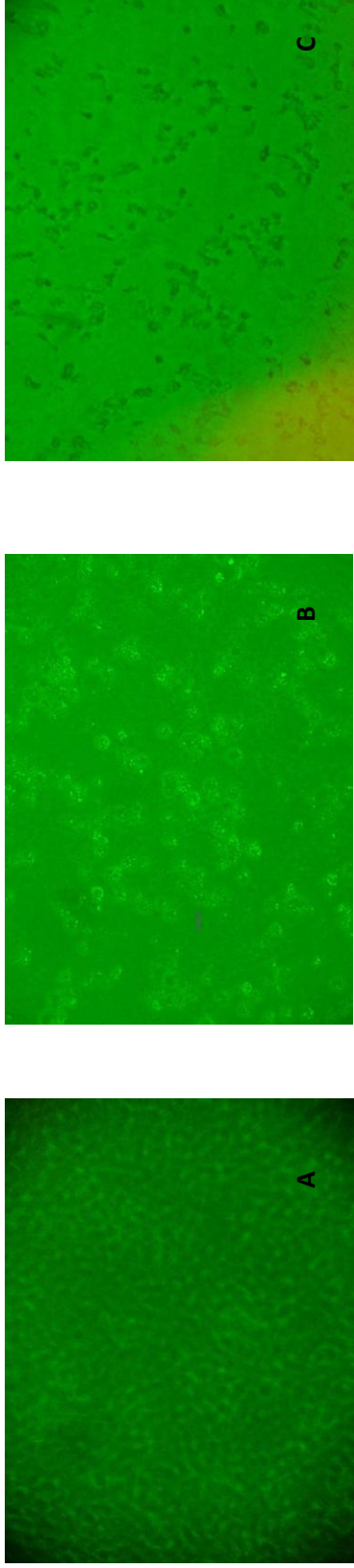
Con el mismo grupo de diecinueve cepas se realizó la serología para los serogrupos (STEC y EHEC) dando como resultado solo una positiva al serogrupo STEC y una positiva al serogrupo EHEC, solo a esta última se le realizó la serología para EHEC O157:H7 resultando negativa a dicho serotipo, como se muestra en el cuadro 13 las diecisiete cepas restantes fueron negativas a cualquiera de los dos serogrupos.

CUADRO 8

EFECTO CITOPÁTICO SOBRE CELULAS VERO DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*

GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4		GRUPO 9	
Cepa	Efecto Toxico	Cepa	Efecto Toxico	Cepa	Efecto Toxico	Cepa	Efecto Toxico	Cepa	Efecto Toxico
DI1a	citofítico	EE4c	s/cambios	EE6c	citotónico	EE8c	citofítico	EE22e	citotónico
DI1b	citofítico	EE4d	s/cambios	EE6d	s/cambios	EE8d	s/cambios	DI23a	citofítico
DI1c	citofítico	EE4e	citofítico	EE6e	citotónico	EE8e	citofítico	DI23b	citofítico
DI2a	citotónico	EE5a	s/cambios	EE7a	s/cambios	EE9a	s/cambios	DI23c	citofítico
DI2c	citotónico	EE5b	s/cambios	EE7b	citotónico	EE9c	citotónico	DI23d	citofítico
EE3b	citofítico	EE5c	s/cambios	EE7c	citofítico	EE9d	citotónico	DI23e	citofítico
EE3c	citofítico	EE5d	citotónico	EE7d	citofítico	EE9e	citofítico	DI24a	citofítico
EE3e	citofítico	EE5e	s/cambios	EE7e	s/cambios	EE10a	citofítico	DI24b	s/cambios
EE4a	s/cambios	EE6a	s/cambios	EE8a	s/cambios	EE10b	citofítico	DI24c	citofítico
EE4b	s/cambios	EE6b	s/cambios	EE8b	s/cambios	EE10c	s/cambios	DI24d	citofítico
GRUPO 5		GRUPO 6		GRUPO 7		GRUPO 8		GRUPO 10	
EE10e	citotónico	EE15c	citotónico	EE18a	citotónico	EE20b	s/cambios	DI24e	citofítico
EE11a	citofítico	EE15d	citotónico	EE18b	citotónico	EE20c	citofítico	DI25a	citofítico
EE11b	citotónico	EE15e	citotónico	EE18c	citotónico	EE20d	citotónico	DI25b	citofítico
EE11c	s/cambios	EE16a	s/cambios	EE18d	citotónico	EE20e	citotónico	DI25d	citofítico
EE11d	citotónico	EE16d	s/cambios	EE18e	citotónico	EE21a	s/cambios		
EE11e	citofítico	EE17a	s/cambios	EE19a	citotónico	EE21d	citotónico		
EE12a	citotónico	EE17b	citofítico	EE19b	citotónico	EE22a	citotónico		
EE12b	citofítico	EE17c	citofítico	EE19c	citotónico	EE22b	citotónico		
EE15a	citotónico	EE17d	citofítico	EE19d	citotónico	EE22c	citotónico		
EE15b	citotónico	EE17e	citofítico	EE20a	s/cambios	EE22d	citotónico		

FIGURA 1
IMÁGENES DEMOSTRATIVAS DE LA PRUEBA PARA PRODUCCIÓN DE TOXINA EN LÍNEA CELULAR VERO
CUBIERTAS CON AGAR



Se puede observar A) células Vero sin inocular se observa que la monocapa celular esta completa. B) células Vero inoculadas con la cepa EE18e se observa que hay daño citotónico. C) células Vero inoculadas con la cepa DI25a se observa que hay daño citolítico.

CUADRO 9

**RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX EN LOS GRUPOS DE
*Escherichia coli***

Grupo	Cepas	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>
1	DI1a, DI1b, DI1c, DI2a, DI2c, EE3b, EE3c, EE3e, EE4a, EE4b.	+	-	+
2	EE4c, EE4d, EE4e, EE5a EE5b, EE5c, EE5d, EE5e EE6a, EE6b	+	-	+
3	EE6c, EE6d, EE6e, EE7a EE7b. EE7c, EE7d, EE7e EE8a, EE8b	+	+	-
4	EE8c, EE8d, EE8e, EE9a EE9c, EE9d, EE9e, EE10a EE10b, EE10c	+	+	+
5	EE10e, EE11a, EE11b, EE11c EE11d, EE11e, EE12a, EE12b EE15a, EE15b	+	+	-
6	EE15c, EE15d, EE15e, EE16a EE16d, EE17a, EE17b, EE17c EE17d, EE17e	+	+	+
7	EE18a, EE18b, EE18c,EE18d EE18e, EE19a, EE19b, EE19e EE19d, EE20a	+	-	+
8	EE20b, EE20c, EE20d, EE20e EE21a, EE21d, EE22a, EE22b EE22c, EE22d	+	-	+
9	EE22e, DI23a, DI23b, DI23c DI23d, DI23e, DI24a, DI24b DI24c, DI24d	+	-	+
10	DI24e, DI25a, DI25b DI25d	+	+	-

CUADRO 10

GENOTIPOS DE *Escherichia coli* ENCONTRADOS POR LA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX

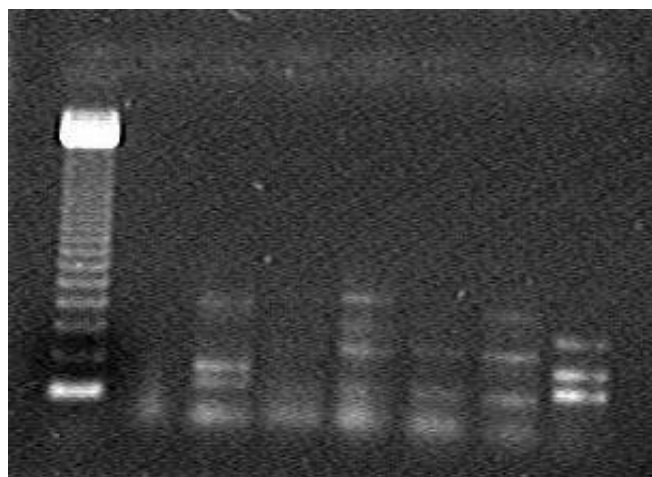
Genes	No. de cepas	% de cepas	
<i>stx1, stx2, eaeA</i>	4	4.2	Total de positivas 61.7
<i>stx1, stx2</i>	11	11.7	
<i>stx1, eaeA</i>	16	17.0	
<i>stx2</i>	1	1.1	
<i>stx1</i>	26	27.7	
Negativo a los genes	36	38.3	38.3
Total	94	100	

Con los resultados del cuadro 10 se observó que de los veinticinco caninos muestreados solo diecinueve (76.0%) resultaron ser portadores de cepas *Escherichia coli* que poseían cualquiera de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) y seis (24.0%) de los caninos no portaron cepas con ninguno de los genes buscados.

FIGURA 2

PCR MULTIPLEX DE ALGUNAS DE LAS CEPAS DE *E. coli* ENSAYADAS

M 1 2 3 4 5 6 7



Línea 7 control positivo con los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*), líneas 2, 4 y 6 cepas positivas a los tres genes identificadas como EE8c, EE9e y EE10b respectivamente.

CUADRO 11

DATOS DE ARCHIVO DE DIVET® DE LOS CASOS TRABAJADOS

Identificación	Reseña	Obtención de la muestra	Diagnóstico
DII	Canino hembra Boxer 2 meses,	Coprocultivo	Flora bacteriana normal
DI23	Canino macho Dogo de Burdeos 8 meses	Necropsia (intestino delgado)	Hepatitis aguda, Glomérulo nefrosis moderada, Neumonía intersticial, Enteritis supurativa
DI24	Canino Hembra beagle	Necropsia (intestino delgado)	Enteritis hemorrágica proliferativa severa, Congestión generalizada
DI25	Canino Hembra Pastor Alemán 8 años	Necropsia (intestino delgado)	Septicemia severa, Exudados generalizados, Choque séptico, Coagulación intravascular diseminada.

CUADRO 12

**CUANTIFICACIÓN DE Stx PRODUCIDAS POR LAS CEPAS DE
Escherichia coli SOBRE CÉLULAS VERO**

PROCEDENCIA DEL CANINO MUESTREADO	CEPA	Título obtenido UCCC/100µl	PRODUCCIÓN DE LA TOXINA (% de cepas)
	Control negativo PBS	-	
	Control positivo EDL933 Δ ler	10 ⁶	
1 DIVET®	DI1b*	10 ²	BAJAS PRODUCTORAS (84.2)
3 albergue	EE3c*	10 ²	
4 albergue	EE4e *	Directo	
6 albergue	EE6e *	10 ¹	
7 albergue	EE7d *	10 ²	
8 albergue	EE8c *	10 ²	
11 albergue	EE11e *	10 ¹	
15 albergue	EE15e*	10 ¹	
17 albergue	EE17c *	10 ²	
18 albergue	EE18c *	10 ¹	
19 albergue	EE19b *	10 ¹	
20 albergue	EE20c (STEC)	Directo	
21 albergue	EE21d *	10 ¹	
22 albergue	EE22d *	Directo	
23 DIVET®	DI23e *	10 ²	
24 DIVET®	DI24e *	10 ²	
9 albergue	EE9e*	10 ³	MEDIANAS PRODUCTORAS (10.5)
10 albergue	EE10b*	10 ³	
25 DIVET®	DI25a (EHEC)	10 ⁶	ALTAS PRODUCTORAS (5.3)

UCCC = Unidad citotóxica en cultivo celular

* No reaccionaron con ninguno de los dos sueros empleados.

CUADRO 13

SEROGURPOS DE *Escherichia coli* ENCONTRADOS

CEPA	STEC*	EHEC*
DI1b	-	-
EE3c	-	-
EE4e	-	-
EE6e	-	-
EE7d	-	-
EE8c	-	-
EE9e	-	-
EE10b	-	-
EE11e	-	-
EE15e	-	-
EE17c	-	-
EE18c	-	-
EE19b	-	-
EE20c	+	-
EE21d	-	-
EE22d	-	-
DI23e	-	-
DI24e	-	-
DI25a	-	+

*El suero STEC contenía los siguientes serogrupos: O26, O103, O111, O145, O157.

*El suero EHEC contenía los siguientes serogrupos: O2, O5, O26, O103, O111, O145, O157.

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas (producción de toxina sobre líneas celulares Vero cubiertas con agar, PCR multiplex, cuantificación de la toxina en líneas celulares Vero y serología), fueron agrupados como se muestra en el cuadro 14.

CUADRO 14

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS, FENOTÍPICAS Y SEROTIPOS DE LAS
CEPAS DE *E. coli* TRABAJADAS**

Cepa	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	Efecto toxico	Cuantificación de la toxina UCCC/100µl	Serotipo STEC/EHEC	
D11b	+	-	-	Citolítico	10 ²	-	-
EE3c	+	-	+	Citolítico	10 ²	-	-
EE4e	+	-	+	Citolítico	Directo	-	-
EE6e	+	+	-	Citotonico	10 ¹	-	-
EE7d	+	+	-	Citolítico	10 ²	-	-
EE8c	+	+	+	Citolítico	10 ²	-	-
EE9e	+	+	+	Citolítico	10 ³	-	-
EE10b	+	+	+	Citolítico	10 ³	-	-
EE11e	+	+	-	Citolítico	10 ¹	-	-
EE15e	+	-	+	Citotonico	10 ¹	-	-
EE17c	+	-	+	Citolítico	10 ²	-	-
EE18c	+	-	-	Citotonico	10 ¹	-	-
EE19b	+	-	+	Citotonico	10 ¹	-	-
EE20c	+	-	+	Citolítico	Directo	+	-
EE21d	+	-	+	Citotonico	10 ¹	-	-
EE22d	+	-	+	Citotonico	Directo	-	-
D123e	+	-	+	Citolítico	10 ²	-	-
D124e	+	+	-	Citolítico	10 ²	-	-
D125a	+	+	-	Citolítico	10 ⁶	-	+

UCCC = Unidad citotóxica en cultivo celular

9.- Análisis estadístico

Se procedió a realizar el análisis estadístico mediante la prueba de chi cuadrada (χ^2) de los casos con diarrea y sin diarrea, asociados a los genes de virulencia de todos los caninos muestreados como se muestra en el cuadro 15 y la grafica 1.

CUADRO 15

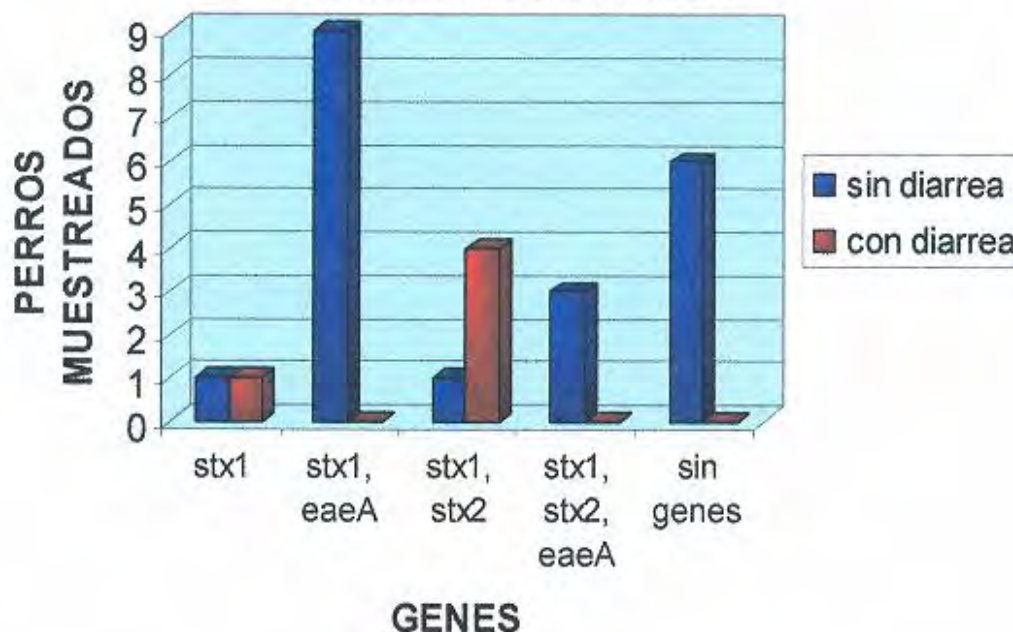
NÚMERO Y PORCENTAJE DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *E. coli* CORRELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE DIARREA

GENES	SIN DIARREA (%)	CON DIARREA (%)	TOTAL DE CANINOS MUESTREADOS (%)
<i>stx1</i>	1 (4.0)	1 (4.0)	2 (8.0)
<i>stx1, eaeA</i>	9 (36.0)	0 (0)	9 (36.0)
<i>stx1, stx2</i>	1 (4.0)	4 (16.0)	5 (20.0)
<i>stx1, stx2, eaeA</i>	3 (12.0)	0 (0)	3 (12.0)
Sin genes	6 (24.0)	0 (0)	6 (24.0)
TOTAL	20 (80.0)	5 (20.0)	25 (100)

La prueba de χ^2 encontró que la combinación de los genes y el cuadro clínico fueron significativamente dependientes ($p < 0.01$).

GRAFICA

ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA CON LA PRESENCIA DE DIARREA



DISCUSIÓN

Aislamientos

De las ciento dieciocho cepas que resultaron de los aislamientos en agar EMB, 79.7% resultaron positivas a *Escherichia coli* en las pruebas bioquímicas, las restantes fueron 8.5% *Klebsiella spp.*, 7.6% *Enterobacter spp* y 4.2% *Proteus spp* dando un total de 20.3% como se puede observar en el Cuadro 6, esto nos indica que el agar EMB es un medio con un grado diferencial escaso y que el brillo metálico no es característico de *Escherichia coli*, esto concuerda con lo postulado por Coria y col. 2006, quienes mencionaron que el agar eosina azul de metileno (EMB) es un medio de cultivo selectivo y diferencial con grado de selectividad escaso y Hernández 2004, mencionó que *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* forman colonias con brillo metálico en el citado medio.

Pruebas bioquímicas

De las noventa y cuatro cepas que resultaron positivas a *Escherichia coli* en las pruebas bioquímicas solo el 2.1 % fue sorbitol negativo como se muestra en el Cuadro 7, con estos resultados se dedujo que probablemente las posibilidades de aislar *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) serían escasas ya que Huguet y col. 2002; López y col. 2002, mencionan que las primeras pruebas presuntivas son las bioquímicas, demostrándose la incapacidad de muchas cepas de EHEC de fermentar el sorbitol y que por lo tanto en dichas cepas predominan las sorbitol negativo. El porcentaje más alto fue para las cepas sorbitol positivo 97.9% de las cuales cuatro de ellas resultaron ser portadoras de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) cuadro 7 y 10, Nataro y Kaper 1998, mencionan que el fenotipo sorbitol negativo es una característica que posee la mayoría de las cepas de EHEC O157:H7

Producción de toxina

En los resultados obtenidos el efecto de la toxina sobre la línea celular Vero el 27.6% de las cepas no produjo efecto toxico, mientras que el 36.2% produjo efecto citotónico y el 36.2% efecto citolítico (cuadros 8), estos resultados sugieren que el daño citotónico, podría ser causado por la toxina LT mientras que el daño citolítico por las toxinas *stx1* y *stx2*. Esto

coincide con Zamora y col. 2000, quienes mencionan que las alteraciones por LT se caracterizan por un efecto citotónico, las células están aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se observan prolongaciones filamentosas. En cambio, la toxina VT tienen efecto citolítico las células se redondean con notables y extensivos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente con el tiempo de incubación, produciendo la muerte celular. Probablemente las cepas que produjeron daño citotónico no pertenecen al grupo de las cepas STEC o que efectivamente fueran dichas cepas pero que también tendrían los genes que codificaran para la toxina LT u otras toxinas que produjeran dicho daño como se muestra en el cuadro 16 ya que Valdivia, 1995, menciona que dicho daño puede deberse al factor citotóxico de necrosis (CNF) o efectivamente a la presencia de la toxina LT, en otros trabajos realizados por Osek y Weiner 2002., Scott y Kaper 1994, mencionan que algunas cepas de *Escherichia coli* expresan la toxina dilatadora citoletal (CDT) que causa elongación de las células de ovario de hamster chino (CHO) a las 24h seguida por distensión celular progresiva y muerte a las 120h y que una citotoxicidad y distensión similar se observa en células HeLa, HEP-2 y las células Vero, la elongación inicial es indistinguible de la que es causada por la toxina LT. En el presente trabajo la observación de los cultivos sobre las líneas celulares Vero fueron a las 24, 48 Y 72h por lo que no se pudo descartar la posibilidad de que en estas cepas estuvieran presentes los genes de algunas de las toxinas antes mencionadas. En cuanto a las cepas que no tuvieron efecto tóxico se podría suponer que es por la carencia de los genes de dichas toxinas, pero también se podría deber a que los genes están presentes pero no se expresan.

CUADRO 16

TOXINAS INVOLUCRADAS EN LOS EFECTOS TÓXICOS SOBRE LÍNEA CELULAR VERO CUBIERTA CON AGAR

Efecto toxico	No. de cepas	%de cepas	Toxinas que podrían estar involucradas
Citolítico	17	18.1	36.2 stx 1, stx2
Citotónico-Citolítico	17	18.1	
Citotónico	34	36.2	LT, CDT, CNF,
Sin efecto	26	27.6	Neg. toxinas (verotoxinas)
TOTAL	94	100	

En base a lo referido por Zamora y col. 2000; Valdivia, 1995; Scott y Kaper 1994; Osek y Weiner 2002.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex individual

En esta prueba, de las noventa y cuatro cepas el 38.3% resultaron ser negativas a cualquiera de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*), mientras que el 61.7% contenían los tres o alguno de los tres genes Cuadro 10 y Figura 2. Pasando dichos resultados a los veinticinco caninos muestreados el 76.0%, resultaron ser portadores de cepas *Escherichia coli* que poseían cualquiera de los tres genes y el 24.0% resultaron ser negativos a dichas cepas, lo que demostró que el porcentaje de caninos portadores de cepas *Escherichia coli* que poseían cualquiera de los tres genes era alto, dicho porcentaje pudo deberse a que probablemente antes de ingresar al albergue estos caninos fueron alimentados con una dieta que contenía carne cruda la cual pudo haber estado contaminada con dicha cepa, esto no se pudo corroborar ya que los caninos que fueron muestreados en dicho lugar carecían de historia clínica. En el trabajo realizado por Freeman y Michel 2001, encontraron que de tres dietas caseras para caninos que contenían carne cruda una de ellas resultó positiva a *E. coli* O157:H7. Considerando que en México son pocos los estudios realizados en caninos y su relación con cepas productoras de las toxinas *stx1* y *stx2*, ya que en países como Argentina si se han realizado este tipo de estudios en dicha especie y en el cual los resultados contradictorios al presente trabajo son los reportados por Fernández y col. 2006, quienes reportaron en su trabajo que en ninguna de las sesenta muestras de caninos que procesaron se detectaron los genes que codifican para VT1 (*stx 1*) y/o VT2 (*stx2*), independientemente de la condición racial, edad, sexo o tipo de alimentación recibida y que en perros con cuadros de gastroenteritis los resultados también fueron negativos. En otro estudio realizado en Berlín por Beutin y col. 1993, encontraron que las cepas de VTEC (STEC) también pueden estar presentes en caninos sanos, mostrando en sus resultados que de sesenta y tres perros muestreados solo 4.8% resultaron ser portadores de dicha cepa.

Cuantificación de la toxina

En cuanto a las pruebas de la cuantificación de la toxina en las diecinueve cepas aisladas de los caninos, resultó que el 84.2% fueron bajas productoras de toxina, el 10.5% fueron medianas productoras de toxinas y solo una cepa resultó ser alta productora de toxina 5.3%, esto concuerda con la clasificación dada por O'Brien y col. 1982, el cual clasifica a las *Escherichia coli* productoras de Shiga toxina como: bajas, medianas y altas

productoras de toxinas. En el presente trabajo solo una cepa resultó ser EHEC no-O157 la cual resulto alta productora de toxina como se puede observar en los Cuadro 12 y 13, esto coincide con lo mencionado por Witthan y col. 1988., Karmali 1989, quienes postulan que las cepas EHEC son consideradas como altas productoras de verotoxinas.

Serología

De las diecinueve cepas solo dos resultaron positivas, una al serogrupo STEC y otra al serogrupo EHEC no-o157 Cuadro 13, con estos resultados no se pudo descartar la posibilidad de que las diecisiete cepas restantes pertenecieran a los mencionados serogrupos, ya que en los sueros empleados se incluían pocos serotipos y que la mayoría de ellos se repetían en ambos sueros, Calderwood y col. 1996, mencionan que *E. coli* O 157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de *E. coli* (O26:H11; O103:H2; O111:NM; O113:H21; O145:NM; entre otros) que comparten el mismo potencial patogénico y que los serotipos de STEC asociados a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC: enterohemorrhagic *E. coli*).

Características Genotípicas, Fenotípicas y Serogrupos

Se reunieron todos los resultados de las pruebas realizadas cuadro 14, se pudo observar que probablemente el poseer los genes no implica que las cepas causen daños esto podría ser por factores tales como, que dichos genes no se expresen, que la mayoría de las cepas aisladas fueron bajas productoras de toxina Stx y que posiblemente carezcan de otros genes de virulencia como los mencionados en el cuadro 17.

Lo anterior coincide con lo mencionado por Garza y col. 2001, los cuales postulan que conviene señalar que los términos VTEC y STEC son equivalentes, ya que ambos se refieren a cepas de *E. coli* productoras de una o más toxinas de la familia *Stx*; pero que no está claro que la sola posesión de los genes *stx* confieran patogenicidad, dado que puede persistir la ausencia de otros factores de virulencia. Nataro y Kaper 1998, refieren que a través de muchas discusiones y consensos científicos se ha establecido que la definición de una típica EHEC es aquella *Escherichia coli* que presenta principalmente toxina shiga, es capaz de producir el fenómeno de "attaching and effacing" (presentan el gen *eaeA*) y lleva

un plásmido p0157 de 60 Mda (el cual lleva el gen de la enterohemolisina).

Casos clínicos de DIVET® positivos a cepas que contenían los genes de stx

En los tres casos remitidos al laboratorio DIVET® para practicarles la necropsia en la cual la reseña y el diagnóstico se pueden observar en el Cuadro 11, el caso identificado como (DI25) dio positivo a *Escherichia coli* enterohemorrágica no O157 (EHEC no-O157) cuadro 13, en éste caso se puede observar que hubo una septicemia severa la cual progresó a choque séptico el cual probablemente pudo haber sido causado por las endotoxinas (LPS), al provocar un cuadro de inflamación y por consiguiente que aumentara la permeabilidad, permitiendo de este modo que otras bacterias invadieran vasos sanguíneos de la lamina propia intestinal y junto con las toxinas stx1 y stx2 de la cepa EHEC provocaran el cuadro antes mencionado, el sinergismo de los LPS y las toxinas (Stx) posiblemente causaron daño al endotelio vascular desencadenando con esto la coagulación intravascular diseminada (CID), esto coincide con el modelo animal realizado por García 1990, en el que administraron cultivos de cepas citotóxicas en un segmento aislado del intestino delgado y se mantuvo durante 14 días y en el cual los caninos desarrollaron diarrea, en algunos casos hemorrágica y coagulación intravascular entre otras cosas, también propusieron que la bacteria y la toxina se incorporan al torrente sanguíneo causando en primera instancia daño a células sanguíneas. Tzipori y col. 1988, menciono que en un modelo en cerdos gnotobiontes, presentaron algunas cepas EHEC penetrando a la mucosa y la lámina propia del intestino El diagnóstico del caso clínico antes mencionado pudiera ser sugestivo a VGRC, aunque no se pudieron obtener más datos por presentar grandes cambios post-mortem.

En el casos del canino identificado como (DI23) hubo enteritis supurativa cuadro 11, la cual pudo haber sido causada por la cepa STEC y la glomérulo nefrosis por la toxina de dicha cepa, en el caso del canino identificado como (DI24) Cuadro 11, la enteritis hemorrágica de igual manera pudo haber sido causada por la cepa STEC que fue aislada de ambos casos esto concuerda con lo reportado por García 1990, mencionando que en dos de los casos inoculados con cepas 933J (productoras de Stx1), presentaron nefrosis moderada, enteritis hemorrágica y congestión severa, en otro estudio realizado por Fenwick

y Cowan, 1998, demostraron que los galgos tuvieron altas concentraciones de Gb3 (receptor específico de las toxinas Stx), en la corteza del riñón y colon.

En el caso identificado como (DI1) Cuadro 11 al canino no se le practicó la necropsia solo fue remitida una muestra fecal al laboratorio DIVET®, la cual dio positivo a cepas de *Escherichia coli* portadoras de los genes de la toxina, la historia clínica de dicho canino no se pudo obtener por lo que faltó información para averiguar si dicha cepa fuera probable que causara algún daño.

Asociación de los genes de virulencia con la presencia de diarrea

La combinación de los genes de las toxinas asociados a diarrea que predominó fueron *stx1* y *stx2* con el 16% y solo 4% de *stx1* como se muestra en el cuadro 15 y la gráfica 1, en el presente estudio se encontró una relación significativa entre la combinación de los genes y la presencia de diarrea ($P < 0.01$), sugiriendo que la combinación de los genes *stx1* y *stx2* en una cepa de *Escherichia coli* sería probablemente la más patógena, pero tendrían que tomarse en cuenta varios factores predisponentes de los caninos muestreados tales como cambios de temperatura, composición y consistencia del alimento, inmunoestatus, presencia de otros agentes infecciosos y la susceptibilidad de los caninos muestreados, en el caso del presente estudio no todos los datos anteriores pudieron ser constatados. En un estudio realizado por Hammermueller y col. 1994, sugirieron que podría existir una posible asociación de la diarrea en perros con la toxina *stx2*, ya que en su estudio observaron que de cuarenta y cinco perros con diarrea la *Escherichia coli* productora de *stx2* estuvo presente en un 22% y no estuvo presente en ningún perro sin diarrea y que solo obtuvieron dos aislamientos con la combinación de los genes de *stx1* y *stx2* en perros con diarrea. Contrario al presente estudio es el postulado por Staats y col. 2003, quienes en sus resultados obtuvieron una asociación significativa entre la toxina de *stx1* y la presencia de diarrea en perros ($p < 0.008$).

CUADRO 17

ELEMENTOS GENÉTICOS QUE CODIFICAN PARA FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS EHEC

Elemento	Fenotipo
Isla de patogenicidad (PAIs)	
LEE	Lesión celular en pedestal <i>AIE</i>
Plásmido de virulencia	
pO157	Hemolisina, proteasa y toxina
Bacteriófagos	
Stx	Toxinas Stx 1 y Stx2
Transposones/ elementos IS	
EASTI IS	Enterotoxina similar a la ST

Tomado y modificado de (Garza y col. 2001).

CONCLUSIONES

- 1.- Se logró aislar una cepas de *E. coli* STEC de un canino sin diarrea y una cepa de *E. coli* EHEC no O157H:7 de un canino con diarrea.
- 2.- Se logró determinar que las cepas que contienen los genes de ambas toxinas (*stx1* y *stx2*) están asociadas significativamente ($p < 0.01$) a caninos con diarrea.
- 3.- En base a los datos de archivo del laboratorio DIVET® se pudo relacionar en tres de los caninos lesiones, atribuidas a cepas *E. coli* STEC o EHEC en riñón e intestino grueso que posiblemente provocaron la muerte.
- 4.- Con base en los resultados de este estudio se presume que los caninos son portadores de cepas STEC y/o EHEC, por lo cual hay la posibilidad de que impliquen un riesgo para la salud pública.
- 5.- Tomando en cuenta que el reservorio principal es el bovino y ya que en México no se han reportado estudios de este tipo en caninos, es necesario que se realicen estudios más amplios en cuanto a zonas geográficas y el papel de las mascotas con sus dueños para identificar el potencial de riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Bell C., Kyriakides A.** 1998. *E. coli*, una aproximación practica al microorganismo y su control en los alimentos. Editorial Acribia, pp. 1-6.
- 2.- **Beutin L., Geier D., Steinüch H., Zimmermann S., Sheutz F.** 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of clinical Microbiology*, 31 (9): 2483-2488.
- 3.- **Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A. & Bernárdez M.I.** 2001. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. Capítulo 21. Manual de Microbiología Veterinaria, S. Vadillo, S. Píriz & E. Mateos. Editorial McGRAW-HILL INTERAMERICANA, Madrid, España, pp.301-325.
- 4.- **Brenes B. F., Naval P. E., Gómez C. J., Cañada M. J., Ródenas A. J., Méndez-Cabeza F. J.** 2003. Manual de evaluación diagnóstica y terapéutica de las infecciones del tracto urinario. Mecanismos de virulencia del germen. Editorial International Marketing & Communications, S. A. (IM&C).
- 5.- **Caldewood S. B., Acheson D. W. K., Keusch G. T., Barrett T. J., Griffin P. M., Strockbine N. A.** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*, 62: 118-119.
- 6.- **Carpenter J. L., Andelman N. C., Moore F. M., King N. W.** 1988. Idiopathic cutaneous an renal glomerular vasculopathy of greyhounds. *Vet. Pathol.* 25: 401-407.
- 7.- **Cicuta E. M., Deza N., Roibón R.W., Benitez C. M., Ramírez V. G., Arzú, R.** 2006. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en medias reses y carnes molidas bovinas. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y tecnológicas. Resumen: V-041.

- 8.- Coria C. R., Cravioto A., Eslava C.C., López V. Y., Tato Z. P., Taylor M. L., Xochihua D. L.** 2006. Coprocultivo: Practicas de bacteriología. Manual departamental de bacteriología. Facultad de medicina, UNAM; p. 67. México.
- 9.- Cowan S. T.** 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia medica. Ed. Continental, segunda edición. pp. 105-107.
- 10.- Fenwick B. W., Cowan L. A.** 1998. Canine model of hemolytic-uremic syndrome. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains, edited by Kaper JB, O'Brien AD, Washington D.C., American Society for Microbiology, pp268 - 277.
- 11.- Fernández D., Etcheverria A. I., Padola N. L., Parma A. E.** 2006. Study of dogs in Tandil's urban-zones as possible carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. In Vet., 8(1): 111-117.
- 12.- Freeman M. L., Michel E. K.** 2001. Evaluation of raw food diets for dogs. Vet. Med. 218(5): 705-709.
- 13.- García C. L. A.** 1990. Empleo del perro como modelo en el Síndrome Urémico Hemolítico. Tesis profesional, FESC, UNAM. México.
- 14.- García T. P.** 2004. Determinación temporal de la expresión de los genes responsables de la formación del pilus Longus en *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), Tesis profesional Universidad de las Américas, Puebla.
- 15.- García A. C.** 2004. Detección del gen stx2 en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Tesis Doctoral Universidad de Barcelona.

- 16.- Garza V. R., Lagos E. L., Mejía Ch. A. G.** 2001. La importancia clínica de los padecimientos ocasionados por EHEC O157:H7 y su diagnóstico de laboratorio, Lab. acta, 13 (12) : 51-59.
- 17.- Hammermueller J., Kruth S., Prescott J., Gyles C.** 1994. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. Vet. Res; 59: 265-270.
- 18.- Hernández C. A.** 2004. Agentes biológicos: Análisis de las muestras. NTP. INSHT. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. España; 9 (18): 611-645.
- 19.- Huguet T. J., Huapaya C. B., Salazar L. E.** 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas Peruanas aisladas entre 1999-2001. Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica, 19 (2).
- 20.- Karmali M.A.** 1989. Infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2(1):15-38.
- 21.- Krieg, N.R., Holt, J.G.** 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1: 414-415.
- 22.- López A. W., Guevara D. J.** 2002. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma, 3 (1) : 38-41.
- 23.- Lopez S. C., Cerna F. J., Villegas S. N., Thompson R., Velásquez R. F., Torres J., Tarr P. I., Estrada G. T.** 2003 Single Múltiplex polimerasa Caín reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases, 9(1): 127-131.
- 24.- Mac Faddin, J. F.** 1993. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Editorial Médica. 2ª. Ed. Editorial Panamericana. pp.294.

- 25.- Mandell G., Bennett J., Dolin R.** 2000. Enfermedades infecciosas principios y prácticas. Editorial Médica Panamericana 5ª edición. (1):30-32, (2):2783-2787.
- 26.- Nataro J. P., Kaper J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev.; 11(1): 142-201.
- 27.- O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson, and S. B. Formal. 1982.** Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli. J. Infect. Dis. 144:763-769.
- 28.- Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).** 2001. IV Reunión de la Red de Vigilancia de Enfermedades Emergentes del Cono Sur. Asunción, Paraguay Disponible en: <http://www.paho.org>
- 29.- Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).** 2002. Food communicable diseases in Uruguay. Montevideo. Disponible en: <http://www.paho.org>
- 30.- Osek J., Weiner M.** 2002. Prevalence of *cdt-III* gene encoding cytolethal distending toxin (CDT) among *Escherichia coli* strains isolated from pigs with diarrhea. Bull. Vet. Inst. Pulawy 47, 17-22.
- 31.- Rodríguez A. G.** 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica. México; 44:464-475.
- 32.- Scott D. A., Kaper J. B.** 1994. Cloning and sequencing of genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending. Infect. Immun. 62: 244-251.
- 33.- Souza V., Rocha M., Sander L., Eguiarte E. L.** 2001. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. Libro virtual editado por UNAM; pp.69-89.

- 34.- Staats J. J., Chengappa M. M., DeBaey C. M., Fickbohm B., Oberst D. R.** 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (est A and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Veterinary Microbiology*, 94: 303-312.
- 35.- Tzipori S., Chow C. W., Powell H. R.** 1988. Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. *J. Clin. Pathol.* 41: 1099-1103.
- 36.- Witthan T. S., Kaye W. J., Wilson R. A.** 1988. Genetic evidence of clone descendent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. *J. Infect Dis*; 157(6): 1124-1133.
- 37.- Valdivia A. G., Cervantes R. R., Soriano B. D., Alba H. F., Montaraz C. J., Tortora P. J.** 2000. Interacción de cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros. *FMVZ. Revista Veterinaria México*, 34 (4) 293-300.
- 38.-Valdivia A. G.** 1995. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de verocitotoxinas (VT) de *Escherichia coli*. Tesis, FESC, UNAM. México.
- 39.- Wieler L.H., Bauerfeind H.** 2002. STEC as a Veterinary Problem. Diagnostics and prophylaxis. *E. coli: Shiga Toxin Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine*, D. Philpott & F. Ebel, Eds. Humana Press. Vol. 73:75-76
- 40.- Zamora J., Reinhardt G., Polette M.** 2000. Rapid detection in diagnosis of toxigenic *Escherichia coli* strains LT and VT producing. *Arch. Met. Vet.*, 32(1): 83-87.